ارزیابی تنوع ژنتیکی در ارقام برنج با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

Evaluation of Genetic Diversity in Rice using Microsatellite Markers

دینا کبریایی[۱]، محمدحسین رضادوست[۲]، مجتبی کردرستمی[۳*] و حبیب‌الله سمیع‌زاده لاهیجی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۳/۲۸

چکیده

به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم، ۷۴ ژنوتیپ برنج انتخاب شده و با استفاده از ۵۶ جفت آغازگر SSR مورد تجزیه قرار گرفتند. تمامی آغازگرها مناطقی از ژنوم برنج را تکثیر نمودند که در مجموع ۳۹۹ آلل چندشکل با میانگین ۷/۱۳ آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره در ژنوتیپ‌ها تکثیر شد. نشانگرهای RM16، RM3355 و RM8006 با ۱۰ آلل بیشترین تعداد آلل را دارا بودند. میزان اطلاعات چندشکلی برای نشانگرهای مورد بررسی از ۰/۵۶ تا ۰/۸۷ با میانگین ۰/۷۹ متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد با استفاده از روش UPGMA، تمامی ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه قرار داد و درصد صحت گروه‌بندی افراد براساس تابع تشخیص ۹۸/۶ درصد بود.

واژه‌های کلیدی: برنج، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره

۱. دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت
۲. مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت
۳. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت
۴. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت
*: نویسنده مسوول Email: kordrostami009@yahoo.com

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی بوده و به‌عنوان منبع اولیه غذایی برای بیشتر از نصف جمعیت جهان به‌کار می‌رود *زینگ و زانگ*(Xing and Zhang, 2010). بیش از ۹۰٪ برنج جهان در آسیا، جایی که بیش از ۶۰٪ جمعیت جهان زندگی می‌کنند، کاشته و مصرف می‌گردد. شاید برنج یکی از متنوع‌ترین گیاهان زراعی باشد که در مناطق مختلفی از جهان کشت می‌شود *خوش* (Khush, 2005). امکانات بیشتر برای بهبود محصول به حفاظت و به‌کارگیری تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی گیاهان و کاربرد روش‌های نوین بیوتکنولوژی بستگی دارد. اطلاعات مربوط به‌مقدار تنوع‌ژنتیکی در ژرم‌پلاسم و ارتباطات ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها برای بررسی و طراحی برنامه‌های به‌نژادی مهم بوده و می‌تواند برای کمک به شناسایی و توسعه ژنتیکی ژرم‌پلاسم به‌کار رفته و موجودیت ارقام را تعریف کند. بنابراین جهت مدیریت و کاربرد مؤثر منابع ژرم‌پلاسم، درک کامل دامنه و ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت موردنظر ضروری است *جیاروکو* و همکاران (Giarrocco *et al*., 2007). یکی از مهمترین کاربرد نشانگرهای مولکولی در دهه‌های اخیر در اصلاح‌نباتات ارزیابی پتانسیل ذخایر توارثی است که از میان نشانگرها، ریزماهواره‌ها نشانگرهای مولکولی قابل اعتماد، کم هزینه، همبارز و فراوانند و درجه بالایی از تنوع آللی را نشان می‌دهند و بنابراین یک نشانگر مولکولی عالی برای بررسی ژرم‌پلاسم‌ها هستند *هررا* و همکاران (Herrera *et al*., 2008).

در مطالعه‌ای *چو* و همکاران (Cho *et al*., 2004) از نشانگرهای SSR و RPAD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین والدین و هتروزیس در جمعیت F_1 برنج استفاده نمودند. براساس ارزیابی تنوع ژنتیکی پیشنهاد کردند که هتروزیس مشاهده شده در F_1ها می‌تواند به‌وسیله ترکیب انتخابی آلل‌های مرتبط با قدرت هیبرید بهبود یابد. در مطالعه دیگری *پال* و همکاران (Pal *et al*., 2004) از نشانگرهای SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام برنج باسماتی و غیرباسماتی استفاده نموده و کاربرد این نشانگرها را برای این کار مناسب دانستند. آنها با تجزیه خوشه‌ای، ارقام باسماتی را از سایر ارقام تفکیک نمودند. *عارف* و همکاران (Arif *et al*., 2005) از نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی ۱۹ رقم برنج در پاکستان استفاده کرده و توانستند با تجزیه خوشه‌ای این ارقام را در دو گروه عمده قرار دهند *ساکر* و همکاران (Saker *et al*., 2005). برای بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط هفت ژنوتیپ برنج مصری از نشانگرهای RAPD، SSR و AFLP استفاده نمودند. آنها گزارش کردند که سطح چندشکلی ایجاد شده توسط SSR از بقیه نشانگرها بالاتر است. همچنین نتایج نشان داد که دندروگرام‌های حاصله از روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای، تفاوت‌های کمی در الگوی خوشه‌بندی دارند. آنها همچنین گزارش کردند که هر سه نوع نشانگر می‌تواند ژنوتیپ‌های مختلف برنج را شناسایی کند. *چاکراوارتی* و همکاران (Chakravarthi *et al*., 2006) از نشانگرهای SSR موجود بر روی کروموزوم ۷ تا ۱۲ برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ برنج استفاده کردند. آنها تنوع بالایی از چندشکلی تمام نشانگرها مشاهده کرده و با استفاده از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نتیجه گرفتند که کاربرد SSR اطمینان بیشتری را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ایجاد می‌کند. در تحقیقی که توسط *رام* و همکاران (Ram *et al*., 2007) بر روی ۳۵ ارقام برنج با استفاده از نشانگر SSR در کل ژنوم انجام شد، نتایج تنوع ژنتیکی قابل‌ملاحظه‌ای (۹۵/۲٪) را نشان داد. همچنین تجزیه خوشه‌ای هر یک از ارقام را به‌طور جداگانه در یک گروه قرار داد. نتایج حاصل از بررسی‌های *هررا* و همکاران (Herrera *et al*., 2008) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام برنج به‌وسیله نشانگرهای SSR در ونزوئلا نشان داد که واریته‌های ونزوئلا شباهت بسیار زیادی داشته و با هم خویشاوندند. در این آزمایش استفاده از نشانگرهای SSR به‌عنوان ابزاری مناسب و کارا در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برنج تایید شد. در بررسی و تحقیقی دیگر *کیبریا* و همکاران (Kibria *et al*., 2009) از نشانگرهای SSR و RAPD برای مطالعه تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های برنج معطر بنگلادش استفاده کرده و از نتایج حاصل برای افزایش پتانسیل ژنتیکی و انتخاب والدین به‌منظور توسعه واریته‌های برتر در برنامه‌های به‌نژادی بهره بردند.

هدف از این آزمایش بررسی تنوع ژنتیکی لاین و ارقام برنج برای تعیین روابط ژنتیکی آنها بود تا از آن طریق والدین مناسب شناسایی و در برنامه‌های اصلاحی و دورگ‌گیری به‌کار برده شوند.

مواد و روش‌ها

جهت تعیین درجه‌ی خویشاوندی ژنتیکی و مطالعه تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ارقام وارداتی، تعداد ۷۴ رقم از ارقام بومی و لاین‌های خارجی (جدول ۱) در مؤسسه تحقیقات برنج کشور واقع در رشت کشت گردید. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان ۵ الی ۶ هفته‌ای با روش تغییریافته CTAB *سقای معروف* و همکاران (Saghai-Maroof *et al*., 1984) در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام

گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتری و الکترفورز ژل آگارز ۰/۶٪ استفاده شد. در این آزمایش از ۵۶ آغازگر SSR برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۰ میکرولیتر با اجزای ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۲۵ میلی‌مولار از هر آغازگر، ۰/۲۵ میلی‌مولار مخلوط dNTP، ۰/۰۲ میلی‌مولار کلریدمنیزیم و ۰/۵۰ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناژن) انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دماهای ۵۰°C تا ۶۵ به‌مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲°C به‌مدت دو دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲°C درجه بود. جداسازی محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌آکریلامید واسرشته‌ساز ۶ درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی ساخت شرکت Bio-Rad انجام و رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره *بسام* و همکاران (Bassam *et al.*, 1991) به‌روش زیر صورت گرفت: اولین مرحله (از چهار مرحله رنگ‌آمیزی) به‌منظور جلوگیری از انتشار و پراکنده‌شدن DNA در بافت ژل انجام گرفت. در این مرحله شیشه کوچک به‌مدت ۴۰ دقیقه در تشتک حاوی محلول تثبیت‌کننده شامل: یک لیتراسیداستیک ۱۰ درصد (۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیداستیک) روی شیکر با دور ۱۰۰ قرار گرفت. سپس ژل طی سه مرحله دو دقیقه‌ای و هر بار توسط یک لیتر آب مقطر انجام گردید تا با حذف مواد ناخواسته و همچنین اسید، در رنگ‌آمیزی تداخل ایجاد نگردد. در مرحله‌ی بعد از محلول رنگ‌آمیزی جهت رنگ‌گیری ژل استفاده گردید. این محلول شامل ۱ گرم نیترات‌نقره، ۲ میلی‌لیتر فرم‌آلدئید و همچنین یک لیتر آب سرد می‌باشد. بهتر است فرم‌آلدئید را حین استفاده از محلول اضافه نمود چرا که فرم‌آلدئید در سرما تجزیه می‌شود. بعد از شستشو، شیشه کوچک به تشتک حاوی محلول رنگ‌آمیزی منتقل شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با دور ۷۵ دور در دقیقه تکان داده شد. در این مدت، زمان نیترات‌نقره در حضور فرم‌آلدئید به‌دلیل داشتن یون مثبت به اسکلت دی‌ان‌ای که دارای بار منفی است پیوند می‌خورد. پس از اتمام رنگ‌آمیزی، شیشه درون تشتک حاوی آب مقطر سرد (۴°c) غوطه‌ور شد. این عمل در حدود ۵ ثانیه انجام شد تا نیترات‌نقره اضافه از بافت ژل خارج گردد. در مرحله‌ی سوم برای نمایان شدن باندها از محلول آشکارگر استفاده می‌شود. این محلول شامل یک لیتر آب مقطر، ۳۰ گرم کربنات‌سدیم، ۲ میلی‌لیتر فرم‌آلدئید و همچنین ۵۰۰ میکرولیتر محلول تیوسولفات سدیم می‌باشد. بعد از شستشو با آب سرد شیشه کوچک همراه با ژل درون این محلول شناور می‌شود. هرچه آشکارگر سردتر باشد باندها واضح‌تر خواهند بود. در مرحله‌ی آخر پس از ظاهرشدن باندها، محلول تثبیت‌کننده مرحله‌ی اول که عمل متوقف‌کردن ظهور باندها را نیز انجام می‌دهد و در حقیقت محلول متوقف‌کننده نیز می‌باشد، به محلول آشکارگر اضافه شد تا از ظهور بیشتر باندها جلوگیری شده و زمینه ژل سیاه نشود. بعد از خشک‌کردن شیشه بایند با استفاده از اسکنر، تصویر ژل اسکن گردید.

الگوهای نواربندی حاصل به‌صورت وجود یا عدم‌وجود نوار امتیازدهی شدند. همچنین برای هر نشانگر آلل‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به‌صورت ۱، ۲، ۳ و ... نام‌گذاری و برای برآورد فراوانی آللی و پارامترهای ژنتیکی هر جایگاه ریزماهواره و نیز فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها استفاده شدند. ماتریس داده‌ها برای کلیه‌ی ارقام و کلیه نشانگرهای مورد مطالعه تشکیل شد.

فاصله ژنتیکی بین ارقام با روش‌ها مختلف محاسبه و گروه‌بندی ارقام با تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc Ver. 2، *رولف* (Rohlf, 1998) و از نرم‌افزار SPSS Ver. 16، *بی‌نام* (Anonymous, 2007) برای انجام تجزیه تابع تشخیص و تعیین صحت گروه‌بندی استفاده شد. میزان چندشکلی بین ارقام مورد مطالعه با استفاده از دو معیار اطلاعات چندشکل یا PIC، *باتستین* (Botestein, 1980) و شاخص تنوع ژنی *نی* (Nei, 1973) با نرم‌افزار PowerMarker Ver. 3.0، *لیو* (Liu, 2004) محاسبه گردید. از نرم‌افزار Popgene Ver. 1.31، *یه* و *بویل* (Yeh and Boyle, 1999) شاخص شانون استفاده شد. تعداد آلل‌های مؤثر از رابطه‌ی زیر *هارتل* و *کلارک* (Hartl and Clark, 1997) و با نرم‌افزار Power Marker و Excel محاسبه گردید:

$$n_e = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

جایی که n_e تعداد آلل موثر برای هر جایگاه و p_i فراوانی هر آلل در آن جایگاه نشانگری است.

جدول ۱: اسامی ارقام و لاین‌های مورداستفاده در این مطالعه

Table1: Names of lines and varieties used in this study

مبداء Origin	نام رقم Variety name	علامت اختصاری Symbol	مبدأ Origin	نام رقم Variety name	علامت اختصاری Symbol
ژاپن	فوجی مینوری	G38	ایران	سپیدرود	G1
فیلیپین	IRRI46	G39	"	خزر	G2
"	IRRI47	G40	"	هاشمی	G3
"	IRRI48	G41	"	واندانا	G4
"	IRRI49	G42	"	طارم	G5
"	IRRI50	G43	"	غریب	G6
"	IRRI32	G44	"	کادوس	G7
"	IRRI31	G45	"	دمسیاه گیلان	G8
ایران	گرده	G46	"	بینام	G9
"	درفک	G47	"	حسنی	G10
"	لاین ۶	G48	"	صالح	G11
"	لاین ۸۳۰	G49	"	طارم دیلمانی	G12
"	لاین ۸۳۱	G50	"	چمپا محلی	G13
"	لاین ۸۴۰	G51	"	دمسیاه الموت	G14
"	لاین ۸۴۱	G52	"	حسن سرایی	G15
"	کاظمی	G53	"	حسن سرایی الموت	G16
"	هیبرید بهار ۱	G54	"	صدری کوتاه خراسان	G17
IRRI	IRRI25	G55	"	صدری الموت	G18
"	IRRI26	G56	"	فجر	G19
"	IRRI27	G57	"	ندا	G20
"	چمپا پاکوتاه	G58	"	نعمت	G21
"	IRRI28	G59	"	ساحل	G22
"	IRRI51	G60	"	شفق	G23
"	IRRI52	G61	IRRI	IRRI33	G24
"	IRRI53	G62	"	IRRI34	G25
"	IRRI54	G63	"	IRRI35	G26
"	IRRI55	G64	"	IRRI36	G27
"	IRRI56	G65	"	IRRI37	G28
"	IRRI57	G66	"	IRRI38	G29
"	IRRI58	G67	"	IRRI39	G30
"	IRRI59	G68	"	IRRI40	G31
"	IRRI60	G69	"	IRRI41	G32
"	IRRI61	G70	"	IRRI42	G33
"	IRRI62	G71	"	IRRI43	G34
"	IRRI63	G72	"	IRRI44	G35
"	IRRI64	G73	"	IRRI45	G36
"	IRRI65	G74	ایران	زاینده رود	G37

نتایج و بحث

در این مطالعه، تعداد زیادی از آلل‌ها برای هر یک از نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه روی ژل اکریلامید ۶ درصد مشاهده گردید که این امر ضرورت استفاده از این ژل را برای جداسازی و تشخیص آلل‌های مختلف اثبات می‌کند. ۵۶ جفت آغازگر مورد بررسی با تکثیر ۵۶ جایگاه ریزماهواره در مجموع ۳۹۹ آلل چندشکل با میانگین ۷/۱۳ آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره در ۷۴ ژنوتیپ و لاین برنج تولید کردند (جدول ۲). دامنه آلل‌ها از ۵ تا ۱۰ آلل متغیر بود. ۱۹/۶۴٪ از نشانگرها دارای بیشترین آلل (۱۰ آلل) و ۱۷/۸۵٪ از نشانگرها کمترین آلل (۵ آلل) را داشته و بقیه نشانگرها هم از لحاظ آلل در این دامنه قرار داشتند. همچنین تعداد آلل مؤثر در جمعیت از ۲/۴۴ تا ۸/۶۴ متغیر بود که بیشترین آلل مؤثر مربوط به نشانگرهای RM188 و RM7027 و کمترین آن مربوط به نشانگر RM3294 بود. بررسی نتایج حاصل از پژوهش‌های محققین دیگر در مورد تعداد آلل‌های مشاهده شده و مؤثر در جایگاه نشانگرهای ریزماهواره بسیار متفاوت می‌باشد. تعداد آلل‌های گزارش شده توسط *جیاروکو* و همکاران (Giarrocco *et al.*, 2007) برای نشانگر RM16 و *هررا* و همکاران (Herrera *et al.*, 2008) برای نشانگر RM30، RM144، RM262 و RM598 متفاوت با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق بود. تفاوت در تعداد آلل شناسایی شده در مطالعات مختلف می‌تواند به‌دلیل منشاء و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نیز ماهیت نشانگرهای ریزماهواره از نظر تعداد نوکلئوتید واحدهای تکراری باشد. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای نشانگرهای مورد بررسی در این مطالعه از ۰/۵۶ تا ۰/۸۷ با میانگین ۰/۷۹ متغیر بود و نشانگر RM3294 کمترین و نشانگرهای RM16، RM3345، RM7027، RM7038، RM7376 و RM7434 بیش‌ترین میزان PIC را داشتند (جدول ۲). نشانگرهایی که بالاترین تعداد آلل‌های مشاهده شده را نشان دادند، دارای PIC بالایی نیز بودند به‌طوری‌که نشانگرهای RM16 و RM7434 با ۱۰ آلل بیشترین میزان PIC را نیز داشتند. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. بنابراین نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌هایی با خویشاوندی نزدیک بسیار مفید خواهند بود. *جیاروکو* و همکاران (2007) مقدار ۰/۶۹ و همچنین *باجراچرایا* و همکاران (Bajracharya *et al.*, 2006) مقدار ۰/۱۷ را برای PIC در ارقام برنج گزارش کردند که کمتر از مقدار PIC گزارش شده در این آزمایش (۰/۷۹) بود.

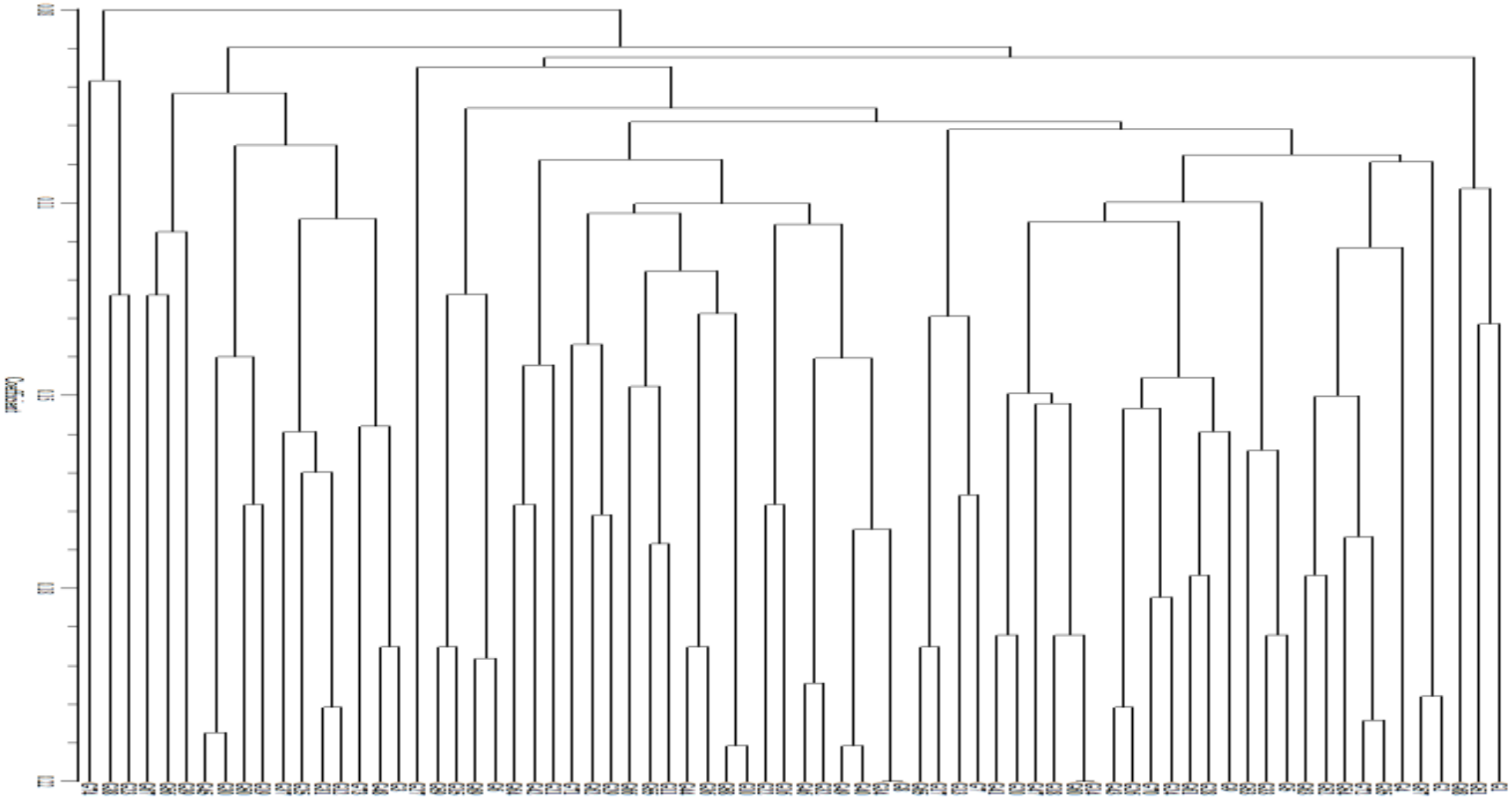
تنوع ژنی (Gene diversity) با میانگین ۰/۸۱ برای نشانگرهای مختلف از ۰/۵۹ تا ۰/۸۸ متغیر بود. بیشترین تنوع ژنی مربوط به نشانگرهای RM16، RM3345، RM7027، RM7038، RM7376 و RM7434 و کمترین به نشانگر RM3294 تعلق داشت. میانگین تنوع ژنی در بین ارقام برنج کوبا توسط *آلوارز* و همکاران (Alvarez, 2007) در حدود ۰/۷ به‌دست آمد که کمتر از نتایج پژوهش حاضر بود. شاخص تنوع شانون نیز بین ۰/۳۱ تا ۰/۸۷ متغیر بود که به‌عنوان مثال کمترین و بیش‌ترین مقدار شاخص شانون نیز به‌ترتیب متعلق به نشانگرهای RM7179 (بیش‌ترین) و RM457، RM7376 و RM7434 (کم‌ترین) بود. *باجراچاریا* و همکارن (2006) مقدار شاخص شانون را در ارقام برنج نپال بین ۰/۰۴ تا ۰/۸ با میانگین ۰/۲۳ برآورد کردند که با نتایج این تحقیق در یک راستا نبود. دلیل این اختلاف به‌خاطر مواد آزمایشی و همچنین نشانگرهای مورد مطالعه می‌تواند باشد. علاوه بر این موارد نبایستی از اثرات محیطی نیز غافل شد. مطمئناً محیط‌های کشت مواد آزمایشی نیز در نتایج به‌دست آمده تأثیر دارند. همچنین مسأله تکاملی ارقام موجود در این مقاله را نبایستی فراموش نمود. همچنین فراوانی آللی نیز از ۰/۲۴ تا ۰/۴۷ برای نشانگرهای مختلف متغیر بود که نشانگر RM549 کم‌ترین و نشانگر RM152 بیش‌ترین فراوانی آللی را داشتند (جدول ۲).

۷۴ رقم و لاین برنج مورد مطالعه در این آزمایش با تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA و براساس ضریب تشابه جاکارد با نرم‌افزار NTSYS گروه‌بندی شدند. شکل ۱ دندروگرام ارقام و لاین‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای پس از ارزیابی روش‌های مختلف برای تعیین تعداد کلاستر، تعداد ۷۴ رقم و لاین را پس از برش در موقعیت ۰/۰۸۸ در چهار گروه مجزا تفکیک نمود. ضریب کوفنتیک ۰/۷۶ بود که نشان‌دهنده‌ی گروه‌بندی خوب ارقام و لاین‌ها است. در گروه اول ژنوتیپ‌های ۱، ۵۱ و ۶۸ قرار گرفتند. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۲۳، ۳۸ و ۷۴ بود. ژنوتیپ‌های ۳، ۱۲، ۱۹، ۲۵، ۳۰، ۳۱، ۳۷، ۳۹، ۴۵، ۴۸، ۵۰، ۵۶، ۶۷ و ۷۳ در گروه سوم و بقیه ژنوتیپ‌ها هم در گروه چهارم قرار گرفتند. گروه چهارم نیز خود به هفت زیر گروه تقسیم شد که ژنوتیپ‌های درون هر زیرگروه شباهت بیشتری به هم داشتند. همان‌طور که در دندروگرام مشاهده می‌شود اکثر ارقام ایرانی و ارقام IRRI در کنار هم قرار گرفته‌اند و این حاکی از گروه‌بندی خوب ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های ژنوتیپی است.

جدول ۲: فراوانی آللی، تعداد الل، تعداد آلل مؤثر، تنوع ژنی، میزان اطلاعات چندشکلی و شاخص شانون برای نشانگرهای SSR در ارقام برنج مورد مطالعه

Table 2: Allele frequency, Allele number, Gene diversity, PIC and Shanon index for SSR markers used in this study

شاخص شانون Shanon Index	آلل مؤثر Effective allele	PIC PIC	تنوع ژنی نی Nei gene diversity	تعداد آلل Allele No	فراوانی آللی Allelic Frequency	نشانگر Marker	شاخص شانون Shanon Index	آلل مؤثر Effective allele	PIC PIC	تنوع ژنی نی Nei gene diversity	تعداد آلل Allele No	فراوانی آللی Allelic Frequency	نشانگر Marker
0.42	4.53	0.75	0.78	6	0.35	RM598	0.32	8.15	0.87	0.88	10	0.22	RM16
0.30	7.73	0.86	0.87	10	0.20	RM1240	0.42	4.78	0.76	0.79	6	0.30	RM30
0.42	4.68	0.76	0.79	6	0.32	RM1337	0.42	4.34	0.74	0.77	6	0.38	RM119
0.47	4.12	0.72	0.76	5	0.34	RM1359	0.36	6.95	0.84	0.86	8	0.23	RM135
0.37	4.74	0.76	0.79	7	0.30	RM1553	0.40	6.52	0.83	0.85	8	0.20	RM144
0.39	2.44	0.56	0.59	5	0.61	RM3294	0.39	3.51	0.68	0.72	6	0.47	RM152
0.34	8.35	0.87	0.88	9	0.18	RM3345	0.43	5.16	0.78	0.81	6	0.26	RM178
0.31	8.12	0.86	0.88	10	0.20	RM3355	0.36	6.97	0.84	0.86	8	0.23	RM218
0.39	6.43	0.82	0.84	7	0.20	RM4862	0.39	6.04	0.81	0.83	7	0.26	RM221
0.40	6.53	0.83	0.85	7	0.22	RM5271	0.38	4.92	0.77	0.80	7	0.35	RM236
0.43	5.01	0.77	0.80	6	0.32	RM5473	0.36	6.91	0.84	0.86	8	0.18	RM261
0.44	5.30	0.78	0.81	6	0.27	RM5474	0.35	7.28	0.85	0.86	9	0.24	RM262
0.46	3.77	0.69	0.73	5	0.36	RM5620	0.42	4.75	0.76	0.79	6	0.31	RM273
0.37	6.91	0.84	0.86	8	0.23	RM5699	0.46	3.74	0.69	0.73	5	0.34	RM288
0.41	4.37	0.74	0.77	6	0.38	RM6080	0.32	8.64	0.87	0.88	10	0.16	RM188
0.44	5.25	0.78	0.81	6	0.27	RM6208	0.30	7.17	0.85	0.86	10	0.23	RM305
0.40	4.24	0.73	0.76	6	0.39	RM6773	0.42	4.71	0.76	0.79	6	0.34	RM316
0.31	7.78	0.86	0.87	10	0.20	RM6832	0.46	3.81	0.70	0.74	5	0.39	RM324
0.40	6.44	0.83	0.84	7	0.19	RM6845	0.43	5.02	0.77	0.80	6	0.28	RM420
0.44	5.37	0.79	0.81	6	0.26	RM7000	0.43	4.82	0.76	0.79	6	0.30	RM435
0.32	8.64	0.87	0.88	10	0.16	RM7027	0.46	3.76	0.69	0.73	5	0.35	RM440
0.35	8.61	0.87	0.88	9	0.15	RM7038	0.46	3.72	0.69	0.73	5	0.42	RM447
0.48	4.34	0.73	0.77	5	0.28	RM7179	0.31	8.01	0.86	0.88	10	0.20	RM457
0.31	8.58	0.87	0.88	10	0.20	RM7376	0.46	3.71	0.69	0.73	5	0.36	RM478
0.31	8.30	0.87	0.88	10	0.20	RM7434	0.32	4.16	0.72	0.76	6	0.34	RM484
0.46	3.84	0.70	0.74	5	0.41	RM7576	0.37	7.06	0.84	0.86	8	0.22	RM515
0.31	8.15	0.86	0.88	10	0.19	RM8006	0.44	5.37	0.79	0.81	6	0.24	RM549
0.37	7.06	0.84	0.86	8	0.22	RM8263	0.43	5.03	0.77	0.80	6	0.30	RM566
							0.39	5.8	0.79	0.81	7.13	0.28	میانگین Mean



شکل ۱: گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های ریزماهواره با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

Fig. 1: Grouping the genotypes based on the SSR datas using UPGMA and Jaccard methods

از روش تابع تشخیص با استفاده از نرم‌افزار SPSS برای مشخص نمودن تعداد گروه‌ها استفاده شد و صحت گروه‌بندی برای چهار گروه به‌دست آمده با تابع تشخیص ۹۸/۶ درصد بود که نشان دهنده گروه‌بندی درست آنها بود. Chakravarthy and Narvaneni (2006) ژنوتیپ‌های برنج هندی را در ۱۱ گروه مجزا قرار دادند. همچنین *رام* و همکاران (2007) با مطالعه ۳۵ رقم بومی زراعی و وحشی برنج نشان دادند که این ارقام به‌طور جداگانه در گروه‌های مختلفی قرار می‌گیرند. در تحقیق دیگر هم *ربانی* و همکاران (Rabbani *et al.*, 2010) با مطالعه ارقام برنج باسماتی و غیرباسماتی پاکستان براساس نشانگرهای SSR توانستند آنها را با تجزیه خوشه‌ای در دو گروه اصلی قرار دهند.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که با توجه به ضرایب تشابه در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی بین ژنوتیپ‌های برنج وجود دارد که می‌توان از این تنوع در برنامه‌های اصلاح نباتات بهره برد. همچنین با توجه به تعداد زیاد آلل به ازای هر جایگاه ریز ماهواره و وجود آلل‌های اختصاصی می‌توان گفت که نشانگرهای ریزماهواره به‌کار برده شده توانستند ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در بیشتر موارد بر اساس شجره آنها تفکیک کنند، هرچند استثناهایی نیز در برخی موارد مشاهده شد. با توجه به بالابودن میزان اطلاعات چندشکل (PIC) برای نشانگرها، می‌توان از ترکیب آنها برای تمایز بین ژنوتیپ‌هایی با خویشاوندی نزدیک استفاده کرد. در پایان پیشنهاد می‌گردد برای اینکه بتوان نتایج دقیق‌تری از این مطالعه به‌دست آورد، از نشانگرهای بیشتری جهت تکثیر ژنوتیپ‌های فوق استفاده شود. همچنین مطالعه ژنوتیپ‌های بیشتر می‌تواند به درک بهتر گروه‌بندی ارقام کمک نماید.

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۱-۱۲ متن انگلیسی مراجعه شود.