دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

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

علی اعلمی[۱] و نوش‌آفرین کرمی[۲]

۱- استادیار، دانشگاه گیلان، (نویسنده مسوول: 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 ٤٠ لاین و رقم بومی و اصلاح‌شده برنج با استفاده از نشانگرهای ISSR، IRAP 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 ۰/٦٥ و ۰/٦٤ 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 ٦ 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 پلاسم برنج برخوردارند و می‌توانند برای مطالعات ژنتیکی و اصلاحی برنج مورد استفاده قرار گیرند.

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

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 زمینه‌ی 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 ریزماهواره 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 همبارز را فراهم می‌کند اما توسعه‌ی آن‌ها وقت‌گیر و پر زحمت است (۱۸).

نشانگرهای ISSR[۱] 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 ریزماهواره نزدیک به هم درژنوم را تکثیر می‌کنند. در این روش نیازی به اطلاعات در مورد توالی ژنومی جهت طراحی آغازگر نمی‌باشد و هر توالی ریزماهواره 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 باندی، 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 ترنسپوزون‌ها و رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم یوکاریوت‌ها بخصوص با فراوانی بالا در گیاهان دیده شده است. رتروترنسپوزون‌ها از طریق یک RNA واسطه و به وسیله‌ی مکانیسم کپی شدن و چسبیدن جابه‌جا می‌شوند (۳). در نتیجه، آن‌ها دلیل اصلی برای تفاوت در اندازه‌ی ژنوم گونه‌های گیاهی نزدیک به هم

1- Inter Simple Sequence Repeat

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

هستند. برای مثال حدود ۲۲-۱۷ درصد از ژنوم برنج به وسیله‌ی رتروترنسپوزون‌ها اشغال شده است و حتی این نسبت در ژنوم‌های بزرگ شبیه ذرت (بیش از ۸۰ درصد) و گندم معمولی (حدود ۹۰ درصد) بزرگ‌تر است (۲۲،۱۷،۱۱). توزیع، بی‌نظمی وفراوانی رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم‌های گیاهی استفاده از آن‌ها را به عنوان نشانگرهای مولکولی، بسیار ایده‌آل می‌سازد. رتروترنسپوزون 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 رتروترنسپوزون‌ها می‌توان به IRAP[1] و REMAP[2] اشاره نمود. نشانگر IRAP چندشکلی مبتنی بر الحاق رتروترنسپوزون‌ها را با تکثیر ناحیه‌ی بین دو عنصر رتروترنسپوزونی آشکار می‌سازد. در این روش آغازگرها (یک یا دو آغازگر) معمولاً براساس بخش بیرونی LTRها[3] طراحی می‌شوند. آغازگرها ممکن است براساس ناحیه انتهایی LTR به طرف نواحی بیرونی رتروترنسپوزون و یا سایر نواحی محفوظ رتروترنسپوزون‌ها 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 رتروترنسپوزون‌های اختلاط یافته با یک ریزماهواره مجاور می‌توانند آشکار شوند، این روش بسته به نحوه‌ی توزیع خانواده‌ی رتروترنسپوزونی روی ژنوم گیاه مورد مطالعه ده‌ها تا صدها محصول در هر واکنش تکثیر، تولید می‌کند (۳۳). نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌های 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، گوجه فرنگی، 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 باسماتی محلی، باسماتی اصلاح شده و غیرباسماتی پاکوتاه ارزیابی شدند. نتایج نشان داد واریته‌های باسماتی محلی کمترین تنوع ژنتیکی و واریته‌های باسماتی اصلاح شده بیشترین تنوع را نشان دادند. آن‌ها همچنین تعدادی از نشانگرهایی که توانسته بودند واریته‌های باسماتی محلی مورد استفاده را به صورت واضح از واریته‌های برنج اصلاح شده و غیرباسماتی متمایز کنند را شناسایی کردند که در برنامه‌های اصلاح برنج باسماتی 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، IRAP و REMAP جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون استفاده شد وگروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به روش UPGMA انجام شد. نتایج نشان داد این نشانگرها از توانایی مناسبی جهت تفکیک ژنوتیپ‌های توتون برخوردارند. (۳۹،۱۳). 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 (۲۹).

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 رتروترنسپوزون و نیز ISSR، پویش 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، چمپابودار، 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، حسن‌سرایی، طارم منطقه، صدری، آمل ۳، بجار، 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 (eppendorf مدل Hamburg 22331) 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 رتروترنسپوزونی 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 میلی‌مولار، ۰/۸ میکرولیتر آغازگر ۱۰ میکرو مولار، یک میکرولیتر بافر 1X PCR و یک واحد آنزیم Taq پلیمراز 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 ۹۴°C، سپس ۳۵ سیکل بصورت ۴۰ ثانیه واسرشته سازی در ۹۴°C، ۴۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

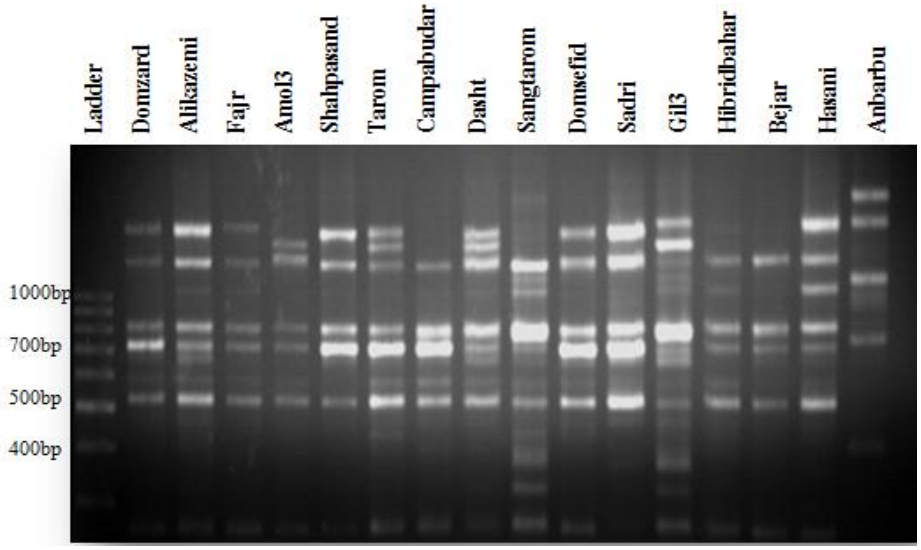
بسته به دمای اتصال هر آغازگر (جدول ۱)، ۲ دقیقه مرحله بسط در دمای۷۲°C و ۵ دقیقه بسط نهایی در دمای ۷۲°C بود. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری و الکتروفورز ژل با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۸۰ دقیقه انجام شد. رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیومبرومايد و آشکارسازی باندها زیر نورUV دستگاه ژل داک (Bio-Rad 2000) انجام گرفت. الگوی باندی بر اساس وجود (یک) یا عدم وجود (صفر) نوارها نمره‌دهی شدند. میزان چندشکلی نشانگر[1]، با استفاده از فرمول

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

محاسبه شد (۳۱)، در این فرمول P_i، فراوانی آلل iام برای هر نشانگر می‌باشد. جهت گروه‌بندی ابتدا تفاوت و مشابهت ژنوتیپ‌ها براساس روش تطابق ساده تهیه و گروه‌بندی با استفاده از روش UPGMA (۳۶) و به کمک نرم‌افزار NTSYS (۲۸) انجام شد و به منظور محاسبه میزان چند شکلی نشانگر و تنوع ژنی نی از نرم‌افزار Popgen نسخه ۱/۳۱ استفاده شد (۴۱). جهت تجزیه به مختصات اصلی از نرم‌افزار Genstat نسخه ۱۲ (۳۷) و برای انجام تجزیه تابع تشخیص از نرم‌افزار SPSS 16.0 (۲) استفاده شد.

نتایج و بحث

ارقام برنج ایرانی، منبع غنی از تنوع زیستی را تشکیل می‌دهند و جهت حفظ و استفاده از آن نیاز است که ساختار ژنتیکی آن‌ها به خوبی شناسایی شود. به این منظور در این پژوهش ۳۰ ترکیب آغازگری ISSR ورتروترنسپوزون مورد استفاده قرار گرفت که بر اساس الگوی نواربندی واضح، قابلیتامتیازدهی و تکرارپذیری، تعداد ۲۰ ترکیبآغازگری 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 می‌شود نشانگرهای مذکور توانسته‌اند ضمن بروز چندشکلی قابل ملاحظه، الگوی واضح و با کیفتی را تولیدکنندکه نشان‌دهنده توانمندی این نوع نشانگرها برای مطالعات بیشتر درگیاه برنج می‌باشد.



شکل ۱- الگوی باندی REMAPحاصل از تکثیر ارقام برنج با استفاده از آغازگرUBC815+TOS2

Figure 1. REMAP banding pattern generated by rice cultivars using UBC815+TOS2 primer

با استفاده از آغازگرهای فوق در مجموع ۳۰۹ نوار تشکیل شد که ۲۷۲ نوار از آن‌ها 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 آغازگرهایترکیبیTOS2+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 رتروترنسپوزون TOS1 و بیشترین تعداد از آن‌ها برای آغازگرهای ترکیبی (REMAP)، TOS2+UBC826 بود. بر این اساس درصد چندشکلی در 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 آن‌هاست (جدول ۱).

1-Polymorphism Information Content

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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

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

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 رتروترانسپوزون 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 رتروترنسپوزن در هر دو تحقیق چند شکلی بالایی را نشان دادند که دلالت بر کارایی این نشانگرها برایارزیابی‌های 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 الل انتخاب شده به طور تصادفی از دو فرد را نشان می‌دهد و فاصله‌ی ژنتیکی تفاوت بین دو موجود است و می‌تواند به وسیله‌ی اختلافآللی 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 برای آغازگرهای ISSR440، 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 کلیه‌ی آغازگرهای مورد مطالعه در جمعیت ۰/۵۷ به‌دست 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 میزانEMR 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 آغازگرهایTOS2+UBC811، TOS2+UBC826 و TOS2+UBC825 به ترتیب با مقادیر ۶/۷۵، ۶/۵۱ و ۶/۰۵ بود (جدول ۲).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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

Table 2. Polymorphism Information Content (PIC), Effective Multiplex Ratio (EMR), Marker Index (MI),Ne: 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 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	۰/۲۷	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

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، 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).

جدول ۳- تجزیه‌ی الگوی باندی تولید شده به‌وسیله نشانگرهای ISSRIRAP و REMAP

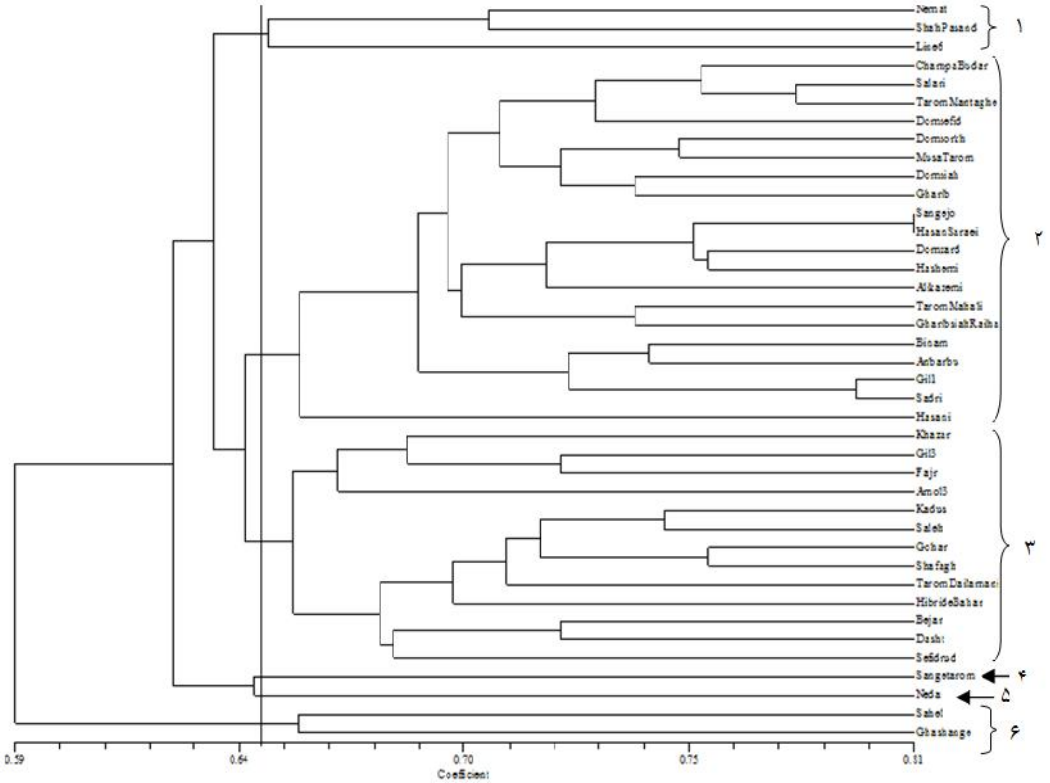
Table 3. Analysis of banding patterns produced by ISSR, IRAP and REMAP markers

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

بر این اساس، به نظر می‌رسد نشانگرهای مبتنی بر توالی‌های رتروترنسپوزون 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 وشباهت‌های ژنوتیپ‌ها بر اساس روش تطابق ساده (SM) محاسبه و گروه‌بندیژنوتیپ‌ها با استفاده از روش UPGMA انجام شد. دندروگرام حاصل ۴۰ ژنوتیپ برنج را در سطح تشابه ۸۱ درصد از یکدیگر تفکیک نمود و میزان تشابه از ۵۹ تا۸۱ درصد متغیر بود. ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس تشابه اولیه و ماتریس کوفنتیک که از فرآیندخوشه‌بندی و دندروگرام به دست آمد حدود ۰/۷۳ بود که نشان‌دهنده دقت مناسب خوشه‌بندیمی‌باشد. 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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

گروه از حدود ۰/۶۵ تا ۰/۷۱ متغیر بود. گروه دوم که عمدتاً ارقام بومی با کیفیت خوب بودند شامل چمپابودار، 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، آمل ۳، کادوس، صالح، گوهر، شفق، طارم دیلمانی، هیبرید بهار، بجار، 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 تلاقی 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 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 بجار 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). میردریکوند و همکاران (۲۳) در مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی برنج‌های ایرانی با استفاده از اطلاعات هفت مکان ژنی آیزوزایم، ۱۲۰ ژنوتیپ انتخابی از ژرم‌پلاسم 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.



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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

تجزیه به مختصات اصلیب 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 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.

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

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 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.

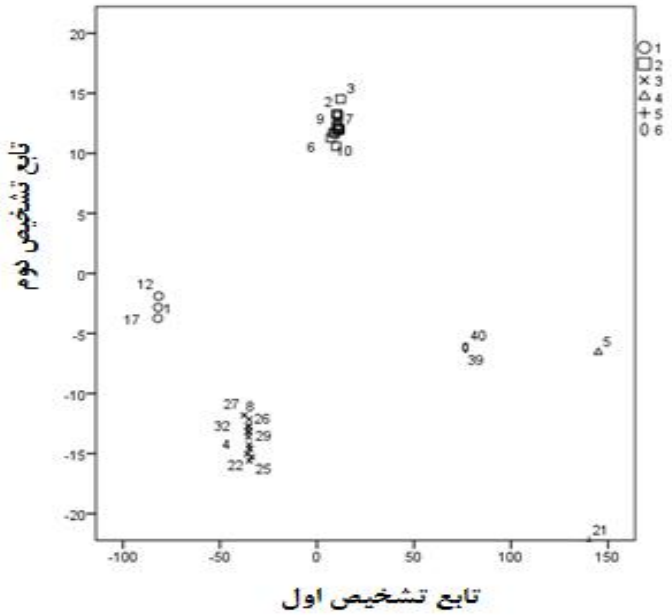
شکل ۳ مربوط به گروه‌بندی ارقام بر اساس توابع تشخیص اول و دوم است که به خوبی تقسیم ارقام در شش گروه به وسیله تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌نماید.

جدول ۵- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر بر اساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای

Table 5. Canonical discriminate 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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]



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

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).

محجوب 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 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 رتروترنسپوزنی 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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 Compan 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. Sigh, 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. Shoaei Deilami. 2015. Assessment of Genetic diversity among and within different typesof Tobacco (*Nicotianatabacum* 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. Souniemi and A.H. Schulman. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theoretical and Applied Genetic**,** 98: 704-711.
16. Kalendar, 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. Aalamiand B. Ghareyazie. 2004. Evaluation of genetic diversity in Iranian rice using isozyme markersIranian Journal Of Agricultural Sciences, 35: 143-153.
24. Mohsenzadeh Golfzane, M., H. Samizadeh, A. Aalami, M. Shoaei 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 Sciense, 2: 371-380 (In Persian).
25. Murray, M. and W.F. Thampson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Research, 8: 4321-4325.
26. Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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 assessgenetic 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, PH.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. Chenl 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 reprat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 178-183.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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

Ali Aalami[1] and Noushafarin Karami[2]

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 AmplifiedPolymorphism) 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 onTOS2+UBC811and 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 *Khaza*r, *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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]