مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۵، شماره ۱، سال ۱۳۸۳ (۱۵۳-۱۴۳)

مطالعه تنوع ژنتیک برنج‌های ایرانی توسط نشانگرهای آیزوزایم

محمد میردریکوند[۱]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲]، علی اعلمی[۳] و بهزاد قره‌یاضی[٤]
۱، ٤، اعضای هیات علمی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج ۲، عضو هیات علمی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه مازندران، ساری.
۳، عضو هیات علمی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۷/۹

خلاصه

شناخت تنوع ژنتیک و طبقه‌بندی ذخایر توارثی (ژرم پلاسم) از فعالیت‌های مهم و ضروری در به‌نژادی و مدیریت حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهان می‌باشند. در این پژوهش تعداد ۱۲۰ ژنوتیپ انتخابی از ژرم‌پلاسم برنج ایران توسط اطلاعات هفت مکان ژنی آیزوزایم از طریق تجزیه خوشه‌ای طبقه‌بندی شدند. عصاره آنزیمی از گیاهچه‌های ۸-٦ روزه استخراج شد. مطالعه آیزوزایم‌ها با تغییراتی در روش گلازمن و همکاران و با استفاده از الکتروفورز افقی ژل نشاسته (HSGE) انجام گردید. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضرایب شباهت جاکارد و به روش پیوستگی متوسط (UPGMA)، نمونه‌ها را به ۷ گروه تقسیم نمود. بیش از ١٦٪ نمونه‌ها در گروه رقم‌های شاخص ژاپونیکا و ۹٪ در گروه ایندیکا قرار گرفتند. حدود ٦٨٪ برنج‌های ایرانی با شباهت بیشتر به گروه ژاپونیکا در دو دسته خارج از ایندیکا و ژاپونیکا و ٤/١٪ نیز در سه گروه حدواسط ایندیکا و ژاپونیکا قرار گرفتند. تعداد ٤٣ ژنوتیپ آیزوزایم با متوسط ۲/۹ نمونه در هر گروه ژنوتیپی مشاهده گردید. توده‌های دارای نام مشابه در بسیاری از موارد، ژنوتیپ‌های مختلفی را بروز دادند (به عنوان مثال در توده‌های غریب و بینام). شاخص تنوع ژنوتیپی نیز معادل ۳/٤۳ بود که در مقایسه با سایر برنج‌های آسیایی، مقدار قابل‌توجهی می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیک در برنج‌های بومی ایران، بسیار زیاد است و آن‌ها را یک منبع ارزشمند و بسیار غنی از تنوع طبیعی برای به‌نژادی برنج معرفی می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: برنج، تنوع ژنتیک، نشانگرهای آیزوزایم، تجزیه خوشه‌ای.

مقدمه

برنج زراعی[۱] بعد از گندم، مهم‌ترین غله در رژیم غذایی مردم ایران می‌باشد و سالانه بالغ بر ۴۰۰ میلیون دلار صرف واردات حدود یک میلیون تن از این محصول می‌شود (۲). بنابراین سرمایه‌گذاری در زمینه افزایش کمیت و کیفیت برنج از طریق به‌نژادی در استقلال اقتصادی و سیاسی کشور، نقش بسیار مؤثری خواهد داشت. ذخایر توارثی[۲] (ژرم‌پلاسم) با داشتن تنوع طبیعی از سرمایه‌های بسیار ارزشمند هر کشور هستند و شناخت ماهیت ژنتیک آن‌ها، از موضوعات مهم و زیربنایی در فعالیت‌های به‌نژادی می‌باشد. شناخت تنوع ژنتیک[۳] و طبقه‌بندی[٤] ذخایر توارثی در طراحی موفق برنامه‌های به‌نژادی و مدیریت صحیح نگهداری منابع ژنتیکی، نقش بسیار مؤثری دارند. آگاهی از میزان شباهت و تفاوت ژنتیک بین ذخایر توارثی از طریق طبقه‌بندی امکان‌پذیر می‌شود و در انتخاب والدین مناسب جهت انجام تلاقی‌ها، راهنمای خوبی برای به‌نژادگران می‌باشد. ارزیابی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی همچنین می‌تواند برای شناسایی نمونه‌های تکراری و آسان نمودن مدیریت حفظ منابع ژنتیکی استفاده شود (۱، ۲، ۳). گروه‌های مختلفی از

1. *Oryza sativa* L.
2. Genetic resources or Germplasm
3. Genetic diversity
4. Classification

مکاتبه کننده: محمد میردریکوند

نشانگرها شامل صفات ظاهری[1]، پروتئین‌های ذخیره‌ای[2]، آیزوزایم‌ها[3]، انواع نشانگرهای دی‌ان‌آ[4] و اخیرا نیز خصوصیات سیتوژنتیک[5] برای بررسی تنوع ژنتیک استفاده می‌شوند که هر یک دارای مزایا و معایب خاصی هستند. صفات مرفولوژیک از نظر تعداد محدود می‌باشند و همچنین اکثر آن‌ها تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. چندشکلی[6] پروتئین‌های ذخیره‌ای در اکثر گیاهان کافی نیست و تا حدودی نیز از اثرات محیطی تأثیر می‌پذیرند. آیزوزایم‌ها یا آیزوآنزیم‌ها یکی از نشانگرهای مفید مولکولی- بیوشیمیایی هستند که به خاطر مزایای بسیار و از جمله همبارز بودن[7]، سادگی، دقت کافی، سرعت و هزینه نسبتا کم به طور بسیار گسترده برای بررسی تنوع ژنتیک، طبقه‌بندی و تعیین روابط فیلوژنتیک در برنج و سایر گیاهان زراعی و وحشی بکار رفته‌اند. آیزوزایم‌ها، انواع مختلف مولکولی یک آنزیم هستند که توسط مکان‌های ژنی مختلف رمزگذاری می‌شوند، ولی فعالیت بیوشیمیایی مشابهی دارند. آلوزایم‌ها نیز زیرگروهی از آیزوزایم‌ها هستند که توسط آلل‌های مختلف یک مکان ژنی رمزگذاری می‌شوند (۱، ۲، ۳، ۷، ۱۸، ۲۵، ۴۳). امروزه انواع مختلف نشانگرهای دقیق دی-ان-آ با داشتن چندشکلی فراوان، مستقل بودن از شرایط و مرحله رشد و فراوان بودن تعداد، معرفی شده‌اند. اما آیزوزایم‌ها به عنوان فرآورده‌های مستقیم ژن و با داشتن سودمندی‌های فراوان هنوز هم ارزش‌های کاربردی خود را در مطالعات ژنتیک و به‌نژادی حفظ نموده‌اند. البته از نظر دقت و اهمیت بخاطر محدود بودن تعداد و کمتر بودن میزان چندشکلی، پس از نشانگرهای دی‌ان‌آ در رده دوم هستند (۲). بررسی این نشانگرها از طریق الکتروفورز افقی ژل نشاسته[8] به دلیل مزیت‌های بسیار همچون سرعت، سادگی و هزینه نسبتا کم به‌طور وسیع برای ارزیابی تنوع و طبقه‌بندی گیاهان به کار می‌رود (۱، ۲، ۳، ۴، ۷، ۱۱، ۱۸، ۲۱، ۲۹، ۳۶، ۳۸). از مطالعات آیزوزایم بطور گسترده برای تعیین تنوع ژنتیک، طبقه‌بندی و تعیین روابط فیلوژنتیک برنج در سایر کشورها استفاده شده‌است (۱۸، ۲۷، ۲۸، ۳۶). به عنوان مثال می‌توان به مطالعات سکند و تروسولت (۱۹۸۰) و سکند (۱۹۸۲، ۱۹۸۵) بر روی گونه‌های زراعی و وحشی، گلازمن (a, b ۱۹۸۷، ۱۹۸۸) بر روی برنج‌های زراعی آسیا، دکوچکو (۱۹۸۷) بر روی برنج‌های آفریقا، شاتا و همکاران (۱۹۹۳)، کای و همکاران (۱۹۹۵، ۱۹۹۶)، کای و موریشیما (۱۹۹۷)، مالک و کوش (a,b ۱۹۹۶)، سا و همکاران (۱۹۹۷)، اندو و همکاران (۱۹۹۷)، تنگ و کوش (۱۹۹۸)، آکیموتو و همکاران (۱۹۹۷، ۱۹۹۸) و فونتس و همکاران (۱۹۹۹) اشاره نمود. نعمت‌زاده و کوش (۱۹۹۳) نیز ۱۴۹ نمونه از برنج‌های ایرانی را از این طریق مطالعه نمودند.

علی‌رغم اهمیت شناخت ماهیت ژنتیک و میزان قرابت توده‌های بومی، اطلاعات بسیار اندکی در این زمینه برای برنج‌های ایران وجود دارد. بنابراین پژوهش حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیک و طبقه‌بندی برنج‌های بومی ایران به کمک آیزوزایم‌ها (برای اولین بار در داخل کشور) انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۱۸ نمونه برنج ایرانی از میان ذخایر توارثی بانک ژن ملی گیاهی ایران انتخاب شدند. هفت رقم شاخص گروه‌های مختلف برنج (از جمله دو رقم ایرانی) نیز از مؤسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (ایری) دریافت گردیدند. تعداد ۱۰ بذر از هر نمونه در یک ظرف پتری بر روی کاغذ صافی مرطوب کشت شدند. پتری‌ها به مدت ۸-۶ روز در درون اینکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی قرار گرفتند. در مواقع لزوم، مقداری آب مقطر به آن‌ها اضافه گردید. سپس پتری‌های حاوی بذور جوانه‌زده، مدت ۱۲ ساعت در شرایط اتاق و روشنایی معمولی آن قرار گرفتند. از هر نمونه، ۶-۴ گیاهچه سبز به طول ۲/۵-۲ سانتی‌متر برای عصاره‌گیری انتخاب شدند. قسمت محور ساقه‌چه و غلاف گیاهچه‌ها[9] در درون مقدار مناسب از بافر استخراج (۱۲ میکرولیتر به ازای هر سانتی‌متر طول گیاهچه) هموژنیزه شدند. سپس مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و در داخل یخچال سانتریفیوژ شد.

1. Morphological traits
2. Storage proteins
3. Isozymes or Isoenzymes
4. DNA markers
5. Cytogenetical traits
6. Polymorphism
7. Co-dominant
8. Horizontal starch gel electrophoresis (HSGE)
9. Plumule & Coleoptile

بافر استخراج از یک ترکیب شامل ۲۵٪ ساکارز، ۱٪ پلی‌اتیلن گلیکول و ۱٪ بووین سرم آلبومین تشکیل گردید که هنگام استفاده مقدار ۰/۳ درصد از ۲- مرکاپتواتانول به آن اضافه می‌شد. الکتروفورز افقی ژل نشاسته با تغییرات اندکی در سیستم I بافری از روش استاندارد گلازمن و همکاران (۱۹۸۸) به شرح زیر انجام گرفت.

اسیدیته بافر ژل ۸/۳ و غلظت ژل نشاسته نیز ۱۳٪ بود. مقدار ۲۳ میکرولیتر از عصاره آنزیمی هر نمونه بر روی کاغذ واتمن شماره ۳ به ابعاد ۱۰ × ۵ میلی‌متر ریخته شد و در شکاف ژل قرار گرفت. از دو رقم آی‌آر۳۶ (IR36) و تایچونگ۶۵ (TC65) به عنوان شاخص (برای شناسایی و نامگذاری باندها) در طرفین و وسط هر ژل استفاده گردید. عمل الکتروفورز ابتدا به مدت یک ساعت با شدت جریان ثابت ۴۰ میلی‌آمپر و سپس ۶ ساعت با شدت ۳۰ میلی‌آمپر در داخل یخچال ۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. البته تمام تغییرات انجام شده در روش استخراج آنزیمی و الکتروفورز به منظور بهتر نمودن آشکارسازی باندها و بر اساس توصیه‌های منابع شماره ۱،۲، ۷، ۱۱، ۲۱، ۲۵، ۲۹، ۴۳ و ۴۵ انجام شده‌اند. برش‌های با ضخامت یک میلی‌متر از ژل تهیه گردید و هفت مکان ژنی کاتالاز-۱ (Cat1)، فسفوگلوکزایزومراز ۱ و ۲ (Pgi1، Pgi2)، آمینوپپتیداز ۱، ۳ و ۴ (Amp1، Amp3، Amp4) و شیکمیت دهیدروژناز (Shd1) به روش استاندارد گلازمن و همکاران (۱۹۸۸) رنگ‌آمیزی شدند. نمره‌دهی باندها بر اساس الگوی نامگذاری استاندارد آیزوزایم‌های برنج و با در نظر گرفتن آلل‌های جدید به صورت ۰ و ۱ انجام گرفت (۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۶، ۳۸، ۴۱، ۴۲، ۴۴). سپس ماتریس شباهت[1] (بر اساس ضرایب تشابه جاکارد) با استفاده از نرم‌افزار NTSYS (ویرایش ۱/۸) محاسبه گردید و طبقه‌بندی به روش پیوستگی متوسط[2] انجام پذیرفت (۳۱، ۳۲).

شاخص‌تنوع ژنوتیپی[3] نیز از فرمول زیر محاسبه گردید(۱۱).

$$GD \text{ or } HG = -\sum_{i=1}^{k} p_i \cdot \ln p_i$$

P_i= فراوانی ژنوتیپ iام k=تعداد کل ژنوتیپ‌های مشاهده شده

1. Similarity Matrix
2. Unweighted pair group of Arithmetic mean (Average linkage)
3. Genotype diversity

در نهایت تعداد ۶۶ نمونه (از ۱۱۸ نمونه) که اطلاعات مربوط به مکان ژنی آمینوپپتیداز-۲ (Amp2) آن‌ها نیز تهیه شده بود، بر اساس کلید آیزوزایمی گلازمن به گروه‌های شش‌گانه طبقه‌بندی شدند (۱۶).

نتایج و بحث

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش پیوستگی متوسط (شکل ۳) نشان می‌دهد که ۱۲۵ نمونه مورد بررسی بر اساس حداقل ۵۰٪ شباهت به هفت گروه تقسیم می‌شوند (جدول ۱). نسبت گروه‌های اول تا هفتم (از بالا به پایین) به ترتیب ۵۷/۵، ۱۲/۵، ۱۶/۶، ۲/۵، ۰/۸، ۰/۸ و ۹/۲ درصد بود. ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس شباهت و دندروگرام ، ۰/۸۷ بود و نشان‌دهنده کارایی زیاد روش پیوستگی متوسط در بیان روابط ژنتیک مطابق با ضرایب شباهت بود. همچنین تجزیه خوشه‌ای به روش پیوستگی منفرد[4] (نزدیکترین همسایه) و پیوستگی کامل[5] (دورترین همسایه) نیز انجام شد، ولی ضریب همبستگی کوفنتیک کمتر بود و نتایج آن‌ها مدنظر قرار نگرفت.

همانطور که مشاهده می‌شود، اکثر نمونه‌ها (۶۹ نمونه، ۵۷/۵ درصد) در گروه اول قرار می‌گیرند. رقم شاخص فیروز (گروه V گلازمن یا برنج‌های کیفی)، چند رقم از گروه ژاپونیکا (گروه VI گلازمن)، تعدادی از رقم‌های حدواسط گلازمن، چند نمونه چمپا و اکثر برنج‌های خوش کیفیت بومی ایران شامل صدری، دمسیاه، عنبربو و حسن‌سرایی در این گروه قرار دارند. بیشتر برنج‌های این گروه از دسته برنج‌های کیفی گلازمن (گروه V) می‌باشند. تنوع ژنوتیپی در این گروه زیاد است و افراد آن ۱۴ ژنوتیپ مختلف آیزوزایم را نشان دادند. گروه دوم با ۱۲/۵ درصد (۱۶ نمونه)، دو رقم شاخص کیفی گلازمن (گروه V) شامل باسماتی و هرندی۳۷۹، تعدادی از رقم‌های کیفی و حدواسط ایرانی و تعدادی از برنج‌های صدری و چمپا را در بر می‌گیرد. در این گروه ۱۴ ژنوتیپ مختلف آیزوزایم وجود داشت. بنابراین برنج‌های کیفی خود به دو گروه مجزا تقسیم شده‌اند و تنوع ژنتیک آن‌ها زیاد می‌باشد. گروه سوم با ۱۶/۶ درصد (۲۲ نمونه) و ۱۰ ژنوتیپ مختلف آیزوزایم از چند رقم بومی مربوط به گروه

4. Single Linkage or Slink
5. Complete Linkage or Clink

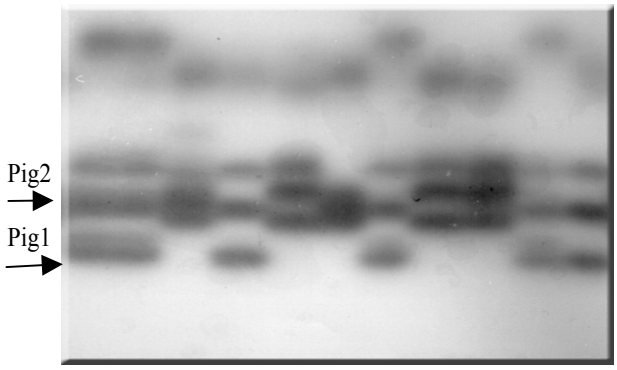
حدواسط گلازمن، رقم اصلاح شده خزر و دو رقم شاخص گروه ژاپونیکا (تایچونگ۶۵ و آزوسنا) تشکیل می‌شود. بنابراین برنج‌های موجود در این گروه از نوع ژاپونیکا هستند. گروه‌های بسیار کوچک چهارم، پنجم و ششم به ترتیب هر کدام ۱، ۲ و ۳ رقم را شامل می‌شوند. این گروه‌ها در حدواسط گروه‌های ژاپونیکا و ایندیکا قرار گرفتند، ولی شباهت بیشتری به گروه ژاپونیکا داشتند. گروه هفتم با ۹/۲ درصد (۱۳ نمونه) و ۷ ژنوتیپ مختلف آیزوزایم، از دو رقم شاخص ایندیکا (IR36، IR28)، رقم‌های اصلاح‌شده نعمت، ندا، سپیدرود و چند توده برنج بومی تشکیل گردید. این نتایج نشان داد که اکثر برنج‌های بومی ایران (حدود ۷۰٪ شامل گروه اول و دوم) با شباهت بیشتر به برنج‌های ژاپونیکا (ضریب شباهت=۰/۳۶) در خارج از گروه‌های ایندیکا و ژاپونیکا قرار می‌گیرند. نعمت‌زاده و کوش (۱۹۹۳) گزارش کردند که ۶۱٪ توده‌های بومی ایران در گروه V گلازمن قرار می‌گیرند و این گروه بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای گلازمن (۱۹۸۷a) به گروه ژاپونیکا (VI) شباهت بیشتری دارند (۱۶، ۳۰). قره‌یاضی و همکاران (۱۹۹۶)، ۳۶ رقم برنج بومی ایران را با استفاده از دو نشانگر مولکولی پی‌بی‌آر[1] و ای‌ال‌پی[2] به سه گروه طبقه‌بندی نمودند. اکثر ارقام آن‌ها شامل ۲۶ رقم صدری و چند رقم چمپا در گروه ژاپونیکا قرار گرفتند.

1. PCR based RFLP (PBR)
2. Amplicon length polymorphism (ALP)

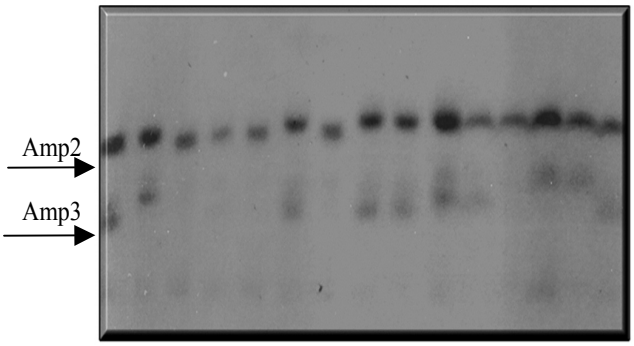
تعداد اندکی در گروه ایندیکا و تعداد دیگری در خارج از گروه‌های ایندیکا و ژاپونیکا و با فاصله ژنتیکی زیاد از آن‌ها قرار داشتند (۱۴). بنابراین نتایج مطالعه یادشده نیز وجود گروه‌های خارج از ایندیکا و ژاپونیکا را در میان برنج‌های ایران تأیید می‌نماید.

به طور کلی، ۴۳ گروه ژنوتیپی آیزوزایم با متوسط ۲/۹ نمونه در هر گروه ژنوتیپی مشاهده گردید. شاخص تنوع ژنوتیپی نیز معادل ۳/۴۳ بود. کای و موریشیما (۱۹۹۷) در بررسی ۱۴۴ نژاد از برنج‌های بنگلادش، مقدار تنوع در ۲۱ مکان ژنی آیزوزایم را ۵/۶ بیان نمودند و ادعا کردند این بالاترین مقداری است که تا بحال گزارش شده است (۸). بنابراین شاخص تنوع برنج‌های ایرانی (۳/۴۳) برای تنها هفت مکان ژنی، دلیلی بر وجود تنوع ژنتیک زیاد آن‌ها می‌باشد. بسیاری از رقم‌های دارای نام مشابه از نظر ژنوتیپ آیزوزایمی با هم متفاوت بودند. به عنوان مثال، توده‌های غریب و بینام در اکثر گروه‌ها پراکنده بودند و حتی در درون یک گروه نیز تنوع نشان دادند (شکل ۳).

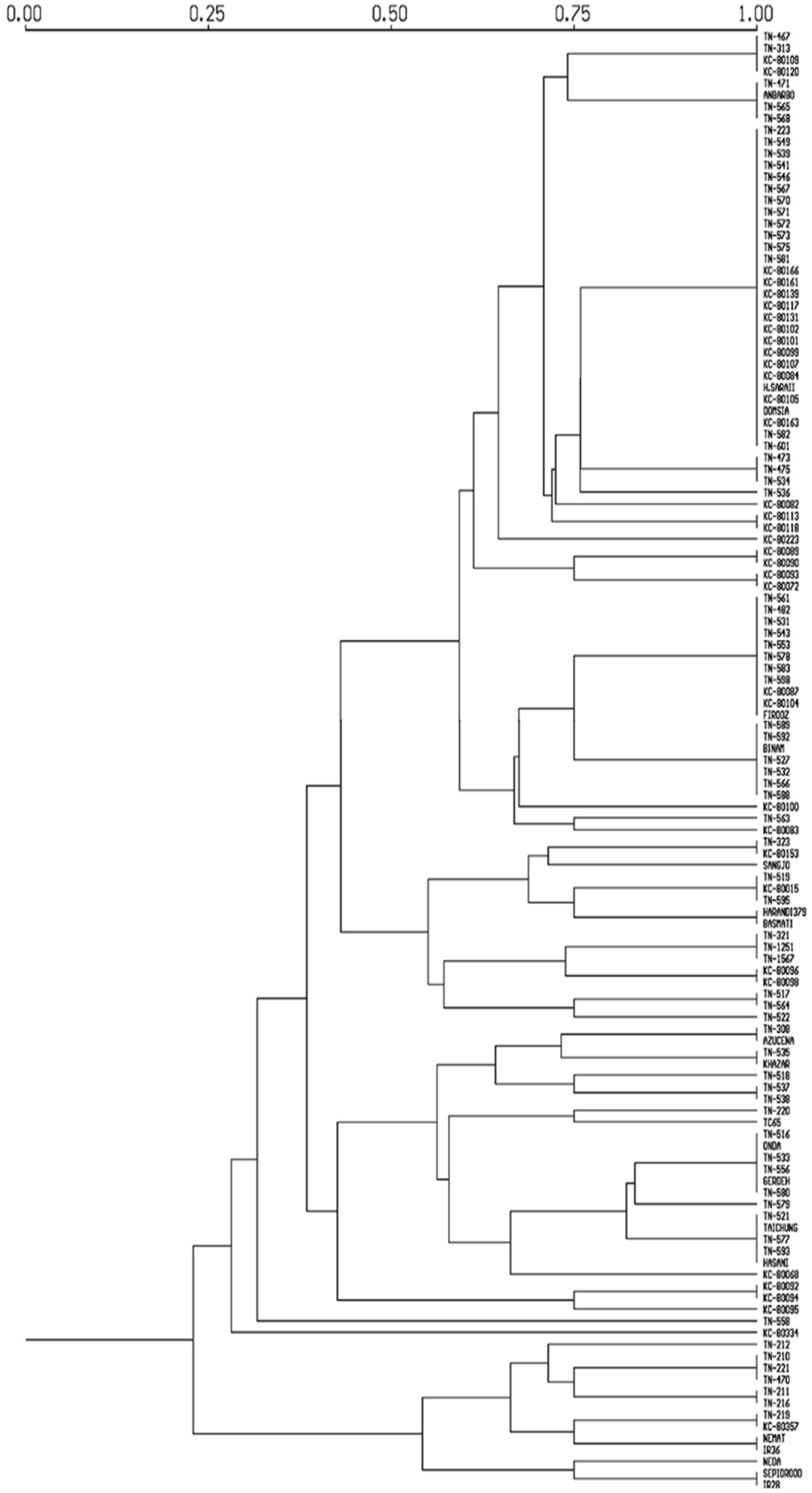
همچنین ۶۶ نمونه از برنج‌های مورد بررسی بر اساس روش طبقه‌بندی گلازمن (۱۹۸۷b) در چهار گروه قرار گرفتند (جدول ۲) که ۳۴/۸٪ از گروه V (برنج‌های کیفی)، ۷/۵٪ از گروه I (ایندیکا)، ۶٪ از گروه VI (ژاپونیکا) و ۱/۵٪ از گروه II بودند. بیش از ۴۸ درصد نمونه‌ها نیز تنها با تفاوت یک آلل در هیچیک از گروه‌های شش‌گانه گلازمن قرار نگرفتند (گروه حدواسط).



شکل ۱- زایموگرام آنزیم فسفوگلوکز ایزومراز (Pgi) گیاهچه برنج بر روی ژل نشاسته، باندهای بالایی مکان ژنی Pig2 و باندهای پایین مکان ژنی Pig1 را نشان می‌دهند.



شکل ۲- زایموگرام آنزیم لوسین آمینوپپتیداز (Leu-Amp) گیاهچه برنج بر روی ژل نشاسته. باندهای بالایی مکان ژنی Amp1 و باندهای پایین مکان ژنی Amp3 را نشان می‌دهند.



شکل ۳- دندروگرام ۱۲۰ نمونه از ژرم‌پلاسم برنج ایران بر اساس ضرایب شباهت جاکارد و با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA (حروف لاتین، گروه آیزوزایمی گلازمن را نشان می‌دهند).

جدول۱-گروه‌های‌حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های آیزوزایم

گروه	شماره بانک ژن	نام محلی	شماره بانک ژن	نام محلی
گروه اول	TN-۰۳-۴۶۷	-	KC-۰۳-۸۰۰۹۹	صدری دم سرخ
	TN-۰۳-۳۱۳	چمپا	KC-۰۳-۸۰۱۰۷	صدری
	KC-۰۳-۸۰۱۰۹	حسن سرایی	KC-۰۳-۸۰۰۸۴	چمپا
	KC-۰۳-۸۰۱۲۰	حسن مولایی	والدینی رشت*	حسن‌سرایی
	TN-۰۳-۴۷۱	-	KC-۰۳-۸۰۱۰۵	صدری
	والدینی رشت*	عنبربو	والدینی رشت*	دمسیاه
	TN-۰۳-۵۶۵	زرد دم	KC-۰۳-۱۶۳	سالاری
	TN-۰۳-۵۶۸	بینام	TN-۰۳-۵۸۲	رضاجو
	TN-۰۳-۲۲۳	بینام	TN-۰۳-۶۰۱	مولایی
	TN-۰۳-۵۴۹	غریب سبق	TN-۰۳-۴۷۳	-
	TN-۰۳-۵۳۹	عنبربو	TN-۰۳-۵۳۴	بینام
	TN-۰۳-۵۴۱	صدری	TN-۰۳-۵۳۶	صدری
	TN-۰۳-۵۴۶	مولایی	KC-۰۳-۸۰۰۸۲	حسنی
	TN-۰۳-۵۶۷	صدری	KC-۰۳-۸۰۱۱۳	حسن‌سرایی
	TN-۰۳-۵۷۰	طارم	KC-۰۳-۸۰۱۱۸	موسی طارم
	TN-۰۳-۵۷۱	صدری	KC-۰۳-۸۰۲۲۳	صدری
	TN-۰۳-۵۷۲	سالاری	KC-۰۳-۸۰۰۸۹	صدری
	TN-۰۳-۵۷۳	صدری	KC-۰۳-۸۰۰۹۰	دم سرخ
	TN-۰۳-۵۷۵	دمسیاه	KC-۰۳-۸۰۰۹۳	چمپا
	TN-۰۳-۵۸۱	قنبر جو	KC-۰۳-۸۰۰۷۲	صدری
	KC-۰۳-۸۰۱۶۶	شاهک	TN-۰۳-۵۶۱	غریب محلی
	KC-۰۳-۸۰۱۶۱	آبجی بوجی	TN-۰۳-۴۸۲	-
	KC-۰۳-۸۰۱۳۹	حسن‌سرایی	TN-۰۳-۵۳۱	صدری
	KC-۰۳-۸۰۱۱۷	موسی طارم	TN-۰۳-۵۴۳	غریب محلی
	KC-۰۳-۸۰۱۳۱	حسن‌سرایی	TN-۰۳-۵۵۳	غریب
	KC-۰۳-۸۰۱۰۲	صدری بینام	TN-۰۳-۵۷۸	دم‌زرد
	KC-۰۳-۸۰۱۰۱	دم سرخ	TN-۰۳-۵۸۳	بینام
	TN-۰۳-۵۹۸	غریبی	KC-۰۳-۸۰۰۸۷	چمپا
	KC-۰۳-۱۰۴	آبجی بوجی	TN-۰۳-۴۷۵	-
	شاخص گروه V	فیروز	TN-۰۳-۵۲۷	بینام
	TN-۰۳-۵۸۹	بشاهی	TN-۰۳-۵۳۲	بینام
	TN-۰۳-۵۹۲	گرمه شلمان	TN-۰۳-۵۶۶	غریب
	والدینی رشت*	بینام	TN-۰۳-۵۸۸	بینام
	TN-۰۳-۵۶۳	غریب	KC-۰۳-۸۰۱۰۰	صدری مولایی
			KC-۰۳-۸۰۰۸۳	صدری دم‌سفید

ادامه جدول ۱

گروه	شماره بانک ژن	نام محلی	شماره بانک ژن	نام محلی
گروه دوم	TN-۰۳-۳۲۳	چمپای ملو	TN-۰۳-۳۲۱	قصرالدشتی
	KC-۰۳-۸۰۱۰۵	چمپای بینام	TN-۰۳-۱۲۵۱	شصت‌رس
	TN-۰۳-۵۱۹	سیاه دم	TN-۰۳-۱۵۶۷	-
	KC-۰۳-۸۰۰۱۵	سلطان رس	KC-۰۳-۸۰۰۹۶	صدری بینام
	والدینی رشت*	سنگ جو	KC-۰۳-۸۰۱۰۵	بینام
	TN-۰۳-۵۹۵	گرم صدری	TN-۰۳-۵۱۷	غول چمپا
	شاخص گروه V	هرندی ۳۷۹	TN-۰۳-۵۶۴	کومه گردان
	شاخص گروه V	باسماتی	TN-۰۳-۵۲۲	چمپا
گروه سوم	TN-۰۳-۳۰۸	صدری کوتاه	TN-۰۳-۵۳۳	بینام
	شاخص ژاپونیکا	آزوسنا	TN-۰۳-۵۵۶	چمپا
	TN-۰۳-۵۳۵	حسنی	والدینی رشت*	گرده
	والدینی رشت*	خزر	TN-۰۳-۵۸۰	مشت عباسی
	TN-۰۳-۵۱۸	حسنی	TN-۰۳-۵۷۹	غریب دم‌دار
	TN-۰۳-۵۳۷	غریب محلی	TN-۰۳-۵۲۱	بینام
	TN-۰۳-۵۳۸	بینام	والدینی رشت*	تایچونگ
	TN-۰۳-۲۲۰	-	TN-۰۳-۵۷۷	امیردوله
	شاخص ژاپونیکا	تایچونگ ۶۵	TN-۰۳-۵۹۳	تکه‌ور
	TN-۰۳-۵۱۶	حسنی	والدینی رشت*	حسنی
	والدینی رشت*	اوندا	KC-۰۳-۸۰۰۶۸	صدری
گروه چهارم	KC-۰۳-۸۰۰۹۲	صدری	KC-۰۳-۸۰۰۹	صدری
	KC-۰۳-۸۰۰۹۴	صدری‌دم‌سرخ	-	-
گروه پنجم	TN-۰۳-۵۵۸	گرم صدری		
گروه ششم	KC-۰۳-۸۰۳۳۴	-		
گروه هفتم	TN-۰۳-۲۱۲	-	TN-۰۳-۸۰۳۵۷	دمسیاه
	TN-۰۳-۲۱۰	-	والدینی رشت*	نعمت
	TN-۰۳-۲۲۱	-	شاخص ایندیکا	IR36
	TN-۰۳-۴۷۰	-	والدینی رشت*	ندا
	TN-۰۳-۲۱۱	-	والدینی رشت*	سپیدرود
	TN-۰۳-۲۱۶	صدری	شاخص ایندیکا	IR28
	TN-۰۳-۲۱۹	-		

* از جمله ژنوتیپ‌هایی هستند که در موسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) به‌عنوان والدین تلاقی استفاده می‌شوند.

بنابراین حدود نیمی از این رقم‌ها دارای آلل خاص بودند و دلیل دیگری بر اثبات ساختار ژنتیک منحصر به فرد برنج‌های بومی ایران می‌باشد. البته گلازمن در بررسی خود به وجود درصد اندکی از چنین ژنوتیپ‌هایی در برنج‌های آسیا اشاره داشته است. نعمت‌زاده و کوش (۱۹۹۳) با بررسی ۱۴۹ نمونه برنج ایرانی گزارش کردند که حدود ۲۵ درصد نمونه‌های مورد بررسی در گروه‌های شش‌گانه گلازمن قرار نگرفتند. ایشان سهم گروه‌های I، V و VI را به ترتیب ۶/۱، ۶۱/۱ و ۶/۷ درصد بیان نمودند(۳۰). در بررسی ۳۴ رقم انتخابی از برنج‌های ایران توسط گلازمن (۱۹۸۷a، ۱۹۸۸) نیز اکثر برنج‌های ایرانی (۵۸/۸٪) در گروه V قرار گرفتند. همچنین نسبت گروه‌های II و VI به ترتیب ۱۷/۶ و ۲۳/۵ درصد بود (۱۵، ۱۷). بنابراین نسبت بین گروه‌های مشاهده شده در این پژوهش تا حدود زیادی با گزارشات دیگران مطابقت دارد. واوقان و جولیانو (۱۹۹۲) با طبقه‌بندی ۱۹۵ رقم برنج از ذخایر توارثی اندونزی گزارش نمودند که ۱۵٪ آن‌ها تنها با تفاوت یک آلل در گروه حدواسط گلازمن قرار گرفتند (۴۴). شاتا و همکاران (۱۹۹۳) و تنگ و همکاران (۱۹۹۸) به ترتیب سهم گروه حدواسط گلازمن را در میان ژرم‌پلاسم میانمار و دو ایالت از چین، ۸٪ و ۱/۷٪ گزارش نمودند (۳۳، ۴۰).

به طور کلی مجموع نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تنوع ژنتیک برنج‌های بومی ایران بسیار زیاد است و یک منبع ارزشمند و غنی از تنوع طبیعی برای برنامه‌های به‌نژادی برنج را فراهم می‌نمایند. برخلاف تصور ناشی از صفات مرفولوژیک که برنج‌های ایرانی را در دسته ایندیکا قرار می‌دهند، این نتایج نشان می‌دهد که اکثر برنج‌های ایرانی دارای ساختار ژنتیکی خاص و منحصر به فردی هستند و در هیچ‌یک از گروه‌های ژاپونیکا و ایندیکا قرار نمی‌گیرند؛ ولی شباهت بیشتری به گروه ژاپونیکا دارند. نتایج این پژوهش همچنین با ارایه تصویری از ماهیت ژنتیک ارقام و توده‌ها می‌تواند به‌نژادگران را در انتخاب والدین مناسب برای دورگ‌گیری کمک نماید. لذا با توجه به مطالب فوق‌الذکر توصیه می‌شود که به‌نژادگران در انتخاب والدین مناسب برای انجام دورگ‌گیری‌ها علاوه بر صفات مطلوب ظاهری و زراعی، به طبقه‌بندی مولکولی آن‌ها نیز توجه داشته باشند.

جدول ۲- طبقه‌بندی ۶۶ نمونه برنج ایرانی به روش گلازمن

گروه	شماره بانک ژن	نام محلی	شماره بانک ژن	نام محلی
گروه I (ایندیکا) ۷/۵٪	KC-۰۳-۸۰۳۵۷	-	TN-۰۳-۵۷۷	شصت‌رس
	شاخص گروه I	IR36	والدینی رشت*	سپیدرود
	شاخص گروه I	IR28	والدینی رشت*	نعمت
گروهII (۱/۵٪)	TN-۰۳-۵۶۴	کومه گردان		
گروه V برنج‌های خوش کیفیت (۴۳/۸٪)	TN-۰۳-۵۵۳	غریب	KC-۰۳-۸۰۱۰۲	صدری بینام
	TN-۰۳-۵۶۳	غریب	KC-۰۳-۸۰۰۸۴	چمپا
	TN-۰۳-۵۷۲	سالاری	KC-۰۳-۸۰۰۸۷	چمپا
	TN-۰۳-۵۷۸	دم‌زرد	KC-۰۳-۸۰۱۱۷	موسی طارم
	TN-۰۳-۵۸۲	رضاجو	KC-۰۳-۸۰۱۳۱	حسن‌سرایی
	TN-۰۳-۵۸۳	بینام	KC-۰۳-۸۰۱۳۹	حسن‌سرایی
	TN-۰۳-۵۹۵	گرم‌صدری	KC-۰۳-۸۰۱۶۱	آبجی‌بوجی
	TN-۰۳-۵۹۸	غریبی	KC-۰۳-۸۰۱۶۳	سالاری
	TN-۰۳-۶۰۱	مولایی	KC-۰۳-۸۰۱۶۶	شاهک
	شاخص گروه V	هرندی۳۷۹	KC-۰۳-۸۰۱۱۸	موسی طارم
	شاخص گروه V	باسماتی	شاخص گروه V	فیروز
	والدینی رشت*	دمسیاه	والدینی رشت*	حسن‌سرایی
گروه VI ژاپونیکا(۶٪)	شاخص ژاپونیکا	آزوسنا	شاخص ژاپونیکا	تایچونگ ۶۵
	TN-۰۳-۵۸۸	بینام	TN-۰۳-۵۶۶	غریب
گروه حدواسط (۴۶/۹٪)	TN-۰۳-۵۹۳	تکه‌ور	KC-۰۳-۸۰۱۰۷	صدری
	TN-۰۳-۵۸۱	قنبرجو	KC-۰۳-۸۰۲۰۴	-
	TN-۰۳-۵۸۰	مشت‌عباسی	KC-۰۳-۸۰۰۹۹	صدری‌دم‌سرخ
	TN-۰۳-۵۴۱	صدری	KC-۰۳-۸۰۰۹۶	صدری بینام
	TN-۰۳-۵۵۶	چمپا	KC-۰۳-۸۰۰۹۸	صدری بینام
	TN-۰۳-۵۵۸	گرم صدری	KC-۰۳-۸۱۰۰	صدری‌مولایی
	TN-۰۳-۵۶۵	زرددم	KC-۰۳-۸۰۱۰۱	صدری‌دم‌سرخ
	TN-۰۳-۵۶۸	بینام	KC-۰۳-۸۰۱۰۴	آبجی بوجی
	TN-۰۳-۵۷۱	صدری	KC-۰۳-۸۰۱۰۵	صدری
	TN-۰۳-۵۷۵	دمسیاه	KC-۰۳-۸۰۲۲۳	صدری
	TN-۰۳-۱۲۵۱	شصت‌رس‌چمپا	KC-۰۳-۸۰۳۳۴	-
	والدینی رشت*	ندا	TN-۰۳-۱۵۶۷	-
	والدینی رشت*	تایچونگ	TN-۰۳-۵۶۷	صدری
	والدینی رشت*	حسنی	TN-۰۳-۵۷۰	طارم
	والدینی رشت*	سنگ‌جو	TN-۰۳-۵۷۳	صدری
	والدینی رشت*	خزر		

* از جمله ژنوتیپ‌هایی هستند که در موسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) به‌عنوان والدین تلاقی استفاده می‌شوند.

سپاسگزاری

نگارندگان لازم می‌دانند از تمام افرادی که زمینه‌ساز انجام این مطالعه برای اولین بار در مؤسسه تحقیقات برنج بوده‌اند و همکاری‌های صمیمانه آقایان مهندس شفیعی، مهندس حسینی سالکده و آقای عادلی‌نسب جهت انجام هماهنگی‌های لازم در تأمین برخی از امکانات مورد نیاز، کمال سپاسگزاری و امتنان را داشته باشند. همچنین از آقایان دکتر علیرضا علی‌اکبر و دکتر سیروس عبدمیشانی به خاطر برخی ارشادات ارزنده در زمینه بررسی آیزوزایم‌ها و تکنیک الکتروفورز افقی ژل نشاسته، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

مراجع مورد استفاده **REFERENCES**

۱. حق‌نظری، ع. ۱۳۷۳. مطالعه پلی‌مورفیسم آیزوزایم‌های استراز و گلوتامات اگسالات ترانس آمیناز در توده‌های بومی جو ایرانی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران، ایران. ۱۶۰ ص.

۲. میر دریکوند، م. ۱۳۷۸. بررسی تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی توده برنج‌های ایرانی با استفاده از نشانگرهای (مارکرهای) بیوشیمیایی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه گیلان. ۱۷۷ص.

۳. نعمت‌زاده، ق. ع. و م. ت. کربلایی، ۱۳۷۵. دستورالعمل آزمایشگاهی مارکرهای بیوشیمیایی آیزوزایم در برنج. تک‌نگاشت، مؤسسه تحقیقات برنج کشور. رشت، ایران. ۳۳ ص.

4. Ahmadi, N., J. C. Glaszmann, & E. Rabary. 1991. Traditional highland rices originating from intersubspecific recombination in Madagascar. In " IRRI(ed.), Rice Genetics II. Proceeding of the Second International Rice Genetic Symposium, 14-18 May 1990, pp. 67-69". P. O. Box 933, Manila, Philippines.
5. Akimoto, M., Y. Shimamoto, & H. Morishima. 1997. Genetic differentiation in *Oryza glumaepatula* and its phylogenetic relationships with other AA genome species. RGN 14: 37-38.
6. Akimoto, M., Y. Shimamoto. & H. Morishima. 1998. Comparison between phynotype variation and isozyme diversity within and between AA genome wild rice species. RGN 15: 78-80.
7. Brar, D. S. 1991. Isozyme: technique and applications in rice improvement. Handout of Second Rice Biotechnology Training Course, 15 Oct. - 27 Dec. IRRI, Philippines.
8. Cai, H. W. & H. Morishima. 1997. Indica- Japonica differentiation of Bangladesh rice cultivars detected by isozyme analysis. RGN 14: 29-30.
9. Cai, H., X. K. Wang, & H. Morishima. 1995. Isozyme variation in Asian common wild rice *Oryza rufipogon*. RGN 12: 178-180.
10. Cai, H., X. K. Wang, & H. Morishima. 1996. Geographical variation of *Oryza rufipogon* with reference to prennial-annual differentiation. RGN 13: 67-69.
11. Endo, T. & H. Morishima. 1983. Rice. In " Tanksley, S. D. & Orton, T. J. (Eds), Isozyme in Plant Genetic & Breeding, Part B. pp 129-146 ". Elsveier Scientific Publishers B. V., Amsterdam.
12. Endo, N., T. Ogawa, & G. S. Khush. 1997. Isozyme classification of Myanmar rice cultivars resistant to bacterial blight. Breeding science 47: 27-32.
13. Fuentes, J. L., F. Escobar, A. Alvarez, G. Gallego, M. C. Duque, M. Ferrer, J. E. Deus, & J. M. Tohme. 1999. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD & AFLP markers. Euphytica 109: 107-115.
14. Ghareyazie, B., G. Huang, G. Second, J. Bennet, & G. S. Kush. 1996. Classification of rice germplasm: fingerprinting rice germplasm using ALP & PCR-based RFLP. IRRN 21: 10-12.
15. Glaszmann, J. C. 1987a. Isozyme & classification of Asian rice varieties. Theor. Appl. Genet. 74: 21-30.
16. Glaszmann, J. C. 1987b. A simplified method to classify rice varieties with isozymes. IRRN 12: 5-7.
17. Glaszmann, J. C. 1988. Geographic pattern of variation among Asian native rice cultivars (*Oryza sativa* L.) based on fifteen isozyme loci. Genome 30: 782-792.
18. Glaszmann, J. C., B. G. De Los Reyes, & G. S. Khush. 1988. Electrophoretic variation of isozymes in plumules of rice- a key to the identification of 76 alleles in 24 loci. IRRI. 14 pp.

19. Ishikawa, R. 1991. Isozyme variations and ecotype-specific alleles found among Japanes rice varieties RGN 13: 12-19.
20. Iwata, N. 1996. Report of commitee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. RGN 13: 12-19.
21. Kephart, S. R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: A comparative analysis of techniques. Amer. J. Bot. 77(5): 693-712.
22. Malik, S. S., D. S. Brar, & G. S. Khush. 1995. Identification of two new alleles in traditional rice germplasm of Philippines. RGN 12: 206-207.
23. Malik, S. S., & G. S. Khush. 1996a. A simplified procedure for classification of rice germplasm based on single isozyme locus. RGN 13: 42-43.
24. Malik, S. S., & G. S. Khush. 1996b. Isozyme classification of Philippines & Thailand rice germplasm. RGN 13: 43-44.
25. May, B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. In "Hoezel, A. R. (ed.), Molecular Genetic Analysis of Population , pp. 1-12". Oxford University Press.
26. Morishima, H., & J. C. Glaszmann. 1990. Current statue of isozyme gene symbols. RGN 7: 51-57.
27. Morishima, H. 1997a. Isozyme. In "Matsuo, T.; Futsuhara, Y.; Kikushi, F. & Yamagushi, H. (eds.), Science of The Rice Plant Genetic, Volume 3, pp. 376-386". Nosan Gyoson Bunka Kyokai, Tokyo, Japan.
28. Morishima, H. 1997b. Isozyme & storage protein in relation to genome constitution. In "Matsuo, T.; Futsuhara, Y.; Kikushi, F. & Yamagushi, H. (eds.), Science of The Rice Plant Genetic, Volume 3, pp. 54-60". Nosan Gyoson Bunka Kyokai, Tokyo, Japan.
29. Murphy, R. W., J. W. Sites, Tr. Donald, G. Buth, & C. H. Haufler. 1996. Proteins I: Isozyme electrophoresis. In "Hillis, D.; Mortiz, M. C. & Mable B. K. (eds.), Molecular Systematics, pp. 45-126". Sinouer Associates INC. Sunderland, Massachuesetts, USA.
30. Nematzadeh, GH. A. & G. S. Khush. 1993. Classification of rice germplasm from Iran through isozyme analysis. RGN 10: 74-75.
31. Rohlf, F. J. 1992. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy & Multivariate Analysis System.
32. Romesburg, H. C. 1990. Cluster Analysis for Researchers. Second edition, Robert E. Krieger Publishing Company INC. 321 p.
33. Shatta, A. M., B. G. Reyes, D. S. Brar, & G. S. Khush. 1993. Isozyme classification of Myanmar rice germplasm based on isozyme polymorphism. RGN 10: 73-74.
34. Second, G. 1982. Origin of the genic diversity of cultivated rice: study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. Jpn. J. Genet. 57: 25-27.
35. Second, G. 1985. Evelutionary relationships in the *Sativa* group of *Oryza* based on isozyme data. Genet. Sel. Evol. 17(1): 89-114.
36. Second, G. 1991. Molecular markers in rice systematics & the eveloution of genetic resources. In "Bajaj, Y. P. S. (Ed), Biotechnology in Agriculture & Forestry, Vol 14, Rice, pp. 468-490". Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
37. Suh, H. S., Y. I. Sato, & H. Morishima. 1997. Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morphophysiology, isozyme & RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 94: 316-321.
38. Sun, X. L., H. W. Cai, J. C. Xu, L. H. Zhu, & X. K. Wang. 1995. Two newly found aminopeptidase loci and allelic variation in Asian cultivars. RGN 12: 189-190.
39. Takahashi, N. 1997. Isozyme and intraspecific differentiation. In "Matsuo, T.; Futsuhara, Y.; Kikushi, F. & Yamagushi, H. (eds.), Science of The Rice Plant Genetic, Volume 3, pp. 128-130". Nosan Gyoson Bunka Kyokai, Tokyo, Japan.
40. Tang, S. X. & G. S. Khush. 1998. Isozyme classification of Taiwan and Yannan rice germplasm of China. RGN 15: 77.
41. Tang, S. X., G. S. Khush, & D. S. Brar. 1996. Identification of a null allele in traditional rice germplasm of Taiwan, China. RGN 13: 53-54.

42. Tang, S. X., G. S. Khush, & D. S. Brar. 1997. A new allele at Amp4 locus in a traditional rice cultivar. RGN 14: 75-76.
43. Tanksley, S. D. & T. J. Orton. 1983. Isozyme in Plant Genetic & Breeding, Part A. Elsveier Scientific Publishers B. V., Amsterdam. 516 pp.
44. Vaughan, D. A. & A. Juliano. 1992. Silent allele for Amp-2 found among Sulawesi varieties. RGN 9: 107-108.
45. Wendel, J. F. & N. F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In "Soltis, D. E. & Soltis, P. S. (eds.), Isozymes in Plant Biology, pp. 5-40". Dioscorides Press, Portland. Oregon, USA.

Iranian, J. Agric. Sci. Vol. 35, No. 1, 2004

Evaluation of Genetic Diversity in Iranian Rice Using Isozyme Markers

M. MIR DERIKVAND[1] , GH. NEMATZADEH[2], A. ALAMY[3] , AND B. GHAREYAZIE[4]

1, Staff Member, Rice Research Institute of Iran, Rasht 2, Faculty of Agricultural Science, Mazandran Universty, Sari 3, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan Universty, Rasht, 4, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

Accepted Oct. 1, 2003

SUMMARY

Genetic characterization and classification of germplasm are very important in that they are helpful in breeding as well as conservation of genetic resources. In this investigation, 120 genotypes of Iranian rice germplasm were classified through data obtained from seven isozyme loci using cluster analysis. Enzyme extract was obtained from 6-8 day seedlings. Horizontal starch gel electrophoresis (HSGE) and Glaszman *et al.* Protocol (1988), with some modifications was employed. Cluster analysis lead to the classification of the samples in seven groups. More than %16 were positioned within Japonica and %9 positioned into Indica group. About %68 in two major groups fell out of Indica and Japonica group (with more similarity to Japonica) and %4 were positioned in three intermediate groups between Indica and Japonica. Forty-three isozyme genotypes were detected, with an average of 2.9 samples for each genotype group. In many cases, accessions with the same name revealed different isozyme genotypes (e.g. in Gharib and Binam). Genotype diversity index was 3.43, which is high in comparison with other Asian rices. These results showed a high genetic variability in Iranian landrace rices introducing them as a valuable and very rich resource of natural diversity for rice improvement as well as breeding.

Key words: Rice (*Oryza sativa* L.), Genetic diversity, Isozyme, Cluster analysis