



مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC



مقاله کوتاه

ارزیابی فواصل ژنتیکی ارقام برنج با استفاده از نشانگرهای RAPD

* غفار کیانی

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

تاریخ دریافت: 1391/03/19، تاریخ پذیرش: 1392/09/06

چکیده

در برنامه های اصلاحی برنج از طریق هیبریداسیون برای تولید لاین های جدید، اطلاع از فواصل و تشابهات ژنتیکی بین ارقام امری ضروری می باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی فواصل ژنتیکی شانزده رقم برنج با استفاده از تجزیه و تحلیل RAPD انجام شده است. از 15 آغازگر مورد استفاده 8 آغازگر تولید چندشکلی نمودند و تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر از 4 (OPB-04) تا 11 (OPD-11) با متوسط 7/75 باند برای هر آغازگر متغیر بود. از مجموع 62 باند، 43 باند (69/35%) چندشکلی بین ارقام را نشان دادند. تجزیه و تحلیل خوشه ای در معیار فاصله ژنتیکی 15، ارقام مورد مطالعه را در 5 خوشه گروه بندی نمود. نتایج این مطالعه نشان داد که ارقام هاشمی و پویا بیشترین فاصله ژنتیکی را از همدیگر و نیز نسبت به سایر ارقام داشتند. اطلاعات بدست آمده در این تحقیق برای انتخاب والدین متفاوت از نظر ژنتیکی در برنامه های آتی اصلاح برنج در ایران مفید خواهد بود.

کلمات کلیدی: برنج، فواصل ژنتیکی، نشانگر RAPD.

گروه I یا ایندیکا، بیشتر از 50 درصد جزء گروه V (ارقام کیفی) و 5/6 درصد جزء گروه VI یا ژاپونیکا می‌باشند. همچنین مطالعه آنان نشان داد که گروه V برنج ایرانی دارای 23 درصد فاصله ژنتیکی با گروه I یا ایندیکا و 57 درصد فاصله ژنتیکی با گروه VI یا ژاپونیکا هستند.

تعداد 54 رقم توسط Vaezi (2000) جمع آوری و تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج وی حاکی از وجود تنوع زیادی در ژرم-پلاسم کشور بود. همچنین Aghazadeh-ghulaki et al. (2000) 56 رقم برنج ایرانی را از طریق نشانگر RAPD طبقه‌بندی نمودند که 12 آغازگر چندشکلی مطلوبی را نشان دادند. در مطالعه آنان ضریب تشابه ارقام از 44 تا 91 درصد متغیر بود و تجزیه خوشه‌ای در فاصله ژنتیکی 18 درصد، ارقام مورد مطالعه آنان را در 7 خوشه مختلف گروه‌بندی نمود. در زمینه ارزیابی تنوع و قرابت ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از نشانگر RAPD در سطح بین المللی نیز گزارشات متعددی وجود دارد (Raghunathachari et al., 2000; Porreca et al., 2001; Rahman et al., 2007; Rabbani et al., 2008). در ایران ارقام مختلفی از برنج اصلاح و معرفی شده است. اطلاع درباره تشابهات و فواصل ژنتیکی بین اینگونه ارقام هدف این تحقیق بوده است.

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 دورگ گیری 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 مهمترین آنها عبارتند از AFLP, RAPD, RFLP و SSR. 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 می‌آورد (Hadrys et al., 1992).

در ایران طبقه‌بندی ژرم پلاسم برنج از طریق نشانگرهای بیوشیمیائی توسط Nematzadeh & Khush (1993) انجام شد. در طبقه‌بندی مورد نظر، از 178 رقم برنج ایرانی استفاده گردید. نتایج تحقیق آنان نشان داد که، 5/5 درصد از برنج‌های ایران جزء

افزار NTSYS (Rohlf, 1992) و SPSS انجام گرفت.

در این مطالعه نشانگرهای RAPD توانستند ارقام برنج را از همدیگر متمایز نمایند، به طوری که از 15 نشانگر مورد استفاده 8 نشانگر OPA-04، OPA-11، OPA-12، OPB-04، OPC-01، OPD-11، OPH-12 و OPH-20 باندهای قابل تکثیر و نمره‌دهی را تولید نمودند (جدول 1). شکل 1 بطور نمونه الگوی‌های باندهای برای آغازگرهای OPA-12 و OPH-20 در ارقام مورد مطالعه نشان می‌دهد. در مجموع 62 باند RAPD در ارقام مورد مطالعه تولید شدند که اندازه این باندها از 350 تا 1800 جفت باز متغیر بود (جدول 1). تعداد باندهای تولید شده به ازای هر آغازگر از 4 (OPB-04) تا 11 (OPD-11) با متوسط 7/75 باند متغیر بود. از مجموع 62 باند تولید شده، تعداد 43 باند (69/35 درصد) بین ارقام چندشکلی را نشان دادند. آغازگرهای OPA-12 و OPB-04 بیشترین درصد باندهای چندشکل را داشتند، در حالی که حداقل چندشکلی مربوط به آغازگر OPH-20 بود. متوسط قطعات چندشکل در بین ارقام 5/37 بود (جدول 1). مقدار چندشکلی در این مطالعه با نتایج مطالعات Choudhury *et al.* (2001) مطابقت دارد.

تجزیه خوشه‌ای در معیار فاصله ژنتیکی 15، ارقام مورد مطالعه را در 5 گروه دسته گروه بندی نمود (شکل 2). خوشه 1 شامل سه زیر گروه بود و

در این تحقیق از شانزده ژنوتیپ برنج استفاده گردید. بذور از موسسه تحقیقات برنج آمل تهیه شدند. ارقام در سال زراعی 1390 در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کشت شدند. استخراج DNA از نمونه‌های برگ طبق روش Dellaporta *et al.* (1983) انجام گرفت. آنالیز PCR با استفاده از 15 نشانگر RAPD انجام شد. مخلوط واکنش 25 میکرولیتری شامل 50 نانوگرم DNA، 2/5 میکرولیتر بافر 10X، 0/3 میکرولیتر dNTPs 10 میلی مولار، 1 میکرولیتر 50 MgCl₂ میلی مولار، 1 میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت 2 میکرومولار و 1 واحد آنزیم Taq پلی مرز بود. واکنش PCR با پروفیل حرارتی 5 دقیقه برای 94°C، 40 چرخه از 94°C به مدت 1 دقیقه، 35°C به مدت 1 دقیقه و 72°C به مدت 2 دقیقه و نهایتاً 72°C به مدت 5 دقیقه انجام شد. فراورده‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز 1/5% در بافر TAE پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برمایند عکسبرداری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

باندهای RAPD بصورت چشمی نمره دهی شدند. حضور باند با 1 و عدم حضور با 0 بطور جداگانه برای تمام آغازگرها در ارقام مختلف کد گذاری شدند. ضریب تشابه ژنتیکی (F) برای تمام ارقام بصورت جفتی با استفاده از فرمول Nei and Li (1979) محاسبه گردید. سپس از ضرایب تشابه بدست آمده، برای ارزیابی روابط بین ارقام از تجزیه خوشه‌ای استفاده گردید. محاسبات با استفاده از نرم

دورگ‌گیری توجه ویژه‌ای به آن شود. تلاقی بین ژنوتیپ‌های با فاصله ژنتیکی بیشتر هتروزیس بالاتری را بدنبال دارد. اینگونه مطالعات در زمینه روابط خویشاوندی بین ارقام مختلف توسط محققین مختلفی گزارش شده است (Porreca *et al.*, 2001; Neeraja *et al.*, 2002; Saker *et al.*, 2005; Rabbani *et al.*, 2008).

اطلاعات بدست آمده درباره فواصل و تشابهات ژنتیکی در طراحی برنامه‌های اصلاحی آتی برنج برای تولید لاین‌های جدید ضروری است. این مطالعه نشان می‌دهد که نشانگر RAPD به طور موثر ارقام مختلف برنج را از همدیگر متمایز نمود. اطلاعات به دست آمده در این مطالعه برای انتخاب مناسب والدین در برنامه‌های اصلاحی از طریق دورگ‌گیری در برنج مفید خواهد بود.

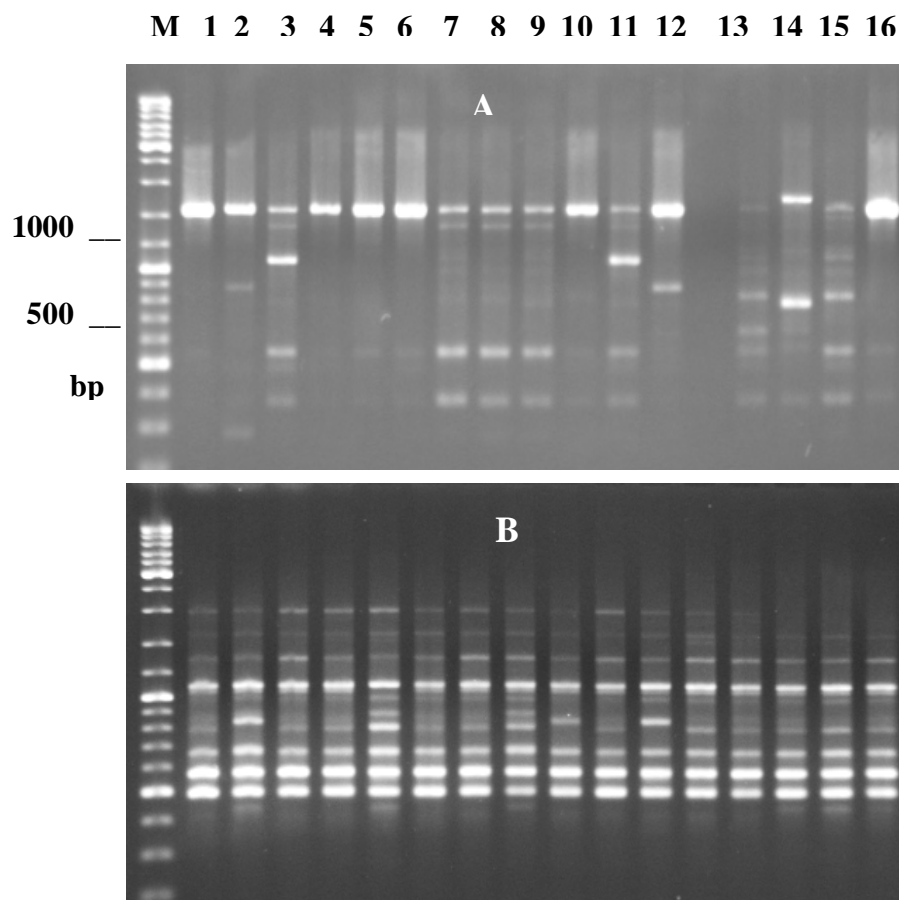
اکثر ارقام در آن قرار گرفتند. در این خوشه ضرایب تشابه ژنتیکی از 0/73 (تابش با سپیدرود) تا 0/98 (قائم با پژوهش) متغیر بود که مبین وجود تنوع نسبتاً کم در بین ارقام موجود در این خوشه می‌باشد. بنابراین در برنامه‌های دورگ‌گیری از تلاقی این ارقام با همدیگر باید اجتناب شود. سایر ارقام، یعنی خزر، پردیس، پویا 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 (0/59) و رقم هاشمی با هر یک از ارقام ندا، چمپا و آمل 3 با مقدار 0/61 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

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 4، زمستان 1392)

جدول 1- آغازگرهای RAPD در مطالعه بررسی فواصل ژنتیکی ارقام برنج.

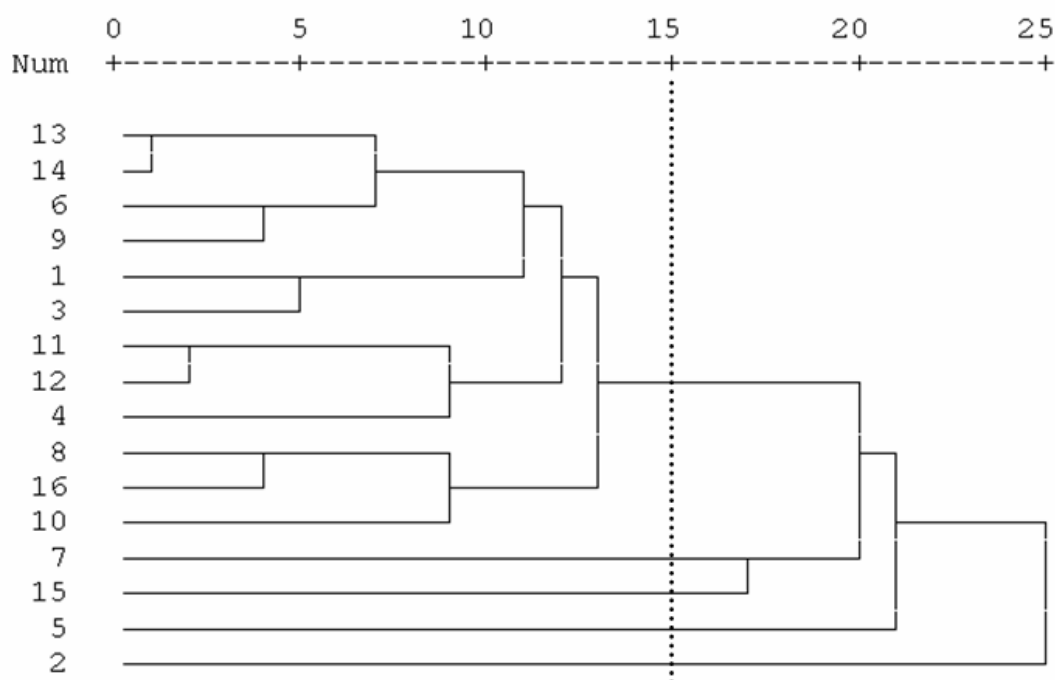
Table 1- RAPD primers in the study of genetic distances for rice varieties.

وزن باندها (bp) Band weights	درصد چندشکلی Polymorphi sm percent	باندهای چندشکل Polymorphi c bands	باندهای تکثیر شده Amplified bands	توالی (5'-3') Sequence	نام نشانگر Primer name
500-1200	50	4	8	AATCGGGC TG	OPA- 04
350-1700	66.67	4	6	CAATCGCC GT	OPA- 11
400-1250	100	7	7	TCGGCGAT AG	OPA- 12
550-1800	100	4	4	GGA CTGGA GT	OPB- 04
350-1600	85.71	6	7	CTCACCGT CC	OPC- 01
350-1250	81.82	9	11	AGCGCCAT TG	OPD- 11
400-1250	55.56	5	9	ACGCGCAT GT	OPH- 12
500-1300	40	4	10	GGGAGAC ATC	OPH- 20
		43	62		Total



شکل 1- نمونه ای از الگوهای نواری نواری ارقام برنج با استفاده از آغازگر OPA-12 (الف) و OPH-20 (ب). M: مارکر وزنی 100 جفت باز، اعداد 1 تا 16 بترتیب ندا، هاشمی، شیرویدی، تابش، پویا، فجر، خزر، شفق، نعمت، دشت، چمپا، آمل 3، قائم، پژوهش، پردیس و سپیدرود می باشند.

Figure 1- Sample of RAPD profiles of rice varieties using primer OPA-12 (A) and OPH-20 (B). M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder), numbers 1 to 16 are Neda, Hashemi, Shiroudi, Tabesh, Pouya, Fajr, Khazar, Shafagh, Nemat, Dasht, Champa, Amol-3, Ghaem, Pajouhesh, Pardis and Sepidrood, respectively.



شکل 2- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ارقام برنج بر اساس داده‌های حاصل از RAPD. اعداد 1 تا 16 بترتیب ندا، هاشمی، شیروودی، تابش، پویا، فجر، خزر، شفق، نعمت، دشت، چمپا، آمل-3، قائم، پژوهش، پردیس و سپیدرود می‌باشند.

Figure 2- Dendrogram of rice varieties constructed by cluster analysis of RAPD data. Numbers 1 to 16 are Neda, Hashemi, Shiroudi, Tabesh, Pouya, Fajr, Khazar, Shafagh, Nemat, Dasht, Champa, Amol-3, Ghaem, Pajouhesh, Pardis and Sepidrood, respectively.

منابع

- Vaezi B (2000). Genetic diversity and classification of rice germplasm through morphological and RAPD markers. M.Sc. Thesis, Mazandaran University, Babolsar, Iran.
- Aghazadeh-ghulaki R (2000). Classification of rice germplasm through RAPD markers. M.Sc. Thesis, Mazandaran University, Babolsar, Iran.
- Choudhury PR, Kohli S, Srinivasan K, Mohapatra T, Sharma RP (2001). Identification and classification of aromatic rices based on DNA fingerprinting. *Euphytica* 118: 243-251.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA mini-preparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Gravois DR, McNew RW (1993). Genetic relationship among and selection for rice yield and yield components. *Crop Science* 33: 249-259.

- Hadrys H, Balick M, Schierwater B (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.
- Neeraja CN, Sarla N, Siddiq EA (2002). RAPD analysis of genetic diversity in Indian landraces of rice (*Oryza sativa* L). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 11: 93-97.
- Nei M, Li WH (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of National Academy of Science USA* 76: 5269-5273.
- Nematzadeh GA, Khush GS (1993). Classification of rice germplasm from Iran through isozyme analysis. *Rice Genetics Newsletter* 10: 74-75.
- Porreca P, Sabina MR, Martelli G, Sunseri F, Greco I, Pruneddu G, Spanu A (2001). Genetic variability among Italian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars investigated by RAPDs analysis. *Journal of Genetics and Breeding* 55:349-355.
- Rabbani MA, Pervaiz ZH, Masood MS (2008). Genetic diversity analysis of traditional and improved cultivars of Pakistani rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 11: 1-10.
- Raghunathachari P, Khanna VK, Singh US, Singh NK (2000). RAPD analysis of genetic variability in Indian scented rice germplasm (*Oryza sativa* L.). *Current Science* 79: 994-998.
- Rahman SN, Islam MDS Alam MDS, Nasiruddin KM (2007). Genetic polymorphism in rice (*Oryza sativa* L.) through RAPD analysis. *Indian Journal of Biotechnology* 6: 224-229.
- 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, Elsharkawy AM (2005). Genetic analysis of some Egyptian rice genotypes using RAPD, SSR and AFLP. *African Journal of Biotechnology* 4: 882-890.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Scott VT (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

Evaluation of Genetic Distances of Rice Varieties using RAPD Markers

Kiani Gh. *

Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

Abstract

In rice breeding programs through hybridization, information on genetic distances and similarities between varieties is necessary for development of new lines. This study conducted with the aim of evaluating genetic distances between sixteen rice varieties using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. Eight out of fifteen primers generated polymorphism and the number of amplification products generated by each primer varied from 4 (OPB-04) to 11 (OPD-11) with an average of 7.75 bands per primer. Out of 62 bands, 43 (69.35 percent) were found to be polymorphic between varieties. Cluster analysis grouped genotypes into 5 clusters. Results of the study showed that varieties Hashemi and Pouya had more genetic distance from each other and from the rest varieties. The information obtained in this study will be helpful in selecting genetically diverse parents for designing rice breeding program in Iran.

Key words: *Rice, Genetic distances, RAPD marker*