# بررسی خصوصیات مولکولی جمعیت نوترکیب اینبرد برنج با استفاده از نشانگر رتروترانسپوزونی *iPBS*

سمیه بختیاری[۱]، داریوش نباتی احمدی[۲]*، کریم سرخه[۳] و مریم حسینی چالشتری[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح و نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲-***نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه زارعت و اصلاح و نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (ndaryoosh23@yahoo.com)

۳- استادیار، گروه زارعت و اصلاح و نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- استادیار پژوهشی، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۴

## چکیده

**در مطالعات ژنتیکی علاوه بر نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA می‌توان از رتروترانسپوزون یا ژن‌های پرشی به‌عنوان نشانگر جهت ارزیابی ویژگی‌ها و خصوصیات تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی استفاده نمود. از آنجایی که رتروترانسپوزون‌ها قابلیت جابجایی در طول ژنوم را دارا هستند از این رو باعث ایجاد تغییر در ترکیب ژنوم می‌گردند. بدین ترتیب باعث افزایش بیان بعضی از ژن‌ها و یا خاموش شدن ژن‌های دیگر می‌گردند. از طرفی رتروترانسپوزون‌ها فعالیت رونوشت‌برداری ژن‌ها را در بافت‌ها و همچنین تنش‌های زیستی و غیرزیستی تحت تأثیر قرار می‌دهند. در این پژوهش جهت بررسی خصوصیات مولکولی و تمایز ۱۳۰ لاین اینبرد برنج که حاصل تلاقی برنج ندا و هاشمی می‌باشند از نشاگر مولکولی رتروترانسپوزونی *iPBS* استفاده شد. ۲۱ آغازگر استفاده شده ۲۹۹۰ باند را تولید کردند که ۱٤٤۹ باند چندشکل بودند. با توجه به تجزیه بسط چندشکلی آغازگرها، آغازگر R2020 در مجموع ٤٤۳ باند چندشکل را نشان داد که با۵٦/۷۹ درصد بیشترین چندشکلی را در بین آغازگرها از خود نشان داد. هیچ آغازگری با باند تک شکل مشاهده نشد. لاین‌های ۱٤۹، ۱۵۱، ۱۵٤، ۱٤٦ و ۱٤۸ همراه با والدین در یک کلاستر قرار گرفته و لاین‌های ٦۷، ٦۳ و ۸۲ در کلاستر دوم با نزدیک ترین فاصله به کلاستر والدین قرار گرفتند که در مجموع این لاین‌ها از نظر حضور ژن‌های رتروترانسپوزونی دارای بیشترین شباهت ژنتیکی با والدین خود می‌باشند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که می‌توان از نشانگرمولکولی iPBS در ارزیابی خصوصیات مولکولی لاین‌های ژنتیکی در یک جمعیت اصلاحی و برنامه‌های به‌نژادی به منظور ترسیم نقشه‌های ژنتیکی استفاده نمود.**

***کلید واژه‌ها: برنج ندا، برنج هاشمی، رتروترانسپوزون‌ها، نشانگر iPBS***

## مقدمه

مطالعات نشان داده است که ژنوم یک موجود از آغاز زندگی تا پایان آن باثبات نیست. علاوه بر جهش‌های تصادفی و اضافه‌شدن ژن‌های ویروسی که در طی زندگی موجود ممکن است رخ دهد، تغییر در ترتیب (بازآرایی) مواد ژنتیکی نیز امکان‌پذیر می‌باشد. این عناصر قابل انتقال (ترانسپوزون‌ها) می‌توانند نسخه‌های جدیدی از خود را در سراسر ژنوم پراکنده سازند. به‌علاوه، این عناصر می‌توانند سبب تغییر در ترتیب مواد ژنتیکی شده و موجب ایجاد جهش گردند. ترانسپوزون‌ها با اسامی ژن‌های پرشی و عناصر ژنتیکی متحرک نیز خوانده می‌شوند (Yazedi Samadi and syed Tabatabaei, 2009). اولین گزارش درباره عناصر ژنتیکی متحرک به اواخر دهه ۱۹۴۰ باز می‌گردد که باربارا مک کلینتوک عامل

تغییر رنگ دانه‌های ذرت (که تصور می‌شد جهش‌های بی‌ثبات می‌باشند) را به این عناصر نسبت داد. وجود یا عدم وجود یک ترانسپوزون در یک مکان ژنی می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر مولکولی برای انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌ها، بررسی تنوع ژنتیکی، تعیین روابط تکاملی و همچنین در تهیه نقشه‌های پیوستگی استفاده شود (Naghvi *et al.*, 2013). رتروترانسپوزون‌ها فراوان‌ترین و گسترده‌ترین عناصر جابه‌جا شونده در ژنوم یوکاریوت‌ها می‌باشند که دارای یک ناحیه حفاظت شده داخلی هستند که فرآورده‌های لازم برای انتقال آن‌ها را فراهم می‌سازد. ناحیه داخلی به وسیله توالی‌های تکراری یعنی *LTR*ها احاطه می‌شوند. بر اساس وجود یا عدم وجود *LTR*، رتروترانسپوزون‌ها به دو گروه مشخص تقسیم می‌شوند: آن‌هایی که دارای *LTR* بوده و گروهی که فاقد *LTR* می‌باشد. گروه دوم شامل *LINE*ها و *SINE*ها می‌باشد (Wicker *et al.*, 2007). رتروترانسپوزون‌ها دارای توالی تکراری انتهایی (*LTR*)، ناحیه با پورین زیاد (PPT)، جایگاه اتصال آغازگر (PBS)، رونوشت معکوس (RT)، اسپارتیک پروتئیناز (AP)، ریبونوکلئاز H (RH) می‌باشند، و تفاوت آن‌ها تنها در موقعیت مکانی برخی از این عوامل می‌باشد (Grandbastien, 1998).

تنوع ژنتیکی اساس و پایه اصلاح نباتات است که از تنوع طبیعی ناشی شده و اجزای مهم پایداری نظام‌های بیولوژیکی می‌باشد. ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی برای برنامه‌های اصلاح نباتات و حفاظت از ذخایر توارثی کاربرد حیاتی دارد. آگاهی از تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی برای انتخاب نژادهای والدینی در جهت به‌دست آوردن هیبریدهای مناسب و پیش‌بینی بنیه هیبرید به‌ویژه در محصولاتی که هیبرید آن‌ها ارزش تجاری دارند، مهم است (Nandakumar *et al.*, 2004؛ Iranjo, 2014). اصلاح‌نژاد بر پایه استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از بهترین دستاوردهای علمی در قرن اخیر به شمار می‌رود. جهت بررسی تنوع ژنتیکی می‌توان از انواع نشانگرها استفاده کرد. نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی به خاطر میزان چندشکلی قابل دسترس در مقایسه با نشانگرهای DNA، کمتر در امر طبقه‌بندی به کار گرفته می‌شوند. نشانگرهای DNA، دارای قدرت تمیز بیشتری نسبت به نشانگرهای مورفولوژیک و پروتئینی است (Smith, 1992). نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها شامل چندشکلی در تکثیر توالی خاص (*SSAP*)، چند شکلی در تکثیر بین رتروترانسپوزون‌ها (*IRAP*[1])، چندشکلی در تکثیر بین ریزه‌ماهواره و رتروترانسپوزون (*REMAP*[2])، چندشکلی مبتنی بر الحاق ترانسپوزون (RBIP[3])، چندشکلی بین عناصر ترانسپوزونی با توالی معکوس کوتاه (*IMP*[4]) و نشانگر مولکولی *iPBS* می‌باشند. *iPBS* توسط Kalendar *et al.* (2010) توسعه یافته و به‌عنوان روشی برای شناسایی تنوع توالی‌های *LTR* و مشاهده مستقیم پلی‌مورفیسم میان ارقام استفاده می‌شود. این روش روی محل PBS فوکوس می‌کند که مجاور *LTR*۵´ قرار دارد و در میان خانواده‌های رتروترانسپوزونی مختلف حفاظت شده است. بنابراین *iPBS* روشی است که برای غربالگری تنوع توالی‌های *LTR* و انگشت‌نگاری ژنتیکی پیشرفت‌های متعددی کرده است. روش تکثیر *iPBS* براساس حضور یک مکمل tRNA به‌عنوان نسخه‌بردار معکوس یک PBS رتروترانسپوزون *LTR* داراست (Kalendar *et al.*, 2010). محصول PCR شامل دو *LTR* و توالی PBS به‌عنوان آغازگر PCR است. در گذشته محدودیت اصلی به کار بردن این نشانگرها به خاطر در دسترس نبودن توالی *LTR* رتروترانسپوزون‌ها مختلف بود. ولی در سال‌های اخیر با کمک تکنیک‌های جدید و سریع، توالی بسیاری از *LTR*ها مشخص و این محدودیت نیز رفع شده است (Pearce *et al.*, 1999). با توجه به این‌که برنج یک محصول زراعی بسیار ارزشمند و پرمصرف در ایران است و از طرفی انواع مختلفی از برنج

1- Inter- Retrotransposon Amplified Polymorphism
2- Retrotransposon- Microsatellite Amplification Polymorphis
3- Retrotransposon Based Insertion Polymorphism
4- Inter-MITE Polymorphism

با ویژگی‌های کیفی و کمی متفاوت وجود دارد و ذائقه مردم در مصرف برنج با هم متفاوت است نیازمند کارهای اصلاحی متعدد برای هماهنگ شدن با ذائقه مصرف‌کننده است. با پیشرفت و بهبود سطح استاندارد زندگی مردم و شدیدتر شدن رقابت‌ها در سطح تجارب بین‌الملل، میزان تقاضا برای برنج با کیفیت خوب افزایش‌یافته و آن را به‌عنوان یک هدف اصلاحی مهم مورد توجه اصلاح‌گران قرار داده است (HossiniChaleshtry and Sorkheh, 2014). برنج هاشمی یکی از بهترین و مرغوب‌ترین ارقام کیفی برنج محسوب می‌شود. که مبدأ آن در گیلان می‌باشد رقم برنج ندا دارای عملکردی بالغ بر ۸ تن در هکتار، نسبتاً میان رس، متحمل به آفت کرم ساقه‌خوار و نسبت به مهم‌ترین بیماری رایج (بلاست برنج) کاملاً مقاوم است. هدف از این مطالعه شناسایی خصوصیات رتروترانسپوزنی مولکولی جمیت نوترکیب اینبرد برنج و غربال نمودن ۱۳۰ فرد از جمعیت برنج حاصل از تلاقی برنج ندا و برنج هاشمی با استفاده از نشانگر مولکولی مبتنی بر ژن‌های رتروترانسپوزونی *iPBS* و گروه‌بندی افراد جمعیت بوده است.

## مواد و روش‌ها

بذرهای جمعیت برنج مورد استفاده در این مطالعه از تلاقی ارقام برنج ندا و هاشمی (نسل $F_9$) تهیه شد و این مطالعه به منظور شناسایی خصوصیات رتروترانسپوزونی مولکولی جمعیت نوترکیب حاصل از تلاقی مذکور با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر اتصال ژن‌های رتروترانسپوزونی در فاصله زمانی آبان ماه ۱۳۹۳ تا آبان ماه ۱۳۹۴ در دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. کاشت برنج در گلدان‌هایی با مساحت ۳۴۵/۲ سانتی‌متر مربع با روش خشکه‌کاری انجام شد. کود مورد نیاز نیز قبل از کاشت به میزان ۹۰:۱۵۰:۲۵۰ کیلوگرم در هکتار از کودهای پتاس، فسفات آمونیوم و اوره استفاده شد. وقتی که گیاهچه به ۳-۴ برگ رسید قسمت هوایی جدا شد و در فویل آلومینیومی پیچیده و تا زمان استخراج DNA و انجام آزمایش‌های مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### ارزیابی خصوصیات فنوتیپی جمعیت نوترکیب اینبرد لاین

برای این منظور صفات فنوتیپی و ژنوتیپی جمعیت مورد مطالعه در طی دو سال متوالی مورد بررسی قرار گرفت. واریانس فنوتیپی، ژنوتیپی و وراثت‌پذیری برخی از صفات مورد مطالعه سنجش گردید.

### استخراج DNA

استخراج DNA از برگ‌های جوان و با استفاده از کیت‌های Gen Mark (DP022/DP022-150) و کیت Bio Flux (BSC13S1) طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت.

### دستورالعمل واکنش زنجیره‌ای *iPBS*

انجام PCR، بر اساس دستورالعمل ارایه شده همراه با تغییرات جزیی انجام شد (Kalender *et al.* 2010). مواد مورد استفاده از شرکت ندای فن تهیه گردیدند. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x)، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰۰ میلی‌مولار)، آغازگر ۱/۵ میکرولیتر (۲ میکرومولار)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase (۵ U/µ) و آب دوبار تقطیر استریل بود. الکتروفورز و رنگ‌آمیزی فراورده های PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت (Kalendar and Schulman, 2006).

### طراحی آغازگرها

بیشتر آغازگرها براساس نواحی مختلف و محفوظ توالی‌های LTR و شمار بسیار کمی براساس نواحی محفوظ داخلی رتروترانسپوزون‌ها طراحی شدند. رتروترانسپوزون‌های مورد استفاده عمدتاً از برنج و سایر گیاهان به لحاظ تکاملی نزدیک به برنج مانند جو، یولاف، گندم، ذرت و براکیپودیوم (گیاهی از خانواده گراس‌ها می‌باشد که اندازه ژنوم آن کوچک، در حد فاصل برنج و آرابیدوپسیس است) بودند. برای طراحی آغازگرها ابتدا باید محل مربوط به LTRها و PBSهارا با استفاده از نرم‌افزار LTR Finder شناسایی و سپس توسط نرم‌افزار

Primer 3.0 و Fast PCR 4.1 آغازگرها طراحی گردیدند. ۲۱ آغازگر در این مطالعه طراحی و توسط شرکت سیناکلون (کرج، ایران) سنتز گردیدند. آغازگرها طبق فرمول مربوط به هریک رقیق ودردمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جدول (۱) لیست آغازگرها و توالی آن‌ها را نشان داده شده است. آغازگرها توسط نرم‌افزار Primer 3 طراحی گردیدند. سپس توسط نرم‌افزار Fast PCR کیفیت آغازگرهای طراحی شده از نظر TM، TA و CG درصد و جایگاه قرارگیری مورد سنجش قرار گرفتند. آغازگرهای انتخاب شده توسط Primer blast در NCBI کیفیت‌سنجی و اختصاص‌سنجی گردیدند. گزینه‌های مدنظر تغییریافته نرم‌افزار شامل ۶۰-۴۰=%CG، طول محصول PCR: ۵۰۰۰-۱۰۰، حداکثر اختلاف دمای ذوب درجه سانتی گراد ۱ و طول آغازگر نیز ۲۲-۱۲ نوکلئوتید در نظر گرفته شد.

### آنالیز داده‌ها

الگوی باندیحاصل از تجزیه *iPBS*ها براساس وجود یا عدم وجود باند خاص در نمونه‌ها، به‌صورت، یک و صفر امتیازدهی شد و بعد در نرم‌افزار اکسل یک ماتریس از اعداد صفر و یک برای آغازگرهای مورد استفاده تهیه شد. داده‌ها به کمک نرم‌افزار NTSYS-PC نسخه ۲/۰۲ براساس ضریب تشابه جاکارد برای ایجاد ضرایب شباهت ژنتیکی میان همه لاین‌های مورد مطالعه، تجزیه و تحلیل شده و در یک ماتریس تشابه مرتب شدند. مقدار عددی ضرایب تشابه بین صفر و یک است که مقدار صفر بیانگر عدم وجود باندهای مشترک (عدم شباهت ژنتیکی) و مقدار یک بیانگر الگوهای باندی یکسان (تشابه ژنتیکی کامل) است. برای گروه‌بندی ارقام از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد صورت گرفته و در نهایت دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شد. داده‌های مربوط به صفات مورفولوژیکی توسط نرم‌افزار SAS آنالیز گردیدند.

## نتایج و بحث

نتایج مورفولوژیکی مربوط به ارزیابی جمعیت نوترکیب اینبرد لاین برنج برای برخی از صفات مورد مطالعه در جدول (۲) آورده شده است. در میان صفات مورد مطالعه ارتفاع بوته و عرض دانه به‌ترتیب بیشترین و کمترین میانگین را نشان دادند. کمترین واریانس فنوتیپی مربوط به طول برگ (۰/۰۶۴۸) و بیشترین مقدار تعداد دانه پر (۲/۲۵۶۳) می باشد. در میان صفات اولیه مورد ارزیابی ارتفاع بوته، طول برگ، وزن ۱۰۰ دانه وراثت پذیری بالایی را نسبت به سایر صفات مورد مطالعه از خود نشان دادند (جدول ۲).

بر اساس آنالیزهای انجام شده از میان ۲۱ آغازگر طراحی شده برای ناحیه حفاظت شده PBS ۴ آغازگر به استثنای آغازگر R6024، چندشکلی قابل قبولی را ایجاد کردند. آغازگر R2020 در مجموع ۴۴۳ باند چندشکل را نشان داد که با ۵۶/۷۹ درصد چندشکلی بیشترین چندشکلی را در بین آغازگرها نشان داد. کمترین میزان چندشکلی را آغازگر R5023 با ۴۰ درصد چندشکلی قابل قبول نشان داد. در مجموع این ۴ آغازگر ۲۹۹۰ باند را تولید کردند که ۱۴۴۹ باند چندشکل بودند. هیچ آغازگری با باند تک‌شکل مشاهده نشد (جدول ۳).

**جدول ۱- لیست آغازگرهای طراحی شده**

**Table 1. List of designed primers**

| آغازگر<br>Primer | توالی<br>Sequence | تعداد نوکلئوتید<br>Number of nucleotides |
|---|---|---|
| R2020 | TTGCCGATGCAC | 12 |
| R3021 | TGGAGTTCCCTTTCA | 15 |
| R4022 | GCCCAACTTCCTGAACGTAGC | 21 |
| R5023 | TACCAAAAAGGGGGAGATTG | 20 |
| R6024 | TACGGGAAGGGGTGACGTTCC | 21 |

**جدول ۲- صفت، میانگین، واریانس فنوتیپی، واریانس ژنوتیپی و وراثت‌پذیری برخی از صفات مورد مطالعه در جمعیت نوترکیب اینبرد لاین برنج**

**Table 2. Trait, mean, phenotypic variance, genotypic variance and heritability of some traits studied in recombinant inbred line population of rice**

| وراثت‌پذیری (درصد) Heritability (%) | واریانس ژنوتیپی Genotypic variance | واریانس فنوتیپی Phenotypic variance | میانگین± انحراف استاندارد Mean ± standard error | صفت Trait |
|---|---|---|---|---|
| 29.49 | 0.0277 | 0.0939 | 300.03±3.87 | ارتفاع بوته (میلی‌متر) Plant height (mm) |
| 24.49 | 0.01587 | 0.0648 | 29.08±2.35 | طول برگ پرچم (میلی‌متر) Length of flag leaf (mm) |
| 6.65 | 0.01916 | 0.2878 | 12.48±1.44 | عرض برگ پرچم (میلی‌متر) Width of flag leaf (mm) |
| 10.46 | 0.02345 | 0.2241 | 18.25±2.35 | تعداد پنجه Number of tillers |
| 13.95 | 0.0556 | 0.3984 | 48.65±3.47 | عملکرد (گرم) Yield (gr) |
| 25.26 | 0.5878 | 2.3265 | 40.65±4.24 | وزن ۱۰۰ دانه (گرم) Weight of 100 seeds (gr) |
| 6.91 | 0.08878 | 1.2847 | 18.35±1.18 | تعداد دانه پوک Number of empty seeds |
| 9.84 | 0.2222 | 2.2563 | 19.66±3.12 | تعداد دانه پر Number of filled seeds |
| 7.87 | 0.09875 | 1.2536 | 45.35±4.22 | تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی Number of day to 50% blooming date |
| 6.26 | 0.07845 | 1.2523 | 47.65±3.27 | طول دوره رشد (روز) Length of growth period (day) |
| 2.75 | 0.03545 | 1.2889 | 45.37±1.15 | دمای ژلاتینی شدن (درجه) Gelatinization temperature (ºC) |
| 3.97 | 0.06489 | 1.6329 | 39.45±2.32 | قوام ژل Gel consistency |
| 3.37 | 0.04578 | 1.3548 | 68.77±3.20 | مقدار آمیلوز (درصد) Amylase content (%) |
| 3.83 | 0.03587 | 0.09345 | 5.11±3.54 | طول دانه (میلی‌متر) Grain length (mm) |
| 29.49 | 0.0277 | 0.0939 | 300.03±3.87 | ارتفاع بوته (میلی‌متر) Plant height (mm) |

**جدول ۳- بررسی اطلاعات چندشکلی طبق آغازگرها**

**Table 3. Analysis of polymorphism information according to primers**

| شاخص نشانگر Marker index | محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphic information content | تعداد کل باندها Total of bands | تعداد باندهای تک شکل Number of monomorphic bands | تعداد باندهای چندشکل Number of polymorphism bands | درصد چندشکلی Polymorphism (%) | پرایمر primer |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 49.277 | 0.6742 | 443 | - | 443 | 56.79 | R2020 |
| 46.202 | 0.7327 | 262 | - | 262 | 50.38 | R3021 |
| 42.599 | 0.7494 | 432 | - | 432 | 47.47 | R4022 |
| 39.904 | 0.8075 | 312 | - | 312 | 40 | R5023 |

**آنالیز کلاستر و تجزیه به مؤلفه‌ها**

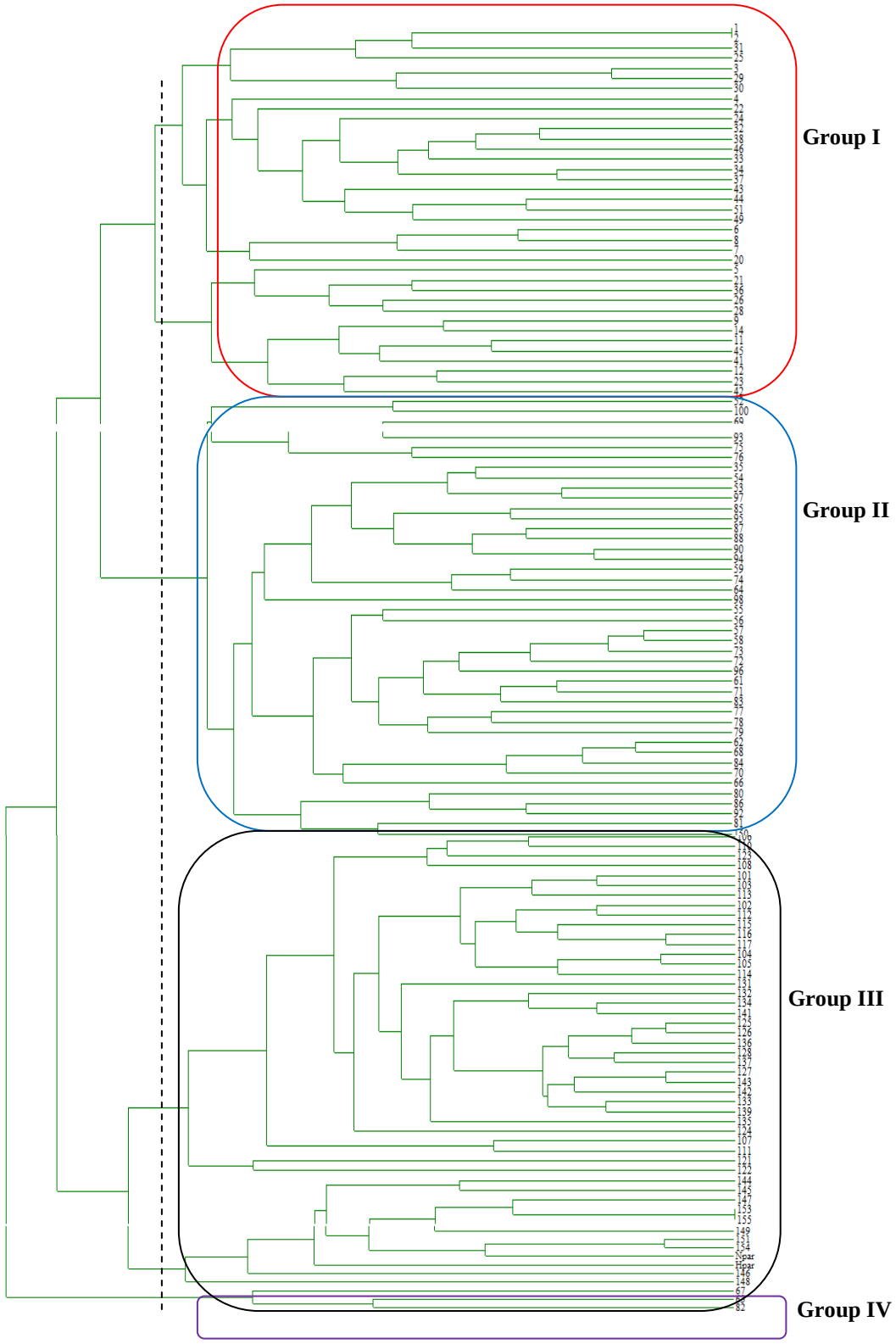
دندوگرام با استفاده از آنالیز UPGMA بر اساس ماتریس ضرایب تشابه برای ۱۳۰ لاین از جمعیت اینبرد برنج حاصل از تلاقی ندا و هاشمی رسم و بررسی شد و نتایج نشان داد که جمعیت مورد مطالعه در ۲ کلاستر بزرگ قرار می‌گیرند. عمده لاین‌ها در کلاستر اول که خود نیز به ۳ گروه بزرگ تقسیم شده است قرار گرفته‌اند. والدهای ندا و هاشمی در گروه سوم این کلاستر قرار گرفته‌اند و لاین‌های ۱۴۹، ۱۵۱، ۱۵۴، ۱۴۶و ۱۴۸ همراه با والدین در یک کلاستر قرار گرفته و لاین‌های ۶۷، ۶۳ و ۸۲ در کلاستر دوم (گروه چهارم) با نزدیک‌ترین فاصله به کلاستر والدین قرار دارد که مجموعاً این لاین‌ها از نظر حضور ژن‌های رتروترانسپوزونی دارای بیشترین شباهت ژنتیکی با والدین خود می‌باشند که می‌توان با بررسی تنوع مورفولوژیکی بهترین لاین‌هایی را که هم از نظر ژنتیکی و هم از نظر مورفولوژیکی دارای ویژگی‌های مطلوب هر دو والد باشند را انتخاب و برای ایجاد واریته مطلوب جدید در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند (شکل ۱).

نتایج به‌دست آمده از تجزیه به مؤلفه‌ها نشان داد که ۳ مؤلفه اول در مجموع ۵۱/۲۳ درصد از کل تغییرات را به خود اختصاص می‌دهد. مؤلفه اول، دوم و سوم به‌ترتیب ۳۷/۴۱، ۹/۱۰ و ۴/۷۱ درصد از تغییرات را توجیه می‌کنند. در کل ۱۹ مؤلفه اول ۷۰/۳۰ درصد از کل تغییرات را به خود اختصاص داده است (جدول ۴).

نشانگرهای میکروستلایت‌ها برای انگشت‌نگاری هیبریدها و بررسی تنوع لاین‌های والدینی و تست خلوص ژنتیکی دانه‌های هیبریدی برنج توسط (Nandakumar *et al.*, 2004) استفاده شد. ۱۰ توالی نشانگر *STMS* برای انگشت نگاری ژنتیکی ۱۱ هیبرید برنج و لاین‌های والدینی آن‌ها استفاده شد. ۹ نشانگر *SIM* پلی‌مورفیک بودند و برای ۱۱ هیبرید انگشت‌نگاری تکی انجام شد. برای ۴ پرایمر هیبریدها از هم متمایز شدند که نشان می‌دهد که این مارکرها می‌تواند برای شناسایی و پیش‌بینی این هیبریدها استفاده شود. آنالیز UPGMA این هیبریدها را در سه گروه قرار داد. تنوع ژنتیکی میان هیبریدها از ۰/۳۳ تا ۰/۹۲ با میانگین ۰/۶۳ بود. این نتایج مارکر *STMS* در بررسی خلوص ژنتیکی والدین هم مؤثر بوده است.

Qian *et al.* (2001) تنوع ژنتیکی ۵ جمعیت *oryza granulata* از دو منطقه در چین را با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR بررسی نمودند. ۲۰ آغازگر RAPD در این مطالعه ۱۹۹ باند با ۳۰/۶۵ درصد پلی‌مورفیک و ۱۲ پرایمر ISSR پنج باند با ۴۶/۰۲ پلی‌مورفیک تولید کردند. در هر دو مارکر پایین‌ترین سطح تنوع ژنتیکی مربوط به جمعیت وحشی *O. Granulata* بود. نتایج اگرچه نشان‌دهنده درصد پلی‌مورفیک بیشتر ISSR نسبت به RAPD بود ولی ISSR نیز می‌تواند در تعیین پلی‌مورفیک برنج نسبت به RAPD عمل کند.

Branco *et al.* (2007) در مطالعه‌ای برای شناسایی میزان مشابهت ژنتیکی میان ۵۱ رقم برنج با استفاده از مارکرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP از *Tos17* که یک رتروترنسپوزون از خانواده *Copia* به‌عنوان مارکر استفاده کردند. تجزیه و تحلیل IRAP سطح بالایی از چندشکلی را تولید کرد. ۹۶ درصد باندها جهت پلی‌مورفویک ظاهر شد و ۹۷ درصد کل باندهای تولید شده از پرایمرها و مارکر *REMAP* چندشکل بودند.که نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که می‌توان از این دو مارکر به‌عنوان مارکرهای قابل اعتمادی مانند AFLP استفاده کرد و امّا آن‌ها همچنین اطلاعات اضافی را به‌دست می‌دهند و نشان می‌دهند که پتانسیل خوبی برای استفاده در بررسی ژنومی و مطالعات انگشت‌نگاری و نقشه‌برداری دارند.




**شکل ۱- گروه‌بندی جمعیت نوترکیب حاصل از تلاقی ارقام برنج ندا وهاشمی براساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از روش UPGMA**

**Figure 1. The classification of recombinant population derived from the cross of Nada and Hashemi rice cultivars according to Jaccard coefficient and uses UPGMA method**

**جدول٤- محاسبه مقادیر برای ۱۹مؤلفهٔ اصلی ابتدائی**
**Table 4. Calculating values of 19 initial of major component**

| مؤلفه Eigen | مقادیر ویژه Eigen values | درصد مقادیر Variation (%) | درصد تجمعی Cumulative variation (%) |
|---|---|---|---|
| 1 | 48.64 | 37.41 | 37.41 |
| 2 | 11.84 | 9.11 | 46.52 |
| 3 | 6.13 | 4.71 | 51.23 |
| 4 | 3.96 | 3.04 | 54.28 |
| 5 | 2.26 | 1.82 | 56.10 |
| 6 | 2.30 | 1.77 | 57.87 |
| 7 | 1.87 | 1.44 | 59.23 |
| 8 | 1.70 | 1.33 | 60.63 |
| 9 | 1.59 | 1.23 | 61.86 |
| 10 | 1.42 | 1.09 | 62.95 |
| 11 | 1.30 | 1.00 | 63.96 |
| 12 | 1.18 | 0.91 | 64.87 |
| 13 | 1.16 | 0.89 | 65.76 |
| 14 | 1.10 | 0.85 | 66.62 |
| 15 | 1.09 | 0.84 | 67.46 |
| 16 | 1.04 | 0.80 | 68.27 |
| 17 | 0.90 | 0.69 | 68.96 |
| 18 | 0.87 | 0.67 | 69.63 |
| 19 | 0.86 | 0.66 | 70.30 |

BaBaJanpur *et al.* (2011) به منظور بررسی تنوع و روابط ژنتیکی بین ۳۰ ژنوتیپ مهم برنج با استفاده از صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی RAPD انجام داده در این مطالعه صفات زراعی نظیر ارتفاع بوته، تعداد پنجه در بوته، طول خوشه، طول شلتوک، عرض شلتوک بودند از ۲۴ آغازگر تصادفی RAPD استفاده شده، ۱۲ آغازگر تصادفی چندشکلی مطلوبی نشان دادند. ۳۰ ژنوتیپ برنج از ارقام مورد کشت و کار در استان گیلان با به کارگیری نشانگر SSAP تعداد ۳ آغازگر رتروترانسپوزونی و ۷ آغازگر AFLP به منظور تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند (Bahadori and Alami, 2012).

Guo *et al.* (2014) مطالعه‌ای به منظور بررسی تنوع ۳۵ واریته انگور با استفاده از نشانگر *iPBS* انجام دادند. که از ۱۵ پرایمر *iPBS* استفاده شد. مطالعات نشان داد که از مجموع ۹۹ باند DNA به‌دست آمده ۸۶/۳ درصد چندشکلی نشان دادند و همچنین بیان کردند که نسبت به دیگر نشانگرهای ترانسپوزونی، *iPBS* در انگور مؤثرتر است. این مطالعه بیان‌گر آن بود که *iPBS* روشی ساده، مؤثر و مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی است.

Yıldız *et al.* (2015) تنوع ژنتیکی ۶۶ توده بامیه را با استفاده از نشانگر رتروترانسپوزونی *iPBS* آنالیز کردند. *iPBS* رتروترانسپوزون‌ها ۸۸ باندبا ۴۰/۲ درصد چندشکلی نشان دادند. متوسط اطلاعات چندشکلی برای رتروترانسپوزون‌ها بین ۰/۱۲ و ۰/۹۹، درحالی‌که برای SSR ۰/۵۲ تا ۰/۸۱ بود. آنالیز براساس SSR در گروه‌بندی موفق‌تر بود. با این حال این مطالعه نقش مؤثر استفاده از *iPBS* رتروترانسپوزون‌ها را به‌عنوان یک بخش غالب و فراگیر از ژنوم یوکاریوت‌ها هستند را نشان داد.

## نتیجه‌گیری

نشانگر *iPBS* نشانگری اختصاصی برای بررسی رتروترانسپوزون‌ها می‌باشد چون توالی‌های بین LTRها

برای گیاهان مختلف محافظت شده است می‌توان بر اساس آن‌ها تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها را به‌دست آورد. روش iPBS روشی قدرتمند برای انگشت نگاری ژنتیکی و بررسی تنوع ژنیکی جمعیت گیاهان می‌باشد. باتوجه به این مطالعه پیشنهاد می شود از این نشانگرها برای مطالعه تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها و صفات در برنج و دیگرمحصولات زراعی استفاده شود.

## References


BaBaJanpur, A. A., Nematzadeh, Gh. A., Magedi, A., Ebrahimi A., Hajipur, A., Hashmi, S. H.R. and Alevi, S. M. (2011). Evaluation of genetic variation among some of rice cultivars via agronomic traits and RAPD markers. Bulletin Publication of Field Crops Breeding, 1(3), 38-49. [In Farsi]

Bahadori, A. and Alami, A. (2012). Application of SRAP molecular marker for assessment of Genetic diversity in some rice cultivars. Presented at the Conference 12th Agronomy and Plant Breeding Proceeding, Karaj.

Branco, C. J., Vieira, E. A., Malone, G., Kopp, M. M., Malone, E., Bernardes, A., Mistura, C. C., Carvalho, F. I. and Oliveira, C. A. (2007). IRAP and REMAP assessment of genetic similarity in rice. Journal of Applied Genetcs, 48(2), 107-113.

Grandbastien, M. A. (1998). Activation of plant retrotransposons under stress conditions. Trends in plant science, 3(5), 181-187.

Guo, D. L., Guo, M. X., Hou, X. G. and Zhang, G. H. (2014). Molecular diversity analysis of grape varieties based on iPBS markers. Biochemical Systematics and Ecology, 52, 27-32.

HossiniChaleshtry, M. and Sorkheh, K. (2014). Rice quality, Aspects of qualitative, molecular and genomic. Tehran: Cinatab Publishers. [In Farsi]

Iranjo, P. (2015). *Assessment of relationship of interspecies and genetic variation of wild pastasio population using RAPS markers.* M.Sc. Thesis, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz. [In Farsi]

Kalendar, R. *and* Schulman, A. H. (2006). IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. Nauture Protocols, 1(5), 2478-2484.

Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P. and Schulman, A. H. (2010). *iPBS*: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. Theoretical and Applied Genetics, 121(8), 1419-1430.

Naghvi, M., Gharehyazi, B. and Hossinisalekdeh, Gh. (2013). *Molecular markers*. Tehran: Tehran University Publishers. [In Farsi]

Nandakumar, N., Singh, A. K., Sharma, R. K., Mohapatra, T., Prabhu, K. V. and Zaman, F. U. (2004). Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. Euphytica, 136(3), 257-264.

Pearce, S. R., Stuart-Rogers, C., Knox, M. R., Kumar, A., Ellis, T. H. and Flavell, A. J. (1999). Rapid isolation of plant Ty1-copia group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. The Plant Journal, 19(6), 711-717.

Qian, W., Ge, S. and Hong, D. Y. (2001). Genetic variation within and among populations of a wild rice Oryza granulata from China detected by RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics, 102(2-3), 440-449.

Smith, J. S. C. and Smith, O. S. (1992). Fingerprinting crop varieties. Advances in Agronomy, 47, 140-149.

Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B. and Schulman, A. H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nature Reviews Genetics, 8(12), 973-982.

Yazedi Samadi, B. and Syed Tabatabaei, B. (2009). Foundation of classical and molecular of genetic of science. Tehran: Tehran University Publishers. [In Farsi]

Yıldiz, M., Kocak, M. and Baloch, F. S. (2015). Genetic bottlenecks in Turkish okra germplasm and utility of iPBSretrotransposon markers for genetic diversity assessment. Genetics and Molecular Research, 14(3), 10588-10602.

# Molecular Characterization of Recombinant Inbred Line Population of Rice With Retrotransposon (*Ipbs*) Marker

S. Bakhtiari[1], D. Nabati Ahmadi[2]*, K. Sorkheh[3] and M. Hosseni Chaleshtari[4]

1- M.Sc. Student of Plant Breeding, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (ndaryoosh23@yahoo.com)
3- Assistant Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Assistant Professor of Rice Research Center, Agricultural Research Education, Rasht, Iran

Received: 27 April, 2016 Accepted: 5 July, 2017

## Abstract

### Background and Objectives

In genetic studies in addition to utilization of molecular markers based on genomic DNA, one can also use retrotranspostion or jumping genes as a marker to identify genetic characterization and diversity in the plant species. Since the retrotransposesons have transferable motive they tend to move along the genome. The movement is a key figure to induce alteration at the genomic structure. Thus, this reinforces the genome to boost the expression of some genes and/or silence the other genes. Furthermore, retrotranspostions are able to affect the activity of genes transcription at the organelles and biotic and abiotic stresses.

### Materials and Methods

In the present study, retrotranspostion *iPBS* marker was used to assess genetic characterization of 130 inbred lines of rice which were derived from hybridization of Neda and Hashmi rice cultivars. In this study, 4 primers were used which were able to produce 2990 bands and among them1449 were polymorphic.

### Results

According to amplification of polymorphic primers analysis, R2020 primer showed totally 443 polymorphic bands and had 56.79% bands with the highest polymorphism among all the primers. None of primers showed any single polymorphic band.

### Discussion

Cluster analysis classified inbred lines of rice into two groups. Parental lines along with 146, 148, 149, 151 and 154 lines were in one group and 67, 68 and 82 lines were fit into another group with close distance to the parental lines. In terms of the presence of retrotransposition genes these lines possess the most genetic similarity to the parental lines. The information which was revealed by the findings of the presented study indicated that iPBA markers can be assigned to trace the genetic mapping in order to assess the molecular genetics of the characteristics of the line within a plant population in the breeding program.

***Keywords: Hashemi rice, iPBS, Neda rice, Retrotransposons***