تحقیقات غلات
دوره هفتم/ شماره اول/ بهار ۱۳۹۶ (۳۱-۱۷)

بررسی تنوع مولکولی توده‌های مختلف برنج هاشمی شمال کشور با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

علیرضا ترنگ[1*] و مریم حسینی[2]

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۲

چکیده

توده‌های محلی برنج ایران از دیرباز در نقاط مختلف برنج‌خیز کشور کشت می‌شوند. این توده‌ها طی سالیان متمادی به شرایط محیطی مختلف سازگار شده‌اند و در نتیجه تنوع نسبتاً زیادی ممکن است در هر کدام از توده‌ها مشاهده شود. از چندین سال پیش تا کنون، کشت رقمی به نام هاشمی که از ارقام محلی برنج ایرانی است، رایج شده است، به‌طوری‌که بیشتر سطح زیر کشت استان گیلان و بخشی از نواحی استان مازندران و حتی برخی از استان‌های دیگر هم‌اکنون به رقم هاشمی اختصاص دارد. با این‌حال، رقمی که با یک نام واحد هاشمی در مناطق مختلف کشور کشت می‌شود، از لحاظ ویژگی‌های مرفولوژیک نظیر ارتفاع بوته و طول دوره رشد و حتی ویژگی‌های ظاهری دانه تنوع بسیار زیادی نشان می‌دهد. اگرچه اثر عوامل محیطی بر ویژگی‌های مرفولوژیک بسیار زیاد است، اما پرسش تحقیق حاضر این بود که آیا در درون این رقم تنوع ژنتیکی وجود دارد؟ برای دستیابی به پاسخ مناسب، ابتدا ۸۷ ژنوتیپ همگی با نام رقم هاشمی شامل ۳۰ ژنوتیپ از غرب استان گیلان، ۴۲ ژنوتیپ از شرق استان گیلان و ۱۵ ژنوتیپ از استان مازندران جمع‌آوری و در مزرعه آزمایشی موسسه تحقیقات برنج کشور در رشت در سال ۱۳۹۳ کشت شدند و سپس تنوع مولکولی آن‌ها با ۲۰ نشانگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از محاسبه همه شاخص‌های تنوع نشان داد که تنوع نسبتاً زیادی در بین ۸۷ ژنوتیپ مورد مطالعه وجود دارد و از این‌رو می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آنچه که به نام رقم هاشمی در مناطق مختلف کشت می‌شود، در حقیقت یک توده بسیار متنوع است که در اثر استفاده از بذرهای خود مصرفی و احتمالاً اختلاط فیزیکی بذر ارقام مختلف و در نتیجه نوترکیبی بین آن‌ها به یک توده بسیار متنوع تبدیل شده است. بنابراین، پیشنهاد می‌شود ضمن حفظ این ژنوتیپ‌ها در بانک ژن برنج ایران و احتمالاً استفاده از ویژگی‌های مطلوب آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی، خالص‌سازی این توده متنوع نیز انجام شود تا بذر خالص بهترین ژنوتیپ‌ها در اختیار کشاورزان قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، خلوص بذر، رقم هاشمی

۱- استادیار پژوهش، شعبه گیلان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
۲- استادیار پژوهش، بخش اصلاح و تهیه بذر، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
* نویسنده مسئول: a_tarang@hotmail.com

مقدمه

برنج، یکی از مهم‌ترین محصولات گیاهی در چرخه غذایی انسان است، به‌طوری‌که غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان و به‌ویژه فقیرترین قشر مردم دنیا را تأمین می‌کند. برنج از گیاهان زراعی مهم در قاره آسیاست و بیش از ۹۰ درصد آن در آسیا تولید و مصرف می‌شود (FAO, 2014). در هر کشوری بسته به سلیقه مصرف کنندگان، نوع ارقام برنجی که مورد کشت وکار قرار می‌گیرند، متفاوت است. از نظر مصرف کنندگان ایرانی، برنجی خوش کیفیت است که علاوه بر ظاهر مناسب از کیفیت پخت و خوراک مناسبی برخوردار بوده و پس از پخت، دانه‌ها به هم نچسبند (Hosseini and Sorkhe, 2015). ارقام محلی برنج که از دیرباز در مناطق مختلف ایران کشت می‌شده‌اند، بسیار خوش کیفیت بوده و به لحاظ خصوصیات مرتبط با کیفیت پخت، عطر و طعم مناسب، مورد استقبال مصرف کننده ایرانی هستند و به این دلیل است که بیشتر سطح زیر کشت استان‌های مهم برنج‌خیز کشور یعنی گیلان، مازندران و تا حدی استان گلستان به کشت ارقام محلی برنج اختصاص دارد.

رقم برنج محلی با نام هاشمی، به دلیل داشتن خصوصیات ظاهری مناسب و کیفیت پخت عالی، نسبت به سایر ارقام محلی برنج محبوبیت بیشتری دارد و کشاورزان کشت این رقم را به سایر رقم‌های برنج ترجیح می‌دهند. رقم محلی هاشمی که حاصل انتخاب از توده محلی برنج بوده است، در سطح وسیعی از شالیزارهای کشور کشت می‌شود، اما تنوع زیادی در این رقم مشاهده می‌شود و به نظر می‌رسد آنچه که به نام رقم هاشمی مورد کشت و کار قرار می‌گیرد، در واقع یک توده محلی برنج شامل مخلوطی از ژنوتیپ‌های مختلف است. از طرفی کشاورزان برای کشت ارقام محلی برنج از بذرهای خودمصرفی استفاده می‌کنند و همین عامل موجب ایجاد تنوع و ناخالصی در بذر شده و طی چند سال زراعی، توده‌های متنوعی از رقم اولیه به وجود می‌آید. ازطرفی عوامل محیطی نقش زیادی در به وجود آمدن تنوع مورفولوژیک دارند و از این‌رو برای آگاهی از تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌ها اغلب تنوع مولکولی در سطح ژنوم مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

تا کنون محققان زیادی در خصوص تنوع مولکولی ژرم پلاسم‌های مختلف برنج بررسی کرده‌اند. لاپیتان و همکاران (Lapitan *et al.*, 2007) ۲۴ رقم برنج با کیفیت پخت مطلوب را با استفاده از ۱۶۴ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند و در مجموع ۸۹۰ آلل مشاهده کردند. بیشترین و کمترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) به ترتیب برای نشانگرهای RM473 و RM420 و میانگین شاخص شانون محاسبه شده در این تحقیق ۰/۷۱ اعلام شد. در بررسی دیگری، ۶۹ رقم برنج از جنس ایندیکا و ژاپنیکا با استفاده از ۲۶ نشانگر ریزماهواره بررسی و در مجموع ۲۱۸ آلل مشاهده و بیشترین میزان اطلاعات چند شکلی برای نشانگر RM259 و کمترین آن برای نشانگر RM148 محاسبه شد (Giarrocco *et al.*, 2007). سی‌تارام و همکاران (Seetharam *et al.*, 2009) با مطالعه تنوع ژنتیکی ۳۰رقم برنج که شامل ارقام بومی هند، لاین‌های خالص و رقم‌های اصلاح شده مقاوم به شوری بودند، با استفاده از ۳۵ نشانگر ریزماهواره گزارش کردند که بیشترین و کمترین میزان اطلاعات چندشکلی به ترتیب مربوط به نشانگرهای RM274 و RM580 و میانگین ۰/۴۶ بود. پراباکاران و همکاران (Prabakaran *et al.*, 2010) تنوع مولکولی ۱۲ ژنوتیپ را با استفاده از ۵ نشانگر ریزماهواره بررسی کردند. از بین نشانگرهای به کار برده شده در این تحقیق، RM481 بیشترین تعداد آلل و بیشترین میانگین اطلاعات چندشکلی را نشان داد.

طبخ‌کار و همکاران (Tabkhkar *et al.*, 2012) تنوع ژنتیکی ۴۸ رقم برنج را با استفاده از ۷ نشانگر ریزماهواره بررسی نمودند که تمامی این نشانگرها لینکاژ زیادی با QTLهای اصلی کنترل کننده صفات کیفی پخت و خوراک برنج (AC، GC و GT) واقع روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۶ داشتند. نتایج تحقیقات آن‌ها توانمندی و پتانسیل نشانگرهای ریزماهواره را جهت تشخیص رقم‌های برنج با مقادیر متنوع AC، GC و GT تایید کرد. این محققین، نشانگرهایRM314 و RM276 را حاوی بیشترین اطلاعات مفید جهت انتخاب به‌کمک نشانگر معرفی کردند. متین و همکاران (Matin *et al.*, 2012) به بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲ رقم برنج بومی بنگلادش با استفاده از ۱۸ نشانگر ریزماهواره پرداختند. در مجموع ۷۹ آلل مشاهده شد که میانگین آلل‌های مشاهده شده ۴/۳۹ برای هر نشانگر بود. بیشترین و کمترین میزان اطلاعات چندشکلی به دست آمده ۰/۷۸۲ و ۰/۴۷۷ بود و نشانگر RM13 بیشترین میزان PIC را داشت. حسین و همکاران (Hossain *et al.*, 2012) با استفاده از ۲۴ نشانگر ریزماهواره به بررسی ۱۲ ژنوتیپ برنج معطر بنگلادش

پرداختند و اعلام کردند که نشانگر RM163 بیشترین میزان اطلاعات چندشکلی را به خود اختصاص داد. پراتفا و همکاران (Prathepha *et al.*, 2012) با بررسی ۱۰۰ رقم برنج نواحی تایلند و لائوس با استفاده از ۷ نشانگر ریزماهواره، گزارش کردند که در مجموع ۸۳ آلل مشاهده شده که سهم هر نشانگر ۱۱/۸۵ بود. بررسی‌های تنوع ژنتیکی انجام شده نشان داد ژرم پلاسم برنج لائوس تنوع بیشتری نسبت به جمعیت برنج‌های تایلند دارد.

سینگ و همکاران (Singh *et al.*, 2013) تنوع موجود در ۳۵ رقم برنج محلی هند را با ۲۵ نشانگر ریزماهواره ارزیابی کردند. آن‌ها میانگین تعداد آلل‌ها را ۲/۴ و میزان PIC را بین ۰/۴۱ تا ۰/۹۰ با میانگین ۰/۷۹ به‌دست آوردند و با تجزیه خوشه‌ای رقم‌ها را به دو گروه *O.rufipogon* و *O.nivara* تقسیم کردند. سرایلو و همکاران (Sarayloo *et al.*, 2015) تنوع ژنتیکی ۲۲ ژنوتیپ برنج را با استفاده از ۲۲ نشانگر ریزماهواره پیوسته با صفت مقاومت به خشکی بررسی کردند. در تحقیق آن‌ها در مجموع ۱۰۶ آلل مشاهده شد و میانگین آلل‌های مشاهده شده ۴/۸۲ برای هر نشانگر بود. میزان اطلاعات چندشکلی از ۰/۲۹ تا ۰/۸۲ و میانگین آن ۰/۶۴ بود. کمترین مقدار PIC برای نشانگرهای RM7424 و RM119 و بیشترین مقدار آن برای نشانگرهای RM7000، RM184 و RM7426 مشاهده شد.

تا کنون تنوع موجود در رقم هاشمی که در نقاط مختلف کشت می‌شود، مورد بررسی قرار نگرفته است. از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع مولکولی بین توده‌های رقم هاشمی جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف استان‌های گیلان و مازندران و دسته‌بندی ژنوتیپ‌هایی که به نام رقم هاشمی کشت می‌شوند، انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای انجام این پژوهش، ابتدا بذر ژنوتیپ‌هایی که به نام رقم هاشمی در مناطق مختلف استان‌های گیلان و مازندران شناخته می‌شدند، جمع‌آوری شدند (جدول ۱). جمع‌آوری این ژنوتیپ‌ها به‌صورت خوشه و در مزرعه در سال زراعی ۱۳۹۲ انجام و به هر کدام از ژنوتیپ‌ها یک کد اختصاص داده شد. در مجموع ۸۷ ژنوتیپ با نام هاشمی جمع‌آوری و بر اساس مناطق جمع‌آوری و شباهت‌ها و تفاوت‌های مشاهده شده بین آن‌ها، به سه زیرجمعیت (زیرجمعیت اول شامل ۳۰ ژنوتیپ از منطقه غرب استان گیلان، زیرجمعیت دوم شامل ۴۲ ژنوتیپ از منطقه شرق استان گیلان و زیرجمعیت سوم شامل ۱۵ ژنوتیپ از استان مازندران) تقسیم شدند. در سال زراعی دوم (سال ۱۳۹۳) خوشه‌های هر ژنوتیپ در خزانه کشت و سپس در مزرعه اصلی در کرت‌های ۱۲ متر مربعی به ابعاد ۲×۶ متر با فاصله ۲۵ سانتی‌متر از هر طرف نشا شدند. مراقبت‌های مزرعه‌ای در طول فصل زراعی مطابق روش رایج منطقه انجام شد. در طول فصل زراعی، بوته‌های خارج از رده دقیقاً شناسایی و با حذف آن‌ها، ژنوتیپ‌ها خالص‌سازی شدند و سپس در مرحله حداکثر پنجه‌دهی، نمونه‌های برگی هر ژنوتیپ جهت استخراج DNA ژنومی تهیه شد.

انتخاب نشانگرها و انجام آزمایش‌های مولکولی

استخراج DNA از نمونه‌های برگی به روش CTAB انجام شد (Murray and Thompson, 1980). با مطالعه منابع مختلف و بررسی نقشه ژنتیکی ارایه شده توسط مک‌کوش و همکاران (McCouch *et al.*, 2002)، ۲۰ نشانگر ریزماهواره مناسب از طریق وبگاه گرامنه (Gramene, 2005) انتخاب و آغازگرهای مورد نظر از شرکت سیناکلون تهیه شدند (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۳/۸ میکرولیتر محلول مادری (شرکت سیناکلون) و آغازگر مستقیم و معکوس هر یک با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر به‌میزان ۰/۵ میکرولیتر بود که به تیوب‌های محتوای ۳ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر اضافه شد و سپس با آب‌مقطر به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. به تیوب‌ها مقدار ۱۲ میکرولیتر روغن معدنی اضافه و بلافاصله به دستگاه ترموسایکلر (Biometra, T-gradient) منتقل شدند. برنامه حرارتی PCR شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۵-۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ ثانیه بود که در انتها بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد.

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های برنج مطالعه شده در این تحقیق

Table 1. Characteristics of studied rice genotypes in current study

شماره No.	منطقه Location	استان Province	شماره No.	منطقه Location	استان Province
1	آستارا Astara	گیلان Guilan	24	ماسوله Masouleh	گیلان Guilan
2	لوندویل Lavandavil	گیلان Guilan	25	شولم Sholam	گیلان Guilan
3	چوبر Chobar	گیلان Guilan	26	گوراب‌پس Gorabpas	گیلان Guilan
4	حویق Havigh	گیلان Guilan	27	کلیدبر Kelidbar	گیلان Guilan
5	لیسار Lisar	گیلان Guilan	28	تولم Tolam	گیلان Guilan
6	هشتپر Hashtbar	گیلان Guilan	29	فومن۲ Fuman 2	گیلان Guilan
7	اسالم Asalem	گیلان Guilan	30	شفت Shaft	گیلان Guilan
8	طولارود Toolroud	گیلان Guilan	31	خشکه‌بیجار Khoshkehbijar	گیلان Guilan
9	پره سر Parasar	گیلان Guilan	32	کوچصفهان Kochesfahan	گیلان Guilan
10	دیناچال Dinachal	گیلان Guilan	33	لشت‌نشا Lashtenesha	گیلان Guilan
11	پونل Ponel	گیلان Guilan	34	آستانه ۱ Astaneh 1	گیلان Guilan
12	رضوانشهر Rezvanshahr	گیلان Guilan	35	آستانه ۲ Astaneh 2	گیلان Guilan
13	شنگاور Shangavar	گیلان Guilan	36	آستانه ۳ Astaneh 3	گیلان Guilan
14	شیخ‌نشین Shikhneshin	گیلان Guilan	37	آستانه ۴ Astaneh 4	گیلان Guilan
15	شاندرمن Shanderman	گیلان Guilan	38	کیسم ۱ Kisom 1	گیلان Guilan
16	ماسال Masal	گیلان Gilan	39	کیسم ۲ Kisom 2	گیلان Guilan
17	تاسکوه Taskoo	گیلان Gilan	40	رودبنه Roudbaneh	گیلان Guilan
18	ضیابر Ziabar	گیلان Gilan	41	دهکاه Dahkah	گیلان Guilan
19	طاهرگوراب Tahergorab	گیلان Gilan	42	دهشال Dehshal	گیلان Guilan
20	بهمبر Bahmbar	گیلان Guilan	43	ده‌سو Dehsoo	گیلان Guilan
21	گوراب‌زرمیخ Gorabzarmikh	گیلان Guilan	44	بازکیاگوراب Bazkiaghorab	گیلان Guilan
22	ماکلوان Maklavan	گیلان Guilan	45	لفمجان Lafmajan	گیلان Guilan
23	فومن ۱ Fuman 1	گیلان Guilan	46	لیالستان Lialastan	گیلان Guilan

جدول ۱- ادامه

Table 1. Continued

شماره No.	منطقه Location	استان Province	شماره No.	منطقه Location	استان Province
47	لنگرود ۱ Langroud 1	گیلان Guilan	68	حاجی‌آباد Hajiabadd	گیلان Guilan
48	لنگرود ۲ Langroud 2	گیلان Guilan	69	چابکسر ۱ Chaboksar 1	گیلان Guilan
49	لنگرود ۳ Langroud 3	گیلان Guilan	70	چابکسر ۲ Chaboksar 2	گیلان Guilan
50	شلمان ۱ Shalman 1	گیلان Guilan	71	چابکسر ۳ Chaboksar 3	گیلان Guilan
51	شلمان ۲ Shalman 2	گیلان Guilan	72	چابکسر ۴ Chaboksar 4	گیلان Guilan
52	کومله Komleh	گیلان Guilan	73	رامسر Ramsar	مازندران Mazandaran
53	اطاقور Otaghvar	گیلان Guilan	74	شیرود ۱ Shiroud 1	مازندران Mazandaran
54	رانکوه Rankoo	گیلان Guilan	75	شیرود ۲ Shiroud 2	مازندران Mazandaran
55	سمام Samam	گیلان Guilan	76	تنکابن Tonkabon	مازندران Mazandaran
56	کجید Kajid	گیلان Guilan	77	نشتارود Nashtaroud	مازندران Mazandaran
57	لونک Lonak	گیلان Guilan	78	چالوس Chalous	مازندران Mazandaran
58	دیلمان ۱ Dilaman 1	گیلان Guilan	79	نور Noor	مازندران Mazandaran
59	دیلمان ۲ Dilaman 2	گیلان Guilan	80	نکا Neka	مازندران Mazandaran
60	کنیه‌گوراب Kenehgorab	گیلان Guilan	81	رستم‌کلا Rostamkola	مازندران Mazandaran
61	رحیم‌آباد Rahimabad	گیلان Guilan	82	آمل ۱ Amol 1	مازندران Mazandaran
62	واجارگاه Vajargah	گیلان Guilan	83	آمل ۲ Amol 2	مازندران Mazandaran
63	چینی‌جان Chinijan	گیلان Guilan	84	فریدون‌کنار Feridonkenar	مازندران Mazandaran
64	کلاچای ۱ Kelachei 1	گیلان Guilan	85	بابل Babol	مازندران Mazandaran
65	کلاچای ۲ Kelachei 2	گیلان Guilan	86	بابلسر Babolsar	مازندران Mazandaran
66	کلاچای ۳ Kelachei 3	گیلان Guilan	87	رودپی Roudpie	مازندران Mazandaran
67	بی‌بالاخان Bibalakhan	گیلان Guilan	-	-	-

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Table 2. Characteristics of the primers used in this research

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer sequence (5–3)	موتیف Motif	اندازه قطعه Product size (bp)	کروموزوم Chromosome
RM11	Forward TCTCCTCTTCCCCCGATC Reverse ATAGCGGGCGAGGCTTAG	(GA)17	140	7
RM124	Forward ATCGTCTGCGTTGCGGCTGCTG Reverse CATGGATCACCGAGCTCCCCCC	(TC)10	271	4
RM125	Forward ATCAGCAGCCATGGCAGCGACC Reverse AGGGGATCATGTGCCGAAGGCC	(GCT)8	127	7
RM144	Forward TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC Reverse GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG	(ATT)11	237	11
RM152	Forward GAAACCACCACACCTCACCG Reverse CCGTAGACCTTCTTGAAGTAG	(GGC)10	151	8
RM171	Forward AACGCGAGGACACGTACTTAC Reverse ACGAGATACGTACGCCTTTG	(GATG)5	328	10
RM178	Forward TCGCGTGAAAGATAAGCGGCGC Reverse GATCACCGTTCCCTCCGCCTGC	(GA)5(AG)8	117	5
RM259	Forward TGGAGTTTGAGAGGAGGG Reverse CTTGTTGCATGGTGCCATGT	(CT)17	162	1
RM277	Forward CGGTCAAATCATCACCTGAC Reverse CAAGGCTTGCAAGGGAAG	(GA)11	124	12
RM283	Forward GTCTACATGTACCCTTGTTGGG Reverse CGGCATGAGAGTCTGTGATG	(GA)18	151	1
RM284	Forward ATCTCTGATACTCCATCCATCC Reverse CCTGTACGTTGATCCGAAGC	(GA)8	141	8
RM316	Forward CTAGTTGGGCATACGATGGC Reverse ACGCTTATATGTTACGTCAAC	(GT)8(TG)9 (TTTG)4(TG)4	192	9
RM431	Forward TCCTGCGAACTGAAGAGTTG Reverse AGAGCAAAACCCTGGTTCAC	(AG)16	251	1
RM447	Forward CCCTTGTGCTGTCTCCTCTC Reverse ACGGGCTTCTTCTCCTTCTC	(CTT)8	111	8
RM484	Forward TCTCCCTCCTCACCATTGTC Reverse TGCTGCCCTCTCTCTCTCTC	(AT)9	299	10
RM507	Forward CTTAAGCTCCAGCCGAAATG Reverse CTCACCCTCATCATCGCC	(AAGA)7	258	5
RM454	Forward CTCAAGCTTAGCTGCTGCTG Reverse GTGATCAGTGCACCATAGCG	(GCT)8	268	6
RM587	Forward ACGCGAACAAATTAACAGCC Reverse CTTTGCTACCAGTAGATCCAGC	(CT)14	169	2
RM519	Forward GAGAGCCCCTAAATTTCCGA Reverse AGGTACGCTCACCTGTGGAC	(AAG)8	122	12
RM518	Forward CTCTTCACTCACTCACCATGG Reverse ATCCATCTGGAGCAAGCAAC	(TC)15	171	4

لازم به ذکر است که ده دور اول چرخه حرارتی به صورت دمای کاهشی (Touch down) جهت حذف نوارهای شبه ریزماهواره براساس روش ارایه شده توسط دان و همکاران (Don *et al*., 1991) برای امتیازدهی صحیح نوارها برنامه‌ریزی شد. محصولات به دست آمده از واکنش PCR، به منظور مشاهده نحوه تکثیر DNA و الگوی نواری ایجاد شده، روی ژل‌های پلی اکریل آمید ۱۰ درصد منتقل و الکتروفورز آن‌ها با ولتاژ ثابت ۱۴۰ ولت انجام شد. برای مشاهده نوارهای ایجاد شده به وسیله ژنوتیپ‌های مختلف نیز از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره (Benbouza *et al*., 2006) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی باندها به صورت مشاهده‌ای با صفر (نبودن نوار) و یک (وجود نوار) انجام شد. در مجموع شاخص‌های متفاوتی مانند تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (Takahata and Nei, 1984) تنوع ژنی نی (Nei, 1987)، تعداد آلل‌های مشاهده شده و نیز تعداد آلل‌های موثر (Kimura and Crow, 1964) با استفاده از نرم‌افزار Popgene Ver. 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) محاسبه شد. تجزیه به بردارهای هماهنگ اصلی (PCoA) نیز با نرم‌افزار GeneAlex 6.2 (Peakall and Smouse, 2007) انجام و نمودار دوبعدی مربوطه رسم شد. تشابه و فاصله ژنتیکی بین زیرجمعیت‌ها، بر اساس ضریب تطابق ساده محاسبه و سپس دندروگرام تجزیه به روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYSpc ver. 2.02 (Rohlf, 2000) رسم شد. برای تعیین روابط خویشاوندی درون توده‌ها و زیرجمعیت‌ها، تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار Darwin Ver. 6.0.012 انجام و به‌همراه مقادیر بوت استرپ (Bootstrap) ارایه شد. تجزیه واریانس مولکولی نیز با استفاده از نرم‌افزار Genealex 6.2 انجام و درصد واریانس مولکولی بین و درون زیرجمعیت‌ها محاسبه شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق، ۲۰ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد در مجموع ۵۴ آلل مختلف مشاهده شد. باندهای ایجاد شده توسط هر نشانگر متفاوت بود و الگوی خاص خود را داشت (شکل ۱). همان‌طور که ملاحظه می‌شود، چندشکلی قابل توجهی در بین ۸۷ ژنوتیپ مورد مطالعه وجود داشت که نشان‌دهنده تفاوت مولکولی بین ژنوتیپ‌هایی است که همه آن‌ها با یک نام واحد هاشمی شناخته می‌شوند. این تنوع هم در بین و هم در درون زیرجمعیت‌های مورد مطالعه نیز مشاهده شد. بنابراین می‌توان گفت ژنوتیپ‌های مختلفی که همه با نام رقم محلی برنج هاشمی کشت می‌شوند، تفاوت‌های زیادی حتی در سطح ژنوم دارند. همه نشانگرهای مورد استفاده ۱۰۰ درصد چند شکل بودند و توانستند تفاوت‌های بین این ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی نشان دهند. نشانگرهای RM124، RM144، RM283، RM316، RM447 و RM507 هر یک با ۴ آلل، بیشترین و نشانگرهای RM11، RM259، RM454، RM587 و RM519 هر یک با ۲ آلل، کمترین تعداد آلل‌ها را ایجاد کردند (جدول ۳). میانگین کل تعداد آلل مشاهده شده نیز ۳ و انحراف معیار آن ۰/۷۹ بود. در مورد تعداد آلل‌های موثر نیز بیشترین تعداد آلل موثر مربوط به نشانگر RM447 با ۸۹۳۲/ ۳ آلل و کمترین آن مربوط به نشانگر RM519 با تعداد ۱/۳۳۴۹ آلل موثر بود و میانگین تعداد آلل‌های موثر برای تمامی نشانگرها ۲/۳۳۳۷ برآورد شد. رابی و همکاران (Rabey *et al.*, 2013) تنوع ژنتیکی ۸ رقم برنج ایندیکا و ژاپنیکا را با استفاده از ۴۶ نشانگر ریزماهواره بررسی و میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده و موثر را به‌ترتیب ۳/۸۳ و ۳/۸۳ گزارش کردند. همچنین، آن‌ها بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده را به‌ترتیب ۶ آلل(RM271) و ۲ آلل(RM133، RM 215 و RM433) و برای تعداد آلل موثر نیز به‌ترتیب ۶ آلل (RM271) و ۲ آلل (RM133، RM 215 و RM433) اعلام کردند. ونکاد و همکاران (Wankhade *et al.*, 2010) نیز بیشترین و کمترین تعداد آلل‌های مشاهده شده را ۸ آلل (RM206) و ۱ آلل (RM248) و میانگین آلل‌های مشاهده شده را ۳/۷ بیان کردند. نتایج تحقیق حاضر با نتایج این محققین نشان می‌دهد که اگرچه تنوع ژنتیکی در مطالعه آن‌ها به دلیل استفاده از ژنوتیپ‌های متفاوت ایندیکا و ژاپنیکا بیشتر است، ولی تنوع ژنتیکی قابل توجهی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق نیز وجود دارد.

برآورد شاخص‌های مختلف تنوع نیز نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های مختلف مورد مطالعه که همه آن‌ها تحت یک نام رقم هاشمی در استان‌های شمالی کشور کشت می‌شوند، وجود دارد، به طوری که متوسط مقدار شاخص شانون، شاخص تنوع ژنی نی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) به‌ترتیب برابر با ۰/۸۷۲۶، ۰/۵۲۲۲، ۰/۵۲۴۰ و۰/۵۳۰۰ بود که همه این مقادیر نشان دهنده تنوع بالا در بین این ژنوتیپ‌ها بودند. علاوه بر آن، بیشترین شاخص شانون (۱/۳۷۲۱)، شاخص نی (۰/۷۴۳۱)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۷۴۵۴) و محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۷۵۶۲) مربوط به نشانگر RM447 و کمترین آن‌ها به ترتیب با مقادیر ۰/۴۱۷۶، ۲۵۰۹، ۰/۲۵۱۸ و ۰/۲۵۸۸ مربوط به نشانگر RM519 بود (جدول۳).

جدول ۳- تجزیه آماری تعداد آلل‌های مشاهده شده و موثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص شانون و شاخص تنوع ژنی نی برای نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه

Table3. Number of observed alleles, number of effective alleles, expected heterozygosis, PIC, Shannon's information index and Nei's gene diversity index for the studied SSR markers

نشانگر Marker	هتروزیگوسیتی موردانتظار Expected heterozygosity	شاخص نی Nei's index	شاخص شانون Shannon's information index	تعدادآلل موثر No. of effective alleles	تعداد آلل مشاهده شده No. of observed alleles	محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphic information content
RM11	0.4921	0.4904	0.6835	1.921	2	0.4990
RM124	0.6300	0.6277	1.1164	2.6860	4	0.6421
RM125	0.5383	0.5362	0.8431	2.1559	3	0.5401
RM144	0.6820	0.6796	1.2422	3.1214	4	0.68821
RM152	0.5971	0.5950	0.9738	2.4691	3	0.5990
RM171	0.6030	0.6012	0.9987	2.5076	3	0.6141
RM178	0.6674	0.6650	1.0961	2.9851	3	0.6712
RM259	0.3196	0.3187	0.4989	1.4677	2	0.3212
RM277	0.5039	0.5024	0.7225	2.0096	3	0.5112
RM283	0.2691	0.2682	0.5312	1.3665	4	0.2721
RM284	0.4605	0.4590	0.7368	1.8484	3	0.4682
RM316	0.7183	0.7162	1.3219	3.5236	4	0.7210
RM431	0.5703	0.5683	0.9312	2.3162	3	0.5778
RM447	0.7454	0.7431	1.3721	3.8932	4	0.7562
RM484	0.6288	0.6263	1.0306	2.6759	3	0.6313
RM507	0.7209	0.7187	1.3125	3.5550	4	0.7322
RM454	0.2957	0.2949	0.4711	1.4183	2	0.2994
RM587	0.4924	0.4908	0.6839	1.9639	2	0.4997
RM519	0.2518	0.2509	0.4176	1.3349	2	0.2588
RM518	0.2932	0.2923	0.4680	1.4131	2	0.2984
میانگین Mean	0.5240	0.5222	0.8726	2.3337	3.00	0.5300
انحراف معیار Standard deviation	0.1622	0.1617	0.3118	0.7844	0.7947	0.1633

بنابراین، نشانگر RM447 در این تحقیق بالاترین سودمندی را جهت تعیین میزان تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های رقم محلی برنج هاشمی داشت. کبریا و همکاران (Kibria *et al.*, 2009) با مطالعه ۱۴ رقم برنج با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، تعداد آلل‌های مشاهده شده و تعداد آلل‌های موثر را به‌ترتیب ۳ و ۲/۱۹ آلل و میانگین شاخص شانون، میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار و تنوع ژنی نی را به‌ترتیب ۰/۸۸۶، ۰/۵۵۳ و ۰/۵۳۴ گزارش کردند. در مطالعه دیگری که روی ۴۰ رقم برنج باسماتی در پاکستان توسط شاه و همکاران (Shah *et al.*, 2013) انجام گرفت، میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده را ۲/۷۵ و محتوای اطلاعات چند شکلی را ۰/۳۸ بیان کردند. مقایسه نتایج تحقیق حاضر با نتایج این محققین نشان می‌دهد که اگرچه در مطالعه حاضر ژنوتیپ‌هایی مورد مطالعه قرار گرفتند که همه آن‌ها تحت نام رقم هاشمی توسط شالیکاران کشت می‌شوند، اما برآورد شاخص‌های تنوع نشان داد که تنوع نسبتاً زیادی در بین این ژنوتیپ‌ها وجود دارد که مقدار آن حتی بیشتر از تحقیق کبریا و همکاران (Kibria *et al.*, 2009) و شاه و همکاران (Shah *et al.*, 2013) است. این نتیجه بیانگر این است که اگرچه در ابتدا یک رقم به نام هاشمی وجود داشت، اما طی سال‌های مختلف احتمالاً عواملی مانند خودبذرگیری توسط کشاورزان مختلف، اختلاط بذر ارقام

دیگر با بذر هاشمی و نوترکیبی احتمالی بین آن‌ها موجب شده است تنوع بسیار زیادی بین آن‌ها ایجاد شود. طبخ‌کار و همکاران (Tabkhkar *et al.*, 2012) تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ مختلف برنج را با استفاده از ۷ نشانگر ریزماهواره پیوسته با صفات مهم تعیین کننده کیفیت پخت بررسی کردند. آن‌ها در مجموع ۴۱ آلل مشاهده کردند که از ۳ تا ۱۰ آلل در هر جایگاه متفاوت بود و میانگین تعداد آلل‌ها نیز ۵/۸۶ آلل گزارش شد. از طریق تجزیه خوشه‌ای نیز این ژنوتیپ‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. در مقایسه گزارش آن‌ها با تحقیق حاضر تعداد آلل مشاهده شده و میانگین آلل‌ها بیشتر است، ولی در هر دو مطالعه تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد. تنوع ژنتیکی مشاهده شده در تحقیق طبخ‌کار و همکاران (Tabkhkar *et al.*, 2012) بیشتر بود و دلیل آن هم استفاده از ژنوتیپ‌های بسیار متفاوت می‌باشد. در مطالعه ولیزاده و همکاران (Valizadeh *et al.*, 2014)، تنوع مرفولوژیک و ژنتیکی ۳۲ ژنوتیپ برنج با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با QTLهای کنترل کننده صفات تحمل به خشکی مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد کل نوارهای تولید شده به وسیله هر یک از نشانگرها در محدوده ۳ نوار در مکان RM317 تا ۸ نوار در مکان‌های RM3، RM228 و RM231 متغیر بود. نشانگر RM317 از نظر تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نی، شاخص اطلاعات شانون و محتوای اطلاعات چند شکل، دارای بالاترین مقادیر در بین نشانگرهای مورد مطالعه بود. ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس صفات مرفولوژیک و نیز بر اساس داده‌های مولکولی به سه گروه تفکیک شدند. سرایلو و همکاران (Sarayloo *et al.*, 2015) تنوع ژنتیکی ۲۲ ژنوتیپ برنج را تحت شرایط نرمال و تنش با ۲۲ نشانگر ریزماهواره مورد مطالعه قرار دادند. در مجموع، تعداد ۱۰۶ آلل مشاهده شد که تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر جایگاه از ۲ تا ۷ آلل متغیر و متوسط آن ۴/۸۲ آلل بود. محتوای اطلاعات چندشکلی برای نشانگرهای مختلف از ۰/۲۹ تا ۰/۸۲ با میانگین ۰/۶۴ و میزان تنوع ژنی از ۰/۳۵۱تا ۰/۸۴۰ با میانگین ۰/۶۸۶ بود. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در دو گروه قرار داد.

مقایسه این دو تحقیق با تحقیق حاضر نشان می‌دهد که اگرچه تعداد آلل‌های مشاهده شده بیشتر است ولی تعداد گروه‌ها کمتر می‌باشد. همچنین تنوع ژنتیکی و مورفولوژی در مطالعه ولیزاده و همکاران (Valizadeh *et al.*, 2014) و سرایلو و همکاران (Sarayloo *et al.*, 2015) بیشتر از تحقیق حاضر می‌باشد، چون مطالعه حاضر روی توده محلی برنج هاشمی که دارای منشا ژنتیکی نزدیک به هم هستند انجام شد، در حالی‌که آن‌ها ژنوتیپ‌های متفاوت از نظر منشا ژنتیکی را بررسی کردند.

تجزیه واریانس مولکولی

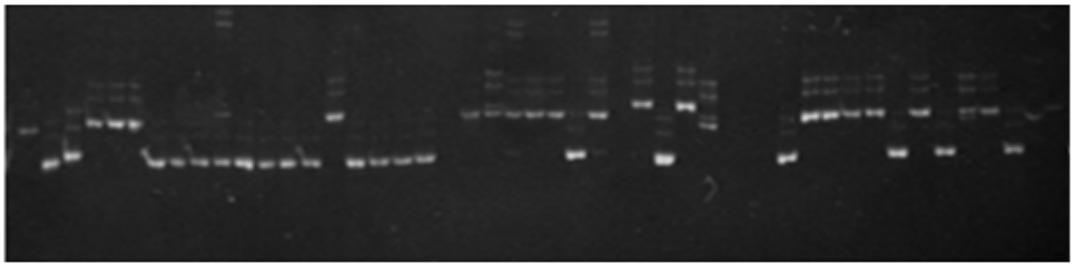
نتایج تجزیه واریانس مولکولی بین ۸۷ ژنوتیپ مورد بررسی در قالب سه زیرجمعیت غرب گیلان، زیرجمعیت شرق گیلان و زیر جمعیت مازندران به ترتیب با تعداد ۳۰، ۴۲ و ۱۵ ژنوتیپ در جدول ۴ ارایه شده است. نتایج نشان داد که ۷۳ درصد از تنوع کل ژنوتیپ‌ها در درون زیرجمعیت‌ها و ۲۷ درصد از آن در بین زیرجمعیت‌ها وجود دارد. بنابراین در این دسته‌بندی میزان تفاوت ژنتیکی درون زیرجمعیت‌ها بسیار بیشتر از بین آن‌ها است. کی و همکاران (Qi *et al.*, 2006) در تحقیقاتی که روی ۴۵۳ رقم برنج چین انجام دادند، بیشترین میزان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها را بین واریته‌های ایندیکا نسبت به واریته‌های ژاپنیکا بیان کردند. سالگوترا و همکاران (Salgotra *et al.*, 2015) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۴۱رقم برنج باسماتی هند با استفاده از ۴۰ نشانگر ریزماهواره ، میزان تنوع ژنتیکی بین گروه‌ها را ۶۰/۶ درصد و بیشتر از میزان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها (۳۹/۴ درصد) گزارش کردند که با تحقیق حاضر مشابهت دارد. بدیهی است که یکی از مهم‌ترین دلایل وجود این تنوع، علاوه بر تعداد نسبتاً زیاد و متنوع ژنوتیپ‌های درون زیرجمعیت‌ها، احتمال وجود نوترکیبی و تفاوت ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها در درون هر یک از زیرجمعیت‌ها است. از آنجا که تقسیم این ژنوتیپ‌ها به سه زیرجمعیت بر اساس محل جمع‌آوری و شباهت‌های ظاهری آن‌ها بود، می‌توان نتیجه گرفت که بسیاری از ژنوتیپ‌هایی که در یک منطقه جغرافیایی کشت می‌شوند، اگرچه همه دارای یک نام هستند و ظاهری مشابه دارند، اما از نظر ژنتیکی متفاوت هستند و در مقابل، شباهت‌های بیشتری بین ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف وجود دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که یقیناً بین ژنوتیپ‌هایی که همگی با نام رقم هاشمی هستند و در یک منطقه از استان گیلان یا مازندران کشت می‌شوند، تفاوت‌های ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای وجود دارد.

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی برای ارزیابی تنوع بین و درون سه زیرجمعیت مورد مطالعه بر اساس نشانگرهای ریزماهواره
Table 4. Molecular analysis of variance to evaluate genetic diversity between and within the studied three subpopulations based on SSR markers

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean squares	تخمین واریانس Estimate variance	تغییرات (درصد) Variation (%)
بین زیرجمعیت‌ها Between subpopulations	2	114.715	57.357	1.935	27%
درون زیرجمعیت‌ها Within subpopulations	84	446.733	5.318	5.318	73%
کل Total	86	561.448	62.676	7.253	27%

تجزیه به بردارهای هماهنگ اصلی (PCoA)

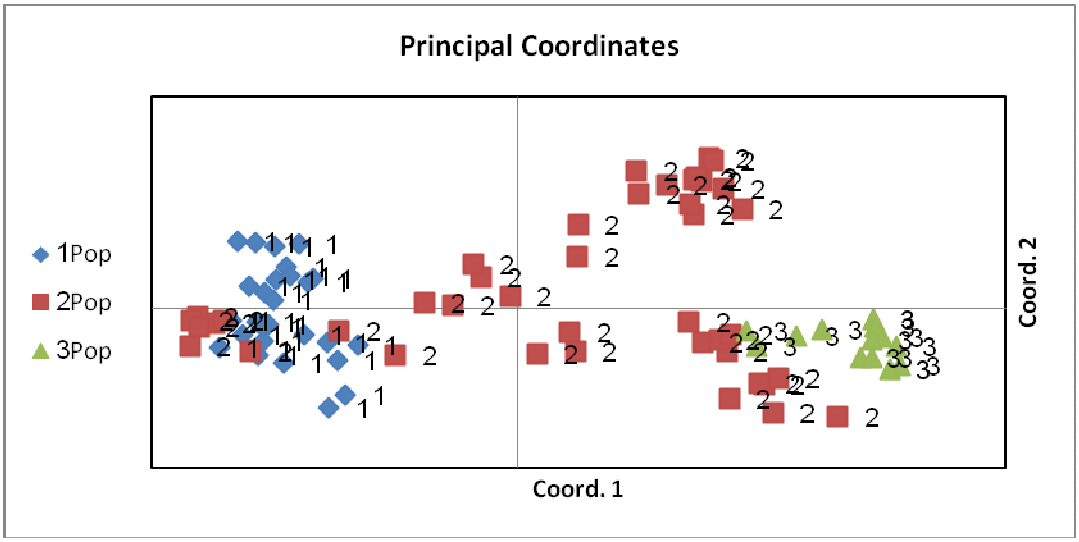
نتایج حاصل از تجزیه به بردارهای هماهنگ اصلی در جدول ۵ ارایه شده است. با استفاده از نتایج این تجزیه، پراکنش دو بعدی ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس دو بردار اول و دوم رسم شد (شکل ۲). همان‌طورکه ملاحظه می‌شود، پراکندگی و تفاوت در زیرجمعیت شماره ۲ (۴۲ ژنوتیپ جمع‌آوری شده از شرق گیلان) بسیار بیشتر از دو زیرجمعیت دیگر است. بنابراین، در درون این زیرجمعیت تفاوت‌های ژنتیکی زیادی وجود دارد، به‌طوری‌که تعدادی از ژنوتیپ‌های این زیرجمعیت در دو زیرجمعیت دیگر پراکنده شده و در حقیقت شباهت بیشتری با ژنوتیپ‌های زیرجمعیت غرب گیلان و زیرجمعیت مازندران دارند (شکل ۲).



شکل ۱- باندهای ایجاد شده در تعدادی از ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از نشانگر RM178
Figure 1. DNA profile of some rice genotypes produced by SSR marker, RM 178

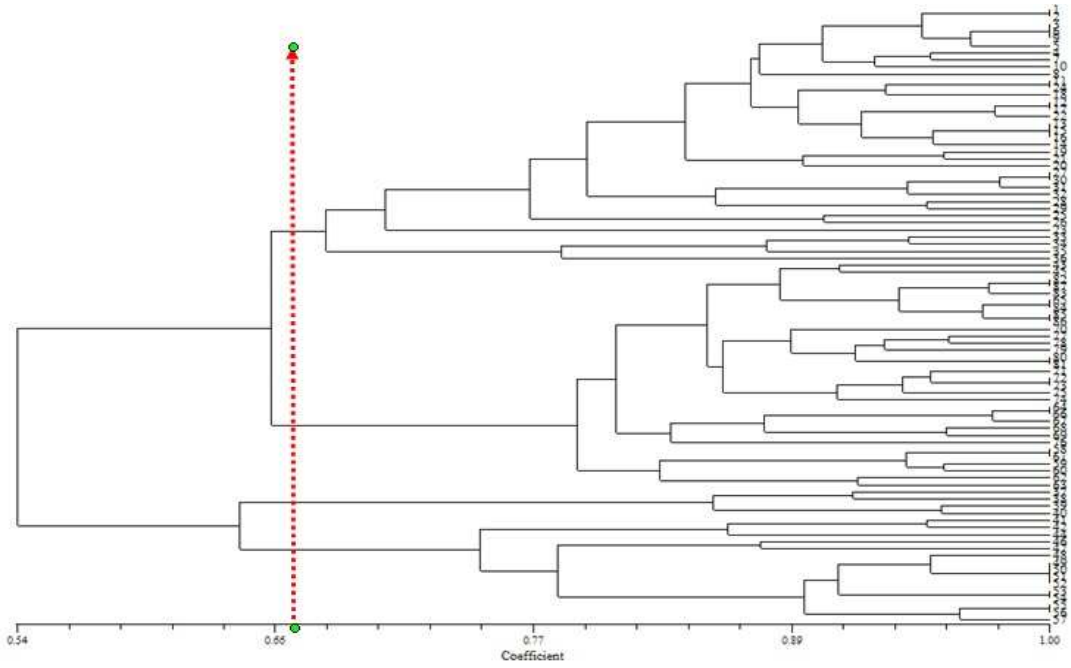
تجزیه خوشه‌ای

تشابه ژنتیکی بین ۸۷ ژنوتیپ و نیز بین سه زیرجمعیت مورد مطالعه بر مبنای روش نی (Nei, 1973) محاسبه شد. بیشترین شباهت ژنتیکی بین زیرجمعیت‌های غرب و شرق گیلان (۰/۷۰۴) و بر عکس کمترین تشابه ژنتیکی بین زیرجمعیت‌های غرب گیلان و مازندران (۰/۵۱۱) مشاهده شد، در حالی‌که تشابه بین زیرجمعیت‌های شرق گیلان و مازندران ۰/۶۵۳ بود. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضرایب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده و به روش UPGMA صورت گرفت. برای ارزیابی عملکرد هر یک از این روش‌ها، ضریب همبستگی کوفنتیک برای هر یک از دندروگرام‌های رسم شده، محاسبه شد که در نهایت تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تطابق ساده (Simple matching) و به روش UPGMA انتخاب شد که ضریب همبستگی کوفنتیک بیشتری داشت. خط برش دندروگرام نیز بر اساس بیشترین فاصله بین دو ادغام متوالی در سطح تشابه ۰/۶۷ در نظر گرفته شد. بر این اساس ۸۷ ژنوتیپ موجود در این تحقیق به چهار گروه تقسیم شدند (شکل ۳).



شکل ۲- پراکنش دو بعدی ۸۷ ژنوتیپ برنج با استفاده از روش PCoA

Figure 2. Two-dimensional distribution of 87 rice genotypes using principal coordinate analysis (PCoA) method



شکل ۳- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA برای گروه‌بندی ۸۷ ژنوتیپ برنج مورد مطالعه با استفاده از ۲۰ نشانگر ریزماهواره

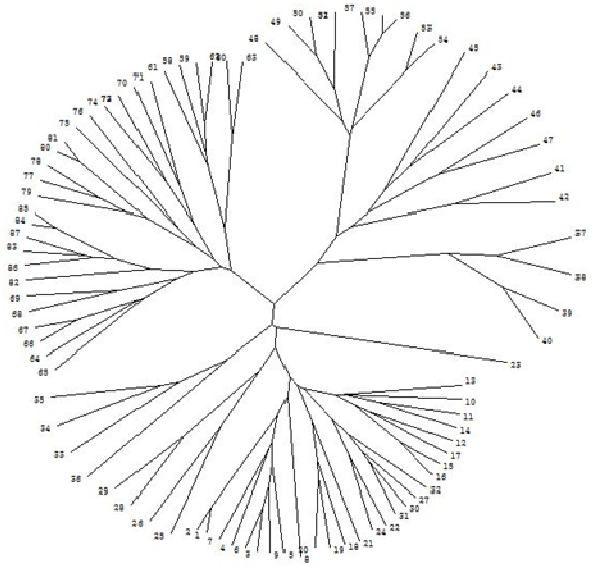
Figure 3. Dendrogram of cluster analysis using UPGMA method to group the 87 studied rice genotypes based on 20 SSR markers

به‌منظور تعیین روابط خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها، دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش عنکبوتی با نرم‌افزار Darwin نیز رسم شد تا تفاوت‌ها و شباهت‌های بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی با وضوح بیشتری به همراه مقادیر بوت استرپ مشخص شود (شکل ۴). همان‌طور که در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است، تعدادی از ژنوتیپ‌های هر زیرجمعیت شباهت ژنتیکی زیادی به زیرجمعیت‌های دیگر داشتند و با آن‌ها در یک گروه قرار گرفتند. به‌عنوان مثال، ژنوتیپ شماره ۲۳ از ژنوتیپ‌های جمعیت اول فاصله داشته و ژنوتیپ ۳۲ از جمعیت دوم به ژنوتیپ‌های ۱۶و ۲۷ جمعیت اول نزدیک‌تر است. از طرفی ژنوتیپ‌های ۳۷ تا ۴۶ که همگی از منطقه شرق گیلان جمع‌آوری شدند و در زیرجمعیت شماره ۲ قرار گرفته‌اند، از نظر ژنتیکی نیز به هم نزدیک بوده و در یک گروه قرار داشتند.

جدول ۵- مقدار ویژه، درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی بردارهای هماهنگ اصلی

Table 5. Eigen value, variance percentage and cumulative variance for principal coordinates

هماهنگ اصلی Principal coordinate	مقدار ویژه Eigen value	درصد واریانس Variance percentage	درصد واریانس تجمعی Cumulative variance
1	14.02	43.18	43.18
2	4.88	15.02	58.20
3	4.16	12.81	71.01



شکل۴- دندروگرام ۸۷ ژنوتیپ برنج بر اساس ۲۰ نشانگر ریزماهواره با استفاده از نرم‌افزار Darwin به‌همراه مقادیر بوت‌استرپ

Figure 4. Dendrogram of 87 rice genotypes based on 20 SSR markers using Darwin software together with bootstrap values

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاصل از نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که رقم هاشمی در واقع یک توده بسیار متنوع است و آنچه به نام رقم هاشمی در مناطق وسیعی از شالیزارهای کشور کشت می‌شود، در واقع یک یا چند توده برنج محلی است که تنوع ژنتیکی زیادی دارد و علی‌رغم شباهت‌های مرفولوژیک نسبی بین آن‌ها، دارای تفاوت‌های ژنتیکی زیادی هستند. برخی از این ژنوتیپ‌ها، شباهت‌های ژنتیکی اندکی نیز با هم دارند. از طرفی تفاوت منطقه مورد کشت دلیل بر تفاوت بین ژنوتیپ‌ها نیست و تفاوت‌ها و شباهت‌ها تا حدی مستقل از محیط نیز قابل دسته‌بندی هستند. بخشی از تنوع مشاهده شده حاصل اختلاط فیزیکی بذرها، نوترکیبی به وجود آمده بین ژنوتیپ‌های مختلف در اثر دگرگشنی‌های احتمالی یا حتی جهش‌های احتمالی و تغییرات ژنتیکی گیاه جهت سازگاری به اقلیم‌های مختلف است. بنابراین تصور اینکه فقط یک رقم محلی با نام هاشمی در بسیاری از مناطق برنج‌خیز کشور کشت می‌شود، صحیح نیست و در واقع بذر اولیه این رقم برگرفته از انتخاب خوشه‌های مناسب از یک توده محلی بوده که به‌تدریج و با استفاده از بذرهای خودمصرفی توسط کشاورزان منطقه رایج شده است. از آنجا که بذر انتخاب شده از توده اولیه، ویژگی‌های مناسب‌تری از لحاظ فرم بوته و عملکرد نسبت به توده اولیه و سایر توده‌های محلی دارا بود، به‌تدریج جایگزین رقم‌های محلی غالب نظیر بینام و حسن‌سرایی شد. بنابراین، طی سالیان متمادی به‌دلیل استفاده از بذرهای خود مصرفی، تبادل بذرهای مختلف بین کشاورزان و سایر عوامل ایجاد کننده اختلاط فیزیکی به‌همراه کمی دگرگشنی در هر سال زراعی و حتی شاید نوترکیبی حاصل از جهش، تنوع زیادی در رقم هاشمی ایجاد شده است، به‌طوری‌که اکنون بسیاری از ژنوتیپ‌هایی که به نام رقم هاشمی کشت می‌شوند، شباهت‌های اندکی به‌هم

دارند و حتی از نظر ویژگی‌های مرتبط با کیفیت ظاهری دانه و کیفیت پخت و خوراک با هم فرق دارند. یکی از اشکالات اساسی تولید برنج در ایران نیز عدم خلوص برنج سفید و یک‌دست نبودن آن است که در واقع علت آن عدم وجود خلوص ژنتیکی در بذر مصرفی است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تفاوت‌های مشاهده شده در فنوتیپ رقم هاشمی در مزارع مختلف، منشا ژنتیکی دارد. از این‌رو، برای حفظ تنوع موجود در ژرم‌پلاسم پیشنهاد می‌شود تمامی این ژنوتیپ‌ها در بانک ژن برنج ایران نگهداری شوند. از طرف دیگر، برای کمک به خلوص برنج سفید و افزایش عملکرد برنج لازم است توده‌های فعلی خالص‌سازی و بهترین ژنوتیپ‌ها انتخاب و به‌عنوان رقم جدید معرفی شوند. بدیهی است برای حفظ خلوص هر رقم جدید برنج، برنامه‌ریزی برای تکثیر بذرها در طبقات مختلف بذری لازم است، در غیر این صورت طی چند سال زراعی، رقم جدید خلوص خود را از دست داده و دیگر موجودیتی نخواهد داشت.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل پروژه شماره ۹۱۱۲۶-۰۴-۰۴-۰۰ مصوب سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی است. بدین‌وسیله از تمام افرادی که در به انجام رساندن این مهم ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P. and Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 2: 77-81.

Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J. and Mattick, J. S. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acid Research** 19: 4008-4012.

FAO. 2014. Food and Agriculture Organization. Retrieved October 23, 2014. from http://fao.org/faostat.

Giarrocco, L. E., Marassi, M. A. and Salerno, G. L.2007. Assessment of the genetic diversity in Argentine rice cultivars with SSR markers. **Crop Science Society of America** 47(2): 853-858.

Gramene. 2005. Retrieved October 19, 2005, from http://gramene.org/markers/microsat.

Hosseini Chaleshtori, M. and Sorkhe, K. 2015. Rice quality. Aspects of qualitative, molecular and genomic (Translation). Publications of Sina-Teb Institute Ltd, Tehran, Iran. (In Persian).

Hossain, M. M., Islam, M. M., Hossain, H., Ali, M. S., Teixeira da Silva, J. A., Komamine, A. and Prodhan, S. H. 2012. Genetic diversity analysis of aromatic landraces of rice (*Oryza sativa* L.) by microsatellite markers. **Genes, Genomes and Genomics** 6 (SI1): 42-47.

Kibria, K., Nur, F., Begum, S. N., Islam, M. M., Paul, S. K., Rahman, K. S. and Azam, S. M. M. 2009. Molecular marker based genetic diversity analysis in aromatic rice genotypes using SSR and RAPD markers. **International Journal of Sustainable Crop Production** 4 (1): 23-34.

Kimura, M. and Crow, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics** 49: 725-738.

Lapitan, V. C., Brar, D. S., Abe, T. and Redona, E. D. 2007. Assessment of genetic diversity of Philippine rice carrying good quality traits using SSR markers. **Breeding Science** 57: 263-270.

Matin, S., Ashrafuzzaman, M., Monirul Islam, M. D., Sikdar, S. U. and Zobayer, N. 2012. Molecular marker based (SSR) genetic diversity analysis in deep water rice germplasms of Bangladesh. **International Journal of Biosciences** 10 (2): 64-72.

McCouch, S. R., Temnykh, L., Xu, Y. and Katarzyna, B. L. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice *(Oryza sativa* L.). **DNA Research** 9: 257-279.

Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research** 8: 4321-4325.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 70: 3321-3323.

Nei, M. 1987. Mulecular phylogeny and genetic diversity analysis. Pennsylvania State University. University Park, PA 16802, USA.

Peakall, R. and Smouse, P. E. 2007. GeneAlex: Genetic analysis in excel. Ver. 6.2. Population genetic software for teaching and research. Canberra, Australian National University, Australia.

Prabakaran, A., Paramasivam, K., Rajesh, T. and Rajarajan, D. 2010. Molecular characterization of rice land races using SSR markers. **Journal of Plant Breeding** 1 (4): 512-516.

Prathepha, P. 2012. Genetic diversity and population structure of wild rice (*Oryza rufipogon*) from North Eastern Thailand and Laos. **Australian Journal of Crop Science** 4: 717-723.

Qi, Y. W., Zhang, D. L., Zhang, H. L., Wang, M. X., Sun, J. L., Liao, D. H., Wei, X. H., Qiu, Z. E., Tang, S. X., Cao, Y. S., Wang, X. K. and Li, Z. C. 2006. Genetic diversity of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) in China and the temporal trends in recent fifty years. **Chinese Science Bulletin** 51: 681-688.

Rabey, H. E., Salem, F. K. and Mattar, M. Z. 2013. The genetic diversity and relatedness of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as revealed by AFLP and SSRs markers. **Life Science Journal** 10 (1): 1471-1479.

Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Ver. 2.02. Exeter Software. Setauket, New York.

Salgotra, R. K., Gupta, B. B. Bhat, J. A. and Sharma, S. 2015. Genetic diversity and population structure of Basmati rice (*Oryza sativa* L.) germplasm collected from North Western Himalayas using trait linked SSR markers**. PLoS ONE** 10 (7): e0131858.

Sarayloo, M., Sabouri, H. and Dadras, A. 2015. Assessing genetic diversity of rice genotypes using microsatellite markers and their relationship with morphological characteristics of seedling stage under non- and drought-stress conditions. **Cereal Research** 5 (1): 1-15. (In Persian with English Abstract).

Seetharam, K., Thirumeni, S. and Paramasivam, K. 2009. Estimation of genetic diversity in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes using SSR markers and morphological characters. **African Journal of Biotechnology** 8 (10): 2050-2059.

Shah, S. M., Naveed, S. A. and Arif, M. 2013. Genetic diversity in basmati and non-basmati rice varieties based on microsatellite markers. **Pakistan Journal of Botany** 45: 423-431.

Singh, N., Choudhury, D. R., Singh, A. K., Kumar, S., Srinivasan, K., Tyagi, R. K., Singh, N. K. and Rakesh, S. 2013. Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties. **PLoS ONE** 8 (12): e84136.

Tabkhkar, N., Rabiei, B. and Sabouri, A. 2012. Genetic diversity of rice cultivars by microsatellite markers tightly linked to cooking and eating quality. **Australian Journal of Crop Science** 6 (6): 980-985.

Takahata, N. and Nei, M. 1984. FST and GST statistics in the finite island model. **Genetics** 107: 501-504.

Valizadeh, Z., Samizadeh, H. and Rabiei, B. 2014. Assessment of morphologic and genetic diversity of rice varieties using microsatellite markers associated with drought tolerance characteristics. **Cereal Research** 4 (2): 89-101. (In Persian with English Abstract).

Wankhade, S. D., Cornejo, M. J. and Mateu-Andres, I. 2010. Microsatellite marker-based genetic variability in Spanish rice cultivars and landraces. **Spanish Journal of Agricultural Research** 8 (4): 995-1004.

Yeh, F. C., Yang, R. C. and Boyle, T. 1999. POPGENE: Microsoft window-based freeware for population genetics analysis. Version 1.32. University of Alberta, Edmonton.

University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research
Vol. 7, No. 1, Spring 2017 (17-31)

Evaluation of molecular diversity of different Hashemi rice varieties of north of Iran using microsatellite markers

Alireza Tarang[1*] and Maryam Hosseini[2]

Received: October 17, 2015 Accepted: Febraury 1, 2016

Abstract

Iranian local rice varieties have been cultivated for a long time in various regions of the Iran. This landraces have adapted to different environmental conditions over the years and a relatively large diversity can be showed in each of them. In recent years, cultivation of Hashemi as a local variety has been increased, so that most of the cultivated area of Guilan and Mazandaran provinces and some other provinces of Iran allocated to Hashemi. However, the variety cultivating with a single name of Hashemi in different regions of Iran shows a great diversity in morphological characteristics such as plant height, growth duration and grain morphological characteristics. Although the effect of environmental factors on morphological characteristics is very high, but the question of current research was whether there is genetic diversity within this cultivar? To achieve the suitable answer, 87 genotypes, all of which were known as Hashemi, collected from different geographic regions of North of Iran (including 42 genotypes from east of Guilan province, 30 genotypes from west of Guilan province and 15 genotypes from Mazandaran province) were cultivated in the experimental field of Rice Research Institute of Iran, Rasht, Iran, in 2014 and their molecular diversity were assessed by 20 microsatellite markers. The results of diversity parameters indicated that there is a relatively high variation among the 87 studied genotypes. It is therefore concluded that what is cultivated as Hashemi in different regions, in fact, it is a very diverse population that has become a very diverse landrace due to the use of self-seeded and posibly the physical mixing of seeds of different cultivars and thus recombination between them. Therefore, it is suggested that while preserving these genotypes in Iran's rice gene bank and possibly using their desirable properties in the breeding programs, purification of this variety can also be performed to provide the pure seeds of the best genotype to farmers.

Keywords: Genetic diversity, Hashemi variety, Pure seed

1. Research Assist. Prof., Guilan Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
2. Research Assist. Prof., Dept. of Seed Improvement, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
* Corresponding author: a_tarang@hotmail.com