مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ارقام برنج با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با تجمع آهن و روی

شهربانو ابوطالبی*[1]، محمدحسین فتوکیان[2]، مهرشاد زین‌العابدینی[3]

[1]دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[2]دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[3]استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۳۱

چکیده

تعیین میزان تنوع ژنتیکی موجود در ذخایر ژنتیکی برنج، اولین گام در جهت پیشرفت برنامه‌های به‌نژادی برنج می‌باشد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۵۰ رقم برنج با استفاده از ٤٠ نشانگر ریزماهواره مرتبط با آهن و روی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه مولکولی نشان داد که تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر جایگاه نشانگری با میانگین ۵/۲۷ آلل از ۲ تا ۱۰ آلل متغیر بود. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی در بین نشانگرها از ۰/۲٤ (RM19675) تا ۰/۸۳ (RM276, RM402) متغیر بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/٦۳ برآورد شد. بیشترین میزان تنوع ژنتیکی و شاخص شانون در نشانگر RM276 مشاهده گردید. در ارزیابی تجزیه ساختار، ارقام به دو زیر جمعیت تقسیم شدند، زیر جمعیت اول شامل ارقام بومی و دوم شامل ارقام اصلاحی و خارجی بودند. در تجزیه واریانس مولکولی، واریانس درون جمعیتی بیشتر از واریانس بین جمعیتی بوده و حداقل فاصله ژنتیکی بین ارقام اصلاحی و خارجی و حداکثر آن بین ارقام بومی و خارجی مشاهده شد. براساس تجزیه خوشه‌ای نیز ارقام بومی در گروه مجزایی نسبت به سایر ارقام قرار گرفتند. این نتایج می‌تواند جهت طراحی برنامه‌های به‌نژادی آهن و روی دانه و گسترش پایه‌های ژنتیکی ارقام برنج استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: *تجزیه خوشه‌ای، تجزیه ساختار جمعیت، شاخص شانون، محتوای اطلاعات چندشکلی.*

* نویسنده مسئول: شهربانو ابوطالبی تلفن: ۰۹۱۳۹۰۸۷۳۶۰ Email: abootalebi5585@gmail.com

مقدمه

برنج غذای اصلی بیش از نیمی از مردم دنیا را تأمین می‌کند. به منظور تأمین منابع غذایی برای جمعیت روزافزون دنیا، تولید برنج تا سال ۲۰۲۵ باید به دو برابر افزایش یابد (Yashitola *et al.*, 2002). حدود سی سال قبل سوء تغذیه فقط مفهومی معادل کمبود دریافت پروتئین و انرژی داشت، اما امروزه گستره وسیعی از کمبود ریزمغذی‌ها را نیز شامل می‌شود (Cole *et al.*, 2010). حدود یک سوم جمعیت جهان و عمدتاً در کشورهای در حال توسعه، به شدت تحت تأثیر کمبود ریزمغذی‌های کلیدی مانند آهن و روی می‌باشند (Ghandilyan *et al.*, 2006). امروزه تمرکز بر روی غنی‌سازی محصولات زراعی[1] از نظر این ریزمغذی‌ها به واسطه دستورزی‌های ژنتیکی و اصلاح نباتات به عنوان یکی از بهترین راه‌کارها مدنظر می‌باشد. برنامه‌های اصلاح نباتات در غنی‌سازی محصولات زراعی از قبیل گندم و برنج نیازمند بهره‌گیری از تنوع ژنتیکی موجود و غربال کردن ژرم پلاسم، واریته‌ها و لاین‌های منتخب برای استفاده به عنوان والدین دهنده است (Stangoulis, 2010). در سال‌های اخیر به علت استفاده از ارقام اصلاح شده و یکنواختی کشت، تنوع ژنتیکی انواع مختلف گیاهان در معرض خطر قرار گرفته است. بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌های گیاهی جهت حفظ و نگهداری تنوع در بانک‌های ژن و ژرم‌پلاسم و برنامه‌ریزی به‌نژادی اهمیت فراوانی دارد (Mohammadi *et al.*, 2003; Omidbakhsh Fard, 2005). نشانگرهای متداول مورد استفاده برای بررسی تنوع مولکولی و فاصله ژنتیکی شامل RFLP[2]، RAPD[3]، AFLP[4]، Microsatellites، SNPs[5] و ... می‌باشد (Mburu and Hanotte, 2005). در حال حاضر نشانگرهای ریزماهواره به دلیل پوشش مناسب ژنومی و تکرارپذیری بالا یکی از بهترین و کامل‌ترین ابزارهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی به شمار می‌آیند. ریزماهواره‌ها واحدهای تکرار شونده ۱ تا ٦ نوکلئوتیدی هستند که در ژنوم بیشتر پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها وجود دارند (Zane *et al.*, 2002). این توالی‌ها عموماً از چندشکلی بالایی برخوردارند و در نواحی کدکننده و غیرکدکننده ژنوم موجودات مختلف وجود دارند (Zane *et al.*, 2002; Karp *et al.*, 1997). در پژوهشی که با استفاده از ۲۵ نشانگر ریزماهواره به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳ رقم برنج ایرانی و ۱۲ رقم برنج وارداتی صورت گرفت، در مجموع ١٦٤ آلل شناسایی شد. بیشترین تعداد آلل مربوط به جایگاه RM70 با تعداد ۱۰ آلل و کمترین تعداد آلل در جایگاه RM184 با تعداد ۲ آلل بود (Noori *et al.*, 2004). در مطالعه دیگری که روی تنوع ژنتیکی

[1] Bio fortification

[2] Restriction Fragment Lengh Polmorphism
[3] Randomly Amplified Polymorphic DNA
[4] Amplified Fragment Lengh Polmorphism
[5] Single Nucleotide Polymorphism

٤١ رقم برنج با استفاده از ۳۰ نشانگر انجام گرفت تعداد ١٠٤ آلل در کل مشاهده شد و تعداد آلل تولید شده توسط هر نشانگر بین ۲ تا ٦ متغیر بود (Rabbani *et al*., 2010). هدف از این پژوهش استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با تجمع آهن و روی به منظور ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت و نیز گروه‌بندی ارقام برنج مورد مطالعه بوده است. انتخاب والدین مناسب براساس نتایج گروه‌بندی و سایر تجزیه و تحلیل‌های این پژوهش می‌تواند گامی مؤثر برای دستیابی به هتروزیس بالاتر در راستای بهبود آهن و روی برنج باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به منظور اجرای این پژوهش یک مجموعه شامل ۵۰ رقم برنج از ایستگاه تحقیقات برنج چپرسر تنکابن وابسته به مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شد. این ارقام شامل ٢٦ رقم بومی ایرانی، ۱۵ رقم اصلاح شده ایرانی و ۹ رقم خارجی می‌باشد (جدول ۱). استخراج DNA به روش Safaie *et al*. (2005) از نمونه‌های برگی انجام شد.

جدول ۱- اسامی ارقام مورد بررسی در این تحقیق.

Table 1- The names of evaluated cultivars in this research.

ارقام بومی ایرانی Iranian landrace cultivars	دیلمانی، موسی طارم، هاشمی، قشنگه، حسن مولایی، غریب، قنبرک، رشتی سرد، سنگ‌جو، عنبربو، فریده، آبجی بوجی، علی کاظمی، شاهک، حسنی، چلی، دمسیاه، صدری، شاهپسند، سالاری، چمپابودار، حسنی فومنی، آقایی سیاه، رمضانعلی طارم، دمسرخ، دادرس Deilamani, Mosa tarom, Hashemi, Ghashange, Hasan molaee, Gharib, Ghanbarak, Rashti sard, Sang ju, Anbarbu, Faride, Abjibuji, Ali kazemi, Shahak, Hasani, Cheli, Domsiah, Sadri, Shahpasand, Salari, Champabudar, Hasani fumani, Aghaee seiah, Ramezanali tarom, Domsorkh, Dadras
ارقام اصلاح شده ایرانی Iranian improved cultivars	آمل۳، گیل۳، گیل۱، هزار، نعمت، مهر، فجر، درفک، خزر، سپیدرود، دشت، بجار، ۱۱۱، شماره ۲۹ از محمدی×(آمل ۳ × طارم)، شماره ۲۷ از عسگری طارم × Ch21 Amol3, Gil3, Gil1, Haraz, Neemat, Mehr, Fajr, Dorfak, Khazar, Sepidrud, Dasht, Bojar, 111, 29 number of Mohammadi ×(Amol3× Tarom), 27 number of Asgari× Ch21
ارقام خارجی foreign cultivars	Fuji، IR24، IR30، Onda، Zineb، Norin22، Cantury patna، شماره ۱۳ ایری از ۲۰۷ لاین، شماره ۱۸ ایری از ۲۰۷ لاین Fuji, IR24, IR30, Onda, Zineb, Norin22, Cantury patna, 13 number of IRRI from 207 Lines, 18 number of IRRI from 207 Lines

چهل نشانگر ریزماهواره براساس مطالعات نقشه‌یابی مکان‌های ژنی کنترل کننده تجمع آهن و روی در دانه برنج (Susanto, 2008; Garcia-Oliveira *et al*., 2009; Stangoulis *et al*., 2007; Norton *et al*., 2010; Lu *et al*., 2008) و نیز اطلاعات نقشه ژنتیکی برنج از سایت‌های www.gramene.org و www.agri-trait.dna.affrc.go.jp انتخاب و سفارش آغازگر از شرکت سیناژن صورت گرفت (جدول ٢). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ١٥ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش برای یک نمونه شامل ٢٠ نانوگرم از DNA ژنومی، ٠/٥ میکرولیتر $MgCl_2$ ٥٠ میلی مول، ١/٥ میکرولیتر بافر 10x، ٠/١٨ میکرولیتر dNTPs ١٠ میلی مول، ٠/٤ میکرولیتر از هر یک از دو آغازگر و ٠/١٥ میکرولیتر Taq polymeras (ساخت شرکت سیناژن) بود. برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از دستگاه ترموسایکلر ABI مدل Verit استفاده شد. در ابتدا بعد از گذشت ٣ دقیقه واسرشته سازی اولیه، ٣٥ چرخه به صورت یک دقیقه واسرشتگی در دمای٩٤°C، یک دقیقه اتصال در دماهای ٥٤-٥٨°C و یک دقیقه بسط در ٧٢°C انجام شد و در آخر واکنش با یک مرحله بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در ٧٢°C پایان یافت. محصولات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ژل آگارز متافور ٣ درصد (ساخت شرکت Sigma) تفکیک شدند و رنگ آمیزی و ظهور باندها با استفاده از اتیدیوم بروماید (٠/٥ میکروگرم در میلی لیتر) انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌های ژنوتیپی

امتیازدهی باندها با استفاده از نرم افزار AlphaEase انجام گرفت. میزان اطلاعات چندشکلی[1] که از مهم‌ترین معیارها در شناسایی مناسب‌ترین نشانگر جهت بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشد براساس رابطه (١) (Botstein, 1980)، محاسبه گردید.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} P_i^2 - 2\sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^{n} P_i^2 P_j^2$$

رابطه (١)

در این رابطه Pi و P_j برابر فراوانی آلل‌های i و j در یک مکان ریزماهواره است که برای n آلل بسط داده می‌شود. تنوع ژنی (Nei, 1978) و شاخص تنوع ژنتیکی شانون (Shannon and Weaver, 1949) نیز که از معیارهای دیگری برای مقایسه میزان تنوع ژنتیکی نمونه‌هاست از رابطه‌های (٢) و (٣) بدست آمدند.

$$H_i = 1 - \sum_{j=1}^{n} P_{ij}^2$$

رابطه (٢) در این رابطه P_{ij} فراوانی آلل j برای نشانگر i و n مجموع آلل‌ها است.

$$H = -\sum_{i}^{n} P_i \ln P_i$$

رابطه (٣) در رابطه فوق P_i فراوانی آلل i ام و n تعداد کل آلل‌های مشاهده شده در آن مکان ژنی است. کلیه شاخص‌های ذکر شده با استفاده از نرم افزار Power marker ver 3.25 (Liu and Muse, 2005) برآورد شدند. تجزیه واریانس مولکولی نیز با استفاده از نرم افزار Arlequin ver 3.5 انجام شد (Excoffier

[1] Polymorphic Information Content (PIC)

(*et al*., 2005). همچنین به منظور تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط با استفاده از روش Bayesian و نرم‌افزار Structure 2.3.4 ارزیابی ساختار جمعیت انجام گرفت (Pritchard *et al*., 2000). این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. بین ۱ تا ۱۰ زیرجمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هرکدام از زیرجمعیت‌ها سه تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آللی با ۵۰۰۰۰ تکرار آزمایش یا burn-in و ۵۰۰۰۰ تکرار MCMC[1] استفاده گردید تا منحنی حداکثر درست نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیر جمعیت) یک ماتریس به نام Q_{st} را بدست می‌دهد که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. تعداد واقعی زیرجمعیت براساس روش Evanno و همکاران (۲۰۰۵) تعیین شد. این روش بر آماره ΔK استوار است که شیب تابع احتمالی را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی درآن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب فاصله P Distance به روش Neighbor Net با ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم‌افزار Split Tree ver 4.13.1 بدست آمد (Huson and Bryant, 2006) و توسط آنالیز Bootstrap صحت گروه‌بندی بررسی گردید (Huson *et al*., 1998).

نتایج و بحث

ارزیابی آماره‌های تنوع ژنتیکی

از میان ٤٠ نشانگر مورد بررسی ٣٤ نشانگر چندشکل بودند و در مجموع ۱۷۹ آلل مشاهده شد. تعداد آلل مشاهده شده در هر جایگاه از ۲ تا ۱۰ متغیر بود که به طور متوسط ۵/۲۷ آلل برای هر نشانگر می‌باشد. بیشترین تعداد آلل در آغازگر RM6925 و کمترین تعداد آلل در RM349 و RM28722 مشاهده شد (جدول ۳). همچنین بیشترین تعداد آلل مؤثر در نشانگر RM276 و کمترین آن در RM19675 بدست آمد. بیشترین میزان اطلاعات چندشکلی (۰/۸۳) و نیز تنوع ژنی (۰/۸۵) مربوط به آغازگر RM276 و کمترین میزان اطلاعات چندشکلی (۰/٢٤) و تنوع ژنی (۰/۲۵) مربوط به آغازگر RM19675 بود. میانگین شاخص میزان چندشکلی کل ۰/٦٣ بدست آمد. در ارزیابی فراوانی آللی و چندشکلی ۲۷ نشانگر ریزماهواره مرتبط با کیفیت دانه برنج روی ٤٧ رقم بومی و اصلاح شده و خارجی، RM276 بیشترین تعداد آلل چندشکل، شاخص شانون و میزان چندشکلی را نشان داد (Tabkhkar *et al*., 2011).

[1]Markov Chain Monte Carlo

جدول ٢- مشخصات نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده.

Table 2- Characteristics of used microsatellite markers.

نشانگر Marker	کروموزوم Chromosome	توالی تکراری Repeat Motif	نشانگر Marker	کروموزوم Chromosome	توالی تکراری Repeat Motif
RM259	1	(CT)17	RM234	7	(CT)25
RM243	1	(CT)18	RM137	8	(CT)7
RM81	1	(TCT)10	RM152	8	(GGC)10
RM237	1	(CT)18	RM407	8	(AG)13
RM34	1	(CT)17(TC)2	RM337	8	(CTT)4-19-(CTT)8
RM53	2	(GA)14	RM6925	8	(TTA)30
RM300	2	(GTT)14	RM22253	8	(TA)13
RM6641	2	(GTA)14	RM22254	8	(ATAG)5
RM6931	3	(TTA)32	RM296	9	(GA)10
RM6832	3	(TCT)8	RM257	9	(CT)24
RM349	4	(GA)16	RM215	9	(CT)16
RM1089	5	(AC)33	RM239	10	(AG)5TG(AG)2
RM276	6	(AG)8A3(GA)33	RM21	11	(GA)18
RM402	6	(ATA)7	RM270	12	(GA)13
RM217	6	(CT)20	RM20	12	(ATT)14
RM204	6	(CT)44	RM3331	12	(CT)15
RM7193	6	(ATAG)7	RM235	12	(CT)24
RM8226	6	(AAG)14	RM1999	12	(AT)19
RM19708	6	(TA)14	RM28722	12	(TA)44
RM19675	6	(TA)22	RM17	12	(GA)21

براساس نتایج بدست آمده در این پژوهش، شاخص شانون جمعیت‌های بومی، اصلاحی و خارجی به ترتیب ١/١٢٥، ١/٠٨٨ و ١/٠٢٧ بوده است. بالا بودن شاخص شانون در جمعیت بومی بیانگر وجود تنوع بالا در ارقام بومی می‌باشد.

بررسی واریانس مولکولی و ساختار ژنتیکی جمعیت

به منظور ارزیابی درصد و سهم تنوع ژنتیک درون و بین جمعیتی در سطح مولکولی تجزیه واریانس مولکولی[1] انجام گردید که نتایج در جدول ٤ نشان داده شده است. براساس نتایج تجزیه واریانس، ١٦/٠٣ درصد از تنوع کل به علت تنوع و تمایز بین جمعیت‌ها بود در حالی که ٨٣/٩٧ درصد از تنوع کل به تفاوت درون جمعیت‌ها برمی‌گردد. در مطالعه تنوع ژنتیکی ١١٩ رقم بومی، اصلاحی ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با عطر و طعم برنج، نتایج مشابهی گزارش گردید و در پژوهش مذکور درصد تنوع درون جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌ها بود (Moumeni *et al.*, 2007)؛ که علت آن می‌تواند به خاطر استفاده از ارقام خارجی در برنامه‌های اصلاحی برنج باشد که به دنبال آن افزایش تفاوت‌های آللی در ارقام ایرانی و زیاد شدن واریانس درون جمعیتی را موجب شده است.

[1] Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

جدول ۳- آماره‌های تنوع ژنتیکی نشانگرهای ریزماهواره در ارقام برنج مورد بررسی.

Table 3- Diversity statistic of microsatellite markers in evaluated rice cultivars.

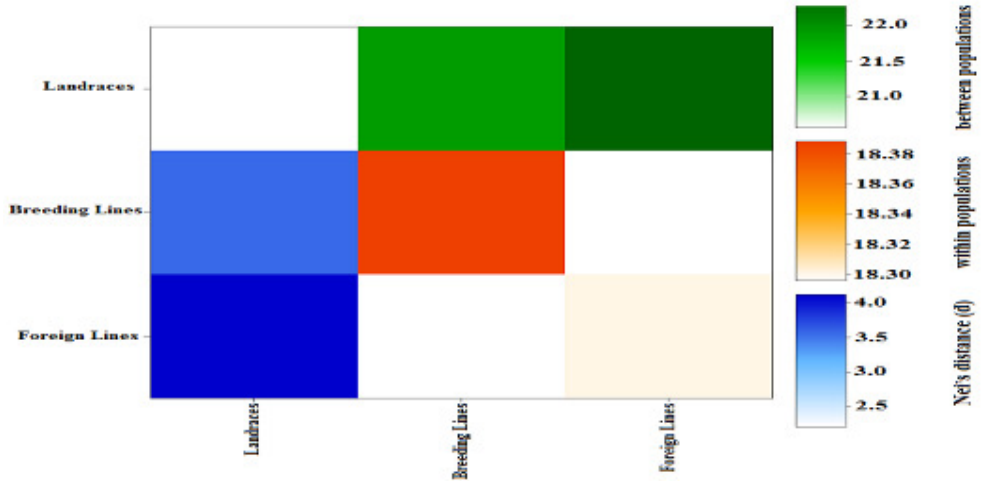
نشانگر Marker	فراوانی آلل غالب Major Allele Frquency	تعداد آلل مشاهده شده Observed Allele number	تعداد آلل مؤثر Effective Allele number	تنوع ژنی gene diversity	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC	شاخص شانون Shannon Index	اندازه آلل(bp) Size of Allele (bp)
RM217	0.42	5	3.23	0.69	0.64	1.32	129-162
RM276	0.28	9	6.51	0.85	0.83	2.03	96-155
RM8226	0.26	6	5.12	0.80	0.78	1.69	205-250
RM402	0.18	7	6.58	0.85	0.83	1.91	116-139
RM7193	0.5	8	3.20	0.69	0.65	1.49	122-186
RM204	0.27	7	4.90	0.80	0.77	1.72	105-168
RM337	0.46	5	3.18	0.69	0.64	1.34	154-457
RM152	0.38	5	3.50	0.71	0.66	1.36	132-159
RM407	0.44	4	3.25	0.69	0.64	1.27	162-176
RM235	0.26	6	5.12	0.80	0.78	1.69	102-137
RM17	0.72	5	1.82	0.45	0.42	0.9	154-184
RM3331	0.31	5	4.45	0.78	0.74	1.55	128-144
RM270	0.5	3	2.6	0.62	0.54	1.02	104-111
RM20	0.32	9	5.59	0.82	0.80	1.92	201-307
RM259	0.46	5	2.93	0.66	0.60	1.22	147-186
RM237	0.64	3	2.09	0.52	0.46	0.89	124-132
RM243	0.38	4	3.64	0.73	0.68	1.34	116-128
RM34	0.52	3	2.59	0.61	0.55	1.02	168-180
RM300	0.42	5	2.72	0.63	0.56	1.14	121-176
RM1089	0.44	7	3.33	0.70	0.65	1.42	212-261
RM234	0.26	6	4.70	0.79	0.75	1.61	132-158
RM215	0.36	3	2.98	0.66	0.59	1.1	138-147
RM257	0.36	8	4.88	0.80	0.77	1.80	121-196
RM21	0.34	7	4.84	0.79	0.77	1.73	128-150
RM6925	0.32	10	5.27	0.81	0.79	1.88	155-287
RM22254	0.58	4	2.30	0.57	0.50	1.00	252-274
RM19708	0.46	3	2.72	0.63	0.56	1.04	316-337
RM28722	0.78	2	1.52	0.34	0.28	0.52	183-200
RM19675	0.86	4	1.34	0.25	0.24	0.54	357-417
RM1999	0.34	5	4.31	0.77	0.73	1.54	170-227
RM6931	0.41	5	2.91	0.66	0.59	1.23	180-233
RM6832	0.46	6	3.62	0.72	0.69	1.53	136-186
RM349	0.76	2	1.57	0.36	0.30	0.55	136-144
RM22253	0.42	3	2.77	0.64	0.56	1.05	306-327
میانگین Mean	0.44	5.27	3.59	0.67	0.63	1.34	

به عنوان مثال رقم هراز از تلاقی دمسیاه×IR8×IR498 و رقم دشت از تلاقی آمل ۱×IR29 حاصل شدند (http://berenjamol.areo.ir). برای بررسی فاصله ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها، فاصله ژنتیکی Nei محاسبه گردید. شاخص تمایز ژنتیک کل جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (F_{st}=۰/۱٦۰۲، P<۰/۰۰۰). مقایسه تفاوت دوبه‌دوی جمعیت‌ها (شکل ۱) نشان داد که بیشترین فاصله ژنتیکی Nei بین ارقام خارجی و بومی وجود دارد (شدت رنگ‌های آبی و سبز) و کمترین فاصله بین ارقام اصلاحی و خارجی می‌باشد، که این می‌تواند به دلیل استفاده از ژنوتیپ‌های خارجی در برنامه‌های اصلاحی باشد.

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر روی جمعیت‌های برنج.

Table 4- Result of AMOVA for populations of rice.

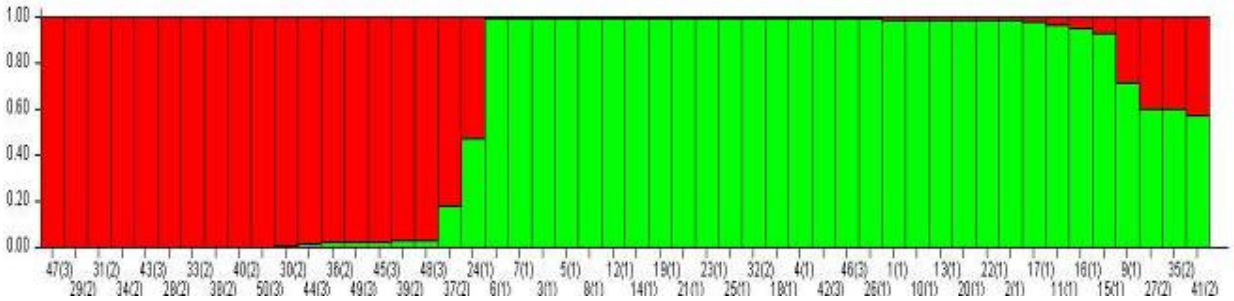
درصد تنوع Percentage of variation	اجزای واریانس Variance component	مجموع مربعات Sum of squares	درجه آزادی df	منابع تغییر S.V.
16.03	1.748	124.513	2	بین جمعیت Between populations
83.97	9.162	888.727	97	درون جمعیت Within population
	10.910	1013.240	99	کل Total



شکل۱ – متوسط تفاوت دو به دوی جمعیت‌ها (براساس نرم افزار Arlequin).

Figure 1- Populations average pairwise difference (Using Arlequin software).

تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به زیرجمعیت‌های مناسب با استفاده از نرم افزار structure انجام گرفت (شکل ۲). با توجه به اینکه مقادیر حداکثر ΔK در K=۲ بدست آمده، بنابراین ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه به احتمال قوی دارای دو زیرجمعیت بوده‌اند. در K=۲ از میان ۲۶ رقم بومی، ۲۰ رقم (۷۶/۹۲ درصد از ارقام بومی) در زیرجمعیت اول قرار گرفتند و ٦ رقم بومی (۲۳/۰۸ درصد) (دادرس، قنبرک، حسنی، حسنی فومنی، چلی و شاهک) علاوه بر زیرجمعیت اول در بخش‌هایی از ژنوم خود با زیرجمعیت دوم مشابهت دارند اما با وجود این، میزان شباهتشان به زیرجمعیت اول بیشتر می‌باشد. اغلب ارقام اصلاحی و خارجی زیر جمعیت دوم را شامل می‌شدند، همچنین ارقام اصلاحی بجار، خزر، گیل۱ و شماره ۲۹ محمدی ترکیبی از هر دو زیرجمعیت را دارا بودند. یکسان شدن زیرجمعیت ارقام اصلاحی با ارقام خارجی و نیز حالت اختلاط آن‌ها با ارقام بومی ایرانی می‌تواند به دلیل وجود زمینه ژنتیکی مشترک بین ارقام و نیز جریان ژنی به ارقام اصلاح شده طی انجام برنامه‌های اصلاحی باشد.



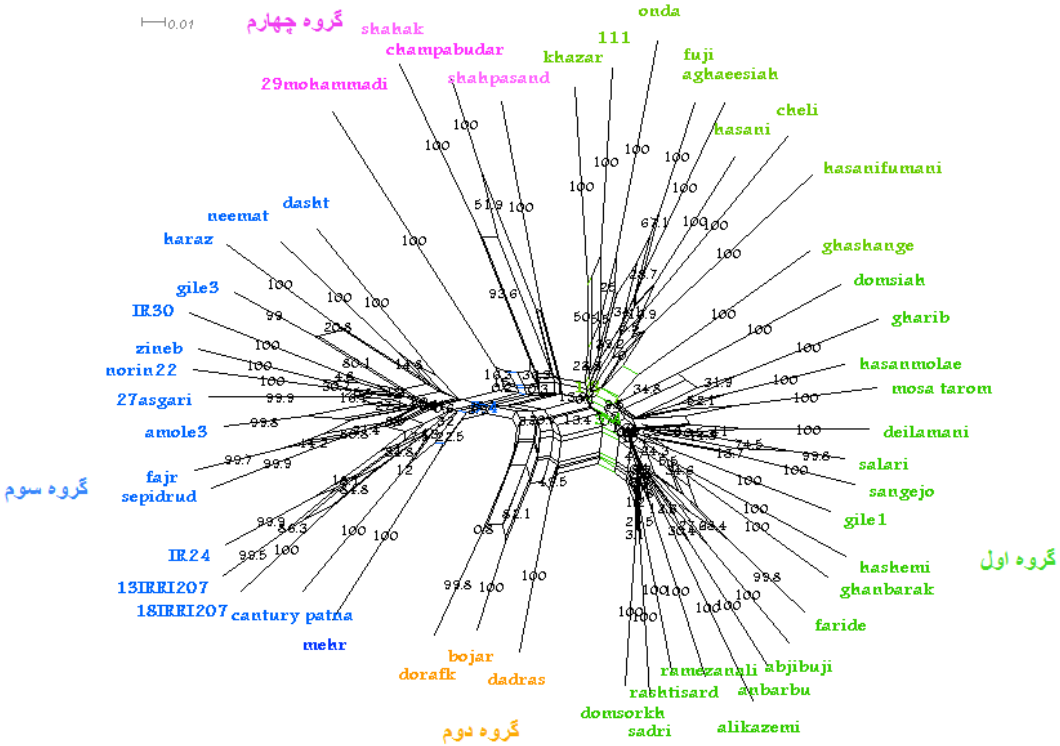
شکل ۲- گروه‌بندی ۵۰ رقم برنج براساس نرم‌افزار Structure.

Figure 2- Classification of 50 rice cultivars using structure software.

تجزیه خوشه‌ای ارقام برنج

براساس نمودار تجزیه خوشه‌ای ارقام در چهار گروه قرار گرفتند که گروه اول بیشترین تعداد ارقام (۲۷ رقم) را شامل می‌شد و اغلب ارقام بومی را به خود اختصاص داده است (شکل ۳). گروه‌های دوم و چهارم هر دو نوع رقم اصلاحی و بومی را دارا بودند و گروه دوم با داشتن ۳ رقم (دادرس، بجار و درفک) کوچکترین گروه می‌باشد. گروه سوم شامل ١٦ رقم بوده که اکثر ارقام خارجی همراه با برخی ارقام اصلاحی (مهر، فجر، هراز، نعمت، دشت، گیل۳، آمل۳ و سپیدرود) در این گروه قرار گرفتند. در تجزیه خوشه‌ای ۱۱۹ رقم بومی، اصلاحی و خارجی با استفاده از نشانگرهای

ریزماهواره، دو جمعیت اصلاحی و خارجی در یک گروه و جمعیت بومی در گروه جداگانه‌ای قرارگرفتند (Moumeni *et al*., 2007). با توجه به معیارهای مختلف محاسبه شده در ارقام مورد مطالعه می‌توان بیان کرد که تنوع ژنتیکی نسبتاً خوبی در هر یک از جمعیت‌های بومی، اصلاحی و خارجی از نظر نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با آهن و روی مورد بررسی وجود دارد و این نشانگرها توانستند تقریباً تمام ارقام بومی را از سایر ارقام به ویژه از ارقام خارجی تفکیک نمایند. این در حالی است که در اکثر نتایج این بررسی، ارقام اصلاح شده ایرانی از ارقام خارجی تفکیک نشدند و به این خاطر پیشنهاد می‌شود با افزایش تعداد نشانگرهای ریزماهواره به تفکیک بهتری از ارقام مورد مطالعه دست یافت. از آنجایی که نشانگرهای مورد مطالعه در این تحقیق با مکان‌های ژنی کنترل کننده آهن و روی دانه پیوسته می‌باشند، این گروه‌بندی برای مکان‌های ژنی مرتبط با این دو ریزمغذی است و می‌توان از تنوع موجود و سایر نتایج ژنوتیپی این پژوهش در جهت اصلاح تجمع آهن و روی دانه ارقام در برنامه‌های به‌نژادی مخصوصاً انتخاب والدین مناسب استفاده نمود.



شکل ۳- گروه‌بندی ارقام برنج با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره براساس الگوریتم Neighbor-Net.

Figure 3- Grouping of rice cultivars using microsatellite markers according to Neighbor- Net algorithm.

منابع

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics 32: 314-331.

Cole CR, Grant FK, Swaby-Ellis ED, Smith JL, Jacques A, Northrop-Clewes CA, Caldwell KL, Pfeiffer CM, Ziegler TR (2010). Zinc and iron deficiency and their interrelations in low-income African American and Hispanic children in Atlanta. The American journal of clinical nutrition 91: 1027-1034.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular ecology 14: 2611–2620.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary bioinformatics online 1: 47.

Garcia-Oliveira AL, Tan L, Fu Y, Sun C (2009). Genetic identification of quantitative trait loci for contents of mineral nutrients in rice grain. Journal of integrative plant biology 51: 84-92.

Ghandilyan A, Vreugdenhil D, Aarts GM (2006). Progress in the genetic understanding of plant iron and zinc nutrition. Pysiological plant arum 126: 407-417.

Huson DH (1998). SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. Bioinformatics. 14: 68-73.

Huson DH, Bryant D (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. Molecular biology and Evolution 23: 254-267.

Karp A, Edwards KJ, Bruford M, Funk S, Vosman B, Morgante M, Seberg O, Kremer A, Boursot P, Arctander P (1997). Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. Nature biotechnology 15: 625-628.

Liu K, Muse SV (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics 21: 2128-2129.

Lu K, Li L, Zheng X, Zhang Z, Mou T, Hu Z (2008). Quantitative trait loci controlling Cu, Ca, Zn, Mn and Fe content in rice grains. Journal of genetics 87: 305-310.

Mburu D, Hanotte O (2005). A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. ILRI, Nairobi, Kenya.

Mohammadi SA, Parsanna BM (2003). Analysis of genetic diversity in crop Plants- Salient statistical tools and considerations. Crop Science 43: 1235-1248.

Moumeni A, Emanykhah F, Maleki Zanjani B, Maleki S (2007). Estimation of genetic diversity of iranian rice cultivars for tight linked markers to aroma. Proc. of 5th National Biotechnology Congress. Nov. 22-25, 2007. Tehran, Iran.

Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

Noori Z, Honarnejad R, Moameni A, Ebadi AA, Allahgholipoor M (2004). Study on genetic diversity and classification of some Iranian & exotic rice germplasm using microsatellite marker. Journal of Agriculture Science 2: 89-99.

Norton GJ, Deacon CM, Xiong L, Huang S, Meharg AA, Price AH (2010). Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. Plant and soil 329: 139-153.

Omidbakhsh Fard MA (2005). Study of genetic diversity in durum wheat using SSR marker. MSc. Thesis. University of Tehran, Iran.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.

Rabbani MA, Masood MS, Shinwari ZK, Yamaguchi-Shinozaki K (2010). Genetic analysis of basmati and non-basmati Pakistani rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using microsatellite markers. Pakistan Journal of Botany 42: 2551-2564.

Safaie N, Alizadeh A, Saidi A, Rahimian H, Adam G (2005). Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat head blight. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 171-189.

Shannon CE, Weaver W (1949). The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

Stangoulis AJ (2010). Technical aspects of zinc and iron analysis in biofortification of the staple food crops, wheat and rice. Proc. of 19th World Congress of Soil Science. August. 1-6, 2010. Brisbane, Australia.

Stangoulis JC, Huynh BL, Welch RM, Choi EY, Graham RD (2007). Quantitative trait loci for phytate in rice grain and their relationship with grain micronutrient content. Euphytica 154: 289-294.

Susanto U (2008). Mapping Of Quantytative Trait Loci For High Iron Ang Zinc Content In Polished Rice (*Oryza Sativa* L.) Grain And Some Agronomic Traits Using Simple Sequence Repeats Markers. Bogor agricultural university, Indonesia.

Tabkhkar N, Rabiei B, Sabouri A (2011). Allelic frequency and polymorphism of microsatellite markers linked to QTLs controlling grain in rice. Iranian Journal of Field Crop Science 42: 495-507.

Yashitola J, Thirumurugan T, Sundaram R, Naseerullah M, Ramesha M, Sarma N, Sonti RV (2002). Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. Crop Science 42: 1369-1373.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular ecology 11: 1-16.

Evaluation of Genetic Diversity and Population Structure of Rice Cultivars using Microsatellite Markers linked to iron and zinc

Abutalebi Sh.*[1], Fotokian M.H.[2], Zeinalabedini M.[3]
[1]MSc Student of Agriculture Biotechnology, College of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran.
[2]Associate Professor, College of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran.
[3]Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

Abstract

Determine genetic diversity in rice genetic resources is the first step toward the development of rice breeding programs. In this study genetic diversity of fifty cultivars of rice were analyzed using forty microsatellite markers linked to iron and zinc loci. Molecular analysis results showed the number of observed alleles per locus markers with average of 5.27 was varied from 2 to 10. The polymorphic information content values of loci was varied from 0.24 (RM19675) to 0.83 (RM276, RM402), respectively. The average of polymorphic information contents was estimated 0.63. RM276 marker was showed the highest genetic diversity and Shannon Index. Cultivars were classified into two sub-population groups according to analysis of population structure including landraces as first group and improved and foreign cultivars as second group. Based on the analysis of molecular variance, intra-population variance was higher than inter-population variance and the minimum and maximum genetic distance was between improved and foreign cultivars and landraces and foreign cultivars, respectively. Based on the cluster analysis, landraces cultivars were separate group than other cultivars. The results of this research could be useful in breeding programs of grain iron and zinc and expanding the genetic bases of rice cultivars.

Keyword : *cluster analysis, population structure analysis, Shannon Index, Polymorphic Information Content.*

* Corresponding Author: Abutalebi Sh. Tel: 09139087360 Email: abootalebi5585@gmail.com