

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های برنج از لحاظ آهن، روی، منگنز و پروتئین دانه و سنجش کارایی نشانگرهای SSR پیوسته به آن‌ها

الهام نصیری^۱، عاطفه صبوری^{۲*}، اکبر فرقانی^۳ و مسعود اصفهانی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۳- دانشیار، گروه علوم خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۴- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۱۴)

چکیده

به‌نژادگران در راستای انتخاب بهترین والدین برای تلاقی، در پی ارقام یا ژنوتیپ‌هایی هستند که از نظر ژنتیکی از هم دور باشند که می‌توان از طریق بررسی فاصله‌ی بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به این هدف دست یافت. پژوهش حاضر با هدف گروه‌بندی ۵۰ ژنوتیپ برنج هوازی و غرقابی براساس خصوصیات بیوشیمیایی از جمله میزان آهن، روی، منگنز و پروتئین دانه و نشانگرهای DNA پیوسته به آن‌ها انجام شد. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای به روش Ward ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در چهار گروه قرار گرفتند. گروه سوم به عنوان کوچک‌ترین گروه با سه ژنوتیپ (Caiapo, IR82635-B-B-82-2) و گوهر)، برای تمام متغیرها بویژه عناصر مورد بررسی بالاترین مقدار را به خود اختصاص دادند. میانگین میزان آهن، روی، منگنز و پروتئین این گروه به ترتیب ۳۲/۳۹، ۳۴/۱۵، ۲۵/۶۶ میلی‌گرم در کیلوگرم و ۶/۷۱ درصد بدست آمد. از سوی دیگر براساس اطلاعات مولکولی نشانگرهای ریزماهواره که بر اساس مطالعات مکان‌یابی QTL، مرتبط با عناصر مذکور شناسایی شده بودند، ژنوتیپ‌ها به دو گروه بزرگ تقسیم شدند. به طوری که قسمت اعظم ژنوتیپ‌های برنج غیربومی و هوازی در گروه مجزایی قرار گرفتند. میزان همبستگی ماتریس فاصله اقلیدوسی بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ میزان عناصر و پروتئین و ماتریس تشابه ژنتیکی بر اساس اطلاعات نشانگرهای ریزماهواره (Nei) با آزمون همبستگی متل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار برآورد شد که می‌تواند دلیلی بر اعتبار پیوستگی ژنتیکی این نشانگرها با نواحی ژنومی کنترل کننده این عناصر در جمعیت حاضر باشد.

واژگان کلیدی: برنج، تجزیه خوشه‌ای، عناصر بیوشیمیایی، غرقابی، هوازی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: a.sabouri@guilan.ac.ir

مقدمه

مواد غذایی گیاهی حاوی ویتامین‌ها و ریزمغذی‌هایی هستند که تأثیر زیادی بر سلامت انسان دارند. تحقیقات نشان می‌دهد که کمبود ریزمغذی‌ها، همه‌ی گروه‌های سنی را شامل می‌شود. کمبود آهن، پروتئین و روی شایع‌ترین کمبودهای غذایی در جهان بویژه در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (Ghandilyan *et al.*, 2006). برنج مهم‌ترین محصول غذایی در جهان است و ۷۶ درصد کالری کشورهای آسیایی را تامین می‌کند (Fitzgerald *et al.*, 2008). به‌علاوه، برنج منبع غنی از کالری است و منبع خوبی از مواد ریزمغذی و اسیدآمین‌های تیمین، نیاسین و ریبوفلاوین نیز می‌باشد (FAO, 2004). بنابراین شناسایی ارقام با بالاترین میزان این عناصر در منابع ژنتیکی برنج پیش نیاز برنامه‌های اصلاح ژنتیکی می‌باشد (Stangoulis, 2010). برای آن که به‌نژادگر بتواند حداکثر بهره‌برداری را از پدیده‌ی هتروزیس به عمل آورد، ابتدا لازم است تنوع موجود بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ارزیابی شود و با تلاقی بین ژنوتیپ‌ها، به ارقام پرمحصول و با صفات مطلوب دست یافت. تجزیه خوشه‌ای یکی از روش‌های آماری چند متغیره است که برای تعیین تنوع بین جوامع مختلف گیاهی، جانوری و نیز دسته‌بندی آن‌ها به گروه‌های مختلف براساس فاصله‌ی ژنتیکی و یا تشابه ژنتیکی به کار گرفته می‌شود (Romesburg, 1990). بنابراین از دیدگاه به‌نژادی در ارتباط با عناصر ریزمغذی و پروتئین در برنج، در گام اول بایستی ژنوتیپ‌های متنوع را از لحاظ این عناصر و همچنین از نظر جایگاه‌های ژنومی کنترل کننده این صفات مورد ارزیابی قرار داد و با استفاده از تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مناسب برای برنامه‌های به‌نژادی را تعیین نمود. زنگ و همکاران (Zeng *et al.*, 2010) نشانگرهای SSR را شناسایی نمودند که ارتباط معنی‌داری با هشت عنصر معدنی (P, K, Ca, Mg, Fe, Mn و Zn) در جمعیتی متشکل از ۶۲۸ برنج قهوه‌ای چین داشتند. از این نشانگرهای معنی‌دار می‌توان در

بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی جمعیت از لحاظ نواحی کنترل کننده این عناصر استفاده کرد. پژوهش‌های مختلف با استفاده از نشانگرهای SSR در برنج نشان داده است که این جایگاه‌های مورد استفاده چند شکلی نسبتاً بالایی را نشان می‌دهند و قدرت بالایی در تمایز ژنوتیپ‌های برنج دارند (Honarvar *et al.*, 2013, 2016; Moumeni *et al.*, 2007; Yasmin *et al.*, 2012). تاکنون مطالعات مکان‌یابی با جمعیت‌های مختلف برنج منجر به شناسایی QTL‌های بزرگ اثری شده است. در پژوهشی با عنوان مکان‌یابی QTL‌ها و ژن‌های کاندید برای محتوای آهن و روی برنج در لاین‌های اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی Madhukar × Swarna، ۱۲ QTL برای این دو ویژگی (شش QTL برای آهن و شش QTL برای روی) شناسایی کردند. همچنین تعداد پنج QTL بر روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۲ به طور معنی‌داری با آهن، روی و یا هر دو مرتبط بودند و QTL‌هایی که مرتبط با هر دو متغیر آهن و روی بودند بر روی کروموزوم‌های ۷ و ۱۲ قرار داشتند (Anuradha, 2012). در پژوهشی با عنوان شناسایی و مکان‌یابی QTL‌های مربوط به آهن، روی و محتوای پروتئین دانه برنج، چهار QTL را در کروموزوم‌های ۶، ۱ و ۱۰ نشان دادند که به طور معنی‌داری مرتبط با مقادیر آهن و پروتئین بودند. مطابق بررسی آن‌ها یک QTL برای محتوای پروتئین دانه (qgpc-1) بر روی کروموزوم ۶ و دو QTL (qgpc-2) و (qgpc-3) روی کروموزوم ۱۰ و یک QTL برای محتوای آهن در دانه برنج روی کروموزوم ۱ شناسایی شدند (Indurkar *et al.*, 2015). در پژوهشی به منظور مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با میزان غلظت آهن در قسمت هوایی جو طی مراحل پنج برگی و رسیدگی کامل، ۱۴۸ لاین هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی ارقام Sahara3771 و Clipper توسط نشانگرهای رتروترانسپوزونی، SSR، RFLP و موفولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفتند که برای غلظت آهن هشت و چهار، محتوای آهن تک بوته شش و سه QTL به ترتیب در مراحل پنج برگی و رسیدگی کامل شناسایی شدند. یک

مواد و روش‌ها

به منظور اجرای این پژوهش یک مجموعه شامل ۵۰ رقم برنج هوازی و غرقابی مورد استفاده قرار گرفت که بذور آن‌ها از مؤسسه تحقیقات برنج کشور در رشت و موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج در فیلیپین تهیه شد و پس از کشت در بخش سنگر شهرستان رشت با مختصات جغرافیایی طول شرقی ۴۹ درجه و ۴۳ دقیقه و ۵۷ ثانیه و عرض شمالی ۳۷ درجه و ۹ دقیقه و ۵۰ ثانیه، بذور مورد نیاز برای آزمایش حاضر تهیه گردید (جدول ۱).

برای اندازه‌گیری میزان آهن، روی، منگنز در دانه‌های برنج قهوه‌ای از دستگاه جذب اتمی استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا نمونه‌ها پوست کنی شده و دانه‌های برنج قهوه‌ای تهیه شد و پس از آرد شدن به مقدار ۱ گرم از هر ژنوتیپ به دقت وزن شده و در کوروزه چینی به مدت دو

ناحیه ژنومی مشترک برای QTL‌های صفات غلظت و محتوای آهن تک بوته شناسایی گردید که ممکن است ناشی از پیوسته بودن QTL‌ها یا اثر پلی‌تروپیک آن‌ها باشد (Gheitaran Poorsahrih *et al.*, 2014). اما آنچه مسلم است تعیین اعتبار این نشانگرها در پیوستگی بین QTL‌های شناسایی شده یک گام اساسی قبل از برنامه‌های به‌نژادی انتخاب به کمک نشانگر است (Nicholas, 2006). یکی از روش‌های اعتبارسنجی، استفاده از زمینه‌های ژنتیکی مختلف است. در تحقیق حاضر از یک جمعیت متنوع متشکل از ژنوتیپ‌های ایرانی و خارجی استفاده شد تا ضمن بررسی و گروه‌بندی آنها از لحاظ میزان عناصر آهن، روی، منگنز و پروتئین، این ژنوتیپ‌ها از لحاظ نشانگرهای SSR پیوسته به QTL‌ها این عناصر و پروتئین ارزیابی شوند.

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر

Table 1. The names of evaluated genotypes in present study

شماره	نامگذاری	والدین یا منشاء	شماره	نامگذاری	والدین یا منشاء
Number	Designation	Parentage or origin	Number	Designation	Parentage or origin
1	IR66417-18-1-1-1	IRRI	26	Panda	India
2	IR71525-19-1-1	IRRI	27	Vandana	C 22/Kalakari
3	IR65907-116-1-B	IRRI	28	Nona Bokra	India
4	IRAT170	IRRI	29	Ghasroldashti	Iran(native)
5	Caiapo	IRAT13/B.CAMPO//CNAx104/PERO LA	30	Sangetarom	Iran(native)
6	Pegaso	Unknown	31	Sangejo	Iran(native)
7	IRAT216	Colombia 1/M 312 A-74-2-8-8	32	Rashtisard	Iran(native)
8	IR 81024-B-254-1-B	IRRI 143/IR 71525-19-1-1	33	Shahpasand	Iran(native)
9	IR 81422-B-B-200-4	IR 74371-3-1-1/IR 64	34	Anbarbou	Iran(native)
10	IR 82590-B-B-32-2	CAUDH 1/IR 74371-54-1-1	35	Salari	Iran(native)
11	IR 82616-B-B-64-3	IR 71524-44-1-1/IR 76569-259-1-2-1	36	Neda	Iran(improved)
12	IR 82635-B-B-82-2	IR 78875-176-B-2/IR 78875-207-B-3	37	Ahlamitarom	Iran(native)
13	IR 82639-B-B-103-4	IR 78875-176-B-2/IR 78908-143-B-4	38	Alikazemi	Iran(native)
14	IR 82639-B-B-118-3	IR 78875-176-B-2/IR 78908-143-B-4	39	Khazar	Iran(improved)
15	IR 82639-B-B-140-1	IR 78875-176-B-2/IR 78908-143-B-4	40	Hashemi	Iran(native)
16	IR 83749-B-B-46-1	IR 71524-44-1-1/2*IR 74371-54-1-1	41	Champaboudar	Iran(native)
17	IR 82589-B-B-114-3	IRRI 132/IR 74371-54-1-1	42	Gharib	Iran(native)
18	IR 82589-B-B-84-3	IRRI 132/IR 74371-54-1-1	43	Domsiah	Iran(native)
19	IR 82590-B-B-90-4	CAUDH 1/IR 74371-54-1-1	44	Sepidroud	Iran(improved)
20	IR 82590-B-B-94-4	CAUDH 1/IR 74371-54-1-1	45	Kadous	Iran(improved)
21	IR 82590-B-B-98-2	CAUDH 1/IR 74371-54-1-1	46	Dorfak	Iran(improved)
22	IR 82635-B-B-143-1	IR 78875-176-B-2/IR 78875-207-B-3	47	Gohar	Iran(improved)
23	IR 82635-B-B-32-4	IR 78875-176-B-2/IR 78875-207-B-3	48	Hasansaraei	Iran(native)
24	IR 83749-B-B-87-3	IR 71524-44-1-1/2*IR 74371-54-1-1	49	Nemat	Iran(improved)
25	IR 83752-B-B-12-3	IR 71524-44-1-1/2*UPL RI 7	50	Domzard	Iran(native)

شماره یک تا ۲۸ ژنوتیپ‌های هوازی و ارقام خارجی و از ۲۹ تا ۵۰ ارقام غرقابی (ایرانی) می‌باشند

Number 1 to 28: aerobic genotypes and foreign cultivars, and from 29 to 50: lowland (Iranian) varieties.

برای انجام بخش مولکولی پژوهش حاضر، از توالی تعداد ۲۰ نشانگر SSR مرتبط با خصوصیات بیوشیمیایی برنج از جمله پروتئین، آهن و روی استفاده شد که اطلاعات این نشانگرها در جدول ۲ آورده شده است.

از نمونه‌های برگ‌گی جوان به روش CTAB استخراج DNA صورت گرفت (Saghai Maroof, 1994). برای ارزیابی کمیت و کیفیت DNA از ژل آگارز استفاده شد و پس از رقیق سازی، عملیات PCR انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد. برای تهیه مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر برای هر نمونه، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیشرفتی و برگشتی با غلظت ۶۰ نانوگرم در میکرولیتر، یک میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۵ میکرولیتر آب دیونیزه شده، ۰/۴۸ میکرولیتر

ساعت در داخل کوره حرارتی الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و خاکستری گردید. سپس به میزان ۵ میلی لیتر اسیدکلریدریک ۲ نرمال برای هر گرم از هر ژنوتیپ اضافه شد و با حرارت دادن ملایم کوروزه روی حمام بن ماری، مواد در اسید حل شده و محلول با عبور از کاغذ صافی، به بالن ژوژه منتقل و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. در مرحله‌ی بعد دستگاه جذب اتمی توسط محلول‌های استاندارد برای هر کدام از عناصر کالیبره شده و مقادیر هر عنصر برای هر ژنوتیپ بر حسب mg/kg قرائت شد (Kalra, 1998). برای اندازه‌گیری میزان پروتئین ابتدا به روش کجدال میزان نیتروژن اندازه‌گیری و سپس با استفاده از حاصل ضرب مقدار نیتروژن در ۵/۹۵ میزان پروتئین بدست آمد (Shi et al., 1999).

جدول ۲- نام و مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Table 2. Name and information of used primers in this study

نشانگر Marker	صفت Trait	توالی آغازگر پیشرو Forward primer sequence	توالی آغازگر معکوس Reverse primer sequence	کروموزوم Chromosome	منبع Reference
RM122		GAGTCGATGTAATGTCATCA GTGC	GAAGGAGGTATCGCTTTGTTGG AC	5	(Anuradha et al., 2012)
RM12796	Zn	GAGAGGATTCATGGTGAGCA TCC	CCAAGACCTCCATTCAAGAGTG C	2	(Indurkar et al., 2015)
RM17	Fe	TGCCCTGTTATTTCTTCTCTC	GGTGATCCTTTCCCATTTC	12	(Stangoulis et al., 2010)
RM171	Fe & protein	AACGCGAGGACACGTACTTA C	ACGAGATACGTACGCCTTTG	10	(Indurkar et al., 2015)
RM234	Fe	ACAGTATCCAAGGCCCTGG	CACGTGAGACAAAGACGGAG	7	(Lu et al., 2008)
RM248	Fe	TCCTTGTAAGAAATCTGGTCCC	GTAGCCTAGCATGGTGCATG	7	(Lu et al., 2008)
RM287	Zn	TTCCCTGTTAAGAGAGAAAT C	GTGTATTTGGTGAAAGCAAC	11	(Indurkar et al., 2015)
RM454	Fe & protein	CTCAAGCTTAGCTGCTGCTG	GTGATCAGTGCACCATAGCG	6	(Indurkar et al., 2015)
RM474	Fe & protein	AAGATGTACGGGTGGCATT	TATGAGCTGGTGAGCAATGG	10	(Indurkar et al., 2015)
RM489	Zn	ACTTGAGACGATCGGACACC	TCACCCATGGATGTTGTCAG	3	(Indurkar et al., 2015)
RM490	Fe	ATCTGCACACTGCAAACACC	AGCAAGCAGTGCTTTCAGAG	1	(Indurkar et al., 2015)
RM514		AGATTGATCTCCATTCCCC	CACGAGCATATTACTAGTGG	3	(Anuradha et al., 2012)
RM517	Fe	GGCTTACTGGCTTCGATTG	CGTCTCCTTGGTTAGTGCC	3	(Swamy et al., 2011)
RM574		GGCGAATTCTTGCACCTGG	ACGGTTTGGTAGGGTGTAC	5	(Anuradha et al., 2012)
RM8007	Fe	AATAGGATGGATCATGGATA	CATCTCATCAGGAACCTAAC	7	(Lu et al., 2008)
RM60		AGTCCCATGTTCCACTTCCG	ATGGCTACTGCCTGTACTAC	3	(Anuradha et al., 2012)
RM260	Fe	ACTCCACTATGACCCAGAG	GAACAATCCCTTCTACGATCG	12	(Stangoulis et al., 2007)
RM488	Fe	CAGCTAGGGTTTTGAGGCTG	TAGCAACAACCAGCGTATGC	1	(Swamy et al., 2011)
RM5	Fe	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA	GCATCCGATCTTGATGGG	1	(Indurkar et al., 2015)
RM7	Fe	TTCGCCATGAAGTCTCTCG	CCTCCCATCATTTCTGTGT	3	(Swamy et al., 2011)
RM510	Fe & protein	AACCGGATTAGTTTCTCGCC	TGAGGACGACGAGCAGATTC	6	(Indurkar et al., 2015)
RM231		CCAGATTATTTCTGAGGTC	CACTTGCATAGTTCTGCATTG	3	(Anuradha et al., 2012)

۱). مطابق نتایج تابع تشخیص، مقدار آماره لانداى ويلک بسیار پايين و برابر با $0.68/0$ بدست آمد ($p < 0.001$) که نشان‌دهنده صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در چهار گروه است. در جدول ۳ میانگین و میزان انحراف از میانگین کل استاندارد شده گروه‌ها برای چهار صفت آهن، روی، منگنز و پروتئین آورده شده است. براساس اطلاعات این جدول، گروه سوم به عنوان کوچک‌ترین گروه با داشتن ۳ عضو (Caiapo, IR82635-B-B-82-2 و گوهر) برای هر متغیر، دارای انحراف مثبت از میانگین کل می‌باشد که نشان دهنده برتری اعضای این گروه از لحاظ صفات مثبت تغذیه‌ای می‌باشد. میانگین میزان آهن، روی، منگنز و پروتئین این گروه بترتیب $32/39$ ، $34/15$ ، $25/66$ میلی‌گرم در کیلوگرم و $6/71$ درصد بدست آمد و همچنین اعضای این گروه از نظر عناصر آهن، روی و منگنز با داشتن بالاترین انحراف استاندارد شده (بالتر از دو برای آهن، روی و منگنز)، برتری نسبی قابل توجهی از لحاظ این عناصر نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها دارند. از لحاظ پروتئین نیز از میانگین کل بالاتر بودند. بنابراین این سه ژنوتیپ می‌توانند منابع ژنوتیپی ارزشمندی بویژه در جهت ارتقای عناصر ریزمغذی آهن، روی و منگنز باشند و در برنامه‌های اصلاحی برای بالابردن ارزش تغذیه‌ای برنج در دستیابی به ارقام مطلوب با عملکرد و کیفیت بالا مورد استفاده قرار گیرند. بدیهی است انتخاب والدین مناسب می‌تواند گامی موثر برای دستیابی به هتروزیس بالاتر در راستای بهبود آهن، روی و پروتئین برنج باشد. گروه اول شامل ۲۵ ژنوتیپ بود که ۱۷ ژنوتیپ از نوع غرقابی (ایرانی) و ۸ ژنوتیپ هوازی و رقم خارجی بودند. این گروه از نظر عناصر آهن، روی و منگنز دارای انحراف مثبت بوده و از نظر پروتئین انحراف منفی داشتند. بعبارت دیگر نسبت به میانگین کل جمعیت، میزان عناصر ریزمغذی بیشتری اما پروتئین کمتری داشتند. میانگین میزان آهن، روی، منگنز و پروتئین این گروه بترتیب $20/19$ ، $11/31$ ، $12/33$ میلی‌گرم در کیلوگرم و $1/11$ درصد بدست آمد. گروه دوم شامل ۱۰ ژنوتیپ که ۸ ژنوتیپ از نوع هوازی و ۲ رقم ایرانی علی کاظمی و سپیدرود بود. ژنوتیپ‌های این گروه از نظر عنصر روی و

کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، $0/6$ میکرولیتر dNTP (۲ میلی‌مولار) و $0/12$ میکرولیتر آنزیم TaqDNA polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) با هم مخلوط شدند. در مرحله‌ی آخر فرآورده‌های PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید شش درصد تفکیک شد و رنگ آمیزی و ظهور باندها با استفاده از نیترات نقره انجام گرفت. امتیازدهی باندها براساس وزن مولکولی و متناسب با ساختار نرم افزار Power Marker انجام شد. برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، بر اساس میزان عناصر آهن، روی، منگنز و میزان پروتئین تجزیه خوشه‌ای با روش Ward با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. به منظور تأیید نقطه برش در دندروگرام حاصل، از تجزیه تابع تشخیص استفاده شد. برای بررسی تفاوت گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تعیین میزان نقش هر یک از متغیرهای اندازه‌گیری شده در تمایز خوشه‌ها، میانگین هر یک از متغیرها و انحراف از میانگین کل آنها محاسبه گردید. بدیهی است که میانگین هر کدام از صفات در هر گروه از میانگین کل آن صفت بیشتر باشد، آن گروه ارزش بیشتری از متوسط ژنوتیپ‌ها خواهد داشت (Rashidi et al., 2007). همچنین به منظور از بین بردن اثر مقیاس متغیرها، و مقایسه نسبی آنها در میزان تمایز خوشه‌ها از انحراف از میانگین استاندارد شده استفاده شد (Dadras et al., 2015). برای تجزیه آماری و ژنتیکی اطلاعات مولکولی نشانگرهای SSR، پس از انجام تجزیه خوشه‌ای با ضرایب شباهت و روش‌های مختلف گروه‌بندی، در نهایت مناسبترین دندروگرام با در نظر گرفتن منشاء ژنوتیپ‌ها و با توجه به شمای ظاهری مناسب و تفکیک بهتر ژنوتیپ‌ها، با استفاده از ضریب شباهت Nei و الگوریتم Neighbor Joining (اتصال همسایگی) حاصل شد که با رسم دندروگرام به صورت نمایش تابشی^۱ مورد تفسیر قرار گرفت.

نتایج و بحث

براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش Ward ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس مقادیر عناصر آهن، منگنز، روی، و پروتئین در چهار گروه قرار گرفتند (شکل

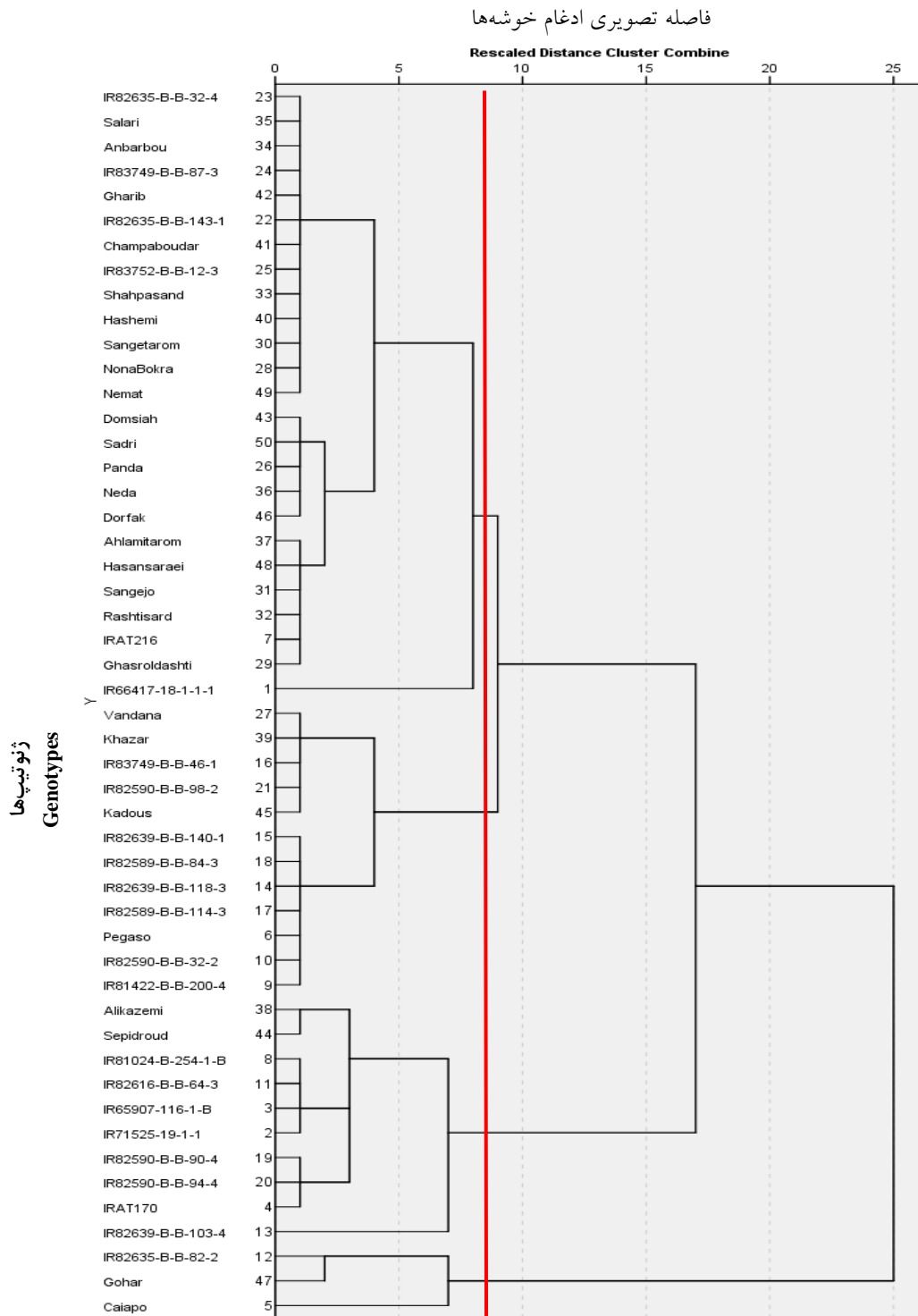
1- Radiation view

گروه بندی ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های مولکولی: تجزیه خوشه‌ای و دندروگرام اطلاعات نشانگرهای SSR با ضرایب شباهت و روش‌های مختلف انجام شد و در نهایت بهترین روش دندروگرام که با استفاده از ضریب شباهت Nei و الگوریتم اتصال همسایگی (Neighbor Joining) بود، مورد تفسیر قرار گرفت (شکل ۲).

تمامی نشانگرهای SSR بکار رفته در این تحقیق بنابر مطالعات مختلف پیشین، پیوسته به عناصر ریزمغذی یا پروتئین گزارش شده‌اند (جدول ۲). برطبق دندروگرام (شکل ۲)، کلیه ژنوتیپ‌ها به دو گروه بزرگ تفکیک شدند. ژنوتیپ‌های هوازی به جز سه ژنوتیپ، همگی در یک گروه قرار گرفته‌اند. در گروه دوم، همه ارقام غرقابی ایرانی به همراه ژنوتیپ هوازی IR82635-B-B-32-4 و دو رقم Nona Bokra و Vandana قرار داشتند. بیشترین قرابت بین ژنوتیپ IR82635-B-B-32-4 با رقم قصرالدشتی و بین Nona Bokra با سنگ طارم مشاهده شد که در تجزیه خوشه‌ای بر اساس عناصر و پروتئین نیز مشاهده شد که این ژنوتیپ‌های مذکور در یک گروه (گروه ۱) قرار داشتند. اگر گروه دوم به سه زیرگروه تقسیم شود نتایج شفاف‌تری حاصل می‌گردد (جدول ۴). به طوری که در زیرگروه اول ۹ رقم ایرانی و زیرگروه دوم شامل ۱۵ ژنوتیپ بود. از زیرگروه اول، شش رقم از ۹ رقم و در زیرگروه دوم ۱۳ ژنوتیپ از ۱۵ ژنوتیپ در تجزیه خوشه‌ای عناصر و پروتئین در گروه یک (گروه با مقادیر عناصر ریزمغذی بالاتر و پروتئین کمتر از میانگین کل) قرار گرفتند. یعنی می‌توان مطابقت خوبی بین دو نوع گروه‌بندی مشاهده کرد. در زیرگروه سوم ارقام Vandana و چمپابودار با فاصله ژنتیکی کم بر اساس اطلاعات نشانگرهای ریزماهواره قرار گرفتند. رقم Vandana یک رقم آپلند مشهور با عملکرد بالا، مقاوم به خشکی با منشا هندی است (Brar et al., 2007) و میزان نسبتاً پایین عناصر ریزمغذی از جمله آهن و روی در این رقم در مطالعات پیشین از جمله تحقیق پاتاک و همکاران (Pathak et al., 2017) هم گزارش شده است.

مقدار پروتئین دارای انحراف استاندارد مثبت، اما از نظر آهن و منگنز دارای انحراف منفی بودند. بنابراین ژنوتیپ‌های این گروه در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، آهن و منگنز کمتری دارند اما بویژه از لحاظ پروتئین برتری نسبی دارند. میانگین میزان پروتئین این گروه ۹/۷۲ درصد بدست آمد. گروه چهارم که دربرگیرنده ۱۲ ژنوتیپ (۸ ژنوتیپ هوازی، دو رقم غرقابی خزر و کادوس و ارقام خارجی Pegaso و Vandana) بود از نظر تمامی صفات دارای انحراف منفی بود و نشان دهنده‌ی ضعیف بودن اعضای این گروه از لحاظ این صفات می‌باشد. میانگین میزان آهن، روی، منگنز و پروتئین این گروه بترتیب ۱۴/۸۷، ۳/۶۱، ۶/۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و ۵/۵۸ درصد بدست آمد.

در جمع‌بندی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های غرقابی ایرانی و ژنوتیپ‌های خارجی و هوازی می‌توان اذعان داشت در این آزمایش رقم گوهر، IR82635-B-B-82-2 و Caiapo بالاترین ارزش تغذیه‌ای را از لحاظ عناصر ریزمغذی مورد بررسی نشان دادند. گروه دوم که قسمت اعظم اعضای آن ارقام خارجی و ژنوتیپ‌های هوازی بودند از لحاظ پروتئین برتری نسبی نشان دادند. بررسی میانگین کل محاسبه شده برای ژنوتیپ‌های ایرانی و غیر ایرانی نیز موید این حقیقت بود که ژنوتیپ‌های غیرایرانی بیشتر از لحاظ پروتئین و ژنوتیپ‌های ایرانی غالباً از لحاظ عناصر آهن، روی و منگنز برتری دارند. الوانچی (Alvanchi, 2013) در پژوهشی بر روی ۴۸ ژنوتیپ برنج، ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه قرار داد و گروه چهارم را که شامل ارقام بومی (بینام، سنگ جو، ندا و سالاری) و ارقام اصلاح شده و خارجی بود به عنوان بهترین گروه معرفی کرد. این گروه از نظر آهن و روی بیشترین مقدار و از نظر فیتات که یک عامل ضد تغذیه‌ای است کمترین مقدار را داشتند. در پژوهش حاضر نیز ارقام ایرانی سنگ جو، ندا و سالاری که در گروه یک قرار گرفتند از لحاظ عناصر ریزمغذی منگنز و روی و بویژه آهن، ارزش نسبی بالاتری از میانگین کل کسب کردند.



شکل ۱- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های برنج براساس عناصر Fe, Mn, Zn و محتوی پروتئین به روش حداقل واریانس وارد
 Figure 1. Grouping of rice genotypes based on Fe, Mn, Zn and protein content using Ward minimum variance method

جدول ۳- اعضای گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای به همراه میانگین و انحراف از میانگین کل استاندارد شده‌ی گروه‌ها برای هر متغیر

Table 3. Member of groups derived from cluster analysis with mean and standardized deviation from mean of groups for each variable

گروه group	ژنوتیپ genotype	صفات Traits	میانگین Mean	انحراف از میانگین کل Deviation from total mean	انحراف استاندارد شده Standardized deviation
1	Ghasroldashti, Sangetarom, Sangejo, Anbarbou, Salari, Neda, Ahlamitarom, Hashemi, Champaboudar, Gharib, Domsiah, Dorfak, Hasansaraei, Nemat, Domzard, Shahpasand, Rashtisard IRAT216, IR66417-18-1-1-1, IR82635-B-B-143-1, IR82635-B-B-32-4, IR83749-B-B-87-3, IR 83752-B-B-12-3, Panda, Nona Bokra,	Fe (mg/kg) Mn (mg/kg) Zn (mg/kg) Protein %	20.190	1.675	0.281
			11.306	0.809	0.085
			12.329	0.590	0.088
			5.533	-0.919	-0.431
			14.533		
2	Alikazemi, Sepidroud, IR71525-19-1-1, IR65907-116-1-B, IRAT170, IR 81024-B-254-1-B, IR 82616-B-B-64-3, IR 82639-B-B-103-4, IR 82590-B-B-90-4, IR 82590-B-B-94-4	Fe (mg/kg) Mn (mg/kg) Zn (mg/kg) Protein %	9.645	-3.982	-0.669
			12.493	-0.852	-0.089
			9.717	0.754	0.112
			32.390	3.265	1.530
			34.150		
3	Gohar, Caiapo, IR82635-B-B-82-2	Fe (mg/kg) Mn (mg/kg) Zn (mg/kg) Protein %	25.675	13.875	2.330
			6.712	23.653	2.479
			6.712	13.918	2.066
			6.712	0.260	0.122
			14.875		
4	Khazar, Kadous, Pegaso, Vandana, IR 81422-B-B-200-4, IR 82590-B-B-32-2, IR 82639-B-B-118-3, IR 82639-B-B-140-1, IR 83749-B-B-46-1, IR 82589-B-B-114-3, IR 82589-B-B-84-3, IR 82590-B-B-98-2,	Fe (mg/kg) Mn (mg/kg) Zn (mg/kg) Protein %	3.608	-3.640	-0.611
			6.401	-6.889	-0.722
			5.581	-5.338	-0.792
			5.581	-0.871	-0.408
			18.515		
میانگین کل Total mean		Fe (mg/kg) Mn (mg/kg) Zn (mg/kg) Protein %	10.492		
			11.739		
			6.452		
			6.452		

جدول ۴- نام ژنوتیپ‌های برنج موجود در هر گروه براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای حاصل از داده‌های مولکولی

Table 4. Rice genotypes name in each group based on cluster analysis arisen from molecular data

گروه group	ژنوتیپ Genotype
1 هوآزی (خارجی) Aerobic (Foreign)	IR66417-18-1-1-1, IRAT216, IR82635-B-B-143-1, IR83749-B-B-87-3, IR 83752-B-B-12-3, Panda, IR71525-19-1-1, IR65907-116-1-B, IRAT170, IR 81024-B-254-1-B, IR 82616-B-B-64-3, IR 82639-B-B-103-4, IR 82590-B-B-90-4, IR 82590-B-B-94-4, Caiapo, Pegaso, IR 81422-B-B-200-4, IR 82590-B-B-32-2, IR 82639-B-B-118-3, IR 82639-B-B-140-1, IR 83749-B-B-46-1, IR 82589-B-B-114-3, IR 82589-B-B-84-3, IR 82590-B-B-98-2,
2-1 غرقابی (ایرانی) Lowland (Iranian)	Nemat, Domzard, Hasansaraei, Gohar, Dorfak, Kadous, Sepidroud, Domsiah, Gharib
2-2 غرقابی (ایرانی) Lowland (Iranian)	Neda, Ahlamitarom, Salari, Anbarbou, Sangejo, Sangetarom, Ghasroldashti, Rashtisard, Shahpasand, Alikazemi, Khazar, Hashemi,
هوآزی (خارجی) Aerobic (Foreign)	IR82635-B-B-32-4, Nona Bokra
2-3 غرقابی (ایرانی) Lowland (Iranian)	Champaboudar
هوآزی (خارجی) Aerobic (Foreign)	Vandana

دو قرار گرفتند و در هر دو پژوهش ارقام سالاری، ندا، شاه‌پسند، دم زرد، دم‌سیاه، هاشمی و غریب که در یک گروه قرار دارند از نظر گروه‌بندی عناصر نیز در گروه‌هایی قرار گرفته‌اند که از لحاظ مقدار عناصر آهن و روی مقادیر بالاتر از میانگین کل دارند.

به طور کلی، نتایج این تحقیق بیانگر وجود تنوع قابل توجه از لحاظ عناصر آهن، روی، منگنز و میزان پروتئین دانه بین ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه بود. ژنوتیپ‌های غیرایرانی بیشتر از لحاظ پروتئین و ژنوتیپ‌های ایرانی غالباً از لحاظ عناصر آهن، روی و منگنز برتری داشتند. از تنوع موجود و ژنوتیپ‌های شناسایی شده غرقابی و هوازی می‌توان برای بهبود عناصر ریزمغذی در برنامه‌های اصلاحی برنج با انتخاب والدین مناسب بهره برد. معنی‌دار بودن همبستگی متل و قرارگیری تعدادی از ژنوتیپ‌هایی که از لحاظ میزان عناصر ریزمغذی مشابه و نزدیک به هم هستند در یک گروه واحد از لحاظ اطلاعات نشانگرهای ریزماهوره، می‌تواند تأییدی بر اعتبار نشانگرهای به کار گرفته شده در جمعیت حاضر به عنوان نشانگرهای پیوسته به QTL‌های کنترل‌کننده این عناصر باشد. از طرفی می‌توان پیش‌بینی کرد این تعداد از ژنوتیپ‌ها می‌توانند از لحاظ این نواحی ژنومی مورد مطالعه قرابت داشته باشند و این نتیجه می‌تواند مقدمه مطالعات ژنتیکی دقیق‌تر و بیشتر و یک گام اساسی قبل از برنامه‌های به‌نژادی انتخاب به کمک نشانگر باشد.

اصلاحی و بومی بود و گروه دوم با داشتن سه رقم (دادرس، بچار و درفک) کوچکترین گروه بود. همچنین گروه سوم شامل اکثر ارقام خارجی همراه با برخی ارقام اصلاحی (مهر، فجر، هراز، نعمت، دشت، گیل، آمل ۳، و سپیدرود) و گروه اول اغلب ارقام بومی از جمله ارقام خزر، دم‌سیاه، غریب، سالاری، سنگ‌جو، هاشمی، عنبر بو، علی‌کاظمی، رشتی سرد و دم زرد را دربرگرفت که می‌توان گفت قرار گرفتن این ارقام در یک گروه با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. چرا که در پژوهش حاضر نیز ارقام اشاره شده در یک گروه بزرگ با دو زیرگروه، زیرگروه اول شامل دم‌سیاه، غریب، دم زرد و زیرگروه دوم شامل ارقام خزر، سالاری، سنگ‌جو، هاشمی، عنبربو، علی‌کاظمی و رشتی سرد قرار گرفته‌اند. به عبارت دیگر، این ارقام در هر دو پژوهش از لحاظ اطلاعات ژنومی مرتبط با نشانگرهای ریزماهوره مورد استفاده نیز قرابت نشان دادند. الوانچی (Alvanchi, 2013) با مطالعه‌ی ۴۸ ژنوتیپ شامل ۲۴ ژنوتیپ بومی، ۱۵ ژنوتیپ اصلاح شده و ۹ ژنوتیپ خارجی براساس داده‌های مولکولی، ژنوتیپ‌ها را به دو گروه تفکیک کرد. که اکثر ارقام بومی همراه ۷ ژنوتیپ اصلاح شده و خارجی در گروه اول قرار گرفتند و گروه دوم را می‌توان گروه ژنوتیپ‌های اصلاح شده و خارجی عنوان کرد. گروه اول شامل ارقامی از قبیل غریب، دم‌سیاه، دم زرد، سالاری، ندا، علی‌کاظمی، خزر، هاشمی و شاه‌پسند می‌باشد که در پژوهش حاضر نیز این ارقام در گروه بزرگ دوم به صورت دو زیر گروه یک و

References

- Aboutalebi, Sh., Fotokian, M.H. and Zeinalabedini, M.** (2015). Evaluation of genetic diversity and population structure of rice cultivars using satellite markers related to iron and zinc accumulation. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **6**(4): 1-14. (In Persian).
- Alvanchi, M.** (2013). *Evaluation of Rice (Oryza sativa L.) Genotypes on the Base of Biochemical Characteristics and Molecular Markers Associated with Grain Nutritional Value*. M.Sc. Thesis, University of Guilan, Guilan, IR (In Persian).
- Anuradha, K., Agarwal, S., Rao, Y.V., Rao, K.V., Viraktamath, B.C. and Sarla, N.** (2012). *Mapping QTLs and Candidate Genes for Iron and Zinc Concentrations in Unpolished Rice of Madhukar × Swarna RILs*. Gene, Directorate of Rice Research, Hyderabad, IN.
- Brar, D.S., Mackill, D.J. and Hardy, B.** (2007). Rice genetics V. *Proceedings of Fifth International Rice Genetics Symposium*. World Scientific Publishing and Los Banos, International Rice Research Institute, Manila, PHL.
- Dadras, A.R., Samizadeh, H. and Sabouri, H.** (2015). Evaluation and grouping of soybean varieties and lines under normal and drought stress using multivariate statistical methods in two regions of Rasht and Gonbad Kavous. *Electronic Journal of Crop Production*, **9**(3): 18-105 (In Persian).

- FAO.** (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations, international year of rice. Rice is life. Rome, IT.
- Fitzgerald, M.A., McCouch, S.R. and Hall, R.D.** (2008). Not just a grain of rice: the quest for quality. *Trends in Plant Science*, **14(3)**: 133-139.
- Ghandilyan, A., Vreugdenhilb, D. and Aarts, M.G.M.** (2006). Progress in the genetic understanding of plant iron and zinc nutrition. *Physiological Plantarum*, **126(3)**: 407-417.
- Gheitaran Poorsahigh, Sh., Mohammadi, S.A., Sadeghzadeh, B.** (2014). Identification of Genomic Oregions Controlling Iron Concentration and Content in Shoot of Barley in A × B Doubled Haploid Mapping Population. *Plant Genetic Researches*. **1(1)**: 1-12.
- Honarvar, F., Sabouri, H., Dadras, A.R. and Saieedisar, S.** (2013). Study of the allelic diversity of SSR markers in rice genotypes. 8th National Biotechnology Congress of I.R. *Iran and 4th National Biosafety Congress of IRAN*. 6-8 July 2013, Tehran University, Tehran, IR (In Persian).
- Honarvar, F., Sabouri, H. and Dadras, A.R.** (2016). Study of genetic diversity of rice genotypes by SSR markers and association analysis for related traits to cold tolerance. *Journal of Crop Breeding*, **8(17)**: 166-173 (In Persian).
- Indurkar, A.B., Majgahe, S.K., Sahu, V.K., Vishwakarma, A., Premi, V., Shrivastatva, P., Dubey, M. and Chandel, G.** (2015). Identification, Characterization and Mapping of QTLs related to Grain Fe, Zn and Protein Contents in Rice (*Oryza sativa* L.). *Electronic Journal of Plant Breeding*, **6(4)**: 1059-1069.
- Kalra, Y.P.** (1998). *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*. Taylor & Francis Group, LLC CRC Press. Boca Raton, FL.
- Lu, K., Li, L., Zheng, X., Zhang, Z., Mou, Y. and Hu, Z.** (2008). Quantitative trait loci controlling Cu, Ca, Zn, Mn and Fe content in rice grains. *Journal of Genetics*, **87**: 305-310.
- Moumeni, A., Emanykhah, F., Maleki Zanjan, B. and Maleki, S.** (2007). Estimation of genetic diversity of Iranian rice cultivars for tight linked markers to aroma. *Proc. of 5th National Biotechnology Congress*. Tehran, IR (In Persian).
- Nicholas, F.W.** (2006). Discovery, validation, and delivery of DNA markers. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. **46**, 155-158.
- Pathak, Kh., Rahman, S.W., Bhagawati, S. and Gogoi, B.** (2017). Assessment of nutritive and antioxidant properties of some indigenous pigmented hill rice (*Oryza sativa* L.) cultivars of Assam. *Indian Journal of Agricultural Research*, **51(3)**: 214-220.
- Rashidi, V., Majidi, I., Mohamadi, S.A. and Moghadam Vahed M.** (2007). Determine of genetic relationship in durum wheat lines by cluster analysis and identity of morphological main characters in each groups. *Journal of Agricultural Science*. **13(2)**: 441-450 (In Persian).
- Romesburg, H.C.** (1990). *Cluster Analysis for Researchers, 1th end*. Krieger Publishing, Malabar, Florida, USA.
- Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q. and Allard, R.W.** (1994). Extraordinarily polymorphic DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, **91(12)**: 5466-5570.
- Shi, C.H., Zhu, J. and Wu, J.G.** (1999). Analysis of embryo, endosperm, cytoplasmic and maternal effects for heterosis of protein and lysine content in indicia hybrid rice. *Plant Breeding*, **118**: 574-576.
- Stangoulis, A.J.** (2010). Technical aspects of zinc and iron analysis in biofortification of the staple food crops, wheat and rice. *19th World Congress of Soil Science*, Brisbane, AU.
- Stangoulis, J.C.R., Huynh, B., Welch, R.M., Choi, E.Y. and Graham, R.D.** (2007). Quantitative trait loci for phytate in rice grain and their relationship with grain micronutrient content. *Euphytica*, **154**: 289-294.
- Swamy, B.P.M., Kaladhar, K., Anuradha, K., Batchu, A.K., Longvah, T., Viraktamath, B.C. and Sarla, N.** (2011). Enhancing iron and zinc concentration in rice grains using wild species. *ADNAT Convention and International Symposium on Genomics and Biodiversity*, CCMB, Hyderabad. IN.
- Yasmin, F., Islam, M.R., S. Rehana, Mazumder, R.R., Anisuzzaman, M., Khatun, H., Rayhan, R. and Gregorio, G.B.** (2012). Molecular characterization of inbred and hybrid rice genotypes of Bangladesh. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, **44(1)**: 163-175.
- Zeng, Y., Zhang, H., Wang, L., Pu, X., Du, J., Yang, S. and Liu, J.** (2010). Genotypic variation in element concentrations in brown rice from Yunnan landraces in China. *Environmental Geochemistry and Health*, **32**: 165-177.

Grouping of Rice Genotypes Based on Grain Iron, Zinc, Manganese and Protein and Performance Measurement of Linked Microsatellite Markers

Elham Nasiri¹, Atefeh Sabouri^{*2}, Akbar Forghani³ and Masoud Esfahani⁴

- 1- M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
- 4- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: November 27, 2017 – Accepted: August 5, 2018)

Abstract

In order to select the best parents for crossings, plant breeders seek varieties or genotypes with highest genetic dissimilarities. This can be achieved by measuring the similarities among genotypes, using multivariate analysis methods such as cluster analysis. This study aimed to group 50 aerobic and lowland rice genotypes based on biochemical characteristics including Iron, Zinc, Manganese and protein, and their linked DNA markers. According to the cluster analysis results using Ward method, the genotypes were assigned to four groups. The third group, as the smallest group including three genotypes (IR82635-B-B-82-2, Caiapo, and Gohar), had the highest value for these micronutrients. Their mean value for Iron, Zinc, Manganese, and protein were 32.39, 34.15, 25.66 mg/kg and 6.71%, respectively. Also, all genotypes were classified into two main groups based on microsatellite markers information, that according to QTL mapping studies these markers were identified as linked to elements. So, the most of non-local genotypes and aerobic rice cultivars were assigned in a separate group. The correlation between Euclidean distance of elements and protein matrix and genetic similarity matrix (Nie) using Mantel correlation test was estimated significant ($p < 0.01$) that can be evidence of a genetic relationship between the SSR markers and genome controlling regions of elements in this population.

Keywords: Rice, Cluster analysis, Aerobic, Biochemical elements, Lowland

* Corresponding Author, E-mail: a.sabouri@guilan.ac.ir