شماره ۹۳، زمستان ۱۳۹۰

نشریه زراعت

(پژوهش و سازندگی)

آزمون خلـوص ژنتیکی بـذور هیبرید برنج بـا اسـتفاده از نشـانگرهای ریزماهـواره

• **سیدحمیدرضا هاشمی پطرودی**
گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
• **سید علی محمد میـرمحمدی میبدی** (نویسنده مسئول)
گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
• **احمد ارزانی**
گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
• **قربانعلی نعمت زاده**
پژوهشکده برنج و مرکبات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تاریخ‌دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۸
تلفن تماس نویسنده مسئول:۰۹۱۳۱۵۱۵۱۴۳
Email: maibody2000@yahoo.com

چکیده

با بکارگیری تکنولوژی برنج هیبرید در کشور آزمون خلوص ژنتیکی بذر هیبرید جهت کنترل و گواهی بذور تولیدی اجتناب ناپذیر می باشـد. بر همین اسـاس در این تحقیق کارآیی نشـانگرهای ریزماهواره (SSR) جهت انگشـت نگاری و تعیین خلوص ژنتیکی هیبریدهای برنج بررسـی گردید. به این منظور، هشـت هیبرید F۱ برنج به همراه والدین شـان با استفاده از ۱۴ نشانگر ریزماهواره تجزیه و تحلیل گردیدند که ۱۰ نشـانگر باندهای چندشـکل تکرارپذیر تولید نمـودند. آغازگرهای مورد اسـتفاده در مجموع ۲۷ باند تولید نمودند که ۲۳ باند آن (۸۵ درصد) چندشـکل بودند. بدین منوال که تعداد متوسـط باند برای هر آغازگر ۱/۹۲ و برای هر ژنوتیپ ۱/۶۸ بود. خلوص ژنتیکی ارقام هیبرید با توجه به اثر انگشت ریزماهواره ها و آغازگرهای چندشکل تعیین گردید بطوریکه توانسـتند بذور حاصل از خودگشنی و دگرگشنی ناخواسـته (Off type) در هیبریدها را شناسایی نمایند. زمانی که ژنوتیپ های هیبرید با نشـانگر ریزماهواره الکتروفورز گردیدند باندهای اضافی غیروالدینی در افراد هتـروزیگوت مشاهـده گـردید. علاوه بر این در سـه لاین اعاده کننده باروری در مکان آللی RM۲۶۴، آلل های خنثی شناسـایی گردیدند. تجزیه تحلیل کلاستر بر مبنای ضریب اشتراک آللی با استفاده از الگوریتم UPGMA، ۱۶ ژنوتیپ برنج را به سه کلاستر اصلـی دسته بندی نمود که این گروه ها به ترتیـب ۴۳/۷۵ ، ۴۳/۷۵ و ۱۲/۵ درصد از ژنوتیپ ها را در بر داشـتند. نتایج این تحقیق نشـان داد که می توان از نشـانگرهای ریزماهواره، به عنوان یک ابزار مفید و کارا برای DNA پروفایلینگ و تعیین خلوص ارقام هیبرید برنج استفاده نمود.

کلمات کلیدی: برنج، آزمون خلوص ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره، هیبرید F۱

www.SID.ir

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 93 pp: 84-92

Genetic purity testing of rice hybrid seeds using microsatellite markers

By: S.H. Hashemi-Petroudi Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, S. A.M. Mirmohammadi-Maibody, Rice and Citrus Research Institute (Corresponding Author; Tel: +989131515143) A.Arzani, and Ghorbanali Nematzadeh. Rice & Citrus Research Institute, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

Identification and determination of genetic purity of rice hybrid varieties for seed certification and control is an essential issue regarding to apply hybrid rice technology in Iran. Therefore, usefulness of microsatellite markers (SSR) for fingerprinting and genetic purity testing were investigated. Eight F1 rice hybrids and their parental lines were evaluated using 14 microsatellite markers in which 10 markers had reproducible polymorphic bands among genotypes. Totally 27 bands (alleles) produced, average number of band per primers and per genotypes were 1.92 and 1.68, respectively. Genetic purity was tested in respect of microsatellite fingerprint and polymorphic primers which detected off types seeds among F1 hybrids. Extra band(s) was also observed when the F1's SSR products were analyzed. Null alleles were appeared in three restorer lines for RM264 microsatellite locus. Cluster analysis based on shared allelic similarity coefficient, using UPGMA algorithm, grouped the 16 rice genotypes into three main clusters, each containing 43.75%, 43.75% and 12.5% of genotypes. Overall, these results indicated there are reliable tools of microsatellite markers in DNA profiling and seed purity testing in rice varieties, especially hybrids.

Key words: Rice, Genetic purity test, Microsatellite marker, F_1 hybrid

Archive of SID

مقدمه

برنـج غذای اصلـی و منبع تامین کربوهیـدرات کثیری از جمعیت جهان بوده که سـطح وسـیعی از زمین های زیر کشـت در آسـیا را به خود اختصاص داده اسـت، بطوری که بیـش از ۹۰ درصد برنج دنیا در آسـیا تولید و مصرف می گردد (۳۵،۳۴). در ایران نیز برنج غذای اصلی مـردم بعد از گندم بوده که با توجه به رشـد جمعیـت و کمبود تولید داخلـی آن، منجر به واردات سـالیانه این محصول جهت مصرف داخلی می گردد. طبق آمار فائو (FAO) واردات برنج درسـال ۲۰۰۰ میـلادی در ایران ۱/۲ میلیون تن بوده که این رقم در سـال های اخیر به جهت اصلاح و معرفی رقم های جدید به ۰/۹۸ میلیون تن در سـال رسـیده اسـت (۷). توجه به روند کلی افزایش جمعیت حاکی از افزایش مصرف کنندگان مواد غذایی بوده که بر همین اسـاس باید تولید مواد غذایـی نیـز افزایش یابد تـا بتواند جوابگـوی جمعیت در حال رشـد جهان باشـد (۲۲). با توجه به محدودیت های اقلیمـی برای رشـد و توسـعه زمیـن های زیر کشـت، این مقدار غذا باید از زمیـن های موجود و با اسـتفاده از عوامل اگروشـیمیایی کمتر بدسـت آید. یکی از روش های افزایـش عملکـرد ژنتیکی و خـروج از این بحـران اسـتفاده از پدیده هـتروزیس مـی باشـد که از زمان کشـف آن توسـط Jones (۱۳) به عنـوان یک راهکار برای افزایـش برنج مدنظر قرار گرفته اسـت (۲۲). پـس از تولید و فراگیر شـدن برنج هیبرید در چیـن توجه جهانـی به بهـره برداری از قـدرت هیبرید در برنج جلب گردیـد بطـوری که با تولید موفق برنج هیبرید در چـین، دسـت کم در ۱۷ کشور برنامه های اصلاحـی برای تولید برنج هیبرید آغاز گردیده اسـت (۳۱). با توجه به ایـن که لاین های هیـبرید در مقایسـه با لاین هـای برتـر هـر منطقه مـی توانند تا ۳۰ درصد افزایش عملکرد نشان دهـند، نقش لایـن های هیبرید بدیهـی بوده و استفـاده از آن ضـروری مـی نماید.

برنج گیاهی خـودگشـن بوده، که جهـت تولید تجاری هیبریدهای برنج باید از سیسـتم های نرعقیمی اسـتفاده نمـود. روش سـه لاینه که شامل سـه لاین: CMS لاین (A لاین)، لاین نگهـدارنده نرعقیمی (Bلایـن) و لاین اعاده کـننده باروری (Rلاین) می باشـند، اصلی ترین سیسـتم نرعقیمی اسـت که بـرای تولید تجاری بـذر برنـج هیـبرید اسـتـفاده مـی گـردد (۳۲،۳۱،۶). کاربـرد موفق ارقـام هیبرید F1 در برنج در درجه اول مسـتلزم بررسـی تنوع و تشابه ژنتیـکی لاین های برنـج جهت انتخـاب لاین های برتر و در درجه دوم تشـخیص و حفظ خلوص ژنتیکـی لاین های والدی و هیبریدهای حاصل از آنهاست (۲۲). در ایـن میان، تولیـد و ارزیابی هیبریدها حایز اهمیت زیادی اسـت به طـوری که رقمی می تواند تجای شـود که اسـتانداردهای ملی و حتی بین المللی را دارا باشـد (۳۵). از آنجایی که در غلات خودگشـن نظیر برنـج، یکی از چالـش های مهم تولید و تهیه بـذر برنج هیبرید خالص می باشد، سطح بالایی از خلوص ژنتیکی در این گیاه جهـت بهـره برداری از سـطـح مناسـبـی از هتـروزیس ضـروری می باشد. به این جهت که بروز ناخالصی در طی مراحل مختلف تولید بذور هیبرید بعلت پراکندگی دانه گرده غیروالدینی، دگرگرده افشـانی ناخواسـته و اختلاط فیزیکی خصوصـاً اختلاط بذور لاین های A و B (مهمترین منبع ناخالصی) دور

www.SID.ir

از ذهن نمی باشد. برآورد می شود به ازای هر ۱ درصد ناخالصی در بذور هیبرید، مقدار کاهش عملکرد در حدود ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار می باشد (۱۸). Ichii و همکاران (۱۱) گزارش نمودند که مقدار خلوص بذور هیبرید ارائه شده به کشاورز نباید از ۹۶ درصد کمتر باشد در حالی که در گزارش Rajendran و همکاران (۲۵) حداقل خلوص ۹۸ درصد اعلام گردید. طبیعی است که لاین های والدینی مورد استفاده در فرایند هیبرید نیز باید از سطح بالایی از خلوص ژنتیکی(٪۹۹<) برخوردار باشند (۲۹، ۳۵). ارزیابی خلوص بذور هیبرید به طور معمول با استفاده از آزمون GOT[1] (آزمون مورفولوژیکی) صورت می گیرد که بر اساس ارزیابی خصوصیات مورفولوژیک و گلدهی در مرحله بلوغ می باشد (۱۴،۱۲،۲). بسیاری از این صفات چندژنی یا کمی بوده، در نتیجه بروز آنها تحت تاثیر عوامل محیطی تغییر می یابند. ضمن اینکه تعداد صفات مورفولوژیک موجود برای تمایز همه ارقام جدید کافی نمی باشند که نیاز به استفاده از روش سریع تر با کارایی بالاتر و در عین حال هزینه و زمان کمتر ضروری می نماید که انگشت نگاری مولکولی[2] کمک بزرگی در نیل به این هدف می باشند. اصطلاح انگشت نگاری مولکولی بطور کلی به کاربرد توالی خاصی از مولکول DNA جهت شناسایی افراد، ژنوتیپ ها و لاین ها اطلاق می شود. روش های انگشت نگاری مولکولی بهمراه نشانگرهای مورفولوژیکی و فیزیکوشیمیایی کاربرد وسیعی را در ژنوتیپ یابی و تجزیه تحلیل تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی و وحشی پیدا نموده است که می توان به موارد شناسایی ارقام، تعیین حقوق مالکیت معنوی برای ارقام، آزمون خلوص ژنتیکی، بررسی قرابت ژنتیکی، آزمون تمایز یکنواختی پایداری (DUS)[3] اشاره نمود. سازمان بین المللی حمایت از ارقام جدید گیاهی (UPOV)، کمیته روش های مولکولی و بیوشیمیایی را برای بررسی کاربرد نشانگرهای مولکولی در سیستم ثبت رقم تشکیل داده است. این کمیته، از میان نشانگرهای مولکولی مختلف نشانگرهای ریزماهواره را به عنوان بهترین روش موجود برای انگشت نگاری DNA جهت قضاوت در شناسایی و تشخیص ارقام مشتق شده معرفی نمود (۳۰،۲۷). در این تحقیق جهت آزمون خلوص ژنتیکی بذور هیبرید، از میان نشانگرهای مبتنی بر DNA، نشانگر ریزماهواره[4] به علت فراوانی، ماهیت هم بارزی، مکان اختصاصی بودن در ژنوم و توزیع یکنواخت در سراسر آن (۲۸،۲۷،۲۱) برای ارقام هیبرید در دست معرفی انتخاب گردید. ضمن این که در دسترس بودن بیش از ۲۷۴۰ نشانگر ریزماهواره با متوسط تراکم هر ۱۵۷ Kb (کمتر از ۱cM) یک نشانگر SSR[5] در ژنوم برنج، سطح بالایی از تنوع آللی، قدرت جداسازی بالا، کار آسان و قیمت پایین تا حد زیادی استفاده از این نشانگرها را توجیه می نماید (۲۱). هدف از اجرای این تحقیق، ارزیابی هیبریدهای برنج و لاین های والدینی به روش ملکولی به منظور تعیین اثر انگشت و بررسی خلوص ژنتیکی بذور هیبرید با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بوده است.

مواد و روش ها

در این تحقیق از ۱۶ ژنوتیپ شامل سه لاین نرعقیمی سیتوپلاسمی: ندا-A، نعمت-A و IR۵۸۰۲۵A؛ پنج لاین اعاده کننده باروری شامل: IR-۳-۵۴-IR،IR۶۹۷۲۶-۱-۳-۱-۹۳-IR۴۲۶۸۶R،IR۶۲۰۳۷ IR۲۸ ، و SA۴ و هشت لاین هیبرید F۱ شامل: /IR۵۸۰۲۵A -۳-۵۴-A، IR۶۹۷۲۶-ندا-IR-۱-۳-۱-۹۳-IR۴۲۶۸۶R، IR۶۲۰۳۷ /IR-ندا-A،IR۲۸/نعمت-A، SA۴-ندا/A، IR۶۲۰۳۷-ندا-A، IR۶۹۷۲۶-۳-۵۴-IR-A،IR۶۹۷۲۶/نعمت-A، IR۲۸-نعمت/A، نعمت-A استفاده شده، که از موسسه تحقیقات برنج آمل، پژوهشکده برنج و مرکبات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و موسسه تحقیقات بین المللی برنج (IRRI) تهیه گردید. استخراج DNA ژنومی به روش دلاپورتا و همکاران با اندکی تغییر در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه صنعتی اصفهان اجرا گردید (۵). کمیت و کیفیت نمونه های DNA نیز با روش الکتروفورز ژل آگارز تعیین گردید.

در این مطالعه از تعداد ۱۴ آغازگر ریزماهواره برای ارزیابی ژنتیکی استفاده گردید که انتخاب آغازگرها و کسب اطلاعات توالی آنها به ترتیب بر اساس گزارشات Chen و همکاران (۴)، Nandakumr و همکاران (۲۲) و Yashitola و همکاران(۳۵) انجام گرفت. اسامی آغازگرها و مشخصات توالی آنها به تفکیک ارائه شده است (جدول ۱). واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر برای هر نمونه اجرا گردید که عبارت بود از ۴/۴ میکرولیتر آب مقطراستریل، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر واکنش (۱۰X)، ۱/۵میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۵ میلی مولار، ۰/۱۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۲۰ میلی مولار، ۰/۵میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت ۵ میکرومولار، یک واحد تک پلی مراز و ۴ میکرولیتر DNA با غلظت ۴۰ نانوگرم. واکنش زنجیره ای پلی مراز نیز در دستگاه ترموسایکر (Techne LTD, UK, Mode FTGENE۵D) در ۳ چرخه اجرا گردید که چرخه اول از یک سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۲ دقیقه، و چرخه دوم از ۳۶ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۲ دقیقه، و نهایتا چرخه سوم شامل بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. به منظور مشاهده الگوی نواری محصولات تکثیری از ژل آگارز ۲ درصد و ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد استفاده گردید. پس از الکتروفورز رنگ آمیزی ژل به روش اتیدیوم بروماید انجام گرفت و از الگوی نواری بدست آمده عکس برداری گردید. تجزیه و تحلیل آماری این نشانگرها با استفاده از نرم افزار PowerMarker V۳,۲۵ اجرا گردید (۱۶). در تجزیه چند متغیره داده های مولکولی، امتیازبندی داده ها و کدگذاری آلل ها بر مبنای طول قطعات انجام گرفت و به ترتیب شاخص های تعداد آلل، تعداد ژنوتیپ، فراوانی آلل اصلی، تنوع ژنی، مقدار هتروزیگوسیتی و نهایتاً مقدار اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر آغازگر برآورد گردید. جهت محاسبه ماتریس ضرایب تشابه، از میان ضرایب تشابه مختلف با استفاده از آزمون مانتل تست (Mantel، ۱۹۶۷)، ضریب اشتراک آللی[6] با فرمول زیر توسط نرم افزار مربوطه محاسبه گردید.

$$D_{SA} = \frac{1}{m}\sum_{j=1}^{m}\sum_{i=1}^{a_j}\min(p_{ij}, q_{ij})$$

Archive of SID

ijp و ijq به ترتیب فراوانی آلل های i ام در مکان ژنی j ام در جمعیت ها (یا ژنوتیپ های) X و Y می باشد همچنین ia تعداد آلل ها در مکان ژنی j و m تعداد مکان های مورد استفاده می باشد. تجزیه خوشه ای نیز با استفاده از الگوریتم UPGMA اجرا شد. جهت رسم دندروگرام نیز از نرم افزار MEGA ۱/۳ استفاده گردید (۱۵) بطوری که تعداد مطلوب خوشه با استفاده از آزمون Bootstrapping تعیین شد.

نتایج و بحث

چند شکلی در جایگاه های ریزماهواره

بررسی چندشکلی موجود در لاین ها و ارقام هیبرید با استفاده از تعداد ۱۴ آغازگر ریزماهواره، منجر به شناسایی و انتخاب ۱۰ نشانگر چندشکل: RM۱، RM۲۶۳، RM۳۳۷، RM۱۷۱، RM۱۶۴، RM۱۱۰۸، RM۲۰۶، RM۶۳۴۴، RM۱۵۴، RM۲۱۶ گردید که جهت انگشت نگاری و بررسی خلوص ژنتیکی ارقام و لاین های برنج مورد استفاده قرار گرفتند.

در این تحقیق نشانگرهای RM۳۳۷، RM۱۵۴ و RM۲۰۶ در ژنوتیپ های مورد استفاده دارای سه آلل بودند در حالی که دیگر آغازگرهای چندشکل از دو آلل برخوردار بودند. آغازگرهای مورد استفاده در مجموع ۲۷ باند (هر باند به منزله یک آلل) تولید نمودند که ۲۳ باند آن (۸۵ درصد) چندشکل بودند. بدین ترتیب تعداد متوسط باندها برای هر آغازگر ۱/۹۲ و برای هر ژنوتیپ ۱/۶۸ بوده است. طول اندازه قطعات تکثیری در این تحقیق از ۱۲۵ bp برای آغازگرهای RM۱، RM۱۱۰۸، RM۶۳۴۴ تا ۴۵۰bp مربوط به آغازگر RM۳۳۷ متغیر بود. آغازگرهای RM۲۵۸ و RM۴۴۳ برای ارقام مورد استفاده هیچ چندشکلی را بر روی ژل آگارز و بر روی ژل اکریل آمید نشان ندادند. گذشته از این نشانگر RM۹ نیز از الگوی آللی نامشخصی برخوردار بود (جدول ۲).

به ترتیب تعداد آلل، تعداد ژنوتیپ، فراوانی آلل اصلی، تنوع ژنی، مقدار هتروزیگوسیتی و نهایتاً مقدار اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر آغازگر برآورد و ارائه گردید (جدول ۲). بیشترین مقدار اطلاعات چندشکلی با مقدار ۰/۵۲ مربوط به آغازگر RM۱۵۴ و کمترین مقدار با ۰/۱۹ مربوط به آغازگر RM۱۱۰۸ بود و میانگین شاخص چندشکلی ۰/۳۵ بدست آمد. هیبرید IR۵۸۰۲۵A/IR۴۲۶۸۶R که اولین برنج هیبرید در دست معرفی در ایران می باشد بخوبی از بقیه هیبریدها تفکیک گردید و الگوی باندی منحصر به فردی را تولید نمود. تحقیقات زیادی درباره شناسایی و انگشت نگاری گیاهان به ویژه برنج صورت گرفته است به طوری که می توان به تحقیقات Ye-yun و همکاران (۳۶) و Chakravarthi و همکاران (۳) در انگشت نگاری ترکیبات هیبرید برنج با نشانگرهای SSR اشاره نمود.

آزمون خلوص ژنتیکی

آزمون خلوص ژنتیکی هیبریدهای مختلف با توجه به اثر انگشت هر هیبرید با استفاده از یک نشانگر خاص بررسی گردید. به این ترتیب که بطور تصادفی بذور هیبرید مختلف با یک نشانگر چندشکل (چندشکلی بین دو والد) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به عنوان مثال برای بررسی بذور هیبرید IR-۳-۵۴-IR۶۹۷۲۶/ندا-A از نشانگر RM۳۳۷ که دارای چندشکلی بین لاین های IR-۳-۵۴-IR۶۹۷۲۶ و ندا-A بود، استفاده گردید (شکل ۱).

از هشت ژنوتیپ مورد بررسی تنها یک بذر، خارج از تیپ تشخیص داده شد که شبیه والد مادری بود در حالی که بقیه بذور این هیبرید دارای باندهای مشترک از هر دو والد بودند (شکل ۲). Yashitola و همکاران (۳۵)، Ye-yan و همکاران (۳۶)، Nandakumr و همکاران (۲۲) نیز به همین ترتیب با استفاده از چندشکلی ریزماهواره خلوص بذور هیبرید برنج را بررسی کردند. برای ارزیابی هیبرید IR۲۸/ندا-A نیز از یک نشانگر پیوسته به ژن اعاده کننده باروری در والد پدری استفاده گردید بدین ترتیب که با استفاده از نشانگر ریزماهواره RM۱۷۱ که به ژن اعاده کننده باروری Rf۴ در رقم IR۲۸ پیوسته بود (۱) آزمون خلوص ژنتیکی بذور صورت گرفت. در آزمایش مشابه Garg و همکاران (۸) از یک ژن بازگرداننده باروری پیوسته به نشانگر RM۲۵۸ برای آزمون خلوص ژنتیکی بذور برنج هیبرید استفاده کرده و نتیجه گیری نمودند که استفاده از یک ژن Rf پیوسته به نشانگر هم بارز می تواند جایگزین دقیق تر و سریع تر برای آزمون GOT جهت بررسی خلوص بذور هیبرید باشد.

باندهای غیر والدینی

در ژنوتیپ های رقم هیبرید که در مطالعات ملکولی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند باندهای اضافه غیروالدینی در برخی از مکان های نشانگری ریزماهواره مشاهده گردید (شکل های ۱ و ۲). در آزمایش هایی که توسط یه تیان)۳۶(بر روی ارقام برنج صورت گرفته بود وجود این باندها گزارش گردید هر چند که دلیلی برای آن بیان نگردید. این باندهای اضافه می تواند ناشی از تشکیل هترودوپلکس۷بین پ توالی های آللی باشند.

هترودوپلکس ها در واقع مولکول های DNA دو رشته ای تشکیل یافته از دو آلل مختلف می باشند که در اثر پیوند اشتباهی۸ بوجود آمده و از آنجایی که از سرعت حرکت متفاوتی نسبت به همودوپلکس ها برخوردارند بر روی ژل جایگاه متمایزی را به خود اختصاص می دهند (۲۴،۱۷).

مشابه این باندها در نشانگر RAPD در تحقیقات هانت و همکاران بر روی زنبور عسل (۱۰)، Huang و همکاران در هیبریدهای Chrysanthemum (۹)، Wu و همکاران در برنج (۳۳) و Zheng و همکاران در سویا (۳۸) نیز مشاهده گردید. بطور کلی، می توان وجود این باندهای غیروالدینی را بعنوان یک مشخصه کلیدی برای شناسایی افراد هتروزیگوت از هموزیگوت در نظر گرفت.

آلل های خنثی

در این تحقیق نشانگر RM۲۶۴ نتوانست در سه لاین اعاده کننده باروری IR-۱-۳-۱-۹۳-IR، IR۶۲۰۳۷-۳-۵۴-IR۶۹۷۲۶ و SA۴ قطعه ای را تکثیر نماید (شکل ۳) که از آن اصطلاحا تعبیر به آلل های خنثی۹ می گردد. آلل های خنثی ناشی از تغییر در توالی های احاطه کننده SSR می باشند. در اثر حذف (ها) یا جهش (های)

www.SID.ir
Archive of SID

نقطـه ای در مکان اتصال آغازگر به لحاظ نظـری انتظار می رود که از اتصال آغازگـر جلوگیری به عمل آمده و نهایتـاً تکثیری صورت نگیرد (۱۹) یا در برخی از افراد تنها یک آلل تولید گردد (۲۶) در آزمایشـات Yü (۳۷) نیـز یک جفـت آغازگر SSR هیـچ فـرآورده ای را در اکثر لایـن های لوبیا تکثیر ننمودند، آنها نبـود باند تکثیری یک آلل در یک ژنوتیـپ خاص را به تغـییر در توالـی احاطـه کننده ریزماهواره ها که منجـر به ایجاد آلل خنثی مـی گردد، نسبت دادند.

ضمـن اینکه احتمال اختلاف در شـرایط مناسـب PCR بـرای تمام ژنوتیپ ها را نیز منتفی ندانستند.

تجزیه خوشه ای

تجزیه خوشـه ای مربـوط به داده های ریزماهواره بـا توجه به کل آلل (باند) های تولید شـده چندشکل محاسـبه گردید. به این منظور ابتدا ماتریس ضرایب تشابه با استفاده از ضریب اشتراک آللی محاسبه گردید. ضرایب تشـابه محاسبه شـده برای ژنوتیپ های مورد مطالعه نشان داد که ارزش های تشابه در دامنه ۰/۱۱ الی ۱ با متوسط ۰/۶۰۷ قرار داشت (جدول ضرایب تشابه آورده نشده است).

همانطوری که بیان نمودیم نشـانگرهای ریزماهواره نتوانسـتند بین دو لایـن CMS (ندا A و نعمـت A) و در نتیجه هیبریدهـای آنها که از یـک والد پدری بودند تمایز قائل شـوند. رقم ندا-A و نعمت-A لاین های خواهری بوده (۲۳) و از والدین مشـترکی برخوردارند که به دلیل داشـتن زمینه ژنتیکی مشترک نشانگرهای ریزماهواره نتوانستند آنها را از هـم تفکیک نمایند. نتایج مطالعه حاضر با گزارش Nandakumr و همکاران (۲۲) که با استفاده از نشانگر SSR در تحقیقات شان نتوانستند بین لاین های CMS مـورد اسـتفاده تمـایزی قائل شـوند، هماهنگی وجـود دارد. همچنیـن Ye-Yun و همکاران (۳۶) نیز نتوانسـتند در انگشـت نگاری پنج هیبرید برنج، دو لایـن CMS ۰۲۹۳ و ۹۳۱۱ را از هم متمایز نمایند. آنها دلیل این امر را نزدیکـی شـجره این لاین ها بیان نمودند. کمـترین شـباهت نیز (۰/۱۱) به لاین های IR۵۸۰۲۵A و ندا-IR۵۸۰۲۵A ، A و نعمت-A اختـصاص داشت.

در ایـن تحقیـق میانگیـن ضرایب تشـابه در لاین های CMS، اعاده کننـده باروری و هیبریدها بـه ترتیب ۰/۴۰۶ ، ۰/۶۲۱ و ۰/۷۴۸ برآورد گردید. کمترین فاصله ژنتیکی نیز بین لاین های نرعقیم و اعاده کننده نیز مربوط به لاین های ندا-A و نعمتA- با SA۴ با ضریب تشابه ۰/۶ بود در حالی که بیشترین فاصله نیز بین ندا- و لاین های بازگرداننده IR۶۲۰۳۷-۹۳-۱-۳-۱-IR و IR۶۹۷۲۶-۵۴-۳-IR با ضریب تشـابه ۰/۳۳ بـود. تجزیه خوشـه ای داده های ریزماهواره بـا توجه به آزمون Bootstrapping بر اسـاس ضریب تشـابه اشـتراک آللـی محاسبه گردیـد و دندروگـرام مربوطه بـا اسـتفاده از الگـوریتم UPGMA ترسـیم شد (شکل ۴) که در آن ژنوتیپ های برنج به ۳ کلاستر اصلـی دسـتـه بندی گردیدند که این گـروه ها به ترتیـب ۴۳/۷۵ ، ۴۳/۷۵ و ۱۲/۵ درصد از ژنوتیـپ ها را در بر داشـتند. نتاج تجزیه کلاستـر نشان می دهد که برخی از ژنوتیپ ها به واسطه داشتن شباهت بیشتر از نظر جایگاه ژنـی ریزماهـواره ها در یک گروه قرار گرفته اند.

گـروه یـک شـامل لایـن هـای نرعقیـم سیتوپلاسـمـی بـوده (بجز IR۵۸۰۲۵A) که ۱۲/۵ درصد از نمونه ها را در بر می گرفت. گروه دوم دارای بیشـترین درصد از هیبریدها بوده بطوری که تمام هیبریدها (بجـزIR۵۸۰۲۵A/IR۴۲۶۸۶R) در ایـن گـروه قـرار گرفتـند. در نهایـت تمام لاین های اعاده کننده بـه همـراه هیـبرید /IR۵۸۰۲۵A IR۴۲۶۸۶R و لاین نرعقیم IR۵۸۰۲۵A در گروه سـوم جای گرفتند. در این تحقیق نشـانگرهای ریزماهواره نتوانسـتند بین دو لاین ندا A و نعمت A (لاین های خواهری) تمایز قائل شـوند. پیشـنهاد می شـود انگشـت نگاری ارقام برنج با تعداد بیشتری نشانگر انجام گیرد و ترجیحاً جهت پوشش کامل ژنوم (بررسی تنوع مولکولی در سطح ۱۲ کروموزوم برنج) با توجه به مکان اختصاصی بودن نشانگرهای SSR، از هر کروموزوم برنج جهت انگشـت نگاری حداقل یک نشانگر مورد استفاده قرار گیرد. مزیت اصلی نشانگرهای ریزماهواره ماهیت همبارزی آنها بوده که بخوبی امکان بررسـی باندهای والدینی را در نتاج هیبرید F۱ فراهم می نماید که از این قابلیت جهت آزمون خلوص استفاده گردید.

نتایج این بررسـی موید پتانسـیل بالای این نشـانگر در تشخیص بذور خـارج از تیپ در هیبریدهای برنج مورد بررسـی می باشـد که امکان بررسی خلوص بذور را در هر مرحله از رشد فراهم می آورد. از آنجائیکه آزمـون خلوص ژنتیکی در ایـن تحقیق در مقیاس آزمایشـی و تنها با اسـتفاده از ۱۰ ژنوتیپ صورت گرفت، توصیه می شود جهت اجتناب از اشـتباه در برآورد درصد خلوص (اریب)، آزمون خلوص ژنتیکی حداقل بـر روی ۵۰ ژنوتیـپ اجرا گـردد. روی هم رفته نتایج نشـان می دهد که از نشـانگرهای ریزماهواره مـی توان جهت شناسـایـی هیـبریدهای برنج و لاین های والدینـی و همچنین بررسـی و تعیین خلوص ژنتیکی هیبریدهای برنج بهره برد.

از ایـن گذشـته باندهای هترودوپلکـس می توان بعنـوان یک ویژگی منحصربفرد در شناسـایی افراد هیبرید استفاده نمود. نتایج این تحقیق می تواند در برنامـه های کنترل و گواهی بذور هیبرید برنج مدنظر قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسـندگان از زحمات موسسه تحقیقات برنج آمل خصوصاً مهندس محمد الزمان نوری و پژوهشـکده برنج و مرکبات دانشـگاه علوم کشـاورزی و منابع طبیعی سـاری نهایت تشـکر و سپاسـگزاری را ابراز می نمایند.

پاورقی ها

1- Grow Out Test
2- Molecular fingerprinting
3- Distinctness uniformity and stability
4- Microsatellite
5- Simple sequence repeat
6- Shared allele
7- Heteroduplex
8- Mismatch
9- Null allele

Archive of SID

www.SID.ir

منابع مورد استفاده

1- Ahmadikhah, A., Karlov G.I., Nematzadeh G., and Bezdi, K.G. (2007) Inheritance of the fertility restoration and genotyping of rice lines at the restoring fertility (Rf) loci using molecular markers. *Int J Plant Prod.* 1: 13-21.

2- Ballestter, J., and Carmen, M. (1998) Determination of F1 hybrid seed purity in pepper using PCR–based markers. *Euphytica* 103: 223–226.

3- Chakravarthi, B.K. and Naravanei, R. (2006) SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L.). *Afr. J. Bitech.*, PP: 684-688.

4- Chen, X., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, YG. and McCouch, S.R. (1997) Development of microsatellite framework map providing genome wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*. 95: 553-567.

5- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Tickes, J.B. (1983) A plant molecular DNA minipreparation Version II. *Plant Mol Biol Rep*. 1: 19–21.

6- Devanand, P.S., Wan, J., Rangaswamy, M. and Ikehashi, H. (1999) Plant genetic resources: isozyme divergence between maintainers and restorers in hybrid rice breeding programs in India. *Crop Sci*. 39: 831-835.

7- Dorosti, H., Nematzadeh, G., Ghodsi, A.H., Allahgholipour, M., Nouri, M.Z., Nahvi, M., Karbalai, M., Erfani, A.R. and Alinia, F. (2006) IRH1-the first aromatic hybrid rice in Iran. IRRI Notes. 31: 31-32.

8- Garg, A., Singh, A.K., Prabhu, K.V., Mohapatra, T., Tyagi, N.K., Nandakumar, N., Singh, R. and Zaman, F.U. (2006) Utility of a fertility restorer gene linked marker for testing genetic purity of hybrid seeds in rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Sci Tech*. 34: 9-18.

9- Huang, S.C., Tsai, C.C. and Sheu, C.S. (2000) Genetic analysis of Chrysanthemum hybrids based on RAPD molecular markers. *Bot Bull Acad Sin*. 41: 257-262.

10- Hunt, G. J. and Page, J., (1992) Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in honeybee. *Theor. Appl. Genet*. 85: 15-20.

11- Ichii, M., Hong, D.L., Ohara, Y., Zhao, C.M. and Taketa, S. (2003) Characterization of CMS and maintainer lines in indica rice (*Oryza sativa* L.) based on RAPD marker analysis. *Euphytica* 129: 249-252.

12- Jianhua, Z., Mcdonald, M.B.and Sweeney, P.M. (1997) Testing for genetics purity in Petunia and Cyclamen seed using random amplified polymorphic DNA markers. *Hort Sci*. 32: 246-274.

13- Jones, J.W. (1926) Hybrid vigor in rice. *J. Am. Soc. Agron*. 18: 424–428.

14- Komori, T. and Nitta, N. (2004) A simple method to control the seed purity of japonica hybrid rice varieties using PCR-based markers. *Plant Breed.* 123: 549- 553.

15- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 5: 150–163.

16- Liu, K. and Muse, S.V. (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21: 2128–2129.

17- Liu, Z. (2007) Aquaculture genome Technologies. *Ames, Blackwell Publishing* XV+551 pp.

18- Mao C.X., Virmani S.S., Kumar I. (1996) Technological innovations to lower the costs of hybrid rice seed production. In: Virmani SS et al (eds) Advances in hybrid rice technology. Proceedings of Third International Symposium on Hybrid Rice, Directorate of Rice Research, *Hyderabad, India.*

19- Masi, P., Zeuli, P.L. and Donini, P. (2003) Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol Breed*. 11: 303–313.

20- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research,* 27:209-220

21- McCouch, S.R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K.B., Clare, K., Fu, M., Walton, B., Li, R., Maghirang, Z., Xing, X., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom, R., Declerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D. and Stein, L. (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). DNA Res. 9: 199–207.

22- Nandakumr, N., Singh, A., Sharma, K., Mohapara, R.K., Prabhu, T.K.V. and Zaman, F.U. (2004) Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* 136: 257-264.

23- Nematzadeh, G.A., JuharAli, A., Sattari, M., Valizadeh, A., Alinejad, E. and Nouri, M.Z., (2006) Relation between different allogamic associated trait characteristics of the five newly developed cytoplasmic male sterile (CMS) lines in rice. *Central Eur Agric J.* 7: 49-56.

24- Perez, J.A., Maca, N. and Larruga, J.M. (1999) Expanding informativeness of microsatellite motifs through the analysis of heteroduplexes: a case applied to Solanum tuberosum. *Theor Appl Genet.* 99: 481–486.

25- Rajendran N., Gandhimani R., Singh S., Palchamy K. (2007) Development of a DNA marker for distinguishing CMS lines from fertile lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 156:129–

Archive of SID

www.SID.ir

32- Virmani, S.S., Sun, Z.X., Mou, T.M., Jauharali, A. and Mao, C.X. (2003) Two-line hybrid rice breeding manual. Los Bonos, Philippinines, IRRI.

33- Wu, J.Y., Wu, H.K. and Chung, M.C. (2002) Co-dominant RAPD markers closely linked with two morphological genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Bot Bull Acad Sin*. 43: 171-180.

34- Yashitola, J, M., Sundaram, R., Biradar, S. K., Thirumurugan, T., Vishnupriya, M. R., Rajeshwari, R., Viraktamath, B. C., Sarma, N. P. and R. V. Sonti. (2004) Sequence specific PCR marker for distinguishing rice lines on the basis of wild abortive cytoplasm from their cognate maintainer lines. *Crop Sci.* 44: 920- 924.

35- Yashitola, J., Thirumurgan, T., Sundaram, R.M., Naseerullah, M.K., Ramesha, M.S., Sarma, N.P. and Sonti, R.V. (2002) Assessment of purity of rice hybrid using microsatellite and STS markers. *Crop Sci*. 42: 1369-1373.

36- Ye-yun, X., Zhan, Z., Yi-ping, X. and Long-ping, Y. (2005) Identification and purity test of super hybrid rice with SSR molecular markers. *Rice Sci.* 12: 7-12.

37- Yu, K., Park, S.J. and Poysa, V. (1999) Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (Phaseolus and Vigna). Genome 42:27-34.

38- Zheng, C., Chang, R., Qiu, L., Chen, P., Wu, X. and Chen, S. (2003) Identification and characterization of a RAPD/SCAR marker linked to a resistance gene for soybean mosaic virus in soybean. *Euphytica* 132: 199–210.

139.

26- Selkoe, K. A. and Toonen, R. J. (2006) Microsatellite for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Lett*. 9: 615-629.

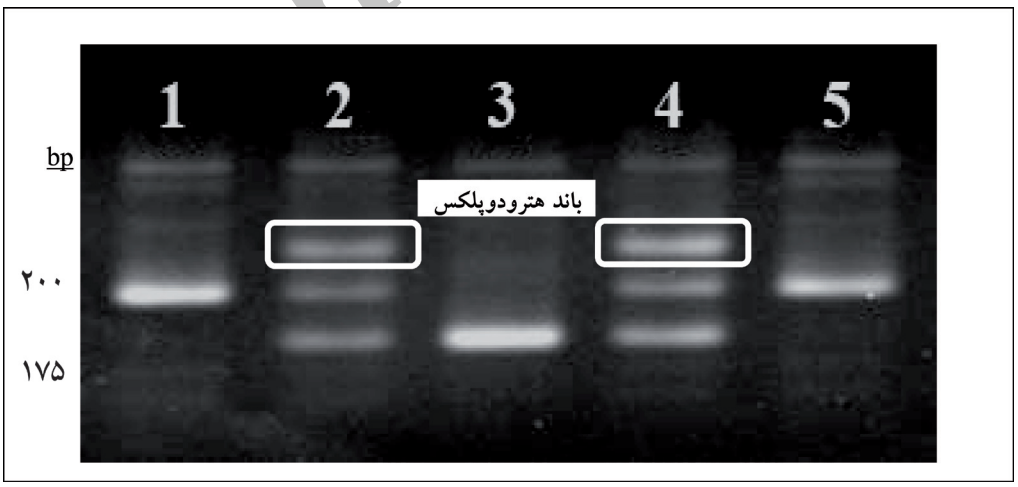
27- Singh, R. K., Sharma, R. K., Singh, A. K. V., Singh, P., Tiwari, S. P. and Mohapatra, T. (2004) Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica* 135: 135–143.

28- Spada, A., Mantegazza, R., Biloni, M., Caporali, E. and Sala, F. (2005) Italian rice varieties: historical date, molecular markers and pedigrees to reveal their genetic relationship. *Plant Breed.* 123:105-111.

29- Sundaram R.M., Naveenkumar B., Biradar S.K., Balachandran S.M., Mishra B., IlyasAhmed M., Viraktamath B.C., Ramesha M.S., Sarma •N.P. (2008) Identifcation of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. *Euphytica*. 163:215–224.

30- UPOV-BMT. (2002) BMT/36/10 Progress report of the 36th session of the technical committee, the technical working parties and working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular, *Geneva*.

31- Virmani, S. S., Mao, C. X., Toledo, R. S., Hossain, M. and Janaiah, A. (2002) Hybrid rice seed production technology and its impact on seed industries and rural employment opportunities in Asia. *IRRI Technical Bull.* PP: 1-13.



شکل ۱- پروفایل اثر انگشت قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از آغازگر b) RM۳۳۷) بر روی ژل آگارز ۲ درصد (M Ladder bp۵۰=). از آغازگر RM۳۳۷ می توان بعنوان یک نشانگر اختصاصی در بررسی خلوص ژنتیکی هیبریدهای IR-۳-۵۴-IR۶۹۷۲۶/نـــدا-A و -IR۶۹۷۲۶ IR-۳-۵۴/نعمت-A استفاده نمود. باندهای هترودوپلکس تشکیل یافته بین توالی های آللـی نیز در ژنوتیپ های هیبرید مشاهده مـی شود. شمـــاره های ۱-۵ نشانـدهنـده پروفایل ارقـام هیـبریـد و لایـن هـا است که به تـرتیـب عبارتنـد از: -۱اندا-IR-۳-۵۴-IR۶۹۷۲۶ -۲ ، A/ نـــدا-IR-۳-۵۴-IR۶۹۷۲۶ -۴ ،IR-۳-۵۴-IR۶۹۷۲۶ -۳ ، A/نعمت--۵ ، Aنعمت-A می باشند.

www.SID.ir
hive of SID

جدول ۱- اسامی و مشخّصات توالی آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده جهت آزمون خلوص ژنتیکی بذور هیبرید برنج

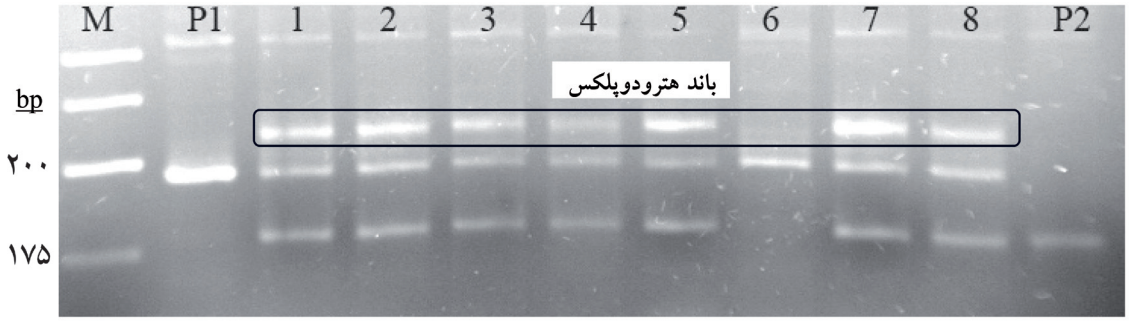
آغازگر	توالی رفت و برگشت	ناحیه کروموزومی	موتیفتکرارشونده
RM۱۷۱	AACGCGAGGACACGTACTTAC ACGAGATACGTACGCCTTTG	۱۰	(GATG)۵
RM۱	GCGAAAACACAATGCAAAAA GCGTTGGTTGGACCTGAC	۱	(AG)۲۶
RM۱۱۰۸	GCTCGCGAATCAATCCAC CTGGATCCTGGACAGACGAG	۱۰	(AG)۱۲
RM۱۵۴	ACCCTCTCCGCCTCGCCTCCTC CTCCTCCTCCTGCGACCGCTCC	۲	(GA)۲۱
RM۱۶۴	TCTTGCCCGTCACTGCAGATATCC GCAGCCCTAATGCTACAATTCTTC	۵	(GT)۱۶TT(GT)۴
RM۳۳۷	GTAGGAAAGGAAGGGCAGAG CGATAGATAGCTAGATGTGGCC	۸	(CTT)۴-۱۹-(CTT)۸
RM۶۳۴۴	ACACGCCATGGATGATGAC TGGCATCATCACTTCCTCAC	۷	(GAA)۸
RM۲۶۳	CCCAGGCTAGCTCATGAACC GCTACGTTTGAGCTACCACG	۲	(CT)۳۴
RM۲۶۴	GTTGCGTCCTACTGCTACTTC GATCCGTGTCGATGATTAGC	۸	(GA)۲۷
RM۲۵۸	TGCTGTATGTAGCTCGCACC TGGCCTTTAAAGCTGTCGC	۱۰	(GA)۲۱(GGA)۳
RM۹	GGTGCCATTGTCGTCCTC ACGGCCCTCATCACCTTC	۱	(GA)۱۵GT(GA)۲
RM۴۴۳	GATGGTTTTCATCGGCTACG AGTCCCAGAATGTCGTTTCG	۱	(GT)۱۰
RM۲۱۶	GCATGGCCGATGGTAAAG TGTATAAAACCACACGGCCA	۱۰	(CT)۱۸
RM۲۰۶	CCCATGCGTTTAACTATTCT CCCATGCGTTTAACTATTCT	۱۱	(CT)۲۱

جدول ۲- آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده در آزمون خلوص ژنتیکی بذور هیبرید برنج

شماره	نام آغازگر	تعداد آلل	تعداد ژنوتیپ	فراوانی آلل اصلی	تنوع ژنی	مقدار هتروزیگوسیتی	مقدار اطلاعات چندشکلی(PIC)
۱	RM۱	۲	۳	۰/۶۵	۰/۴۵	۰/۴۴	۰/۳۵
۲	RM۲۶۳	۲	۳	۰/۶۵	۰/۴۵	۰/۴۴	۰/۳۵
۳	RM۳۳۷	۳	۴	۰/۶۸	۰/۴۷	۰/۱۳	۰/۴۳
۴	RM۱۷۱	۲	۳	۰/۵۳	۰/۴۹	۰/۳۱	۰/۳۷
۵	RM۱۶۴	۲	۳	۰/۷۸	۰/۳۴	۰/۱۹	۰/۲۸
۶	RM۱۱۰۸	۲	۳	۰/۸۷	۰/۲۱	۰/۱۳	۰/۱۹
۷	RM۲۰۶	۳	۵	۰/۵۶	۰/۵۵	۰/۳۱	۰/۴۷
۸	RM۶۳۴۴	۲	۳	۰/۵۷	۰/۴۸	۰/۵۴	۰/۳۷
۹	RM۱۵۴	۳	۶	۰/۵۶	۰/۵۸	۰/۳۱	۰/۵۲
۱۰	RM۲۱۶	۲	۳	۰/۹	۰/۱۶	۰/۰۶۳	۰/۱۶
	میانگین	۲/۳	۳/۶	۰/۶۷	۰/۴۲	۰/۲۹	۰/۳۵

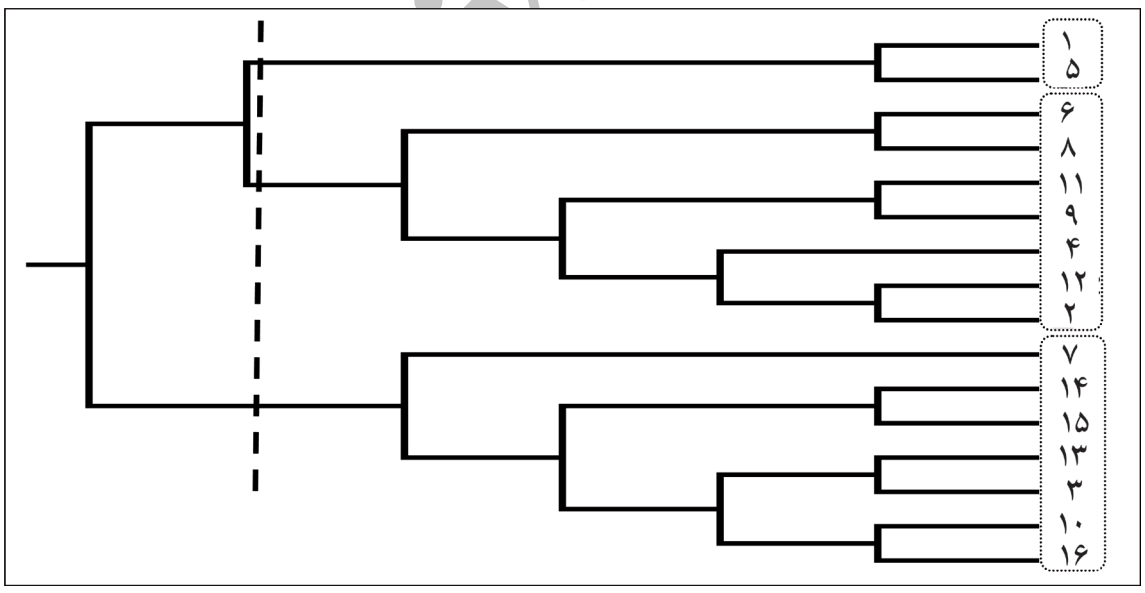
PowerMarker V۳.۲۵

www.SID.ir



شکل ۲- پروفایل ژل قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از آغازگر RM۳۳۷ بر روی ژل آگارز. P۱ و P۲ به ترتیب لاین نرعقیم ندا-A و نربارور IR۶۹۷۲۶-۵۴-۳-IR (والدین) بوده، در حالی که هشت بذر هیبرید تصادفی بین آنها قرار دارد. از هشت ژنوتیپ مورد بررسی تنها یک بذر آلوده شناسایی می گردد (شماره ۶) که شبیه والد مادری است در حالی که در بقیه بذور علاوه بر باندهای هر دو والد، باندهای هترودوپلکس نیز مشاهده مـی گردد که مبین هیبرید بودن بذور است.

شکل ۳ - پروفایل ژل قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از آغازگر RM۲۶۴. در سه لاین اعاده کننده باروری IR-۱-۳-۱-۹۳-۱-۳۷-۶۲۰۳IR، IR۶۹۷۲۶-۵۴-۳-IR، SA۴ قطعـه ای تکثیر نگـردید که احتمالا ناشی از حذف (ها) یا جهش (های) نقطه ای (divergence) در تـوالـی جایگاه اتصال آغازگرهای SSR مـی باشند (آلل های نول).شماره های ۱-۱۵ به ترتیب نشاندهنده -انعمت-۱-۳-۱-۲۸IR-۲، A/ندا--۳-۲۸IR-۴، A/نعمت-۲۸IR-۴-۵۴-۳-IR-ندا-۵، A/ندا--۶-IR۶۹۷۲۶-۵۴-۳-IR-ندا-۶، A/ندا--۷-IR۶۹۷۲۶-۵۴-۳-IR/نعمت--۹-IR۶۹۷۲۶-۵۴-۳-IR، ۸-IR۶۹۷۲۶-۵۴-۳-IR نعمـت-۱-۳-۱-۹۳-۱-۳۷-۶۲۰۳IR-۱۰، A/نعمـت--۳-۱-۹۳-۱-۳۷-۶۲۰۳IR-۱۲، ۱-۳-۱-۹۳-۱-۳۷-۶۲۰۳IR-۱۱، A/ندا--۱-IR-۱۳، ندا-SA۴-۱۴، A/ندا-A و SA۴-۱۵ می باشند.



شکل -۴ گروهبندی لاین های هیبرید و والدین شان با استفاده از روش تجزیه خوشه ای بر اساس ضریب تشابه اشتراک آللی و االگوریتم UPGMA. شماره های ۱-۱۶ نشانـدهنـده ارقـام هیـبریـد و لایـن هـای مـورد استـفاده بـوده که به تـرتیـب عبارتنـداز -۱انعمـت-۲-IR۲۸ ، A/نعمت-۳-IR۲۸، A/ندا--۴-IR۲۸، A/نـــدا-۵، A/ندا-IR-۳-۵۴-۶-IR۶۹۷۲۶، A/ندا-IR-۳-۵۴-۸-IR۶۹۷۲۶، A/نعمت--۹-IR۶۲۰۳۷، A/نعمت-IR-۱-۳-۱-۹۳/نعمـت-IR-۱-۳-۱-۹۳-۱-۳-۱-IR۶۲۰۳۷، ۱۱-IR۶۲۰۳۷-۹۳-۱-۳-۱-IR، ۱۰- IR۶۲۰۳۷-۹۳-۱-۳-۱-IR، A/ندا-SA۴-۱۲، A/ندا-IR۵۸۰۲۵A-۱۳، SA۴-۱۴- IR۵۸۰۲۵A/IR۴۲۶۸۶R، ۱۶- IR۴۲۶۸۶R-۱۵ می باشند.

www.SID.ir