مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

بررسی تنوع ژنتیکی یک کلکسیون بین‌المللی برنج به وسیله نشانگر ریزماهواره

مجتبی جهانی*[1]، قربانعلی نعمت زاده[2]، قاسم محمدی نژاد[3]

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲. استاد اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳. دانشیار اصلاح نباتات، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۸/۰۷

چکیده

در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی برنج مجموعه ای از ۹۵ ژنوتیپ از کشورهای مختلف جمع‌آوری و با ٦۷ نشانگر ریزماهواره که تمامی کروموزوم‌های برنج را پوشش می‌دادند ارزیابی شدند. مجموعا تعداد ۳۰۳ آلل چندشکل با میانگین ٤/٥۲ آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره تکثیر یافت. آماره محتوی اطلاعات چند شکلی دارای میانگین ۰/٥۱ در کل جمعیت بود. حداکثر و حداقل محتوی اطلاعات چند شکل به ترتیب مربوط به نشانگر ریزماهواره RM 10364 (۰/۸۱) و RM 4862 (۰/۱۱) بود. تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضریب فاصله نی ژنوتیپ‌ها را بر مبنای تفاوت‌های ژنتیکی و مبدا جغرافیایی در ٤ گروه اصلی جای داد. تجزیه به مختصات اصلی با در نظر داشتن دو مولفه اول که ۷۱/۱٥ ٪ از تغییرات کل را توجیه می‌کردند نیز نتایج تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد. صحت گروه‌بندی افراد به وسیله تجزیه واریانس مولکولی ارزیابی و تایید شد. این تحقیق با ارزیابی فواصل ژنتیکی بخشی از ژرم پلاسم برنج ایرانی در مقابل ارقام و لاین‌های خارجی نتایج مناسبی برای بهره‌وری از ذخایر توارثی داخلی در برنامه‌های به‌نژادی را فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ***برنج، تنوع ژنتیکی، SSR، تجزیه خوشه ای، تجزیه به مختصات اصلی***

* نویسنده مسئول: مجتبی جهانی تلفن: ۰۳٤۳۳۲٥۷٥۱۰ Email: mojtaba.jahani@hotmail.com

مقدمه

برنج (*Oryza Sativa*) غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان است، جمعیت کشورهای مصرف کننده برنج روز به روز در حال افزایش است و پیش بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ تولید برنج باید تا ٤٠ درصد افزایش پیدا کند (Khush, 2005). بنابراین سرمایه گذاری در زمینه افزایش کمیت و کیفیت برنج از طریق بهنژادی نقش بسیار مؤثری در تامین غذای بشر خواهد داشت. برای اتخاذ تدابیر اصلاحی مناسب، بهنژادگر بایستی از تنوع ژنتیکی صفات گیاه مورد نظر شناخت کافی داشته باشد تا برنامه های بهنژادی خود را با وسعت نظر بیشتری تدوین نماید. تولید ارقام پر محصول و با کیفیت مطلوب، از طریق شناسایی ذخایر ژنتیکی و اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی موجود در جوامع گیاهی و ارقام دارای صفات مطلوب میسر می‌شود. برنج دارای یکی از بزرگترین کلکسیون‌های ذخایر توارثی در جهان است (Jackson and Juggan, 1993). کشور ایران نیز با داشتن ژرم پلاسمی وسیع سهم بسزایی در ذخایر توارثی بین‌المللی برنج دارد. برای استفاده از این سرمایه عظیم، اطلاع از ماهیت و میزان تنوع موجود در ژرم پلاسم، از اهمیت بسیار زیادی در برنامه‌های بهنژادی برخوردار است. والدینی که از لحاظ ژنتیکی متفاوت هستند، هیبریدهایی با هتروزیس بیشتر تولید می‌کنند و احتمال به دست آوردن نتاج تفرق یافته برتر (تفکیک متجاوز) افزایش می‌یابد. ارزیابی و طبقه بندی ذخایر توارثی همچنین می‌تواند برای شناسایی نمونه‌های تکراری و آسان نمودن مدیریت حفظ منابع ژنتیکی استفاده شود. اطلاعات حاصل از بررسی تنوع و فواصل ژنتیکی کلکسیون‌های بین‌المللی برای مدیریت و بهره‌وری ذخایر توارثی برای بهنژادگران ضروری است. تنوع ژنتیکی عموما بر اساس تجزیه و تحلیل شجره‌ای، مورفولوژی، ایزوزایم‌ها و مارکرهای مولکولی مبتنی DNA بررسی می‌شوند (Doebley *et al*., 1988; Smith *et al*., 1997; Smith and Smith, 1992). انواع مختلفی از نشانگرهای مبتنی بر DNA شامل: چند شکلی حاصل از قطعات برش یافته (RFLP)، قطعات DNA تکثیر یافته تصادفی (RAPD)، چندشکلی حاصل از قطعات تکثیر یافته (AFLP) و توالی‌های ساده تکراری (SSR) در مطالعات تنوع ژنتیکی گیاهی به کار گرفته شده است (Tanksley, 1983). در میان نشانگرهای مبتنی بر DNA توالی‌های ساده تکراری (ریزماهواره‌ها) که عموما قطعاتی شامل اجزای تکرار شونده ٦-١ تایی هستند (Rotolski *et al*,.1996) در مطالعات انگشت نگاری DNA، تنوع ژنتیکی، تشخیص ارقام و نقشه یابی ژنتیکی به علت طبیعت چند آللی، تکرار پذیری، الگوی همبارزی، فراوانی چندشکلی و پوشش ژنومی مناسب به وفور در مطالعات تنوع ژنتیکی برنج به کار گرفته می‌شوند (Ashfaq and Khan 2012; Cao *et al*., 2006; Choudhary *et al*., 2013; Huang *et al*., 2010; Abutalebi *et al*., 2014; Zarea *et al*., 2013) تغییرات ژنتیکی در جمعیت‌های

گیاهی می‌تواند به وسیله مکانیسم‌های مختلفی از قبیل جهش، نوترکیبی ژنتیکی، مهاجرت، جریان ژنی، رانده شدن ژنتیکی و گزینش به وجود آیند. مطالعات تنوع ژنتیکی فرآیندی است که تفاوت یا شباهت گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا افراد را با استفاده از روش‌ها یا مدل‌های آماری خاصی بیان می‌کند (Mohammadi and Prasanna, 2003). روش-های آماری چند متغیره نقش مهمی در بررسی تنوع ژنتیکی بر عهده دارند. یکی از این روش-های آماری تجزیه خوشه‌ای است که افراد را بر اساس فواصل در یک تصویر گرافیکی (دندروگرام) از هم جدا و گروه‌بندی می‌کند. در این روش ابتدا فاصله دو به دو تمامی افراد توسط یک سری الگوریتم‌ها مشخص می‌شود و سپس با الگوریتم‌های تجزیه خوشه‌ی دندروگرام رسم می‌شود. از دیگر روش‌های آماری چند متغیره برای بررسی تنوع ژنتیکی تجزیه به مختصات اصلی است که با ارئه پلات‌های دو و سه بعدی روابط ژنتیکی میان افراد مورد بررسی را با توجه به اطلاعات نشانگرهای مولکولی آشکار می‌کند. چنین روش‌های اساس مطالعه بسیاری از محققین برای بررسی تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی گیاهان بوده است: (Jin *et al*., 2010) ٤١٦ ژنوتیپ برنج که شامل ارقام بومی، لاین‌های اصلاحی و کولتیوارهای برنج بود را به وسیله ۱۰۰ نشانگر ریزماهواره با روش ساختار شناسی به ۷ زیر جامعه تقسیم کردند. در حالی‌که در مطالعه (Yan *et al*., 2009) در بررسی تنوع ژنتیکی ۹۰ ژنوتیپ برنج بر پایه ۱۰۸ نشانگر ریز ماهواره و یک نشانگر Indel افراد در تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضریب فاصله Rogers و روش UPGMA به سه خوشه اصلی تقسیم شدند. همچنین در این مطالعه تجزیه به مولفه‌های اصلی با توجیه حدود ۷۰٪ از تغییرات توسط دو مولفه اول نیز نتایج تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد و ژنوتیپ‌ها را به سه گروه اصلی تقسیم بندی کرد. در مطالعه دیگری (Choudhary *et al*., 2013) تعداد۱۰۰ ژنوتیپ برنج را به وسیله ۵۲ نشانگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار دادند. مجموعا ١٨٤ آلل با میانگین ٣/٦٣ آلل در هر لوکوس گزارش شد. تجزیه خوشه‌ای ۱۰۰ ژنوتیپ برنج را به چهار گروه متمایز تقسیم کرد. (Zhang *et al*., 2011) از ٢٧٤ نشانگر ریزماهواره برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۱۵۰ ژنوتیپ برنج استفاده کردند و در بررسی تنوع ژنتیکی دو گروه اصلی را گزارش کردند. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی به وسیله الگوریتم‌های فاصله محور و همچنین تجزیه به مولفه‌های اصلی به منظور بررسی روابط ژنتیکی و فواصل ارقام و ژنوتیپ‌های بومی ایرانی در یک کلکسیون بین‌المللی ژنوتیپ‌های برنج می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل مجموعه ای از ۹۵ ژنوتیپ از کشورهای ایران، هند، ایتالیا، فیلیپین، ویتنام و چین بود (جدول ۱).

جدول ۱- نام و مبدا ژنوتیپ‌های ارزیابی شده.

Table 1- Name and origin of evaluated genotypes.

شماره Number	نام Name	مبدا Origin	شماره Number	نام Name	مبدا Origin	شماره Number	نام Name	مبدا Origin
1	سنگ جو SANGE JO	ایران IRAN	33	کریپتو CRIPTO	ایتالیا ITALY	65	IR 84677-132-2-B	فیلیپین Philippines
2	ماری 305 MARI 305	-	34	گرده GERDEH	ایران IRAN	66	IR 84678-25-5-B	فیلیپین Philippines
3	حسن سرایی HASAN SARAI	ایران IRAN	35	دشت DASHT	ایران IRAN	67	HHZ 5-SAL9-Y3-Y1	فیلیپین Philippines
4	اهلمی طارم EHLAMI TAROM	ایران IRAN	36	قائم GHAEM	ایران IRAN	68	HHZ 8-SAL9-DT1-Y1	فیلیپین Philippines
5	شصتک SHASTAL	ایران IRAN	37	آی آر 24 IR24	فیلیپین Philippines	69	HHZ 11-Y6-Y1-Y1	فیلیپین Philippines
6	یوسن USEN	ویتنام Vietnam	38	آی آر 58 IR58	فیلیپین Philippines	70	HHZ 11-SAL6-Y1-Y1	فیلیپین Philippines
7	سی اچ 2 CH 2	هندوستان INDIA	39	آبجی بوجی ABJI BUJI	ایران IRAN	71	HHZ 12-Y4-Y3-Y1	فیلیپین Philippines
8	بینام BINAM	ایران IRAN	40	عنبر بو ANBARBOO	ایران IRAN	72	HHZ 5-SAL10-DT1-DT1	فیلیپین Philippines
9	لوملینو LOMELLINO	ایتالیا ITALY	41	دمسیاه DOMSIAH	ایران IRAN	73	HHZ 5-SAL10-DT2-DT2	فیلیپین Philippines
10	کورالو CORALLO	ایتالیا ITALY	42	آمل ۳ AMOL 3	ایران IRAN	74	HHZ 5-Y3-SAL3-DT1	فیلیپین Philippines
11	حسنی HASANI	ایران IRAN	43	سپید رود SEPIDROD	ایران IRAN	75	HHZ 9-DT 7-SAL2-DT1	فیلیپین Philippines
12	مانجینگ MANJING	چین CHINA	44	IR 83140-B-11-B	فیلیپین Philippines	76	HHZ 11-Y11-Y3-DT1	فیلیپین Philippines
13	فوجی مینوری FUJI MINORI	ایران IRAN	45	IR 83140-B-28-B	فیلیپین Philippines	77	HHZ 17-DT 6-SAL3-DT1	فیلیپین Philippines
14	اوندا ONDA	ایتالیا ITALY	46	IR 83140-B-32-B	فیلیپین Philippines	78	ایری 123 IRRI 123	فیلیپین Philippines
15	رایب RIBE	ایتالیا ITALY	47	IR 83140-B-26-B	فیلیپین Philippines	79	آی آر 64 IR 64	فیلیپین Philippines
16	دولار DULAR	هندوستان INDIA	48	IR 83141-B-17-B	فیلیپین Philippines	80	ایری 132 IRRI 132	فیلیپین Philippines

17	رم ROMEO	ایتالیا ITALY	49	IR 83141-B-18-B	فیلیپین Philippines	81	IR 04L191	فیلیپین Philippines
18	JASMINE 85	ویتنام Vietnam	50	IR 83142-B-19-B	فیلیپین Philippines	82	IR 66946-3R-178-1-1	فیلیپین Philippines
19	آمل۲ AMOL 2	ایران IRAN	51	IR 83142-B-20-B	فیلیپین Philippines	83	زرک ZARAK	ایران IRAN
20	سالاری SALARI	ایران IRAN	52	IR 83142-B-21B	فیلیپین Philippines	84	نماریوران NEMARIVARAN	ایران IRAN
21	پژوهش PAJOUHESH	ایران IRAN	53	IR 83142-B-49-B	فیلیپین Philippines	85	آلم سبز ALAM SABZ	ایران IRAN
22	آی آر 56 IR56	فیلیپین Philippines	54	IR 83142-B-57-B	فیلیپین Philippines	86	کا اچ 23 KH23	-
23	طارم امیری TAROM AMIRI	ایران IRAN	55	IR 83142-B-60-B	فیلیپین Philippines	87	کلا چای زود رس KOLA CHAI ZOODRAS	ایران IRAN
24	رشتی RASHTI	ایران IRAN	56	IR 83142-B-61-B	فیلیپین Philippines	88	خزر KHAZAR	ایران IRAN
25	غریب GHARIB	ایران IRAN	57	IR 83142-B-79-B	فیلیپین Philippines	89	شاهک SHAHAK	ایران IRAN
26	آی آر 50 IR50	فیلیپین Philippines	58	IR 83142-B-7-B-B	فیلیپین Philippines	90	سردک SARDAK	ایران IRAN
27	صدری SADRI	ایران IRAN	59	IR 83142-B-8-B-B	فیلیپین Philippines	91	شلتوک هراز SHALTOK HARAZ	ایران IRAN
28	بالدو BALDO	ایتالیا ITALY	60	IR 84675-7-3-2-B-B	فیلیپین Philippines	92	قاطردم بیریشک GHATERDOM BIRISHK	ایران IRAN
29	آمل ۱ AMOL 1	ایران IRAN	61	IR 84675-25-7-3-B-B	فیلیپین Philippines	93	پردیس PARDIS	ایران IRAN
30	بجار BEJAR	ایران IRAN	62	IR 84675-58-4-1-B-B	فیلیپین Philippines	94	ندا NEDA	ایران IRAN
31	VIALONE NANO	ایتالیا ITALY	63	IR 84677-34-1-B	فیلیپین Philippines	95	جلودار JELODAR	ایران IRAN
32	RINGO	ایتالیا ITALY	64	IR 84677-51-1-B	فیلیپین Philippines			

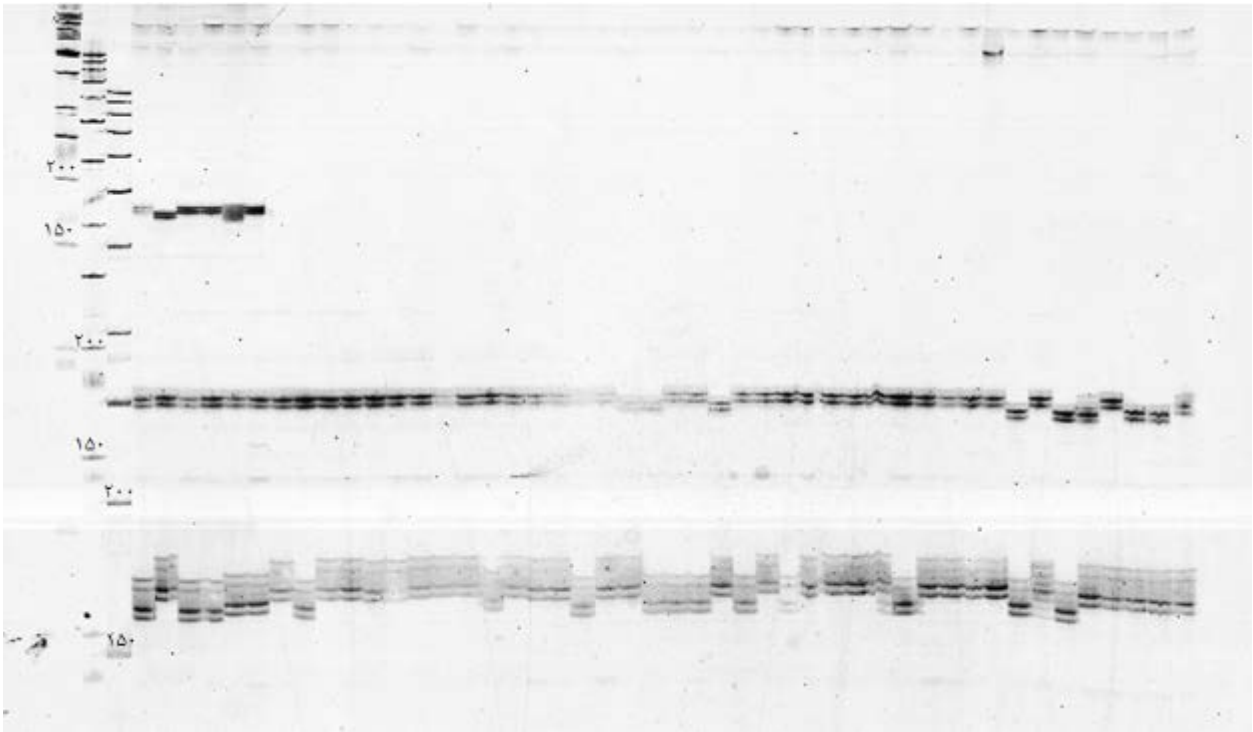
این مجموعه از بانک بذر ملی ایران، موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج[1] و پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان[2] دریافت گردید. ژنوتیپ‌های برنج در شرایط گلخانه‌ای کشت و مقدار ۰/۱ گرم از برگ‌های

[1] International Rice Research Institute (IRRI)

[2] Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT)

جوان هر ژنوتیپ برداشت شد. استخراج DNA از روش تغییر یافته (Dellaporta et al., 1983) که برای گیاه برنج بهینه شده انجام شد. ٦٧ نشانگر ریزماهواره با پوشش هر دوازده کرموزوم برنج (تقریبا ٦ نشانگر در هر کروموزوم) از پایگاه داده Gramene (http://www.gramene.org/) گزینش شدند. واکنش زنجیره پلی‌مراز در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر محتوی ۰/۵ میلی‌مولار از هرکدام از پرایمرهای پیشرو و برگشتی، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، بافر واکنش زنجیره پلی‌مراز با غلظت 1X، ٦۰ نانو گرم DNA ژنومی و یک واحد از آنزیم پلیمراز *Taq* بود. نمونه‌ها در دستگاه ترمال سایکلر Veriti (Applied Biosystems) به مدت ۵ دقیقه در دمای واسرشته سازی ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و سپس وارد ۳۵ چرخه سه گانه واسرشته سازی، اتصال و بسط به شرح ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ٤٥ ثانیه، دمای بهینه شده برای اتصال به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه شدند متعاقبا بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. توالی‌های ساده تکراری تکثیر شده دارای الگوی نواربندی با تفاوت ناچیز هستند از این رو برای تفکیک این محصولات واکنش زنجیره پلی‌مراز نشانگر ریزماهواره قبل از بارگذاری، واسرشته شدند. برای این منظور مقدار ۲ میکرولیتر از بافر بار-گذاری حاوی فرم‌آمید به ۱۲/۵ میکرولیتر محصول PCR اضافه شد. همچنین نشانگر وزنی استاندارد نیز که به آن بافر بارگذاری حاوی فرم-آمید اضافه شده به همراه دیگر نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشته سازی قرار گرفتند و بلافاصله بر روی یخ منتقل شدند، این نمونه‌ها بر روی ژل پلی-اکریل آمید واسرشته کننده ٦ درصد بارگذاری شدند و در نشانگرهای همچون SSR که فقط یک لوکوس در فرآیند PCR تکثیر می‌شود. می‌توان در یک ژل چندین مجموعه محصول PCR را بارگذاری کرد. با این توضیح که بهینه سازی فرایند PCR به خوبی انجام شده بود و رشته های غیر هدف تکثیر نشده باشند.مقدار ۲ میکرولیتر از محصول PCR واسرشته شده در داخل چاهک‌ها بارگذاری شده و الکتروفورز با قدرت ثابت ٦٥ وات راه‌اندازی شد. مدتی پس از سیر نمونه ها در ژل مجموعه دوم محصولات PCR در همان چاهک ها بارگذاری شدند (برای هربار بارگذاری از یک نشانگر استاندارد وزنی مجزا استفاده می‌شود). در تمام طول مدت انجام الکتروفورز دمای ژل روی ۵۰ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شد تا محصولات واکنش زنجیره پلی‌مراز فرم خطی خود را حفظ کنند. آشکار سازی الگوی نواربندی به وسیله رنگ‌آمیزی نیترات نقره طبق روش ابداعی (Ji *et al*., 2007) انجام شد. تصاویر اسکن شده ژل‌ها به وسیله نرم افزار TotalLab امتیازدهی شدند. در شکل ۱ تصویر ژل آکریل آمید نشانگر RM487 با سه بارگذاری و نشانگر استاندارد وزنی مجزا آورده شده است. شاخص-های نشانگری (تعداد آلل، فراوانی آلل غالب،

محتوی اطلاعات چند شکلی) به وسیله نرم افزار-های GenAlEx V 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) و PowerMarker V 3.25 (Liu and Muse, 2005) محاسبه شدند. ضریب فاصله Nei از طریق نرم‌افزار PowerMarker V 3.25 و رسم دندروگرام با الگوریتم UPGMA در نرم‌افزار XLSTAT (Addinsoft, 2012) انجام شد.به منظور بررسی میزان تنوع بین و درون خوشه‌های معرفی شده تجزیه‌واریانس مولکولی (AMOVA) انجام شد. آزمون معنی داری آماره Φ در AMOVA بر اساس ۹۹۹ جایگشت در افراد مربوط به خوشه‌ها انجام شد. تجزیه به مختصات اصلی و رسم بای پلات ها از طریق نرم‌فزار GenAlEx V6.5 (Peakall and Smouse, 2012) انجام شد. مکان برش صحیح دندروگرام با توجه به پراکنش ژنوتیپ ها در بای‌پلات تجزیه به مختصات اصلی انجام و به وسیله تجزیه واریانس مولکولی تایید شد.



شکل ۱- تصویر ژل پلی اکریل آمید مربوط به نشانگر ریزماهواره RM487.

Figure 1- Image of polyacrylamide gel for RM487

نتایج و بحث

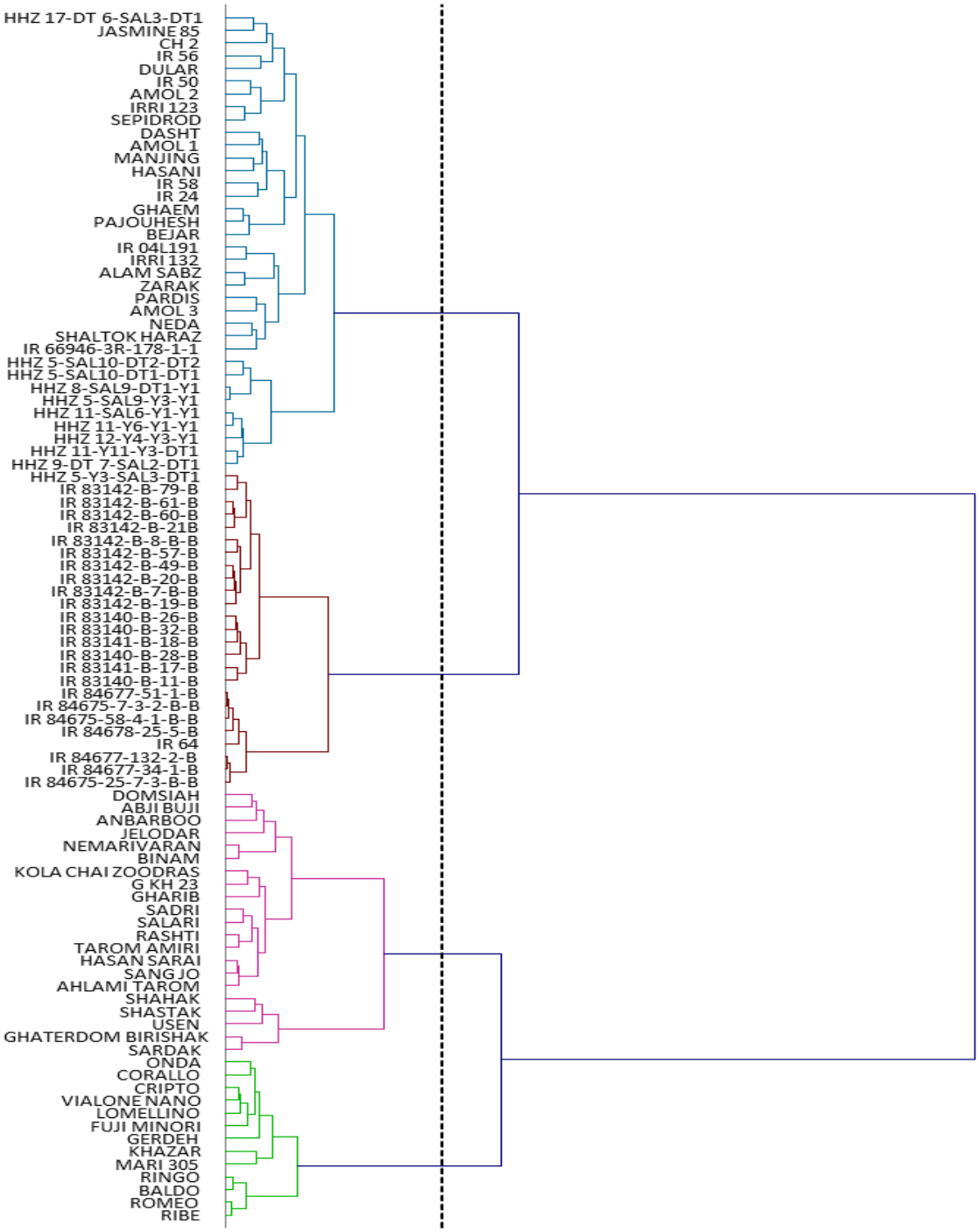
در این مطالعه ٦٧ نشانگر الگوی نواربندی چند شکل داشتند که در این میان بیش‌ترین تعداد آلل مربوط به ریز ماهواره RM 1341 با ۱۰ آلل بود. در مورد اهمیت تعداد آلل های تکثیر شده باید به این نکته اشاره کرد که تعداد آلل های تکثیر شده از مکان ژنی، تأثیر مستقیمی بر میزان هتروزیگوسیتی، فراوانی ژنوتیپی و محتوای اطلاعات چند شکلی آن نشانگر دارد. با افزایش تعداد آلل تکثیر شده در یک مکان، میزان

اطلاع‌رسانی آن مکان برای تعیین تنوع ژنوتیپ ها افزایش می‌یابد. تعداد ۳۰۳ آلل با میانگین ٤/٥٢ آلل در هر مکان در این ٦٧ نشانگر تکثیر یافت. به طوری‌که فراوانی آلل غالب در دامنه ٠/٩٤ (RM4862) تا ٠/٢٦ (RM10346) در جامعه مورد مطالعه متغیر بود (جدول ۲). میزان متوسط تعداد آلل در مقایسه با مطالعات پیشین (Borba *et al*., 2010) و (Agrama *et al*., 2007) کمتر بود که این تفاوت را می‌توان به تفاوت در اندازه جامعه و میزان تنوع بین افراد جامعه مربوط مورد مطالعه مربوط دانست. مقایسه تعداد آلل‌ها و فراوانی آلل غالب در مکان‌های ژنی مختلف نشان داد که عموماً حداکثر فراوانی آلل غالب مربوط به نشانگرهایی بود که دارای تعداد آلل کمتری بودند. میزان محتوی اطلاعات چند شکلی در جامعه مورد بررسی از ٠/١١ تا ٠/٨١ متغیر بود. نشانگر ریز ماهواره RM 10364 واقع در کروموزوم یک برنج بیش‌ترین میزان آماره محتوی اطلاعات چند شکلی را به خود اختصاص داد این در حالی است که نشانگر RM 4862 که به کروموزوم ۱۱ مربوط می‌شود دارای کمترین محتوی اطلاعات چند شکلی بود. به طور کلی میانگین آماره محتوی اطلاعات چند شکلی در جامعه ارزیابی شده ٠/٥١ بود که حاکی از چند شکلی مناسب در تمامی نشانگرها می‌باشد. اطلاعات نشانگری در جدول ۲ آورده شده است. در مطالعه‌ای در مجموعه‌ای از ۲۰ رقم ایرانی که به وسیله ۱۹ نشانگر SSR بررسی شدند محتوی اطلاعات چند شکلی از مقدار ٠/٧ تا ٠/٨٩ متغیر بود و میانگین این آماره به میزان ٠/٨١٧ برآورد شده بود (Amini Nasab *et al*., 2012). به منظور تعیین اندازه فاصله ژنتیکی ۹۵ ژنوتیپ بر اساس اطلاعات ٦٧ نشانگر ریزماهواره، دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای به روش UPGMA ترسیم شد (شکل ۲). تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های برنج این مجموعه را به ٤ گروه اصلی تقسیم‌بندی کرد. خوشه اول شامل ۲۱، خوشه دوم شامل ۱۳ و خوشه سوم و چهارم به ترتیب ٣٦ و ۲۵ ژنوتیپ را در خود جای دادند. خوشه اول حاوی ارقام بومی و محلی ایرانی مانند سنگ جو، حسن سرایی، شصتک، عنبر بو و دمسیاه بود در حالی‌که خوشه دوم ارقام ایتالیایی همچون بالدو، رینگو، کریپتو و اوندا را در خود جای بود. خوشه سوم که بزرگترین خوشه در این مجموعه بود ارقام پر محصول و مدرن ایرانی و همچنین برخی از لاین‌های اصلاحی وارد شده از موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج را در برگرفته بود از این ارقام می‌توان به ارقام پرمحصول ندا، قائم، پردیس حسنی، آمل ۱، آمل ۲ و آمل ۳ اشاره کرد. نهایتا خوشه چهارم لاین‌های اصلاحی با پیشوند IR را شامل بود. نتایج تجزیه به مختصات اصلی به نوعی تأییدی بر نتایج تجزیه خوشه‌ای بود به نحوی که توانست با دو مختصات اول که مقدار ٧١/١٥ ٪ از تغییرات کل را توجیه می‌کردند ژنوتیپ‌ها را در پلات دوبعدی به ٤ گروه متمایز (شکل ۳) تقسیم کردند.

جدول ۲- فهرست نشانگرهای ارزیابی شده.

Table 2- List of evaluated markers.

Marker نشانگر	Chromosome کروموزوم	Size of product (bp) اندازه محصول (bp)	Major allele frequency فراوانی آلل غالب	Number of alleles تعداد آلل	Polymorphism information محتوی اطلاعات چند شکلی	Marker نشانگر	Chromosome کروموزوم	Size of product (bp) اندازه محصول (bp)	Major allele frequency فراوانی آلل غالب	Number of alleles تعداد آلل	Polymorphism information محتوی اطلاعات چند شکلی
RM10346	1	293	0.26	7	0.81	**RM17488**	4	166	0.76	3	0.36
RM10386	1	216	0.27	8	0.8	**RM17492**	4	113	0.69	2	0.33
RM10402	1	287	0.43	5	0.66	**RM241**	4	264	0.58	6	0.58
RM1201	1	189	0.5	4	0.61	**RM401**	4	241	0.37	5	0.72
RM3148	1	159	0.43	6	0.66	**RM6314**	4	169	0.55	4	0.56
RM3746	1	139	0.37	5	0.63	**RM6748**	4	255	0.41	9	0.76
RM414	1	159	0.86	2	0.21	**RM3345**	5	201	0.55	7	0.63
RM443	1	167	0.45	3	0.52	**RM3631**	5	82	0.6	3	0.42
RM466	1	191	0.58	2	0.37	**RM459**	5	437	0.68	4	0.43
RM5	1	194	0.48	5	0.63	**RM3343**	6	146	0.33	9	0.79
RM580	1	145	0.62	9	0.56	**RM340**	6	139	0.58	7	0.57
RM106	2	297	0.62	2	0.36	**RM454**	6	268	0.87	3	0.21
RM112	2	128	0.69	2	0.33	**RM510**	6	193	0.42	4	0.59
RM1358	2	374	0.34	7	0.77	**RM527**	6	106	0.48	4	0.61
RM174	2	268	0.56	2	0.37	**RM11**	7	115	0.31	7	0.78
RM262	2	154	0.33	4	0.66	**RM2878**	7	165	0.6	3	0.4
RM279	2	164	0.38	4	0.62	**RM436**	7	81	0.61	2	0.36
RM4499	2	176	0.85	3	0.24	**RM256**	8	127	0.82	2	0.25
RM497	2	199	0.56	3	0.5	**RM284**	8	87	0.64	4	0.5
RM1164	3	97	0.72	2	0.32	**RM310**	8	176	0.38	7	0.74
RM16	3	148	0.47	4	0.63	**RM447**	8	112	0.55	7	0.61
RM186	3	124	0.48	3	0.42	**RM7027**	8	122	0.65	3	0.38
RM2334	3	155	0.36	8	0.78	**RM8018**	8	199	0.69	7	0.47
RM282	3	136	0.38	3	0.59	**RM288**	9	125	0.57	2	0.37
RM3607	3	254	0.51	3	0.52	**RM566**	9	143	0.35	9	0.78
RM468	3	159	0.56	3	0.5	**RM3123**	10	197	0.89	4	0.19
RM487	3	176	0.73	2	0.32	**RM596**	10	242	0.65	2	0.35
RM6959	3	92	0.33	8	0.74	**RM1341**	11	183	0.32	10	0.74
RM 3471	4	149	0.46	5	0.67	**RM441**	11	185	0.31	6	0.77
RM1359	4	241	0.59	5	0.55	**RM4862**	11	558	0.94	2	0.11
RM17466	4	172	0.93	2	0.13	**RM101**	12	154	0.82	3	0.28
RM17473	4	493	0.77	5	0.36	**RM309**	12	178	0.38	3	0.59
RM17483	4	148	0.85	2	0.22	**RM3739**	12	377	0.69	5	0.45
RM17486	4	194	0.43	7	0.72						



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ۹۵ ژنوتیپ برنج بر اساس اطلاعات ٦٧ نشانگر ریز-ماهواره.

Figure 2- Clustering analysis for 95 rice genotypes base on 67 microsatellite marker.

همانطور که در پلات دوبعدی مشخص است خوشه‌های اول و سوم که هر دو دارای ارقام ایرانی هستند فاصله و تمایزکمتری دارند.

تجزیه واریانس مولکولی برای بررسی تمایز و تفکیک خوشه‌های ناشی از تجزیه خوشه‌ای انجام شد. میزان واریانس درون خوشه‌ها ٦٤ ٪ و بین خوشه‌ها ٣٦ ٪ محاسبه گردید. مقدار آماره (Φ=۰/۳۵۹) و در سطح ۱ ٪ معنی دار بود (جدول ۳) که نشان دهنده تمایز بالا میان خوشه-ها است. در تمامی روش‌های به کار برده شده برای تفکیک مجموعه مورد مطالعه مبدا جغرافیایی ژنوتیپ‌ها در تفکیک آن‌ها دخیل بود و ارقام هر کلاستر عموما از یک کشور بخصوص بودند و یا ویژگی‌های ژنتیکی مشابه‌ای داشتند. اختلاط برخی ارقام ایرانی مدرن از جمله ندا، پژوهش، قائم و پردیس با ارقام خارجی می‌تواند حاکی از این مطلب باشد که ارقام ایرانی مدرن ممکن است حاوی بخشی از ژنوم ارقام خارجی باشند که توسط والدین آنها به این ارقام انتقال یافته است.

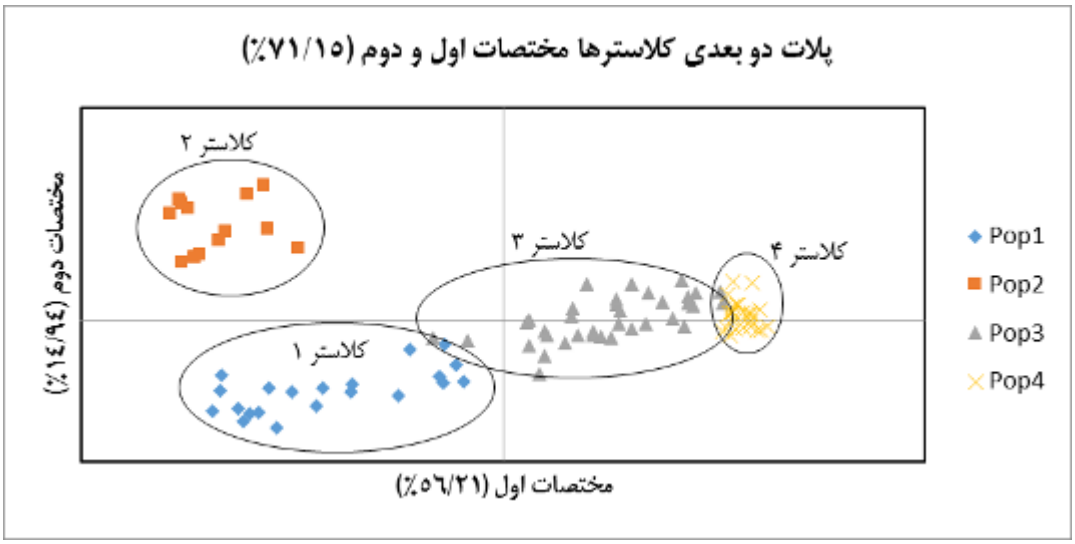
نتیجه گیری

در این تحقیق از نشانگر ریزماهواره به منظور بررسی تنوع ژنتیکی مجموعه‌ای از ژنوتیپ‌های ایرانی، لاین‌های اصلاحی و ارقام ایرانی و خارجی استفاده شد. نشانگرهای مانند RM 10346 و RM 10386 که دارای بیشترین محتوای اطلاعات چند شکلی بودند را می‌توان در مطالعات آتی تنوع ژنتیکی برنج به علت چند شکلی مناسب به کار برد. نتایج بررسی تنوع ژنتیکی به وسیله تجزیه‌های مختلف به خوبی قادر به تفکیک ژنوتیپ‌های برنج بود.

جدول۳- تجزیه واریانس مولکولی بین خوشه‌ها.

Table 3- Analysis of molecular variance between clusters.

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	مجموع مربعات Sum od squares	میانگین مربعات Mean of squares	تخمین واریانس Estimated variance	درصد تغییرات Present of variation	Φ
بین خوشه‌ها Between clusters	3	2285.111	761.704	30.998	36	0/395**
درون خوشه‌ها Within clusters	91	5039.268	55.377	55.377	64	
کل total	94	7324.379		86.375	100	



شکل۳- پلات دو بعدی مختصات اول و دوم در تفکیک خوشه‌ها.

Figure 3- Bi-dimensional plot of two first coordinates for classification of groups

در تمامی روش‌های به کار برده شده برای تفکیک مجموعه مورد مطالعه مبدا جغرافیایی ژنوتیپ‌ها در تفکیک آن‌ها دخیل بود و ارقام هر خوشه عموما از یک کشور بخصوص بودند و یا ویژگی‌های ژنتیکی مشابه‌ای داشتند. ارقام ایتالیایی، ژنوتیپ‌های بومی ایرانی، لاین‌های موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج و ارقام مدرن و پرمحصول در خوشه‌های جداگانه تفکیک شدند. همچنین بر اساس نتایج تحقیق بهره‌گیری از نشانگرهای ریزماهواره و تجزیه خوشه ای به روش UPGMA بر اساس معیار فاصله نی در مطالعات تنوع ژنتیکی کارا بنظر می‌رسند.

منابع

Addinsoft, S. A. R. L. (2012). "XLstat 2012: Leading Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel." *Addinsoft SRL*

Agrama HA, Eizenga GC, Yan W (2007). Association mapping of yield and its components in rice cultivars. Molecular Breeding. 19:341-356.

Amini Nasab R, Ebrahimi M.A, Ebadi A.A, Ghodsi M (2012). Study of Genetic Variation in Iranian Rice (Oryza sativa L.) Varieties by using Molecular Markers Linked with Drought Resistance Genes.Crop Biotechnology. 2:15-25

Abutalebi Sh, Fotokian M.H, Zeinalabedini M (2014). Evaluation of Genetic Diversity and Population Structure of Rice Cultivars using Microsatellite Markers linked to iron and zinc. Journal of Agricultural Biotechnology. 16:1-14

Ashfaq M, Khan AS (2012). Genetic diversity in basmati rice (Oryza sativa L.) germplasm as revealed by microsatellite (SSR) markers. Russian journal of genetics. 48:53-62.

Borba, T. C. D. O., Brondani, R. P. V., Breseghello, F., Coelho, A. S. G., Mendonça, J. A., Rangel, P. H. N., & Brondani, C. (2010). Association mapping for yield and grain quality traits in rice (Oryza sativa L.). Genetics and molecular biology 33: 515-524.

Cao Q, Lu B-R, Xia H, Rong J, Sala F, Spada A, Grassi F (2006). Genetic diversity and origin of weedy rice (Oryza sativa f. spontanea) populations found in north-eastern China revealed by simple sequence repeat (SSR) markers. Annals of botany. 98:1241-1252

Choudhary, G., Ranjitkumar, N., Surapaneni, M., Deborah, D. A., Vipparla, A., Anuradha, G., Siddiq, E. A. & Vemireddy, L. R. (2013). Molecular genetic diversity of major Indian rice cultivars over decadal periods. PloS one 8: e66197.

Dellaporta S, Wood J, Hicks J (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.

Doebley J, Wendel J, Smith JSC, Stuber C, Goodman M (1988). The origin of cornbelt maize: The isozyme evidence. Economic Botany 42:120-131.

Huang M, Xie F-m, Chen L-y, Zhao X-q, Jojee L, Madonna D (2010). Comparative Analysis of Genetic Diversity and Structure in Rice Using ILP and SSR Markers. Rice Science 17: 257-268.

Jackson M, Juggan R (1993). Sharing the diversity of rice to feed the world. Diversity. 9:22-25

Ji YT, Qu CQ, Cao BY (2007). An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. Electrophoresis 28: 1173-1175.

Jin L, Lu Y, Xiao P, Sun M, Corke H, Bao J (2010). Genetic diversity and population structure of a diverse set of rice germplasm for association mapping. Theorethical Applied Genetics 121:475-487.

Khush, G.S. (2005). What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. Plant Molecular Biology 59: 1–6.

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

Mohammadi S, Prasanna B (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. Crop Science 43: 1235-1248.

Peakall R, Smouse PE (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. Bioinformatics 28: 2537-2539.

Rotolski IA, VogeI JM, Morgoante M, PoweII IW, Andre C, Tingey SV (1996). Generating and using DNA markers in plants Nonmammalian genomic analysis: a practical guide:75.

Smith JS, Chin EC, Shu H, Smith OS, Wall SJ, Senior ML, Mitchell SE, Kresovich S, Ziegle J (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (Zea mays L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. Theorethical Applied Genetics 95: 163-173

Smith O, Smith J (1992). Measurement of genetic diversity among maize hybrids-a comparison of isozymic, RFLP, pedigree, and heterosis data. Maydica 37: 53-60.

Tanksley SD (1983) Molecular markers in plant breeding. Plant Molecular Biology Reports 1: 3-8

Yan WG, Li Y, Agrama HA, Luo D, Gao F, Lu X, Ren G (2009). Association mapping of stigma and spikelet characteristics in rice (Oryza sativa L.) Molecular Breeding 24: 277-292.

Zarea R, Mohammadi-Nejad G, Shahsavand-Hassani H (2013). Allelic variation of containing markers in responsible QTL for salinity tolerance (Saltol) at seedling stage in Iranian rice cultivars. Journal of Agricultural Biotechnology. 5:1-14

Zhang, P., Li, J., Li, X., Liu, X., Zhao, X., & Lu, Y. (2011). Population structure and genetic diversity in a rice core collection (Oryza sativa L.) investigated with SSR markers. PloS one 6: e27565.

Genetic diversity analysis in a global panel of rice genotypes by microsatellites

Jahani M.*[1], Nematzadeh Gh.A.[2], Mohammadi-Nejad Gh.[3]

[1]Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
[2]Department of biotechnology and Plant Breeding, College of Agronomy Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran.
[3]Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

Abstract

The study was designed to characterize the genetic diversity of 95 rice genotypes from various countries by 67 microsatellite markers which covered all rice chromosomes. Number of 303 alleles was detected with an average of 4.52 alleles per locus. The average polymorphism information content value across the marker dataset was 0.51, and it was varied from 0.81 (RM 10346) to 0.11 (RM 4862). The cluster analysis based on UPGMA and Nei genetic distance grouped the studied population in four main subgroups with a significant tendency to cluster by geographical origins. Phylogenetic relationships among the genotypes were in agreement with cluster analysis results. Principal co-ordinates analysis (PCoA) with considering two first co-ordinates that explained about 71.15% of the total variation also confirmed cluster analysis results. Accuracy of cluster analysis was assessed by analysis of molecular variance and results revealed significant difference between clusters. The present study by evaluation genetic distances in part of Iranian germplasm against foreign inbreed lines and varieties obtain appropriate results for applying Iranian germplasm in rice breeding projects.

Key words: *Rice, Genetic diversity, SSR, Cluster analysis, Principal Co-ordinates Analysis.*

* Corresponding Author: Jahani M. Tel: 03433257510 Email: mojtaba.jahani@hotmail.com