

انگشت‌نگاری تعدادی از ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP

میثم علی‌زاده^۱، قربانعلی نعمت‌زاده^{۲*}، محمدعلی ابراهیمی^۳ و سیدحمیدرضا هاشمی^۴

۱، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ۲، استاد پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ۳، استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ۴، دانشجوی دکتری پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۳/۴)

Fingerprinting of Some Rice (*Oryza sativa* L.) Germplasm via AFLP Markers

M. ALIZADEH¹, GH. NEMATZADEH^{2*}, M. A. EBRAHIMI³ AND S. H. HASHEMI⁴

1, M.Sc. Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran; 2, Professor, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, Iran; 3, Assistant Professor, Department of Agriculture Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran; 4, Ph. D. student in Plant Breeding, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

(Received: January 5, 2013 - Accepted: May 25, 2013)

Abstract

Rice is the main source of carbohydrates for more than a third of the world's population. It is also a principal food stuff for the Iranian people. In this study, AFLP markers were used to evaluate and fingerprint a number of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes, including 28 Iranian local varieties and 19 exotic varieties. Using 10 primer combinations, 675 bands were obtained out of which 429 bands (63.5%) showed polymorphism. Among the used primers, E-TTG, M-CAT with 107 bands and E-AGG, M-CTG with 34 bands had the highest and the lowest band numbers, respectively. Average polymorphism information content (PIC) was at 0.34. The best primer combination to differentiate rice samples were E-TTG, M-CAT with the marker index of 24.1. The average genetic similarity based on Nei coefficient, was estimated at 0.67 (0.97 to 0.40). The dendrogram obtained by using the UPGMA determined three main groups among the investigated varieties which was in concordance with the PCR analysis results. In conclusion, AFLP markers could provide unique fingerprinting patterns for all the studied varieties. The finding of this study could be used in inbreeding programs to produce hybrid and promising varieties based on the genetic distances and the identification of heterotic groups.

Keywords: Rice, AFLP marker, Genetic diversity, Polymorphism

چکیده

برنج غذای عمده و منبع اصلی کربوهیدرات برای بیش از یک سوم از جمعیت جهان است. این گیاه همچنین جزء غذاهای اصلی مردم ایران محسوب می‌شود. در این پژوهش به منظور ارزیابی و انگشت‌نگاری تعدادی ژرم پلاسِم برنج کشور که شامل ۲۸ رقم محلی و ۱۹ رقم خارجی بوده است، از نشانگرهای مولکولی AFLP استفاده گردید. با استفاده از ۱۰ ترکیب آغازگر، تعداد ۶۷۵ نوار (باند) به دست آمد که تعداد ۴۲۹ نوار (۶۳/۵٪) چندشکلی نشان دادند. از بین آغازگرهای مورد استفاده، ترکیب آغازگر، E-TTG و M-CAT با ۱۰۷ نوار بیشترین تعداد نوار و ترکیب آغازگر، E-AGG و M-CTG با ۳۴ نوار کمترین تعداد نوار را تولید نمودند. مقدار متوسط محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) نیز در این تحقیق ۰/۳۴ برآورد گردید. بهترین ترکیب آغازگرها برای تفکیک بهتر نمونه‌های برنج نیز E-TTG و M-CAT با شاخص نشانگر ۲۴/۱ تشخیص داده شد. میانگین شباهت ژنتیکی بر پایه ضریب Nei، ۰/۶۷ تخمین زده شد (۰/۴۰-۰/۹۷). دندروگرام به دست آمده با استفاده از روش UPGMA، سه گروه اصلی را بین ارقام مورد بررسی مشخص نمود که با نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل PCA نیز هم‌خوانی داشت. در این تحقیق نشانگر AFLP توانست اثر انگشت منحصر به فردی را برای تمامی ارقام ایجاد کند. با توجه به شناسایی گروه‌های هتروتنیک، نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی جهت تولید ارقام هیبرید و امیدبخش استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: برنج، نشانگر AFLP، تنوع ژنتیکی، چندشکلی

شناسایی تنوع در برنج مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Prashanth *et al.*, 2002). در میان آن‌ها نشانگر مولکولی AFLP هم مزایای روش RAPD را داراست و هم دقت روش RFLP را به‌طور همزمان به همراه دارد. همچنین عدم حساسیت به DNA الگو، تکرارپذیری بالا، امکان بررسی چندین مکان ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگرها، امکان پایش نسبی ژنوم برای نمایان ساختن چندشکلی، تولید تعداد زیاد نوارهای چندشکل با تکرارپذیری بالا از مزایای این روش محسوب می‌شود (Vos *et al.*, 1995; Prashanth *et al.*, 2002; Nandakumr *et al.*, 2004). این نشانگر همچنین توانایی بسیار بالایی در شناسایی تنوع و نقشه‌یابی ژنتیکی و تجزیه و تحلیل QTL داراست (Zhou *et al.*, 1995). در مطالعه‌ای که توسط Spada *et al.* (2004) انجام گرفت از نشانگر AFLP و SSR برای تجزیه و تحلیل برنج ایتالیایی استفاده شد، هر دو این نشانگرها توانستند ارقام مورد نظر را در دو گروه اصلی مورد بررسی قرار دهند. Bao *et al.* (2004) با استفاده از نشانگرهای AFLP و ISSR به‌منظور کمک به اصلاح ژرمپلاسم برنج واکسی، تنوع ژنتیکی ارقام برنج واکسی را در هر دو زیرگونه برنج ایندیکا و ژاپونیکا مورد بررسی قرار دادند. Nandi *et al.* (1997) از نقشه‌یابی AFLP به‌همراه روش ژنوتیپ انتخابی برای شناسایی QTL ژن مقاومت به غرقابی در برنج استفاده کردند. هدف از اجرای این تحقیق ارزیابی و تعیین سطح تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی رقم و لاین‌های برنج کشور با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP و ارائه اثرانگشت اختصاصی برای هر ژرمپلاسم و گروه‌بندی آن‌ها به روش تجزیه کلاستر بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

نمونه‌های برنج مورد مطالعه در این تحقیق از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان تهیه گردید. این ارقام شامل ۲۸ رقم داخلی و ۱۹ رقم خارجی بودند (جدول ۱). بذور نمونه‌های یادشده با استفاده از روش هیدروپونیک در محلول یوشیدا (Yoshida *et al.*, 1976) کشت داده شدند و نمونه‌های برگی آن‌ها (در مرحله دو برگی) برای استخراج DNA تهیه گردید.

مقدمه

برنج غذای عمده و منبع اصلی کربوهیدرات برای بیش از یک سوم از جمعیت جهان است و سطح وسیعی از زمین‌های زیر کشت در آسیا را به خود اختصاص داده است. بیش از ۹۰ درصد برنج جهان در آسیا تولید و مصرف می‌شود (Yashitola *et al.*, 2002; Yashitola *et al.*, 2004). در ایران برنج غذای اصلی مردم بعد از گندم بوده که با توجه به رشد جمعیت و کمبود تولید داخلی آن نیاز به واردات این محصول جهت مصرف داخلی وجود دارد (Dorosti *et al.*, 2006). طبق آمار وزارت کشاورزی آمریکا (USDA) در سال ۲۰۰۸، میزان مصرف سالانه برنج در ایران ۳۵۵۰ هزار تن می‌باشد که از این مقدار ۲۲۷۳ هزار تن در داخل ایران تولید شده و بقیه نیاز برنج کشور با واردات تأمین می‌شود. توجه به روند کلی افزایش جمعیت حاکمی از افزایش مصرف‌کنندگان مواد غذایی است، بر همین اساس باید تولید مواد غذایی افزایش یابد تا بتوان پاسخگوی جمعیت در حال رشد بود (Nandakumr *et al.*, 2004). با توجه به محدودیت‌های اقلیمی برای رشد و توسعه زمین‌های زیرکشت این مقدار غذا باید از زمین‌های موجود و با استفاده کمتر از عوامل آگروشیمیایی حاصل آید. برای این منظور نیاز به گسترش برنامه‌های به‌نژادی برای تولید ارقام برتر برنج می‌باشد. شناخت میزان تنوع ژنتیکی نمونه‌های ژرمپلاسم و روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها اهمیت بسیار بالایی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی دارد. اولین قدم برای ارزیابی میزان تفاوت ژنتیکی و دامنه تنوع بین انواع برنج ایرانی جهت تعیین راهبردهای اصلاحی، اطلاع از تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین ارقام و لاین‌های مناطق مختلف است. در گذشته شناسایی تنوع میان ژرمپلاسم‌ها با استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی و مورفولوژیکی انجام می‌شد. توسعه و پیشرفت ژنتیک گیاهی و بیولوژی مولکولی اجازه گسترش انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی که می‌تواند برای شناسایی ژرمپلاسم‌ها استفاده شود را فراهم نمود. نشانگرهای مولکولی مختلفی در حال حاضر وجود دارند که هر کدام از آن‌ها دارای تفاوت‌هایی در اصول اجرا، کاربرد، نوع و میزان چندشکلی و هزینه با یکدیگر هستند (Herrera *et al.*, 2008). پرکاربردترین این نشانگرها، AFLP، SSR، RAPD، ISSR و RFLP می‌باشند. انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی از جمله نشانگرهای یادشده برای

استخراج DNA

استخراج DNA بر مبنای روش دلاپورتا با اندکی تغییر انجام شد (Dellaporta *et al.*, 1983). گیاهچه‌ها در مرحله دو برگی جهت استخراج DNA ژنومی مورد استفاده قرار گرفتند. برگ‌های تازه و جوان به کمک ازت مایع پودر و سپس منجمد شدند. نمونه‌های پودر شده تا زمان استخراج در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری گردیدند.

اجرای مراحل AFLP

آزمایشات AFLP براساس روش Vos *et al.*, (1995) با کمی تغییرات انجام گرفت. ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم DNA ژنومی به کمک ۱۰ واحد از هر کدام از آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *Tru91* (Roche) مورد هضم قرار گرفته و سپس دو آداپتور مربوط به آنزیم برشی فوق به

انتهای قطعات برش خورده متصل شدند. در مرحله تکثیر پیش‌انتخابی از آغازگرهای دارای یک نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳ توالی آداپتور -5 *EcoRI*: GACTGCGTACCAATTCA-3 و *Tru91*:5- GATGAGTCCTGAGTAAC-3 استفاده شد. سپس به کمک آغازگرهایی با سه نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳ (جدول ۲)، واکنش تکثیر انتخابی انجام گرفت. به منظور انتخاب بهترین ترکیب آغازگرها، با استفاده از ۴ نمونه گیاهی، بیش از ۵۰ ترکیب آغازگر مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۱۰ ترکیب با بیشترین تعداد نوار و چندشکلی انتخاب شدند. ترکیبات مختلف آغازگر مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های برنج مورد استفاده در این آزمایش

ردیف	ژنوتیپ	ردیف	ژنوتیپ	ردیف	ژنوتیپ	ردیف	ژنوتیپ
1	سنگ جو (1)	13	رشتی (26)	25	سپیدرود (44)	37	(15) Dular
2	حسن سرایی ۱ (3)	14	غربی (27)	26	نعمت (45)	38	(16) Roma
3	اهلمی طارم (4)	15	صدری (29)	27	خزر (46)	39	(17) Jasmin85
4	حسن سرایی ۲ (5)	16	آمل ۱ (31)	28	چمپا (47)	40	(22) IR64
5	بینام (7)	17	بجار (32)	29	(2) Mari 305	41	(24) IR56
6	حسینی (10)	18	گرده (36)	30	(6) CH2-1	42	(28) IR50
7	زیره بند پی (18)	19	موسی طارم (37)	31	(8) Lemonimo	43	(39) IR58
8	آمل ۲ (19)	20	میرطارم (38)	32	(9) Corallo	44	(30) Baldo
9	سالاری (20)	21	آبجی بوجی (40)	33	(11) Manjing	45	(33) Vialolenano
10	رشتی سرد (21)	22	عنبر بو (41)	34	(12) Fujiminori	46	(34) Ringo
11	ندا (23)	23	دمسیاه (42)	35	(13) Onda	47	(35) Cripto
12	طارم امیری (25)	24	آمل ۳ (43)	36	(14) Ribe		

واکنش PCR

مقدار هم حجم بافر بارگذاری فرم‌آمید (۹۸٪ فرم‌آمید، EDTA ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۱٪ بروموفنیل‌بلو، ۰/۱٪ زایلین سیانول) طی مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد واسرشت شده و سپس روی ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشت ۶ درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی (Sequi-Gen GT, BIO-RAD, USA) مشاهده شد. ابتدا الکتروفورز مقدماتی جهت گرم‌شدن بافر ژل به مدت ۳۰ دقیقه و سپس الکتروفورز اصلی با قدرت ثابت ۶۵ وات برای مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. پس از الکتروفورز به منظور مشاهده باندها از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (Bassam *et al.*, 2007).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

وجود و عدم وجود نوار به ترتیب با اعداد ۱ و ۰ برای رقم‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار Excel کدگذاری

واکنش PCR برای مرحله پیش‌انتخابی در دستگاه ترموسایکلر (applied biosystems, veriti 96 well thermal cycler) با ۲۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، انجام گرفت. در مرحله تکثیر انتخابی، محصولات حاصل از مرحله تکثیر پیش‌انتخابی به نسبت ۱ به ۵ رقیق شدند و با استفاده از روش Touchdown PCR تکثیر انجام گرفت. به این ترتیب که در ۱۲ چرخه ابتدایی دمای اتصال به مقدار ۰/۷ درجه سانتی‌گراد در ابتدای هر چرخه کاهش داده شد. ۲۳ چرخه بعدی با برنامه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت. محصولات مرحله تکثیر انتخابی همراه با

۱۲۰۰ جفت باز) به‌دست آمد و باندهایی در محدوده ۱۰۰ الی ۱۱۰۰ جفت باز مورد آنالیز قرار گرفتند. تمامی این ترکیبات در بین ارقام، چندشکلی نشان دادند. شکل ۱ الگوی چندشکلی به‌دست‌آمده از ترکیب آغازگری E-CAA و M-CAC را نشان می‌دهد. از بین آغازگرهای مورد استفاده ترکیب آغازگری E-TTG و M-CAT با ۱۰۷ نوار بیشترین تعداد نوار و ترکیب آغازگر E-AGG و M-CTG با ۳۴ نوار کمترین تعداد نوار را تولید کردند. مقادیر محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای هر جفت آغازگر، به همراه نوع آغازگرها و تعداد نوارهای چندشکل و شاخص نشانگر در جدول ۲ نشان داده شده است. میانگین درصد چندشکلی برابر با ۶۴/۰۴ و میانگین تعداد نوارهای چندشکل به ازای هر ترکیب آغازگر ۴۳/۱ نوار بوده است. بیشترین و کمترین میزان PIC به ترتیب ۰/۳۸۷ برای ترکیب آغازگر E-AGG و M-CTG و ۰/۲۸۹ برای ترکیب آغازگر E-CTC و M-CTT بود، میانگین PIC مقدار عددی ۰/۳۴۲ را نشان داد. بالابودن میزان PIC نشان‌دهنده سطح بالای تمایز می‌باشد. شاخص نشانگر بر پایه تعداد نوارهای چندشکل در هر ترکیب آغازگر محاسبه شد که از ۸/۹ تا ۲۴/۱ متغیر بود. بیشترین میزان شاخص نشانگر ۲۴/۱ و مربوط به ترکیب آغازگر E-TTG و M-CAT بود، که نشان‌دهنده توان جداسازی بالای این ترکیب در مقایسه با دیگر ترکیب‌های آغازگر می‌باشد.

شد. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها شامل تشکیل ماتریس تشابه، تجزیه خوشه‌ای^۱ و تجزیه مؤلفه‌های اصلی^۲ با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc ver 2.02 انجام شد. همچنین پارامترهایی چون محتوای اطلاعات چندشکل^۳ و شاخص نشانگر^۴ نیز محاسبه شدند. مقادیر PIC برای هر جفت آغازگر بر پایه رابطه (Roldan-Ruiz, PIC= [2Pi (1-Pi)] *et al.*, 2000) محاسبه گردید. به‌طوری‌که F_i برابر با فراوانی الل تکثیرشده و (1-Fi) فراوانی الل غایب در نظر گرفته شد. شاخص نشانگر بر اساس تعداد نوارهای چندشکل و PIC در هر ترکیب آغازگر برآورد گردید (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000). همچنین ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه و آزمون مانتل (Mantel, 1967) برای ارزیابی همبستگی بین ماتریس‌های تشابه و دندروگرام نهایی، بر پایه ضریب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده^۵ انجام شد. در نهایت دندروگرام به‌دست‌آمده از گروه‌بندی نمونه‌ها، براساس روش دایس و روش اتصال میانگین (UPGMA^۶) تهیه شد.

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل مولکولی

در این پژوهش از ۱۰ ترکیب آغازگر با آنزیم‌های *EcoRI / Tru9I* در مجموع تعداد ۶۷۵ نوار (محدوده ۷۰ تا

1. Cluster analysis
2. Principal Component Analysis (PCA)
3. Polymorphic Information Content (PIC)
4. Marker Index(MI)
5. Simple Matching Coefficient
6. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)

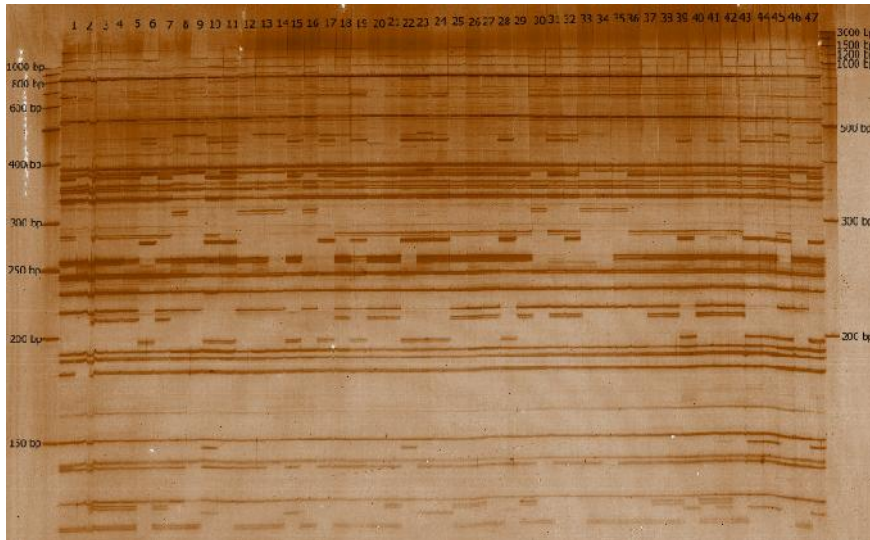
جدول ۲- ترکیب آغازگرها و تعداد نوارهای چندشکل امتیاز داده شده AFLP در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

ترکیب‌های آغازگر	تعداد کل نوار در بین نمونه‌ها	تعداد نوارهای چندشکل	درصد نوارهای چندشکل	PIC	MI
E-AGG , M-CTG	34	23	67.6	0.387	8.9
E-GGA , M-CCT	87	52	59.8	0.342	17.8
E-GTG , M-CTT	54	37	68	0.384	14.2
E-GGA , M-CAT	63	37	58.7	0.320	11.8
E-CAA , M-CAC	71	47	66.2	0.336	15.8
E-CTC , M-CTG	63	42	66.7	0.320	13.4
E-CTC , M-CTT	60	34	56.7	0.289	9.8
E-CAA , M-CTC	72	53	73.6	0.343	18.2
E-TCC , M-CTG	65	40	61.5	0.334	13.4
E-TTG , M-CAT	107	66	61.6	0.366	24.1
میانگین	67.6	43.1	64.04	0.342	14.74

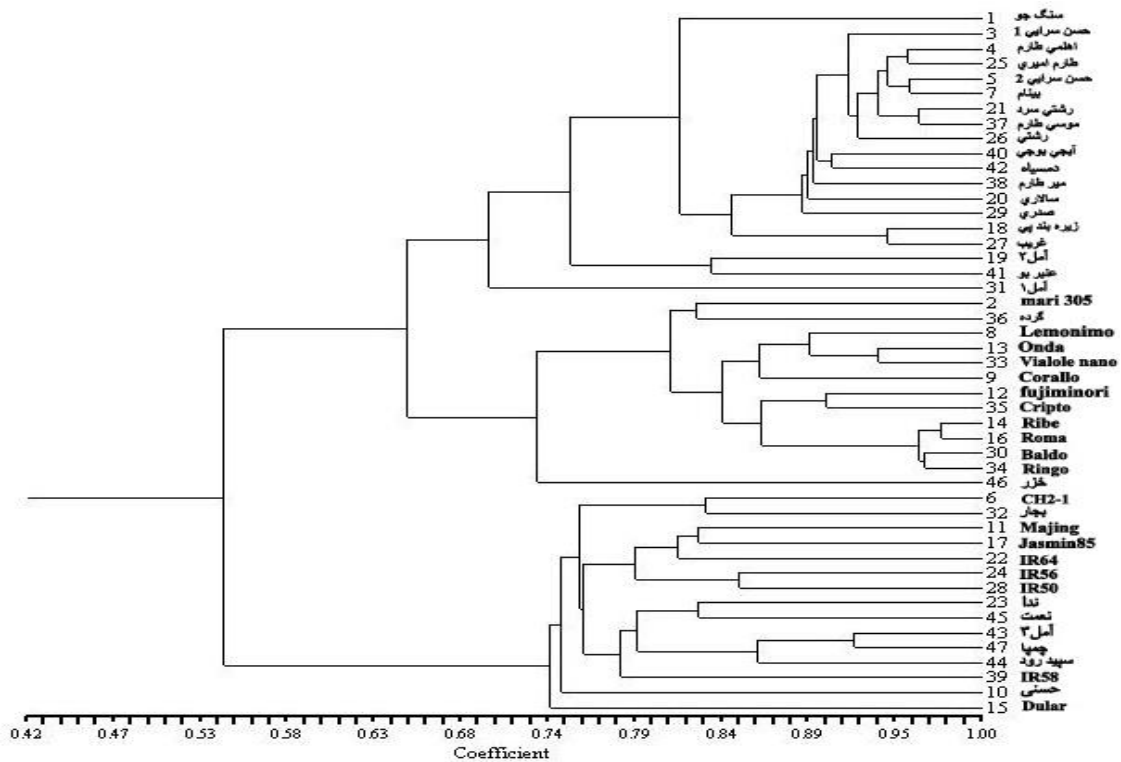
تجزیه خوشه‌ای

برای تجزیه خوشه‌ای در ابتدا آزمون مانتل (Mantel, 1967) برای ضرایب تشابه تطابق ساده، دایس و جاکارد انجام شد. از بین این سه ضریب، ضریب تشابه دایس بهترین نتیجه را نشان داد. سپس به منظور انتخاب بهترین روش برای خوشه‌بندی از آزمون مانتل بین سه روش اتصال ساده^۱، اتصال میانگین^۲ و اتصال کامل^۳ استفاده شد. بر پایه نتایج به دست آمده، روش اتصال میانگین با ضریب همبستگی ۰/۹۲ و آماره t مانتل ۲۵/۱۵، دارای بیشترین همبستگی با ضریب تشابه دایس بود. بر اساس داده‌های AFLP تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین ۰/۴۰ تا ۰/۹۷ متغیر بود و میانگین شباهت ژنتیکی بین تمامی جفت نمونه‌ها ۰/۶۷ محاسبه گردید. بیشترین تشابه ژنتیکی بین دو رقم ایتالیایی Roma و Ribe (۰/۹۷۴) و کمترین میزان شباهت ژنتیکی بین دو نمونه Jasmine 85 و رقم سنگ‌جو (۰/۴۰۵) مشاهده شد. دندروگرام به دست آمده از گروه‌بندی نمونه‌ها بر پایه ضریب دایس و روش UPGMA، در شکل ۲ آورده شده است. براساس دندروگرام حاصله در شباهت ژنتیکی ۰/۶۷ تعداد ۴۷ نمونه مورد بررسی در ۳ کلاستر دسته‌بندی شدند. این گروه‌ها به ترتیب ۳۱/۹، ۲۷/۶، و ۴۰/۵ درصد از ژنوتیپ‌ها را شامل شدند.

1. Simple Linkage
2. Average Linkage
3. Complete Linkage



شکل ۱- پروفایل AFLP ۴۷ ژنوتیپ برنج با استفاده از ترکیب آغازگر *Mse*I Adaptor+CAC و *Eco*R1 Adaptor+CAA



شکل ۲- دندروگرام به دست آمده از روش UPGMA و ضریب دایس در ۴۷ نمونه برنج با استفاده از نشانگر AFLP

لاین‌های خواهری بوده و در یک زیر گروه قرار می‌گیرند. همچنین ارقام IR50 (حاصل تلاقی-1-14-IR36/IR2153-14-1-IR50) و IR56 (حاصل تلاقی-53-IR4432-53-IR28//6-2) در یک زیر گروه قرار می‌گیرند. شباهت آن‌ها به دلیل وجود نیای مشترک می‌باشد.

گروه اول: شامل ارقام Dular، حسنی، IR58، سپیدرود، چمپا، آمل ۳، نعمت، ندا، IR50، IR56، IR64، IR58، Jasmine85، Manjing، بجار و CH2-1 در این گروه رقم Dular یک زیرگروه جدا تشکیل می‌دهد. این رقم حاصل تلاقی Dumal/Larkoch می‌باشد. ارقام ندا و نعمت

در پیرامون مؤلفه‌های اصلی ابتدایی نیز نشان‌دهنده پراکنش بیشتر افراد در اطراف سه مؤلفه اول است. چگونگی تجمع یا پراکنده‌گی افراد در این نمودار، نشان‌دهنده مجموعه‌ای از افراد است که از نظر ژنتیکی مشابه یا متفاوت هستند.

از آنجایی که برنج گیاهی خودگشن و با خلوص بالا (هموزایگوس و هموزن) محسوب می‌شود، نمایان‌ساختن تنوع بین ارقام و استفاده از پدیده هتروزیس (تفکیک برتر) در برنامه‌های اصلاحی نتایج مطلوبی خواهد داد (Spada *et al.*, 2004). در این تحقیق نشانگر AFLP توانست اثر انگشت اختصاصی را برای تمامی ارقام مطالعه‌شده ایجاد کند. به طوری که با ۴ ترکیب E-AGG, M-CTG, E- و E-TTG, M-CTC, CAA, M-CAC و E-CAA, M-CAT می‌توان کلیه این ارقام را تعیین مشخصه کرد (جدول ۳). همچنین با توجه به اینکه ترکیب آغازگرهای مورد استفاده، اثر انگشت منحصر به فردی را در ارقام مورد بررسی ایجاد کرده‌اند، می‌توان برای هر رقم یا لاین یک نشانگر مشخص را معرفی کرد تا بتوان بر اساس آن، رقم موردنظر را تشخیص داد. نتایج حاصل از ماتریس تشابه (در دامنه ۰/۹۷ تا ۰/۴۰) نشان‌دهنده میزان تنوع قابل قبول بین ارقام مورد بررسی می‌باشد. در این تحقیق با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP سطح بالایی از چندشکلی شناسایی شدند و از آنجایی که تعدادی از نمونه‌های به کار رفته در این تحقیق دارای اطلاعات شجره‌ای نیستند، شناسایی فاصله ژنتیکی میان این نمونه‌ها اهمیت فراوانی در به حد اکثر رساندن استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی دارد. داده‌های به دست آمده در این تحقیق می‌تواند مورد استفاده در اصلاح‌نات از طریق انجام تلاقی‌های مناسب بین نمونه‌های با پس‌زمینه ژنتیکی متفاوت قرار گیرد. به علاوه امکان استفاده از داده‌های این نشانگر به همراه نشانگرهایی که چندشکلی بالایی را تولید می‌کنند در گسترش نقشه‌های ژنتیکی دقیق‌تر وجود دارد.

سپاسگزاری

از همکاری بی‌دریغ کارکنان پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان در انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

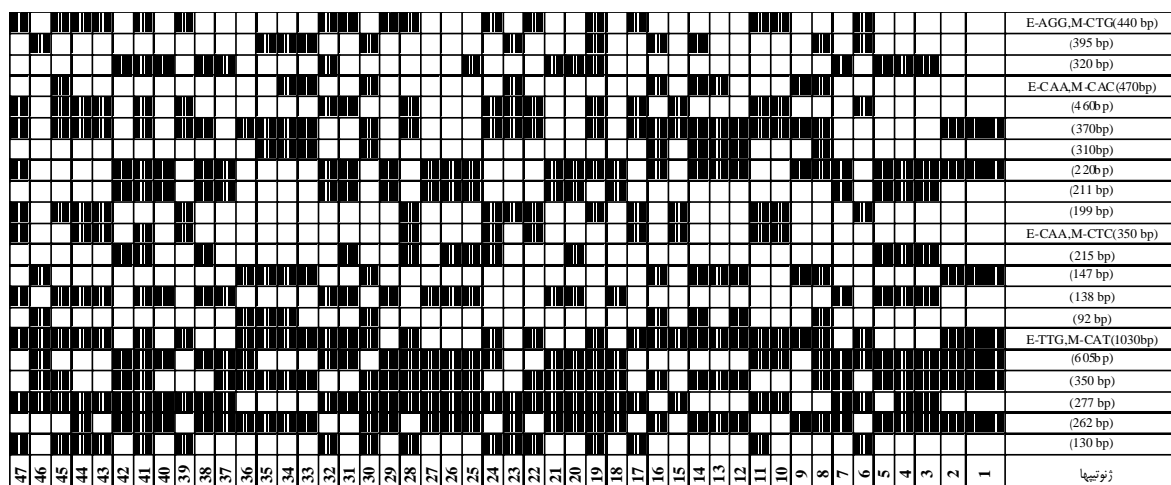
گروه دوم: شامل دو زیر گروه می‌باشد: ۱- رقم خزر که یک رقم اصلاح شده است در زیرگروه جداگانه‌ای قرار می‌گیرد. این رقم حاصل تلاقی IR / TANU 7456 / 2071-625-252 می‌باشد. ۲- ارقام گروه خارجی از جمله: Fojiminori, Cripto, Ribe, Roma, Baldo, Ringo, Lemonimo, Onda, Vialonenano, Corallo و Mari305 در زیرگروه دوم قرار می‌گیرد. کلیه ارقام ایتالیایی در این زیرگروه قرار دارند (Spada *et al.*, 2004).

گروه سوم: شامل دو زیرگروه می‌شود: ۱- رقم آمل ۱ به تنهایی در این زیرگروه قرار گرفت. این رقم دورگ بین وارپته محلی ایرانی (طارم فیروزکنده ساری) با یک رقم تایوانی به نام تای‌چانگ‌نیتو- ۱ (رقمی نیمه پاکوتاه با عمکرد زیاد) می‌باشد. از ویژگی‌های عمده رقم آمل ۱ پنجه‌زنی زیاد، مقاومت به خوابیدگی و مقاومت به بیماری بلاست را می‌توان نام برد. ۲- شامل دو زیرشاخه است: ۱- شامل ارقام عنبربو و آمل ۲ و ۲- این زیرشاخه شامل بیشترین تعداد ارقام می‌باشد که شامل ارقام بومی به همراه تعدادی از ارقام اصلاح‌شده داخلی می‌باشد که عبارتند از: غریب، زیره بندی، صدری، آجی‌بوجی، میرطارم، دمسیاه، سالاری، رشتی، بینام، حسن‌سرای ۲، موسی‌طارم، رشتی سرد، طارم امیری، اهلمی‌طارم، حسن‌سرای ۱ و سنگ‌جو. رقم سنگ‌جو در این زیر گروه از دیگر ارقام جدا شده و به تنهایی در یک دسته قرار می‌گیرد.

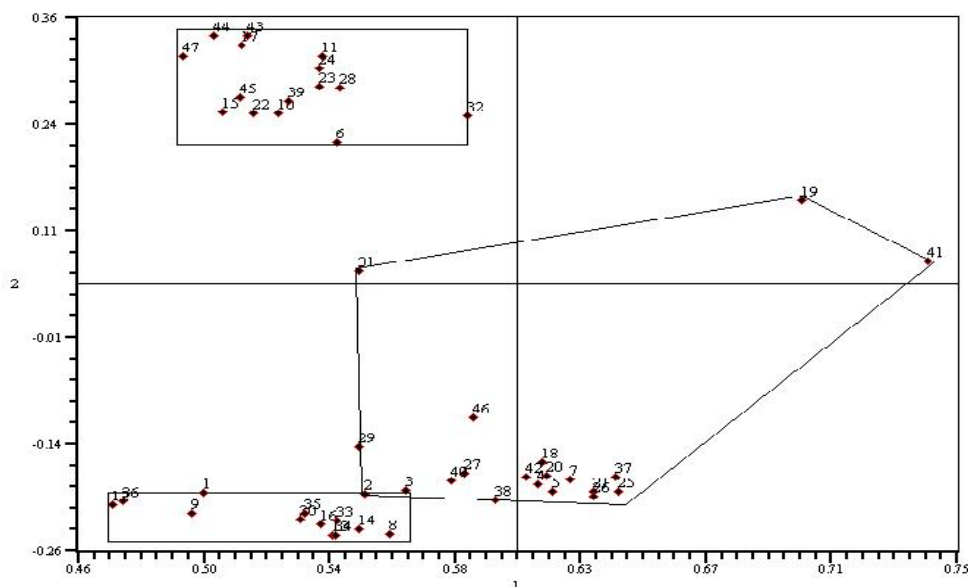
در مجموع خوشه‌بندی با استفاده از روش اتصال میانگین به وضوح ارقام داخلی و خارجی و حدواسط را از هم جدا کرد.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)

یکی از روش‌های چندمتغیره برای گروه‌بندی بر پایه ضریب تشابه یا واریانس / کوواریانس بین داده‌ها است، که اطلاعات مفیدتری درباره تمایز گروه‌های اصلی ارائه می‌کند (Bottini *et al.*, 2002). در این تحقیق تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر پایه ماتریس تشابه دایس و با بهره‌گیری از نرم‌افزار NTSYS pc ver 2.02 (Rohlf, 1998) انجام گرفت که بر پایه آن سه مؤلفه اول ۷۰/۱ درصد از تنوع کل را توجیه نموده است. ۹۳/۷ درصد از تغییرات توسط ۳۰ مؤلفه اول توجیه می‌شود. نمودار دو بعدی PCA (شکل ۳) وارپته‌ها را به سه گروه اصلی مطابق آنچه در دندروگرام UPGMA به دست آمد، تقسیم‌بندی کرد. نمودار سه بعدی پراکنش افراد



هر ستون بیانگر یک رقم و هر سطر بیانگر الگوی نواریندی مرتبط با آن رقم در نشانگر موردنظر است.



شکل ۳- نمودار دو بعدی تنوع ژنتیکی ۴۷ ژنوتیپ برنج با استفاده از PCA بر مبنای ۱۰ ترکیب آغازگر AFLP

REFERENCE

- Bao J, Corke H, Sun M (2004) Analysis of genetic diversity and relationships in waxy rice (*Oryza sativa* L.) using AFLP and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 323-330.
- Bassam BJ, Gresshoff PM (2007) Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.* 2(11):2649-54.
- Bottini MCJ, Bustos A, Jouve N, Poggio L (2002) AFLP characterization of natural population of *Berberis* in Patagonia, Argentina. *Journal of Plant Systematic and Evolution*, 231: 133-142.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA Miniprep: Vertion II. *Plant Molecular Biology Reporter* 4(1): 19-21.
- Dorosti H, Nematzadeh G, Ghodsi AH, Allahgholipour M, Nouri MZ, Nahvi M, Karbalai M, Erfani AR, Alinia F (2006) IRH1-the first aromatic hybrid rice in Iran. *IRRI Notes*. 31: 31-32.
- Herrera TG, Posso Duque D, Pérez Almeida I, Torrealba Núñez G, Pieters AJ, Martinez CP, Tohme JM (2008) Assessment of genetic diversity in Venezuelan rice cultivars using simple sequence repeats markers. DOI: 10.2225/vol11-issue5-fulltext-6.

- IRRI. Annual report 1998 - 2012. Manila (Philippines): International Rice Research Institute.
- Mackill DJ, Zhang Z, Redona E, Colowit PM (1996) Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome*, 39: 969-977.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 27: 209-220.
- Nandakumr N, Singh A, Sharma K, Mohapara RK, Prabhu TKV, Zaman FU (2004) Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* 136: 257-264.
- Nandi S, Subudhi PK, Senadhira D, Manigbas NL, Sen-Mandi S, Huang N. (1997) Mapping QTLs for submergence tolerance in rice by AFLP analysis and selective genotyping. *Mol. Gen. Genet.* 255(25):1-8
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey V, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238.
- Prashanth SR, Parani M, Mohanty BP, Talame R, Tuberosa R, Parida A (2002) Genetic diversity in cultivars and landraces of *Oryza sativa* subsp. Indica as revealed by AFLP markers. *Genome* 45: 451-459.
- Rohlf FJ (1990) NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter Software, New York.
- Roldan-Ruize I, Calsyn E, Gilliland TJ, Coll R, Vaneijk MJT, De Loose M (2000) Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2. AFLP characterization. *Mole. Breed.* 6: 593-602
- Spada A, Mantegazza R, Biloni M, Caporali E, Sala F (2004) Italian rice varieties: historical data, molecular markers and pedigrees to reveal their genetic relationships. *Plant Breeding* 123: 105-111.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Yashitola J, Thirumurgan T, Sundaram RM, Naseerullah MK, Ramesha MS, Sarma NP, Sonti, RV (2002) Assessment of purity of rice hybrid using microsatellite and STS markers. *Crop Sci.* 42: 1369-1373.
- Yashitola JM, Sundaram R, Biradar SK, Thirumurugan T, Vishnupriya MR, Rajeshwari R, Viraktamath BC, Sarma NP, Sonti RV (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.
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976) Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. Third Edition. IRRI.
- Zhou Z, Gustafson JP (1995) Genetic variation detected by DNA fingerprinting with a rice minisatellite probe in *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 91: 481-488.