



بررسی تنوع ژنتیکی ارقام برنج ایرانی با استفاده از نشانگرهای IRAP، ISSR و REMAP

علی اعلمی^۱ و نوش آفرین کرمی^۲

۱- استادیار، دانشگاه گیلان، (نویسنده مسول: ali_aalami@guilan.ac.ir)

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲۳

چکیده

در این مطالعه، تنوع ژنتیکی ۴۰ لاین و رقم بومی و اصلاح‌شده برنج با استفاده از نشانگرهای IRAP، ISSR و REMAP مورد ارزیابی قرار گرفت. فرآورده تکثیر برای ۲۰ نشانگر، نوارهای واضح و چندشکلی را بین ژنوتیپ‌ها نشان داد که در مجموع ۳۰۹ نوار با میانگین چندشکلی ۸۸/۰۳ درصد تولید شد. میانگین تنوع ژنی، شاخص شانون و محتوای اطلاعات چندشکلی به ترتیب ۰/۳۹، ۰/۵۷ و ۰/۳۵ بود. آغازگرهای UBC811 و UBC813 به ترتیب بالاترین شاخص‌های تنوع ژنتیکی را با مقادیر ۰/۶۵ و ۰/۶۴ نشان دادند. به منظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) محاسبه شد که بر این اساس نشانگرهای ترکیبی TOS2+UBC811 و TOS2+UBC826 به ترتیب با بیشترین مقدار MI و EMR از کارایی بهتری برخوردار بودند. دندروگرام با استفاده از روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را به ۶ گروه تقسیم کرد که بیشتر ارقام بومی مانند هاشمی، علی کاظمی و حسن سرایی در گروه دوم و ارقام اصلاح شده همچون خزر، کادوس و گوهر بیشتر در گروه سوم قرار گرفتند. همچنین نتایج نشان داد نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون همچون REMAP از توانایی خوبی جهت نشان دادن تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما برنج برخوردارند و می‌توانند برای مطالعات ژنتیکی و اصلاحی برنج مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: برنج، تجزیه خوشه‌ای، نشانگرهای مولکولی، رتروترانسپوزون

مقدمه

برنج در بین غلات دارای کوچکترین ژنوم از نظر اندازه می‌باشد و این امر سبب شده تا به عنوان گیاه زراعی ایده‌آل در تحقیقات تکاملی غلات و گونه‌های مهم زراعی مورد استفاده قرار گیرد (۸). دلایل دیگری نیز وجود دارد تا برنج ماده آزمایشی خوبی برای تحقیقات ژنتیکی و مولکولی باشد. برنج دومین غله مهم دنیا می‌باشد و غذای بیش از ۵۰ درصد مردم جهان را تأمین می‌کند. به علت قابلیت رشد در شرایط محیطی متفاوت، امکان بررسی و مطالعه آن در محیط‌های مختلف وجود دارد. تنوع واریته‌های زراعی برنج بیش از سایر گیاهان زراعی است، گیاهی دیپلوئید است و طول ژنوم آن کوتاه می‌باشد (۴۴،۹). از آنجا که تنوع، ماده‌ی خام اصلاح‌نباتات می‌باشد و برنج نیز دارای تنوع وسیع ژنتیکی و دامنه سازگاری بالایی می‌باشد، از این رو اتخاذ روش مناسب در جهت اصلاح و معرفی ارقام با کیفیت بالا نیازمند شناخت صحیح از تنوع و ماهیت آن می‌باشد (۴۳،۳۴). پیشرفت‌های اخیر در زمینه استفاده از نشانگرهای مولکولی و ابداع و توسعه آن‌ها، به‌نژادگران را به استفاده از این نشانگرها به عنوان ابزاری قدرتمند برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و انتخاب والدین متنوع از این گروه‌ها واداشته است. یکی از مهم‌ترین موارد کاربردی این نشانگرها در اصلاح نباتات ارزیابی پتانسیل ذخایر توارثی است که می‌تواند نمونه‌های با ارزش را در اختیار به‌نژادگران قرار دهد (۱۴). نشانگرهای DNA ترکیبات توالی ژنوم را به تصویر می‌کشند و بنابراین قادر به شناسایی تفاوت‌ها در اطلاعات ژنتیکی حمل شده به وسیله افراد

مختلف هستند (۳۲). نواحی ریزماهوره یا توالی کوتاه تکرار شونده (SSR) شامل توالی‌های DNA کوتاه تکرار شده متوالی (۶-۱ جفت باز) بوده و در ژنوم یوکاریوت‌ها فراوان هستند. اگرچه تجزیه SSRها یک سیستم نشانگری با اطلاعات ژنتیکی و تکرارپذیری بالا و نیز همباز را فراهم می‌کند اما توسعه‌ی آن‌ها وقت‌گیر و پرهزینه است (۱۸). نشانگرهای ISSR راهکار متفاوتی از SSR است که توالی DNA بین دو جایگاه SSR را تکثیر می‌کند (۴۵). آغازگرهای ISSR بر اساس تکرار دو، سه، چهار و یا پنج نوکلئوتید با بازهای انکور ۳' یا ۵' هستند (۱۹) و ناحیه بین دو ریزماهوره نزدیک به هم در ژنوم را تکثیر می‌کنند. در این روش نیازی به اطلاعات در مورد توالی ژنومی جهت طراحی آغازگر نمی‌باشد و هر توالی ریزماهوره با یک یا چند باز انکور در انتهای ۳' یا ۵' به عنوان آغازگر استفاده می‌شود. نشانگر مولکولی ISSR به دلیل ایجاد چندشکلی بالا در الگوی باندهی، سادگی کاربرد، هزینه اندک و عدم نیاز به داشتن اطلاعات اولیه از توالی DNA هدف به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در درون و بین گونه‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۱۵). عناصر جابه‌جا شدنی (Transposable Elements: TEs) به دو نوع ترانسپوزون‌ها و رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم یوکاریوت‌ها بخصوص با فراوانی بالا در گیاهان دیده شده است. رتروترانسپوزون‌ها از طریق یک RNA واسطه و به وسیله مکانیسم کپی شدن و چسبیدن جابه‌جا می‌شوند (۳). در نتیجه، آن‌ها دلیل اصلی برای تفاوت در اندازه‌ی ژنوم گونه‌های گیاهی نزدیک به هم

IRAP و REMAP جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون استفاده شد و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به روش UPGMA انجام شد. نتایج نشان داد این نشانگرها از توانایی مناسبی جهت تفکیک ژنوتیپ‌های توتون برخوردارند. (۱۳، ۳۹). به منظور بررسی تنوع ژنتیکی میان ۹۲ رقم بومی زنجبیل، شش آغازگر IRAP و ۲۵ ترکیب آغازگری REMAP مورد استفاده قرار گرفت. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها نیز به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام شد و ارقام در ۳ گروه اصلی قرار گرفتند (۳۹).

با توجه به اهمیت مطالعه ژرم‌پلاسم برنج ایرانی به سبب سازگاری به شرایط منطقه و دارا بودن ژن‌های مفید، در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر نواحی رتروترانسپوزون و نیز ISSR، پویس جدیدی از ژنوم این گیاه مورد بررسی قرار گرفت ضمن اینکه توسعه این نشانگرها در تحقیقات بعدی روی برنج همچون مکان‌یابی و تجزیه ارتباطی می‌تواند با استفاده از نتایج این تحقیق تسهیل و تسریع گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این تحقیق شامل ۴۰ لاین و رقم محلی و اصلاح شده برنج شامل نعمت، بینام، دشت، چمپاودار، سالاری، عنبربو، دم‌سفید، دم سرخ، موسی طارم، ساحل، شاه‌پسند، ندا، دم‌سیاه، قشنگه، سنگ‌جو، دم زرد، کادوس، صالح، هیبرید بهار، خزر، طارم محلی، هاشمی، شفق، سنگ طارم، غریب سیاه ریحانی، علی‌کاظمی، سفیدرود، گیل ۱، فجر، گیل ۳، لاین ۶، گوهر، حسن‌سرای، طارم منطقه، صدری، أمل ۳، بچار، طارم‌دیلمانی، غریب و حسنی بوده که از مرکز تحقیقات برنج گیلان (رشت) تهیه شد. نمونه‌های بذر در گلدان و در گلخانه کشت شد و در مرحله گیاهچه‌ای از نمونه برگی آن‌ها استخراج DNA به روش CTAB (۲۵) با اندکی تغییر صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر (Hamburg 22331 eppendorf مدل) تعیین شد. DNAهای استخراجی با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق و از آن‌ها در واکنش‌های PCR استفاده شد. نشانگرهای مورد استفاده شامل ۱۱ آغازگر ISSR (۳۹)، هفت آغازگر ترکیبی REMAP (سه آغازگر رتروترانسپوزونی از خانواده Tos شامل Tos-1، Tos-2، و Tos-3 در ترکیب باپرایمرهای ISSR) و دو آغازگر ترکیبی IRAP (ترکیب آغازگرهای رتروترانسپوزن) بود. واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل حدود ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۴ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۰/۴ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۸ میکرولیتر آغازگر ۱۰ میکرو مولار، یک میکرولیتر بافر PCR 1X و یک واحد آنزیم Taq پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Astec مدل PC 818 ساخت ژاپن) در سال ۱۳۹۰ و در دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان انجام شد. چرخه حرارتی به صورت ۴ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در $94^{\circ}C$ ، سپس ۳۵ سیکل بصورت ۴۰ ثانیه واسرشته‌سازی در $94^{\circ}C$ ، ۴۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر

هستند. برای مثال حدود ۲۲-۱۷ درصد از ژنوم برنج به وسیله‌ی رتروترانسپوزون‌ها اشغال شده است و حتی این نسبت در ژنوم‌های بزرگ شبیه ذرت (بیش از ۸۰ درصد) و گندم معمولی (حدود ۹۰ درصد) بزرگ‌تر است (۱۱، ۱۷، ۲۲). توزیع، بی‌نظمی و فراوانی رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم‌های گیاهی استفاده از آن‌ها را به عنوان نشانگرهای مولکولی، بسیار ایده‌آل می‌سازد. رتروترانسپوزون شامل نواحی محفوظ، مشخص و طولانی بوده که می‌توانند برای طراحی آغازگر استفاده شوند (۳۳). محفوظ بودن این توالی‌ها سبب می‌شود آغازگرهای طراحی شده در یک گونه برای گونه‌های دیگر نیز استفاده شود (۱۶). از مهم‌ترین نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها می‌توان به IRAP^۱ و REMAP^۲ اشاره نمود. نشانگر IRAP چندشکلی مبتنی بر الحاق رتروترانسپوزون‌ها را با تکثیر ناحیه‌ی بین دو عنصر رتروترانسپوزونی آشکار می‌سازد. در این روش آغازگرها (یک یا دو آغازگر) معمولاً براساس بخش بیرونی LTRها طراحی می‌شوند. آغازگرها ممکن است براساس ناحیه انتهایی LTR به طرف نواحی بیرونی رتروترانسپوزون و یا سایر نواحی محفوظ رتروترانسپوزون‌ها طراحی شوند. همچنین اندازه‌ی محصولات تکثیر شده برای این آغازگرها معمولاً ۱۰۰ جفت باز تا چندین کیلو باز می‌باشند (۱۵).

روش REMAP، شبیه به IRAP است. اما یکی از دو آغازگر با یک موتیف ریزماهواره جفت می‌شود (۱۶). REMAP شیوه‌ای است که رتروترانسپوزون‌های اختلاط یافته با یک ریزماهواره مجاور می‌توانند آشکار شوند، این روش بسته به نحوه‌ی توزیع خانواده‌ی رتروترانسپوزونی روی ژنوم گیاه مورد مطالعه ده‌ها تا صدها محصول در هر واکنش تکثیر، تولید می‌کند (۳۳). نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌های LTR در روش‌های بالا نسبتاً جدید بوده و در طی ۱۳ سال از زمان معرفی حداقل ۹۹ تحقیق با استفاده از این سیستم‌های نشانگری تا پایان سال ۲۰۰۹ منتشر شده است که تنوعی از غلات و چمن‌ها تا نارگیل، گوجه‌فرنگی، فلفل، گونه‌های حبوبات، قارچ‌ها، پرندگان و حشرات را شامل می‌شود (۱۶).

در مطالعه‌ای با استفاده از ۱۹ نشانگر ISSR و ۱۲ آغازگر ISSR-PCR ارتباط ژنتیکی بین واریته‌های برنج باسامتی محلی، باسامتی اصلاح شده و غیرباسامتی پاکوتاه ارزیابی شدند. نتایج نشان داد واریته‌های باسامتی محلی کمترین تنوع ژنتیکی و واریته‌های باسامتی اصلاح شده بیشترین تنوع را نشان دادند. آن‌ها همچنین تعدادی از نشانگرهایی که توانسته بودند واریته‌های باسامتی محلی مورد استفاده را به صورت واضح از واریته‌های برنج اصلاح شده و غیرباسامتی متمایز کنند را شناسایی کردند که در برنامه‌های اصلاح برنج باسامتی و نیز تأیید واریته‌های محلی کاربرد دارند (۲۷). محققین دیگری تنوع ژنتیکی بین ۳۴ جمعیت برنج وحشی (Oryza meyeriana Baill) را با استفاده از ۱۳ نشانگر ISSR بررسی کردند. در مجموع این جمعیت‌ها با استفاده از روش UPGMA بر اساس مناطق مربوطه گروه‌های مختلفی تقسیم شدند (۴۰). در مطالعات دیگری از نشانگرهای ISSR،

1- Inter-Retro transposon Amplified Polymorphism
3- Long Terminal Repeat

2- Retro transposon-Microsatellite Amplified Polymorphism

نرم افزار Genstat نسخه ۱۲ (۳۷) و برای انجام تجزیه تابع تشخیص از نرم افزار SPSS 16.0 (۲) استفاده شد.

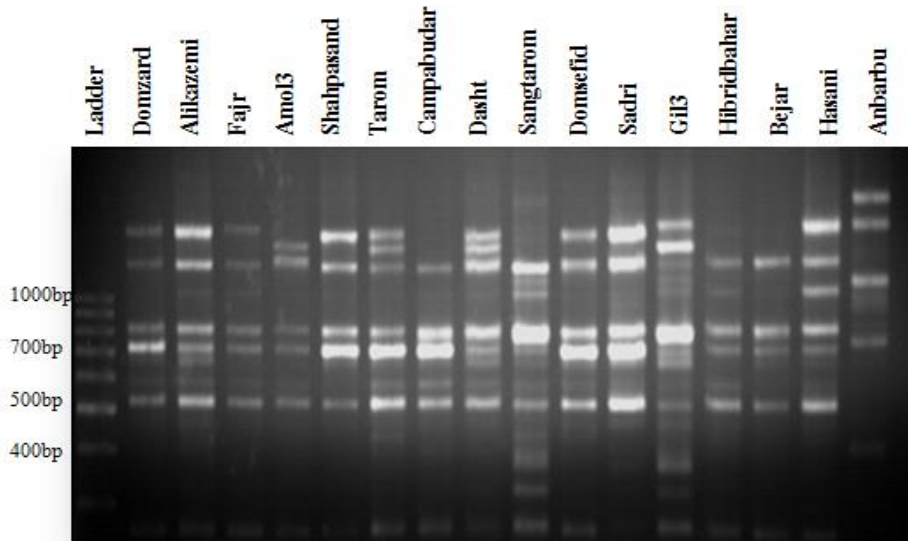
نتایج و بحث

ارقام برنج ایرانی، منبع غنی از تنوع زیستی را تشکیل می دهند و جهت حفظ و استفاده از آن نیاز است که ساختار ژنتیکی آن ها به خوبی شناسایی شود. به این منظور در این پژوهش ۳۰ ترکیب آغازگری ISSR و رتروترانسپوزون مورد استفاده قرار گرفت که بر اساس الگوی نواریندی واضح، قابلیت امتیازدهی و تکرارپذیری، تعداد ۲۰ ترکیب آغازگری شامل ISSR، IRAP و REMAP انتخاب (جدول ۱) و بر آن اساس تنوع ژنتیکی ۴۰ ژنوتیپ برنج بومی و اصلاح شده ایرانیمورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود نشانگرهای مذکور توانسته اند ضمن بروز چندشکلی قابل ملاحظه، الگوی واضح و با کیفیتی را تولیدکننده نشان دهند توانمندی این نوع نشانگرها برای مطالعات بیشتر در گیاه برنج می باشد.

بسته به دمای اتصال هر آغازگر (جدول ۱)، ۲ دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲°C و ۵ دقیقه بسط نهایی در دمای ۷۲°C بود. محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز روی ژل آغاز ۱/۵ درصد بارگذاری و الکتروفورز ژل با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۸۰ دقیقه انجام شد. رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید و آشکارسازی باندها زیر نور UV دستگاه ژل داک (Bio-Rad 2000) انجام گرفت. الگوی باندی بر اساس وجود (یک) یا عدم وجود (صفر) نوارها نمره دهی شدند. میزان چندشکلی نشانگر^۱، با استفاده از فرمول

$$PIC=2\sum P_i(1-P_i)$$

محاسبه شد (۳۱)، در این فرمول P_i فراوانی آلل نام برای هر نشانگر می باشد. جهت گروه بندی ابتدا تفاوت و مشابهت ژنوتیپها بر اساس روش تطابق ساده تهیه و گروه بندی با استفاده از روش UPGMA (۳۶) و به کمک نرم افزار NTSYS (۲۸) انجام شد و به منظور محاسبه میزان چند شکلی نشانگر و تنوع ژنی نی از نرم افزار Popgen نسخه ۱/۳۱ استفاده شد (۴۱). جهت تجزیه به مختصات اصلی از



شکل ۱- الگوی باندی REMAP حاصل از تکثیر ارقام برنج با استفاده از آغازگر UBC815+TOS2
Figure 1. REMAP banding pattern generated by rice cultivars using UBC815+TOS2 primer

میان ژنوتیپها نیز از ۴۵/۴۵ درصد برای آغازگر TOS1، تا ۱۰۰ درصد برای آغازگرهای ISSR (UBC811، UBC813، UBC815، UBC817، UBC823، ISSR425) و آغازگرهای ترکیبی REMAP (TOS2+UBC815، TOS2+UBC817، TOS2+UBC825، TOS2+UBC826، TOS2+ISSR425) نوسان داشت. میانگین درصد چندشکلی آغازگرها برای ژنوتیپهای مذکور ۸۸/۰۳ درصد بود که بیانگر میزان تنوع ژنتیکی قابل توجه آن هاست (جدول ۱).

با استفاده از آغازگرهای فوق در مجموع ۳۰۹ نوار تشکیل شد که ۲۷۲ نوار از آن ها چندشکل بودند. تعداد نوارهای تشکیل شده برای آغازگرها متفاوت بود. از ۹ نوار برای آغازگر UBC817 (کمترین تعداد نوار) تا ۲۱ نوار برای آغازگر UBC812 و آغازگرهای ترکیبی TOS2+UBC826 که بیشترین تعداد نوار را داشتند متغیر بود. تعداد نوارهای چندشکل نیز از ۵ تا ۲۱ نوار متغیر بود که کمترین تعداد نوار چندشکل متعلق به آغازگر رتروترانسپوزون TOS1 و بیشترین تعداد از آن ها برای آغازگرهای ترکیبی (REMAP)، TOS2+UBC826 بود. بر این اساس درصد چندشکلی در

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده، دمای اتصال، درصد چندشکلی، تعداد نوار، تعداد نوار چندشکل و توالیها
 Table 1. List of used primers, annealing temperature, polymorphism percentage, band numbers, polymorphism band numbers and sequences

توالی	تعداد نوار چندشکل	تعداد نوار	درصد چندشکلی	دمای اتصال	نام آغازگر	نوع نشانگر
GAGAGAGAGAGAGAGAC	۱۵	۱۵	۱۰۰	۴۳	UBC811	ISSR
GAGAGAGAGAGAGAGAA	۱۵	۲۱	۷۱/۴۳	۴۲	UBC812	ISSR
CTCTCTCTCTCTCTT	۱۰	۱۰	۱۰۰	۴۲	UBC813	ISSR
CTCTCTCTCTCTCTA	۱۳	۱۹	۶۸/۴۲	۴۱	UBC814	ISSR
CTCTCTCTCTCTCTG	۱۵	۱۵	۱۰۰	۴۳	UBC815	ISSR
CACACACACACACAAA	۹	۹	۱۰۰	۴۷	UBC817	ISSR
TCTCTCTCTCTCTCC	۱۴	۱۴	۱۰۰	۴۴	UBC823	ISSR
ACACACACACACACACC	۱۲	۱۷	۷۰/۵۹	۴۹	UBC826	ISSR
GACAGACAGACAGACA	۱۲	۱۶	۷۵	۴۳	UBC876	ISSR
ACACACACACACACACC	۱۳	۱۳	۱۰۰	۶۰/۲	ISSR425	ISSR
CACACACACACACACAG	۱۳	۱۹	۶۸/۴۲	۵۸	ISSR440	ISSR
TGTTGGGAATAGTCCACA	۵	۱۱	۴۵/۴۵	۵۹/۳	TOS1	IRAP
TGTTAGAAGTATAATATGT	۱۰	۱۲	۸۳/۳۳	۵۳/۳	TOS1+TOS3	IRAP
TGTTGAATAGTCCACATT	۱۵	۱۶	۹۳/۷۵	۴۸	TOS2+UBC811	REMAP
	۱۸	۱۸	۱۰۰	۴۸	TOS2+UBC815	REMAP
	۱۴	۱۴	۱۰۰	۴۹/۴	TOS2+UBC817	REMAP
	۱۵	۱۶	۹۳/۷۵	۵۰	TOS2+UBC823	REMAP
	۱۶	۱۶	۱۰۰	۴۹	TOS2+UBC825	REMAP
	۲۱	۲۱	۱۰۰	۵۱/۳	TOS2+UBC826	REMAP
	۱۷	۱۷	۱۰۰	۶۰	TOS2+ISSR425	REMAP
	۲۷۲	۳۰۹	۸۸/۰۳			کل

برای آغازگرهای JSSR440، TOS2+UBC811 و TOS1+TOS3 با مقدار ۰/۴۸ و کمترین میزان تنوع مربوط به آغازگرهای UBC817 و TOS2+UBC815 با مقدار ۰/۲۵ بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی برای کل ژنوتیپها و آغازگرهای مورد مطالعه برابر ۰/۳۵ بود. یکی دیگر از شاخصهای تنوع، شاخص شانون می‌باشد. میانگین شاخص شانون برای کلیه آغازگرهای مورد مطالعه در جمعیت ۰/۵۷ به دست آمد. همانند تنوع ژنی، بیشترین و کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به آغازگرهای UBC811 و TOS2+UBC815 به ترتیب با مقادیر ۰/۶۵ و ۰/۴۲ بود. شاخص شانون بالای آغازگر UBC811، نشان‌دهنده این است که این آغازگر می‌تواند تنوع ژنتیکی موجود را بهتر نمایش دهد و بنابراین برای ارزیابی تنوع درون جمعیتی مناسب است. همچنین تنوع ژنتیکی مشاهده شده در تعدادی از ارقام خیلی محدود است که ممکن است نتیجه‌ی سابقه‌ی طولانی کشت آن‌ها و تطبیق با شرایط agroclimatic محل باشد و یا شاید نتیجه‌ی زمینه‌ی ژنتیکی محدود آن‌ها باشد (۳۵). به منظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) محاسبه شد. بیشترین میزان EMR برای آغازگرهای ترکیبی TOS2+UBC826 با مقدار ۲۱ و کمترین میزان آن برای آغازگر TOS1 با مقدار ۲/۲۷ بود. میزان MI برای آغازگرهای مختلف بین ۰/۷۳ تا ۶/۷۵ نوسان داشت که کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر TOS1 و بیشترین مقادیر نیز متعلق به آغازگرهای TOS2+UBC811، TOS2+UBC826 و TOS2+UBC825 به ترتیب با مقادیر ۶/۷۵، ۶/۵۱ و ۶/۰۵ بود (جدول ۲).

در تحقیق مشابه‌ای روی ۴۹ ژنوتیپ مختلف توتون از آغازگرهای رتروترانسپوزن و ISSR بصورت تنها و ترکیبی استفاده شد (۲۴) که تعدادی از آغازگرها از جمله سه آغازگر رتروترانسپوزن با آغازگرهای تحقیق حاضر مشترک بود. نتایج تحقیق آن‌ها نیز مانند این مطالعه، تکثیر موفق و نوارهای واضح روی ژل بود که به راحتی بین ژنوتیپها قابل نمره‌دهی و ارزیابی بودند، ضمن اینکه نشانگرهای رتروترانسپوزن در هر دو تحقیق چند شکلی بالایی را نشان دادند که دلالت بر کارایی این نشانگرها برای ارزیابی‌های ژنتیکی در این دو گونه می‌باشد. ارزیابی تنوع ژنتیکی یک جزء مهم در شناسایی ژرم پلاسم و حفظ آن است. نتایج به دست آمده از تنوع ژنتیکی در سطح DNA به کمک نشانگرهای مولکولی می‌تواند برای طراحی برنامه‌های اصلاحی مؤثر و توسعه‌ی اساس ژنتیکی واریته‌های تجاری به کار برده شود. بر این اساس در این تحقیق جهت ارزیابی نشانگرها از تنوع ژنی، شاخص PIC و شاخص تنوع شانون استفاده شد. تنوع ژنی نی که اغلب هتروزیگوسیتی مورد انتظار نامیده می‌شود، احتمال متفاوت بودن دو آلل انتخاب شده به طور تصادفی از دو فرد را نشان می‌دهد و فاصله‌ی ژنتیکی تفاوت بین دو موجود است و می‌تواند به وسیله‌ی اختلاف‌آلی توصیف شود (۲۸). در این مطالعه میانگین تنوع ژنی نی برآورد شده برای کل ژنوتیپها ۰/۳۹ به دست آمد. آغازگر UBC811 با ۰/۴۶ و آغازگرهای ترکیبی TOS2+UBC815 با ۰/۲۷ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان تنوع ژنی را دارا بودند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها و معیار دقیق‌تری از میزان تنوع هر ژن را بیان می‌کند که مستقل از تعداد نمونه مورد مطالعه می‌باشد (۴). بیشترین میزان PIC

جدول ۲- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR)، شاخص نشانگری (MI)، تنوع ژنی نی و شاخص شانون برای نشانگرهای REMAP، ISSR و IRAP در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

Table 2. Polymorphism Information Content (PIC), Effective Multiplex Ratio (EMR), Marker Index (MI), Nei's Diversity Index and I: Shannon's information index for ISSR, REMAP and IRAP markers in studied rice genotypes

نوع نشانگر	نام آغازگر	PIC	EMR	MI	تنوعی ژنی نی	شاخص شانون
ISSR	UBC811	۰/۳۱	۱۵	۴/۶۵	۰/۴۶	۰/۶۵
ISSR	UBC812	۰/۳۷	۱۰/۷۱	۳/۹۶	۰/۴۳	۰/۶۲
ISSR	UBC813	۰/۳۶	۱۰	۳/۶	۰/۴۴	۰/۶۴
ISSR	UBC814	۰/۴۲	۸/۸۹	۳/۷۳	۰/۴۳	۰/۶۲
ISSR	UBC815	۰/۳۲	۱۵	۴/۸	۰/۳۵	۰/۵۳
ISSR	UBC817	۰/۲۵	۹	۲/۲۵	۰/۴۳	۰/۶۲
ISSR	UBC823	۰/۳۶	۱۴	۵/۰۴	۰/۳۹	۰/۵۷
ISSR	UBC826	۰/۳۱	۸/۴۷	۲/۶۳	۰/۴۲	۰/۶۰
ISSR	UBC876	۰/۳۴	۹	۳/۰۶	۰/۴۳	۰/۶۲
ISSR	ISSR425	۰/۳۷	۱۳	۴/۸۱	۰/۳۸	۰/۵۶
ISSR	ISSR440	۰/۴۸	۸/۸۹	۴/۲۷	۰/۳۸	۰/۵۶
IRAP	TOS1	۰/۳۲	۲/۲۷	۰/۷۳	۰/۳۷	۰/۵۶
IRAP	TOS1+TOS3	۰/۴۸	۸/۳۳	۴	۰/۳۳	۰/۵۱
REMAP	TOS2+UBC811	۰/۴۸	۱۴/۰۶	۶/۷۵	۰/۴۰	۰/۵۹
REMAP	TOS2+UBC815	۰/۲۵	۱۸	۴/۵	۰/۳۷	۰/۴۲
REMAP	TOS2+UBC817	۰/۲۸	۱۴	۳/۹۲	۰/۳۴	۰/۵۱
REMAP	TOS2+UBC823	۰/۳۴	۱۴/۰۶	۴/۷۸	۰/۴۲	۰/۶۱
REMAP	TOS2+UBC825	۰/۳۸	۱۶	۶/۰۸	۰/۴۰	۰/۵۸
REMAP	TOS2+UBC826	۰/۳۱	۲۱	۶/۵۱	۰/۴۲	۰/۶۰
REMAP	TOS2+ISSR425	۰/۳۵	۱۷	۵/۹۵	۰/۲۸	۰/۴۴
میانگین		۰/۳۵		۴/۳۰	۰/۳۹	۰/۵۷

شاخص نشانگری و ... حاصل از کاربرد آغازگرهای ISSR و REMAP در جدایه‌های قارچ عامل بلاست برنج به این نتیجه رسیدند که آغازگرهای REMAP کارآتر از ISSR هستند (۷). در پژوهش‌هایی نیز نتیجه گرفته‌اند که ISSR می‌تواند ابزار بهتری از RAPD برای مطالعات فیلوژنتیک باشد (۱۰، ۱). در مطالعه‌ی دیگری نیز گزارش گردید که آغازگرهای ISSR چندین مرتبه اطلاعات بهتری از نشانگرهای RAPD را در گندم تولید کردند (۲۶).

به‌طور کلی در مقایسه، نشانگرهای REMAP پلی‌مورفیسم بالاتری را نسبت به ISSR و IRAP نشان دادند. میانگین نشانگرهای چندشکل، درصد چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) مربوط به نشانگرهای ISSR، REMAP و IRAP به صورت مقایسه‌ای در جدول ۳ ارائه شده است.

در تحقیق دیگری نیز با مقایسه‌ی پارامترهایی مانند تعداد کل نوارها، تعداد نوارهای چندشکل، درصد چندشکلی، تعداد نوارهای هر آغازگر، نوارهای چندشکل هر آغازگر، PIC،

جدول ۳- تجزیه‌ی الگوی باندهای تولید شده به‌وسیله نشانگرهای REMAP و ISSR

Table 3. Analysis of banding patterns produced by ISSR, IRAP and REMAP markers

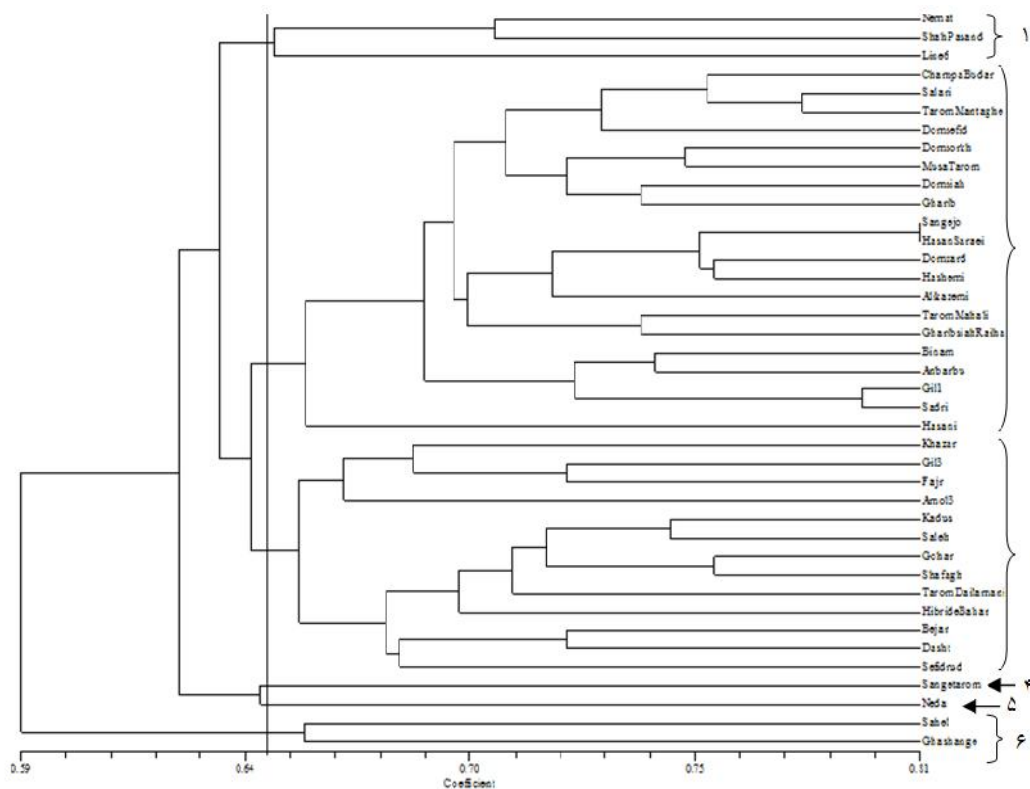
مؤلفه	ISSR	REMAP	IRAP
تعداد آغازگرها	۱۱	۷	۲
تعداد نوارها	۱۶۸	۱۱۸	۲۳
تعداد نوار برای هر آغازگر	۱۵/۲۷	۱۶/۸۶	۱۱/۵
میانگین نوارهای چندشکل	۱۲/۸۲	۱۶/۵۷	۷/۵
درصد چندشکلی	۸۶/۷۱	۹۸/۲۱	۶۴/۳۹
EMR	۱۱/۰۹	۱۶/۳۰	۵/۳
MI	۳/۸۹	۵/۵۰	۲/۳۶

تفکیک نمود و میزان تشابه از ۵۹ تا ۸۱ درصد متغیر بود. ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس تشابه اولیه و ماتریس کوفنتیک که از فرآیند خوشه‌بندی و دندروگرام به دست آمد حدود ۰/۷۳ بود که نشان‌دهنده دقت مناسب خوشه‌بندی می‌باشد. گروه‌بندی با ترسیم خط برش از ناحیه تشابه حدود ۰/۶۵ انجام و ژنوتیپ‌ها به ۶ گروه تقسیم شدند (شکل ۲). در این تقسیم‌بندی ارقام نعمت، شاه پسند و لاین ۶ در گروه یک قرار گرفتند که ضریب تشابه بین ارقام این

بر این اساس، به نظر می‌رسد نشانگرهای مبتنی بر توالی‌های رتروترانسپوزون همچون REMAP در ژنوم برنج تنوع قابل ملاحظه‌ای دارند، بنابراین می‌توانند با کارایی بالا برای تحقیقات ژنتیکی و اصلاحی این گونه بکار روند. جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها ابتدا تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنوتیپ‌ها بر اساس روش تطابق ساده (SM) محاسبه و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش UPGMA انجام شد. دندروگرام حاصل ۴۰ ژنوتیپ برنج را در سطح تشابه ۸۱ درصد از یکدیگر

ژنوتیپ‌ها بر اساس منشأ و خصوصیات ژنتیکی آن‌ها کاملاً از یکدیگر تفکیک نماید. در عین حال مشاهده می‌شود تفکیک ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای مذکور توانسته گروه‌بندی قابل قبولی را ایجاد نماید. به عنوان نمونه، ژنوتیپ‌ها در گروه دوم همگی از ارقام بومی و با کیفیت منطقه می‌باشند و یا در گروه سوم به جز طارم دیلمانی و بجا همه ژنوتیپ‌ها ارقام اصلاح شده‌می‌باشند. این نتایج نشان می‌دهند نشانگرهای مورد استفاده احتمالاً بیشتر در نواحی ژنی و بیان شونده ژنوم قرار گرفته‌اند و به همین دلیل دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها تفکیک بهتری را ایجاد نموده و از توجیه قابل قبولی برخوردار است. البته در تأیید این مطلب گفته می‌شود نواحی LTR رتروترانسپوزون‌ها عمدتاً در مجاورت نواحی رمزکننده ژنوم قرار دارند (۶). میردیکوند و همکاران (۲۳) در مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی برنج‌های ایرانی با استفاده از اطلاعات هفت مکان ژنی آیزوایم، ۱۲۰ ژنوتیپ انتخابی از ژرم‌پلاسما برنج ایران را به روش UPGMA به ۷ گروه تقسیم نمودند. در گروه‌بندی انجام شده ژنوتیپ‌هایی مانند سالاری، دم سرخ، موسی طارم، دمسیاه، غریب، حسن سرایی، دم زرد، بینام، عنبربو، صدری و حسنی نیز در یک گروه قرار گرفتند که با گروه دوم تحقیق حاضر مطابقت دارند.

گروه از حدود ۰/۶۵ تا ۰/۷۱ متغیر بود. گروه دوم که عمدتاً ارقام بومی با کیفیت خوب بودند شامل چمپادار، سالاری، طارم منطقه، دم سفید، دم سرخ، موسی طارم، دمسیاه، غریب، سنگ جو، حسن سرایی، دم زرد، هاشمی، علی کاظمی، طارم محلی، غریب سیاه ریحانی، بینام، عنبربو، گیل ۱، صدری و حسنی می‌باشد که تشابه بین ارقام از حدود ۰/۶۶ تا ۰/۸۱ متغیر و بیشترین تشابه در این گروه بین دو رقم سنگ جو و حسن سرایی با ضریب تشابه ۰/۸۱ بود. خزر، گیل ۳، فجر، أمل ۳، کادوس، صالح، گوهر، شفق، طارم دیلمانی، هیبرید بهار، بجا، دشت و سفیدرود نیز با وجود ضریب تشابه حدود ۰/۶۶ تا ۰/۷۵ در گروه سوم قرار گرفتند. سنگ طارم و ندا هر یک در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند و تفاوت زیادی با سایر ارقام داشتند و دو رقم ساحل و قشنگه نیز که ضریب تشابه حدود ۰/۶۶ داشتند در گروه ششم قرار گرفتند. با توجه به اینکه ارقام دورتر تفاوت ژنتیکی بیشتری دارند بنابراین انجام تلافی بین ارقام دورتر، در صورتی که دارای صفات تکمیل کننده یکدیگر باشند می‌تواند کارایی تولید هیبرید و امکان ایجاد هتروزیس را بیشتر نماید. اگر چه استفاده از تنها ۲۰ نشانگر سطح اندکی از ژنوم برنج را پوشش می‌دهد و بنابراین نمی‌توان انتظار داشت که این گروه‌بندی بتواند



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه تطابق ساده برای ۴۰ ژنوتیپ برنج مورد مطالعه
 Figure 2. Dendrogram of 40 studied rice genotypes using UPGMA (Unweighted Pair Group Means Analysis) clustering method and simple matching similarity coefficient

مولکولی توجیه مقادیر اندکاز تنوع موجود بین نشانگرها توسط چند مؤلفه‌ی اصلی اول، دلیل بر استقلال مکان‌ها و نشانگرهای مورد مطالعه و توزیع آن‌ها در نواحی مختلف ژنوم است. بنابراین اگر نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند پیوستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه تعداد بیشتری مؤلفه برای توجیه تغییرات کل آن‌ها مورد نیاز است. نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که نشانگرهای مورد استفاده در این پژوهش در نواحی مختلف ژنوم پراکنده هستند.

تجزیه به مختصات اصلی ر اساس ماتریس تشابه به‌دست آمده از ضریب تطابق ساده انجام شد. مقادیر مختصات محاسبه شده برای ۱۷ مؤلفه‌ی اول و میزان تغییراتی که توسط آن‌ها توجیه می‌شود در جدول ۴ آورده شده است. در این جدول مشاهده می‌شود که مؤلفه‌ی اصلی اول تنها ۸/۳۶ درصد و مجموع ۱۷ مؤلفه‌ی اول ۶۷/۸۱ درصد از تغییرات مربوط به ۲۰ آغازگر مورد مطالعه را توجیه کردند. همان‌طور که مورد انتظار بود مؤلفه‌ی اول بیشترین سهم را در توجیه تغییرات داشت. در داده‌های مربوط به نشانگرهای

جدول ۴- درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی برای ۱۷ مؤلفه اول
Table 4. variance percentage and cumulative variance percentile for first 17 principal coordinates

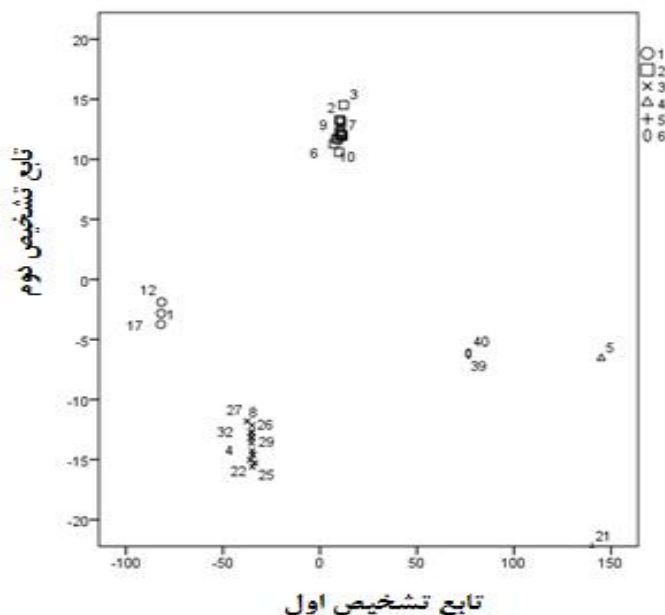
مؤلفه اصلی	مقادیر ویژه	درصد واریانس	درصد واریانس تجمعی
۱	۱/۱۴	۸/۳۶	۸/۳۶
۲	۰/۹۲	۶/۷۵	۱۵/۱۱
۳	۰/۷۹	۵/۷۷	۲۰/۸۸
۴	۰/۶۵	۴/۷۴	۲۵/۶۲
۵	۰/۵۹	۴/۳۴	۲۹/۹۶
۶	۰/۵۷	۴/۱۵	۳۴/۱۱
۷	۰/۵۳	۳/۹	۳۸/۰۱
۸	۰/۴۹	۳/۶۱	۴۱/۶۲
۹	۰/۴۸	۳/۴۹	۴۵/۱۱
۱۰	۰/۴۶	۳/۴۱	۴۸/۵۲
۱۱	۰/۴۱	۳/۰۴	۵۱/۵۶
۱۲	۰/۴۱	۳/۰۲	۵۴/۵۸
۱۳	۰/۴۰	۲/۹۱	۵۷/۴۹
۱۴	۰/۳۸	۲/۸۰	۶۰/۲۹
۱۵	۰/۳۷	۲/۷۴	۶۳/۰۳
۱۶	۰/۳۳	۲/۴۲	۶۵/۴۵
۱۷	۰/۳۲	۲/۳۶	۶۷/۸۱

نتیجه گرفت که تابع تشخیص تقسیم ارقام در شش گروه به وسیله تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌نماید. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۶۷/۵ درصد برآورد شد. شکل ۳ مربوط به گروه‌بندی ارقام بر اساس توابع تشخیص اول و دوم است که به خوبی تقسیم ارقام در شش گروه به وسیله تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌نماید.

صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای نیز به وسیله تجزیه تابع تشخیص مورد آزمون قرار گرفت. با توجه به جدول ۵، توابع تشخیص اول تا پنجم به ترتیب ۷۸/۲ درصد، ۱۸/۱ درصد، ۳/۳ درصد، ۰/۳ درصد و صفر درصد از واریانس موجود و در مجموع ۱۰۰ درصد تنوع داده‌ها را توجیه نمودند. بنابراین پنج تابع تشخیص، کل تنوع موجود بین ارقام و گروه‌های اولیه را توصیف نموده‌اند. به این ترتیب می‌توان

جدول ۵- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر بر اساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای
Table 5. Canonical discriminant functions generated by Fisher's linear method based on premier grouping resulted from cluster analysis

تابع تشخیص کانونی	واریانس (درصد)	واریانس تجمعی (درصد)	همبستگی کانونی
اول	۷۸/۲	۷۸/۲	۱
دوم	۱۸/۱	۹۶/۳	۱
سوم	۳/۳	۹۹/۶	۹۹/۸
چهارم	۰/۳	۱۰۰	۹۷/۶
پنجم	۰	۱۰۰	۸۲/۰



شکل ۳- نمودار تنوع ژنتیکی ۴۰ ژنوتیپ برنج ایرانی با استفاده از تجزیه تابع تشخیص بر مبنای ۲۰ ترکیب آغازگری ISSR، IRAP و REMAP
Figure 3. Graphic representation genetic diversity of 40 Iranian rice genotypes using discriminant function analysis based on 20 primer combinations of ISSR, IRAP and REMAP

درصد و برای ISSR، ۶۴ درصد بود. بر اساس نتایج تحقیق مذکور آن‌ها راهکارهای مناسب مانند نجات و نگهداری از جمعیت‌های مرکزی جهت نگهداری در شرایط آزمایشگاه، نمونه‌برداری و نگهداری از جمعیت‌های بیشتر با تعداد افراد کمتر از هر جمعیت را برای حفظ منابع ژنتیکی این گونه‌ها پیشنهاد کردند (۳۸). همچنین نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی میان ۲۳ واریته برنج، شامل ۱۶ گونه غیرباسماتی معطر، ۵ گونه باسماتی و ۲ گونه غیرعطری، از طریق نشانگرهای ISSR و RAPD نشان داد که درصد چندشکلی آن‌ها به ترتیب ۶۵ و ۸۰ درصد بود. آن‌ها با استفاده از ترکیب داده‌های حاصل از هر دو سیستم نشانگری توانستند گونه‌های برنج باسماتی و غیرباسماتی را به طور جداگانه گروه‌بندی نمایند. این مطالعه همچنین تنوع ژنتیکی بالایی را در میان گونه‌های برنج معطر غیرباسماتی آشکار کرد (۲۱). با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه که عمدتاً از ارقام بومی و اصلاح شده برنج می‌باشند از تنوع بالایی برخوردارند. همچنین ژنوم این گونه از توزیع پراکنده‌ای برای توالی‌های رتروترانسپوزنی برخوردار است و به همین دلیل نشانگرهای مبتنی بر این توالی‌ها همچون IRAP و REMAP می‌توانند در تحقیقات ژنتیکی این گونه با موفقیت ظاهر شوند و برای اهدافی مانند تهیه نقشه‌های ژنتیکی و تجزیه ارتباطی قابل توصیه باشند.

در یک پژوهش از ۱۶ ترکیب آغازگری REMAP و ۶ ترکیب آغازگری IRAP جهت بررسی تشابه میان ۵۱ ژنوتیپ برنج از کشورهای ژاپن، برزیل و فیلیپین استفاده گردید. گروه‌بندی بر اساس روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را به ۸ گروه مجزا تفکیک کرد. آن‌ها بیان کردند با مقایسه‌ی نتایج حاصل از IRAP و REMAP ثابت شده است که این نشانگرها مانند AFLP نشانگرهای مولکولی قابل اطمینانی هستند و همچنین اطلاعات بیشتری نیز در اختیار قرار می‌دهند که نشان‌دهنده‌ی پتانسیل زیاد این نشانگرها در تشخیص‌های ژنومی برای مطالعات انگشت نگاری، مکان‌یابی و تنوع می‌باشند (۵).

محبوب و همکاران (۲۰) جهت شناسایی نشانگرهای ISSR مؤثر در تفکیک گونه‌های جنس براسیکا، از ۳۶ ژنوتیپ جنس براسیکا و ۱۳ نشانگر ISSR استفاده کردند که تعدادی از آغازگرها با آغازگرهای مطالعه حاضر مشترک بودند. نتایج نشان داد که این نشانگرها می‌توانند برای شناسایی تفاوت‌های بین گونه‌ای و همچنین داخل گونه‌ای در مطالعات فیلوژنی استفاده شود.

پژوهشگران به منظور ارزیابی و محافظت از گونه‌های وحشی برنج (*Oryza granulata*) در معرض خطر، تنوع ژنتیکی تعدادی از جمعیت‌های وحشی برنج را با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی کردند. درصد نوارهای چندشکل بین ۱۴ جمعیت برای نشانگرهای RAPD، ۵۹

منابع

1. Ajibade, S.R., N.F. Weeden and S. Michite. 2000. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica*, 111: 47-55.
2. Anonymous. 2007. The SPSS system for Windows. Release 16.0.SPSS Inc., an IBM Company Headquarters, USA.
3. Bennetzen, J.L. 2000. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology*, 42: 251-269.
4. Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
5. Branco, C.J.S., E.A. Vieira, G. Malone, M.M. Kopp, E. Malone, A. Bernardes, C.C. Mistura, F.I.F. Carvalho and Costa A. Oliveira. 2007. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *Journal of Applied Genetics*, 48: 107-113.
6. Casacuberta, J.M. and N. Santiago. 2003. Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene*, 311: 1-11.
7. Chadha, S. and T. Gopalakrishna. 2007. Comparative assessment of REMAP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*. *Current Science*, 93: 688-692.
8. Dash, S.K., J. Singh, M. Tripathy and D. Mishra. 1996. Association of quantitative traits and path analysis in medium landrice. *Environment and ecology*, 14: 99-102.
9. Derierwala, A.P., W. Ramakrishna, P.H. Ranjekar and V.S. Gupta. 2000. Sequence variations at a complex microsatellite locus in rice and its conservation in cereals. *Theoretical and Applied Genetic*, 101: 323-341.
10. Galvan, M.Z., B. Bornet, P.A. Balatti and M. Branchard. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) marker as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 132: 297-301.
11. Gao, L., E.M. McCarthy and E.W. Ganko. 2004. Evolutionary history of *Oryza sativa* LTR retrotransposons: a preliminary survey of the rice genome sequences. *BMC Genomics*, 5: 1-18.
12. Hair, J.R., R.E. Anderson, R.L. Tatham and W.C. Black. 1995. *Multivariate data analysis with readings*. 4th ed, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
13. Hassani Tesie, S.F., H. Samizadeh Lahiji and M. Shoaie Deilami. 2015. Assessment of Genetic diversity among and within different types of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Using IRAP and REMAP markers. *Journal of Crop Breeding*, 7: 1-9 (In Persian).
14. Herrera, T.C.H., D.P. Duque, I.P. Almeida, G.T. Nunez, A.J. Pieters, C.P. Martinez and J.M. Tohme. 2008. Assessment of genetic diversity in Venezuelan rice cultivars using simple sequence repeat markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11:1-14.
15. Kalender, R., T. Grob, M. Regina, A. Soumiemi and A.H. Schulman. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetic*, 98: 704-711.
16. Kalender, R., A.J. Flavell, T.H.N. Ellis, T. Sjakste, C. Moisy and A.H. Schulman. 2011. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*, 106: 520-530.
17. Kashkush, K. 2007. Genome-wide impact of transcriptional activation of long terminal repeat retrotransposons on the expression of adjacent host genes. *Israel Journal of Plant Sciences*, 55: 241-250.
18. Kaye, C., J. Milazzo, S. Rozenfeld, M.H. Lebrun and D. Tharreau. 2003. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genetics and Biology*, 40: 207-214.
19. Lu, G., P.F. Cannon, A. Reidand and C.M. Simmons. 2004. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological Research*, 108: 53-63.
20. Mahjoob, B., H. Najafi-Zarini and S.H.R. Hashemi. 2014. Assessment of Genetic Relationships Among 36 Brassica Genotypes using ISSR Molecular Markers. *Journal of Crop Breeding*, 6: 96-106 (In Persian).
21. Mathure, S., N. Jawali and A. Nadaf. 2010. Diversity Analysis in Selected Non-basmati Scented Rice Collection. *Rice Science*, 17: 35-42.
22. McCarthy, E.M., J. Liu, L.Z. Gao. 2002. Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*. *Genome Biology*, 3(10): research0053.1-0053.11.
23. Mir Derikvand, M., Gh. Nematzadeh, A. Aalamian and B. Ghareyazie. 2004. Evaluation of genetic diversity in Iranian rice using isozyme markers. *Iranian Journal Of Agricultural Sciences*, 35: 143-153.
24. Mohsenzadeh Golfzane, M., H. Samizadeh, A. Aalami, M. Shoaie Daylami and S. Talesh Sasani. 2012. Study of Genetic Diversity among flue-cured Tobacco *Nicotiana tabacum* genotypes using ISSR and retrotransposon markers. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 2: 371-380 (In Persian).
25. Murray, M. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, 8: 4321-4325.
26. Nagaoka, T. and Y. Ogiwara. 1997. Applicability of inter simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 597-602.
27. Nagaraju, J., M. Kathirvel, R. Ramesh Kumar, E.A. Siddiq and S.E. Hasnain. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *PNAS*. 99: 5836-5841.

28. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations, Proceedings of the National Academy of Sciences, 70: 3321-3323.
29. Pandotra, P., M.K. Husain, G. Ram, S. Gupta and A.P. Gupta. 2013. Retrotransposon based genetic status of North-West Himalayan Zingiber officinal revealed high heterogeneity Journal Plant Biochem. Biotechnol DOI10.1007/s13562-013-0196-8.
30. Rohlf, F.J. 1992. NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0, State University of New York, Stony Brook, New York.
31. Roldan-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Vanbockstaele, A. Depicker and M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium spp.*). Molecular Breeding, 6: 125-134.
32. Saker, M.M., S.S. Yossef, N.A. Abdullah, H.S. Bashandy and A.M. Elsharkawy. 2005. Genetic analysis of some Egyptian rice genotype using RAPD, SSR and AFLP. African Journal of Biotechnology, 4: 882-890.
33. Schulman, A.H. 2007. Molecular markers to assess genetic diversity. Euphytica. 158: 313-321.
34. Second, G. 1991. Molecular markers in rice systematics and the evaluation of genetic resources in Y. P.S. Bajaja (ed). Biotechnology in agriculture and forestry, 4: 468-490.
35. Seehalak, W., N. Tomooka, A. Waranyuwat, P. Thipyapong, P. Laosuwan, A. Kaga and D.A. Vaughan. 2006. Genetic diversity of the Vigna germplasm from Thailand and neighbouring regions revealed by AFLP analysis. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 1043-1059.
36. Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
37. VSN International. 2009. GenStat for Windows 12th Edition. VSN International, Hemel Hempstead. UK.
38. Wu, C.J., Z.Q. Cheng, X.Q. Huan, S.H. Yin, K.M. Cao and C.R. Sun. 2004. Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of the endangered species. Plant Science, 167: 35-42.
39. Yang, B.C., B.G. Xiao, X.J. Chen and C.H. Shi. 2007. Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using inter simple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. Annals of Applied Biology, 150: 393-401.
40. Ya-tao, W., A. Xin-xiang, F. Chuan-zhang, X. Fu-rong, Y. Teng-qiong, T. Cui-feng and D. Lu-yuan. 2008. ISSR analysis on genetic diversity of the 34 populations of *Oryza meyeriana* distributing in Yunnan Province, China. Rice Science, 15: 13-20.
41. Yeh, F.C. and R. Yang. 1999. Popgene Ver. 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis Quick User Guide. University of Alberta And Tim Boyle, Centre for International Forestry Research.
42. Zhang, C.H., J.Z. Li, Z. Zhu, Y.D. Zhang, L. Zhao and C.L. Wang. 2010. Cluster analysis on Japonica Rice (*Oryza sativa L.*) with good eating quality based on SSR markers and phenotypic traits. Rice Science, 17: 111-121.
43. Zhu, J., M.D. Gale and S. Guarrie. 1998. AFLP markers for the study of rice biodiversity. Theoretical and Applied Genetic, 96: 602-611.
44. Zhu, H., Z. Xie and S. Ge. 2003. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon Griff.*) in China. Theoretical and Applied Genetic, 107: 332-339.
45. Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 178-183.

The Study of Genetic Diversity in Iranian Rice Cultivars using ISSR, IRAP and REMAP Markers

Ali Aalami¹ and Noushafarin Karami²

1- Assistant Professor, University of Guilan (Corresponding author: ali_aalami@guilan.ac.ir)

2- M.Sc. Student, University of Guilan

Received: January 15, 2015

Accepted: July 14, 2015

Abstract

In this study, genetic diversity was evaluated for 40 landraces and improved rice genotypes by inter-simple sequence repeat (ISSR), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified) and REM (Retro transposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) marker systems. Amplified productions of 20 primers indicated distinct and polymorphic bands among genotypes that produced a total of 309 bands and an average of 88.03% polymorphism. The average gene diversity, Shannon's diversity index and polymorphism information content were 0.39, 0.57 and 0.35, respectively. UBC811 and UBC813 markers showed the highest genetic diversity indices which were 0.65 and 0.64, respectively. In order to determine the efficiency of the markers in polymorphism appearance, marker index (MI) and effective multiplex ratio (EMR) were calculated which based on TOS2+UBC811 and TOS2+UBC826 markers with the highest MI and EMR value, had better efficiency, respectively. The dendrogram obtained using UPGMA method divided genotypes into six clusters. The most of local rice varieties including *Hashemi*, *Alikazemi* and *Hassansaraiee* located in cluster two whereas improved cultivars such as *Khazar*, *Kadous* and *Gohar* located in cluster three. Also, the results indicated that markers based on retrotransposon as REMAP have good potential for using in genetics and breeding researches in rice.

Keywords: Cluster analysis, Molecular markers, Retro transposon, Rice