گروه‌بندی ارقام برنج با استفاده از نشانگر مولکولی رپید

غفار کیانی
استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

چکیده
اطلاع از روابط ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی برای ایجاد لاین‌های جدید ضرورت دارد. در این مطالعه از نشانگرهای RAPD برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مختلف برنج استفاده گردید. تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر از ۴ تا ۱۱ باند برای هر آغازگر متغیر بود. ضرایب تشابه Nei و Li برای ارقام برآورد گردید. بیشترین مقدار ضریب تشابه برای DN-33-1 با DN-33-18، چمپا با آمل۳، فجر با نعمت و شفق با سپیدرود بدست آمد. کمترین ضریب تشابه در رقم هاشمی با پویا و پس از آن هاشمی با هریک از ارقام ندا، چمپا، آمل۳ و DN-32-6 مشاهده گردید. تجزیه و تحلیل ماتریس تشابه با استفاده از UPGMA، ارقام مورد مطالعه را در پنج دسته گروه‌بندی نمود. اطلاعات بدست آمده در این تحقیق در برنامه‌های آتی اصلاح برنج در ایران مفید خواهد بود.

کلمات کلیدی: برنج، تجزیه خوشه‌ای، روابط ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی.

مقدمه

تولید ارقام پرمحصول و با کیفیت مطلوب، از طریق شناسایی ذخایر ژنتیکی و اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی موجود در جوامع گیاهی و ارقام دارای صفات مطلوب میسر می‌شود. بنابراین تنوع ژنتیکی اساس و پایه کار اصلاح نباتات می‌باشد. متخصصان اصلاح نباتات از تنوع موجود جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی و یا انتقال ژن‌های مطلوب به ارقام دیگر استفاده می‌نمایند. در برنامه‌های دورگ‌گیری گیاهان خودگشن، برای بهره‌وری بهتر از تفکیک متجاوز، بایستی والدین از نظر ژنتیکی از همدیگر دور باشند تا برتری نتاج نسبت به والدین بیشتر اتفاق افتد (Gravois and McNew, 1993). انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در برنج در دسترس می‌باشند که در بین آن‌ها، از نشانگرهای RAPD به علت سرعت و سادگی (Williams et al., 1990) در مطالعات تنوع ژنتیکی بیشتر استفاده می‌شود. این تکنیک ارزیابی تنوع ژنتیکی را بدون داشتن آگاهی از توالی DNA فراهم می آورد (Hadrys *et al.,* 1992). علاوه بر این، از نشانگرهای RAPD در تمایز ارقام تجاری (Thomas et al., 2006)، تعیین نقشه (Michelmre *et al.,* 1991)، ژنتیک جمعیت (Haig *et al.,* 1994)، و تاکسونومی (Chapco *et al.,* 1992) نیز استفاده می‌شود. این مطالعه به منظور استفاده از نشانگرهای RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در داخل یک مجموعه از ژنوتیپ‌های برنج برای مشخص نمودن روابط ژنتیکی بین آن‌ها برای انتخاب درست والدین در برنامه‌های دورگ‌گیری انجام شده است.

مواد و روش ها

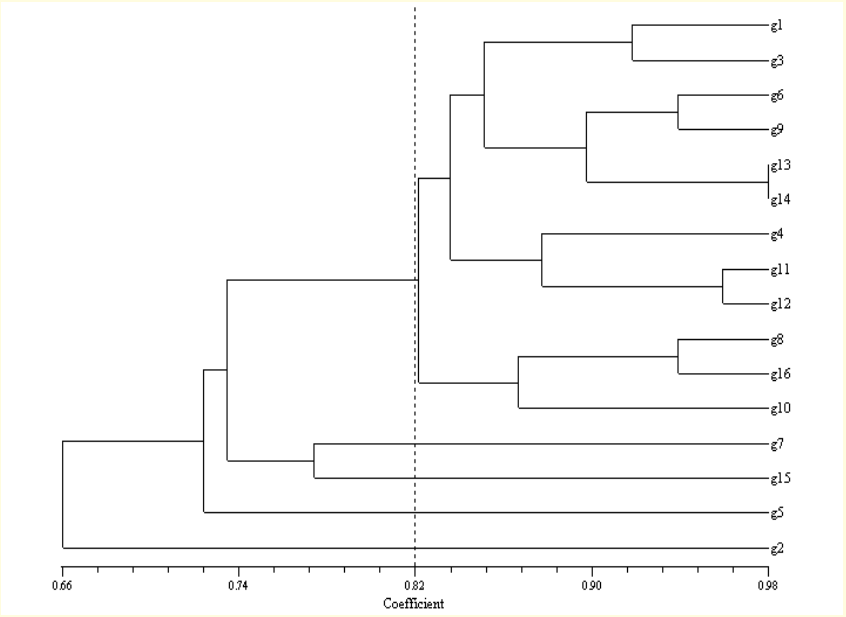
در این تحقیق از ۱۶ ژنوتیپ برنج که در برنامه‌های اصلاحی با اهمیت هستند، استفاده گردید. ارقام در سال زراعی ۱۳۸۹ در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کشت شدند. استخراج DNA از نمونه های برگی طبق روش Dellaporta et al., (1983) انجام گرفت. آنالیز PCR با استفاده از ۱۵ نشانگر RAPD انجام شد.

ضریب تشابه ژنتیکی (F) برای تمام ارقام بصورت جفتی بر اساس فرمول F = 2Nab/(Na + Nb) (Nei and Li, 1979) محاسبه گردید که در آن Na تعداد کل باندهای شناسائی شده در فرد a، Nb تعداد کل باندهای شناسائی شده در فرد b و Nab تعداد باندهای مشترک بین فرد a و b می باشد. سپس از ضرایب تشابه بدست آمده، برای ارزیابی روابط بین ارقام با استفاده از تجزیه خوشه ای به روش UPGMA استفاده گردید. تمام محاسبات با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc, Version 2.2 (Rohlf, 1992) انجام گرفت.

نتایج و بحث

ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد برای ۱۶ رقم مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. برآوردهای ضرایب تشابه از ۰/۵۹ تا ۰/۹۸ متغیر بود. مشابه این ضرایب توسط محققین دیگر در ارقام برنج پاکستانی و هندی نیز گزارش شده است (Davierwala *et al.,* 2000; Ren *et al.,* 2003; Rabbani *et al.,* 2008). بیشترین مقدار ضریب تشابه برای DN-33-1 با DN-33-18، چمپا با آمل۳، فجر با نعمت و شفق با سپیدرود بدست آمد. کمترین ضریب تشابه در رقم هاشمی با پویا (۰/۵۹) و پس از آن هاشمی با هریک از ارقام ندا، چمپا، آمل۳ و قائم ۱ مشاهده گردید.

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ماتریس ضرایب تشابه با الگوریتم UPGMA در معیار تشابه ژنتیکی ۸۲ درصد (که گروه بندی مناسبی را برای ارقام ایجاد نمود) شانزده رقم مورد مطالعه را در ۵ گروه دسته گروه بندی نمود (شکل ۱). خوشه ۱ شامل سه زیر گروه بود و اکثر ارقام در آن قرار گرفتند. در این خوشه ضرایب تشابه ژنتیکی از ۰/۷۳ (تابش با سپیدرود) تا ۰/۹۸ (DN-33-1 با DN-33-18) که مبین وجود تنوع نسبتاً کم در بین ارقام موجود در این خوشه می‌باشد. بنابراین در برنامه‌های دورگ‌گیری از تلاقی این ارقام با همدیگر اجتناب شود.



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ های برنج براساس داده های حاصل از RAPD.
g_1 تا g_{16} بترتیب ندا، هاشمی، شیرودی، تابش، پویا، فجر، خزر، شفق، نعمت، دشت، چمپا، آمل۳، DN-33-1، DN-33-18، DN-32-6 و سپیدرود می باشند.

سایر ارقام، یعنی خزر، DN-32-6، پویا و هاشمی هر یک به طور جداگانه ضمن متمایز شدن از دیگر ارقام، خوشه‌های بعدی را تشکیل دادند. کمترین ضریب تشابه بین رقم پویا با رقم هاشمی (۰/۵۹) و رقم هاشمی با هریک از ارقام ندا، چمپا و آمل۳ با مقدار ۰/۶۱ مشاهده گردید که حاکی از فاصله بیشتر ژنتیکی بین این ارقام می‌باشد. رقم محلی هاشمی نسبت به سایر ارقام از فاصله ژنتیکی بیشتری برخوردار است که با توجه به کیفی بودن این رقم ضروری است که در برنامه‌های اصلاحی دورگ‌گیری توجه ویژه‌ای به آن شود. تلاقی بین ژنوتیپ‌های با ضریب تشابه کم، هتروزیس بالائی را بدنبال دارد.البته قابلیت ترکیب پذیری عمومی و خصوصی نیز از عوامل دیگر تأثیرگذار می‌باشد که در برنامه‌های اصلاحی بدان توجه شود.

اطلاعات بدست آمده درباره تشابهات و تنوع در طراحی برنامه‌های اصلاحی آتی برنج برای تولید لاین‌های جدید ضروری است. مطالعه حاضر تنوع و روابط ژنتیکی بین ۱۶ ژنوتیپ برنج را نشان داد. این مطالعه نشان می‌دهد که نشانگر RAPD بطور موثر ارقام اصلاح شده، تجاری و محلی را از همدیگر متمایز نمود. اطلاعات بدست آمده در این مطالعه برای انتخاب مناسب والدین در برنامه‌های اصلاحی از طریق دورگ‌گیری در برنج مفید خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شده است. از همکاری مؤسسه تحقیقات برنج آمل خصوصاً جناب دکتر ستاری و مهندس نوروزی سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

واعظی ب، ۱۳۷۹. تعیین تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ژرم‌پلاسم برنج کشور از طریق مارکرهای مورفولوژیکی و مولکولی PCR-RAPD. پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران.

آقازاده قولکی ر، قره یاضی ب، نعمت زاده ق و بابائیان ن، ۱۳۸۲. طبقه بندی بخشی از ژرم پلاسم برنج ایرانی با استفاده از نشانگر RAPD. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۳۴، شماره ۳. صفحه های ۷۵۷ تا ۷۶۷.

Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW, 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. Am J Hum Genet 32: 314–331.

Chapco W, Ashton NW, Martel RK, Antonishishyn N and Crosby WL. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systemic of grasshoppers. Genome 35: 569-574.

Choudhury PR, Kohli S, Srinivasan K, Mohapatra T and Sharma RP, 2001. Identification and classification of aromatic rices based on DNA fingerprinting. Euphytica 118: 243-251.

Davierwala AP, Chowdari KV, Kumar S, Reddy APK, Ranjekar PK and Gupta VS. 2000. Use of three different marker systems to estimate genetic diversity of Indian elite rice varieties. Genetica 108: 269-284.

Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB, 1983. A plant DNA mini-preparation: Version II. Plant Mol Biol Rep 1: 19-21.

Gravois DR, and McNew RW, 1993. Genetic relationship among and selection for rice yield and yield components. Crop Science 33: 249-259.

Hadrys H, Balick M and Schierwater B, 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol Ecol 1: 55-63.

Haig SM, Rhymer JM and Heckel DG, 1994. Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers Picoides borealis. Mol Ecol 3: 581-595.

Khush GS and Brar DS, 2002. Biotechnology for rice breeding: Progress and Potential impact. In the Proceeding of the 20th Session of the International Rice Commission, 23 - 26th July, 2002, Bangkok, Thailand.

Ko HI, Cowan DC, Henry RJ, Graham GC, Blakeney AB and Lewin LG, 1994. Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Euphytica 80: 179-189.

Mackil DJ, 1995. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. Crop Sci 35: 889-894.

Michelmore RW, Paran I and Kesseli RV, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9828-9832.

Neeraja CN, Sarla N and Siddiq EA, 2002. RAPD analysis of genetic diversity in Indian landraces of rice (*Oryza sativa* L). J Plant Biochem Biotechnol 11: 93-97.

Nei M and Li WH, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA 76: 5269-5273.

Nematzadeh GA and Kiani G, 2007. Agronomic and quality characteristics of high-yielding rice lines. Pak J Biol Sci 10: 142-144.

Nematzadeh GA and Khush GS, 1993. Classification of rice germplasm from Iran through isozyme analysis. Rice Genetics Newsletter 10: 74-75.

Parsons BJ, Newbury HJ, Jackson MT and Fordlloyd BV, 1999. The genetic structure and conservation of aus, aman and boro rices from Bangladesh. Genet Resour Crop Evol 46: 587-598.

Porreca P, Sabina MR, Martelli G, Sunseri F, Greco I, Pruneddu G and Spanu A, 2001. Genetic variability among Italian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars investigated by RAPDs analysis. J Genet Breed 49: 553-355.

Raghunathachari P, Khanna VK, Singh US and Singh NK, 2000. RAPD analysis of genetic variability in Indian scented rice germplasm (*Oryza sativa* L.). Curr Sci, 79: 994-998.

Rabbani MA, Pervaiz ZH and Masood MS, 2008. Genetic diversity analysis of traditional and improved cultivars of Pakistani rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD markers. Electron J Biotechnol 11: 1-10.

Rahman SN, Islam MDS, Alam MDS and Nasiruddin KM, 2007. Genetic polymorphism in rice (*Oryza sativa* L.) through RAPD analysis. Indian J Biotechnol 6: 224-229.

Ren F, Lu B, Li S, Huang J and Zhu YA, 2003. Comparative study of genetic relationships among the AA genome Oryza species using RAPD and SSR markers. Theor Appl Genet 108: 113-120.

Rohlf FJ, 1992. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 1.7. New York, Exeter Publications.

Saker MM, Youssef SS, Abdallah NA, Bashandy HS, and Elsharkawy AM, 2005. Genetic analysis of some Egyptian rice genotypes using RAPD, SSR and AFLP. Afric J of Biotechnol 4: 882-890.

Tautz D, 1989. Hypervariablity of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res 17: 6463-6471.

Thomas G, Mohapatra T, Rao AR and Sharma RP, 2006. Distinguishing Indian commercial wheat varieties using RAPD based DNA fingerprints. Indian J Biotechnol 5: 200-206.

Verma SK, Khanna V and Singh N, 1999. Random amplified polymorphic DNA analysis of Indian scented basmati rice (*Oryza sativa* L.) germplasm for identification of variability and duplicate accessions, if any. Electrophoresis 20: 1786-1789.

Virk PS, Newbury HJ, Jackson MT and Fordlloyd BV, 1995. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. Theor Appl Genet 90: 1049-1055.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23: 4407-4414.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18: 6531-6535.