



بررسی تنوع ژنتیکی یک کلکسیون بین‌المللی برنج به وسیله نشانگر ریزماهواره

مجتبی جهانی^{۱*}، قربانعلی نعمت زاده^۲، قاسم محمدی نژاد^۳

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: ۱۳۹۴/۰۸/۰۷

چکیده

در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی برنج مجموعه ای از ۹۵ ژنوتیپ از کشورهای مختلف جمع‌آوری و با ۶۷ نشانگر ریزماهواره که تمامی کروموزوم‌های برنج را پوشش می‌دادند ارزیابی شدند. مجموعاً تعداد ۳۰۳ آلل چندشکل با میانگین ۴/۵۲ آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره تکثیر یافت. آماره محتوی اطلاعات چند شکلی دارای میانگین ۰/۵۱ 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 ۴ گروه اصلی جای داد. تجزیه به مختصات اصلی با در نظر داشتن دو مولفه اول که ۷۱/۱۵٪ 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 پلاسما 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 خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی

مقدمه

ارزیابی و طبقه بندی ذخایر توارثی همچنين می-تواند 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 عموماً بر اساس تجزیه و تحلیل شجره‌ای، مورفولوژی، ایزوزایم‌ها و مارکرهای مولکولی مبتنی بر DNA بررسی می‌شوند (Doebly 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)، چندشکلی DNA تکثیر یافته تصادفی (RAPD)، چندشکلی حاصل از قطعات تکثیر یافته (AFLP) و توالی-های ساده تکراری (SSR) در مطالعات تنوع ژنتیکی گیاهی به کار گرفته شده است (Tanksley, 1983). در میان نشانگرهای مبتنی بر DNA توالی‌های ساده تکراری (ریزماهوره‌ها) که عموماً قطعاتی شامل اجزای تکرار شونده ۶-۱ تایی هستند (Rotolski et al., 1996) در مطالعات انگشت نگاری DNA، تنوع ژنتیکی، تشخیص ارقام و نقشه یابی ژنتیکی به علت طبیعت چند آلی، تکرار پذیری، الگوی همبارزی، فراوانی چندشکلی و پوشش ژنومی مناسب به وفور در مطالعات تنوع ژنتیکی برنج به کار گرفته می-شوند (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

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 ۴۰ 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 نتایج تفرق یافته برتر (تفکیک متجاوز) افزایش می‌یابد.

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 توجه 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) تعداد ۱۰۰ ژنوتیپ برنج را به وسیله ۵۲ نشانگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار دادند. مجموعاً ۱۸۴ آلل با میانگین ۳/۶۳ آلل در هر لوکوس گزارش شد. تجزیه خوشه‌ای ۱۰۰ ژنوتیپ برنج را به چهار گروه متمایز تقسیم کرد. (Zhang *et al.*, 2011) از ۲۷۴ 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).

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). روش‌های آماری چند متغیره نقش مهمی در بررسی تنوع ژنتیکی بر عهده دارند. یکی از این روش‌های 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 خوشه‌ای 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) ۴۱۶ 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 حالی که در مطالعه (Yan *et al.*, 2009) در بررسی تنوع ژنتیکی ۹۰ ژنوتیپ برنج بر پایه ۱۰۸ نشانگر ریز ماهواره و

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	هندو 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 3 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	هندو INDIA	48	IR 83141-B-17-B	فیلیپین Philippines	80	ایری 132 IRRI 132	فیلیپین Philippines

جهانی و همکاران، ۱۳۹۵

17	م ROMEO	ایتالیا ITAL Y	49	IR 83141-B-18-B	فیلیپین Philip pines	81	IR 04L191	فیلیپین Philipp ines
18	JASMINE 85	ویتنام Vietna m	50	IR 83142-B-19-B	فیلیپین Philip pines	82	IR 66946-3R-178-1-1	فیلیپین Philipp ines
19	آمل ۲ AMOL 2	ایران IRAN	51	IR 83142-B-20-B	فیلیپین Philip pines	83	زرک ZARAK	ایران IRAN
20	سالاری SALARI	ایران IRAN	52	IR 83142-B-21B	فیلیپین Philip pines	84	نماروران NEMARIVARAN	ایران IRAN
21	پژوهش PAJOUHESH	ایران IRAN	53	IR 83142-B-49-B	فیلیپین Philip pines	85	آلم سبز ALAM SABZ	ایران IRAN
22	آی آر 56 IR56	فیلیپین Philip pines	54	IR 83142-B-57-B	فیلیپین Philip pines	86	کا اچ 23 KH23	-
23	طارم امیری TAROM AMIRI	ایران IRAN	55	IR 83142-B-60-B	فیلیپین Philip pines	87	کلا چای زود رس KOLA CHAI ZOODRAS	ایران IRAN
24	رشتی RASHTI	ایران IRAN	56	IR 83142-B-61-B	فیلیپین Philip pines	88	خزر KHAZAR	ایران IRAN
25	غریب GHARIB	ایران IRAN	57	IR 83142-B-79-B	فیلیپین Philip pines	89	شاهک SHAHAK	ایران IRAN
26	آی آر 50 IR50	فیلیپین Philip pines	58	IR 83142-B-7-B-B	فیلیپین Philip pines	90	سردک SARDAK	ایران IRAN
27	صدری SADRI	ایران IRAN	59	IR 83142-B-8-B-B	فیلیپین Philip pines	91	شلتوک هراز SHALTOK HARAZ	ایران IRAN
28	بالدو BALDO	ایتالیا ITAL Y	60	IR 84675-7-3-2-B-B	فیلیپین Philip pines	92	قاطر دم بیریشک GHATERDOM BIRISHK	ایران IRAN
29	آمل ۱ AMOL 1	ایران IRAN	61	IR 84675-25-7-3-B-B	فیلیپین Philip pines	93	پردیس PARDIS	ایران IRAN
30	بچار BEJAR	ایران IRAN	62	IR 84675-58-4-1-B-B	فیلیپین Philip pines	94	ندا NEDA	ایران IRAN
31	VIALONE NANO	ایتالیا ITAL Y	63	IR 84677-34-1-B	فیلیپین Philip pines	95	جلودار JELODAR	ایران IRAN
32	RINGO	ایتالیا ITAL Y	64	IR 84677-51-1-B	فیلیپین Philip pines			

ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان^۲
دریافت گردید. ژنوتیپ‌های برنج در شرایط
گلخانه‌ای کشت و مقدار ۰/۱ گرم از برگ‌های

این مجموعه از بانک بذر ملی ایران،
موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج^۱ و پژوهشکده

² Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT)

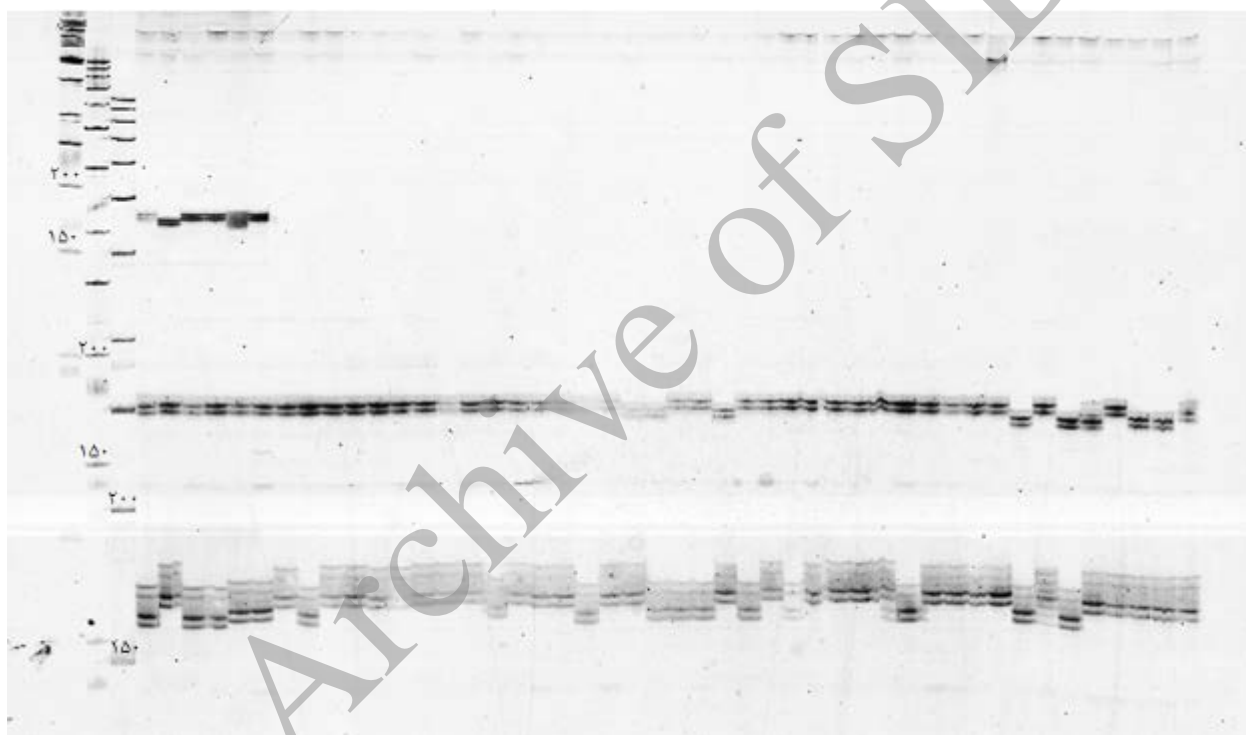
¹ International Rice Research Institute (IRRI)

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 ۶ 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 ۶۵ وات راه‌اندازی شد. مدتی پس از سیر نمونه ها در ژل مجموعه دوم محصولات PCR در همان چاهک ها بارگذاری شدند (برای هر بار 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 پلی‌مرز فرم خطی خود را حفظ کنند. آشکار سازی الگوی نواریندی 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. شاخص‌های نشانگری (تعداد آلل، فراوانی آلل غالب،

جوان هر ژنوتیپ برداشت شد. استخراج DNA از روش تغییر یافته (Dellaporta et al., 1983) که برای گیاه برنج بهینه شده انجام شد. ۶۷ نشانگر ریزماهواره با پوشش هر دوازده کروموزوم برنج (تقریباً ۶ نشانگر در هر کروموزوم) از پایگاه داده Gramene (<http://www.gramene.org/>) گزینش شدند. واکنش زنجیره پلی‌مرز در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر محتوی ۰/۵ میلی‌مولار از هرکدام از پرایمرهای پیشرو و برگشتی، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، بافر واکنش زنجیره پلی‌مرز با غلظت 1X، ۶۰ نانوگرم DNA ژنومی و یک واحد از آنزیم پلیمرز 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 ۴۵ ثانیه، دمای بهینه شده برای اتصال به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه شدند متعاقباً بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. توالی‌های ساده تکراری تکثیر شده دارای الگوی نواریندی با تفاوت ناچیز هستند از این رو برای تفکیک این محصولات واکنش زنجیره پلی‌مرز نشانگر ریزماهواره قبل از بارگذاری، واسرشته شدند. برای این منظور مقدار ۲ میکرولیتر از بافر بارگذاری حاوی فرم‌آمید به ۱۲/۵ میکرولیتر محصول PCR اضافه شد. همچنین نشانگر وزنی استاندارد نیز که به آن بافر بارگذاری حاوی فرم-

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 نرم‌افزار GenAIEx V6.5 (Peakall and Smouse, 2012) انجام شد. مکان برش صحیح دندروگرام با توجه به پراکنش ژنوتیپ ها در بای پلات تجزیه به مختصات اصلی انجام و به وسیله تجزیه واریانس مولکولی تایید شد.

محتوی اطلاعات چند شکلی) به وسیله نرم افزار- های GenAIEx V 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) و PowerMarker V 3.25 (Liu and Nei, 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 تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)



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

Figure 1- Image of polyacrylamide gel for RM487

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

نتایج و بحث

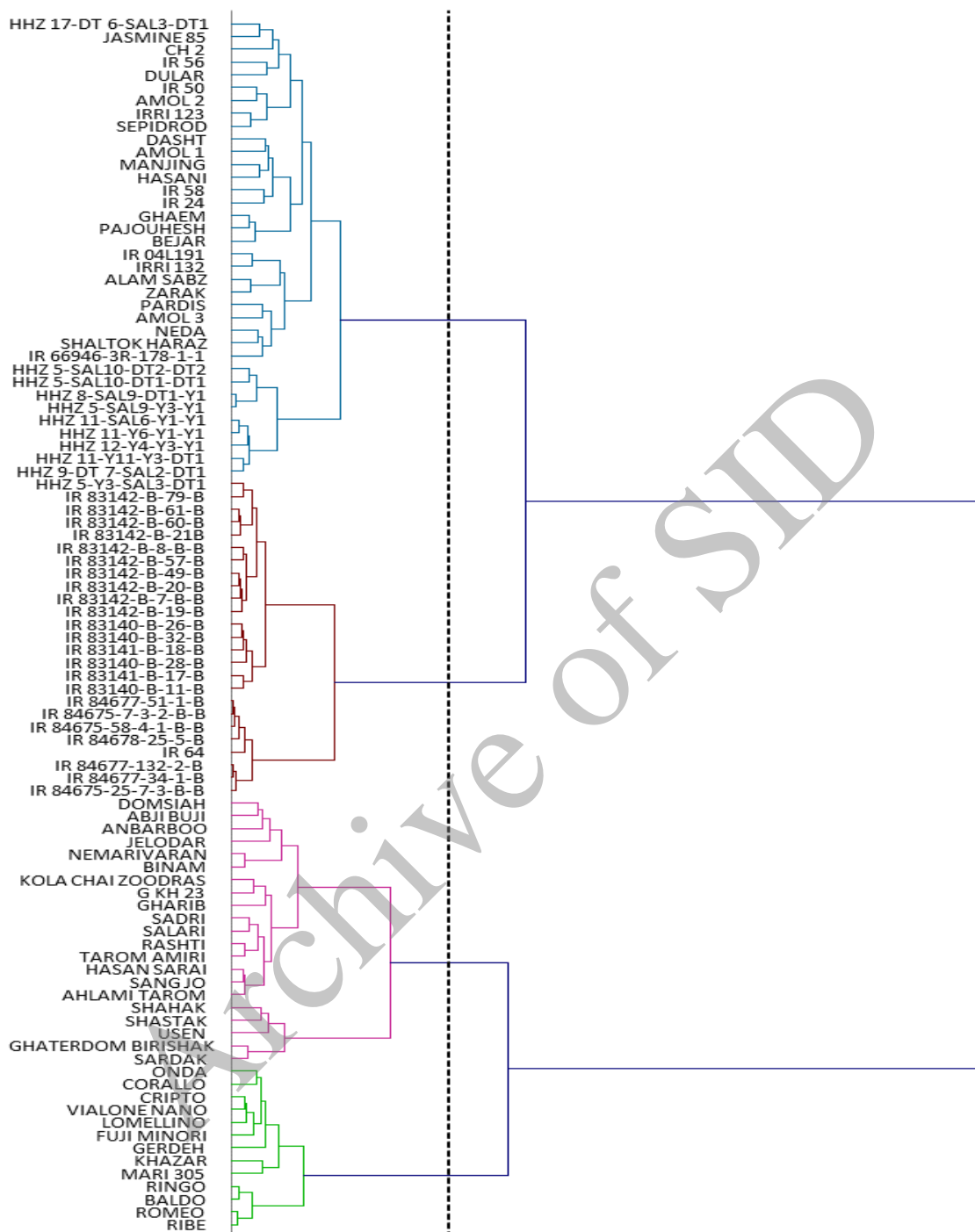
در این مطالعه ۶۷ نشانگر الگوی نواربندی چند شکل داشتند که در این میان بیشترین تعداد آلل مربوط به ریز ماهواره RM 1341 با ۱۰ آلل بود. در مورد اهمیت تعداد آلل های تکثیر شده

اطلاعات چند شکلی از مقدار ۰/۷ تا ۰/۸۹ متغیر بود و میانگین این آماره به میزان ۰/۸۱۷ برآورد شده بود (Amini Nasab et al., 2012). به منظور تعیین اندازه فاصله ژنتیکی ۹۵ ژنوتیپ بر اساس اطلاعات ۶۷ نشانگر ریزماهواره، دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای به روش UPGMA ترسیم شد (شکل ۲). تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های برنج این مجموعه را به ۴ گروه اصلی تقسیم‌بندی کرد. خوشه اول شامل ۲۱، خوشه دوم شامل ۱۳ و خوشه سوم و چهارم به ترتیب ۳۶ 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 حالی که 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 بر گرفته بود از این ارقام می‌توان به ارقام پر محصول ندا، قائم، پردیس حسنی، آمل ۱، آمل ۲ و آمل ۳ اشاره کرد. نهایتاً 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 ۷۱/۱۵٪ از تغییرات کل را توجیه می‌کردند ژنوتیپ‌ها را در پلات دوبعدی به ۴ گروه متمایز (شکل ۳) تقسیم کردند.

اطلاعرسانی آن مکان برای تعیین تنوع ژنوتیپ‌ها افزایش می‌یابد. تعداد ۳۰۳ آلل با میانگین ۴/۵۲ آلل در هر مکان در این ۶۷ نشانگر تکثیر یافت. به طوری که فراوانی آلل غالب در دامنه ۰/۹۴ (RM4862) تا ۰/۲۶ (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 ۰/۱۱ تا ۰/۸۱ 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 ۰/۵۱ 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

Table 2- List of evaluated markers.

Marker	Chromosome	Size of product (bp)	Major allele frequency	Number of alleles	Polymorphism information	Marker	Chromosome	Size of product (bp)	Major allele frequency	Number of alleles	Polymorphism information
نشانگر	کروموزوم	اندازه محصول (bp)	فراوانی آل غالب	تعداد آل	محتوی اطلاعات چند شکلی	نشانگر	کروموزوم	اندازه محصول (bp)	فراوانی آل غالب	تعداد آل	محتوی اطلاعات چند شکلی
RM1034 6	1	293	0.26	7	0.81	RM1748 8	4	166	0.76	3	0.36
RM1038 6	1	216	0.27	8	0.8	RM1749 2	4	113	0.69	2	0.33
RM1040 2	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
RM1746 6	4	172	0.93	2	0.13	RM101	12	154	0.82	3	0.28
RM1747 3	4	493	0.77	5	0.36	RM309	12	178	0.38	3	0.59
RM1748 3	4	148	0.85	2	0.22	RM3739	12	377	0.69	5	0.45
RM1748 6	4	194	0.43	7	0.72						



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ۹۵ ژنوتیپ برنج بر اساس اطلاعات ۶۷ نشانگر ریز- ماهواره.

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

ممکن است حاوی بخشی از ژنوم ارقام خارجی باشند که توسط والدین آنها به این ارقام انتقال یافته است.

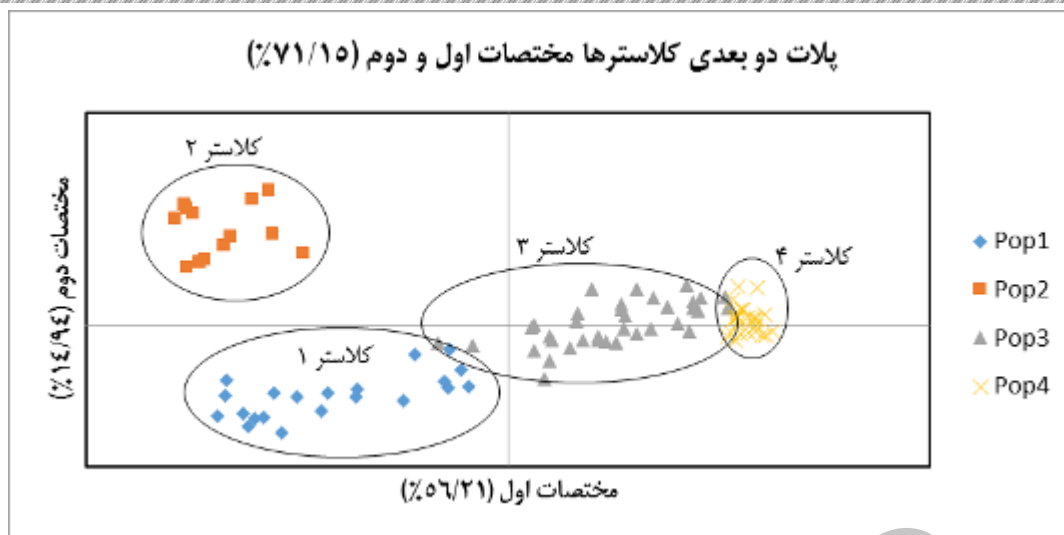
نتیجه گیری

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.

همانطور که در پلات دوبعدی مشخص است خوشه‌های اول و سوم که هر دو دارای ارقام ایرانی هستند فاصله و تمایز کمتری دارند. تجزیه واریانس مولکولی برای بررسی تمایز و تفکیک خوشه‌های ناشی از تجزیه خوشه‌ای انجام شد. میزان واریانس درون خوشه‌ها ۶۴٪ و بین خوشه‌ها ۳۶٪ محاسبه گردید. مقدار آماره $(\Phi=0/359)$ و در سطح ۱٪ معنی دار بود (جدول ۳) که نشان دهنده تمایز بالا میان خوشه‌ها 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 عموماً از یک کشور بخصوص بودند و یا ویژگی‌های ژنتیکی مشابهی 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 جدول ۳- 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 of 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	



شکل ۳- پلات دو بعدی مختصات اول و دوم در تفکیک خوشه‌ها.

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

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 خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس معیار فاصله‌نی در مطالعات تنوع ژنتیکی کارا بنظر می‌رسند.

در تمامی روش‌های به کار برده شده برای تفکیک مجموعه مورد مطالعه مبدا جغرافیایی ژنوتیپ‌ها در تفکیک آن‌ها دخیل بود و ارقام هر خوشه عموماً از یک کشور بخصوص بودند و یا ویژگی‌های ژنتیکی مشابه‌ای داشتند. ارقام ایتالیایی، ژنوتیپ‌های بومی ایرانی، لاین‌های

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., Ranjtkumar, 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 miniprep: 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. *Theoretical 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). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Rotolski IA, Vogel JM, Morgoante M, Powell 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, Ziegler 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. *Theoretical 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

¹Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

²Department of biotechnology and Plant Breeding, College of Agronomy Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran.

³Department 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 inbred 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