"مجله علوم زراعي ايران"
جلد ششم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۳

بررسي فراواني آللي و چندشكلي نشانگرهاي آيزوزايم در برنج‌هاي ايراني

Allelic Frequency and Polymorphism of Isozyme Markers in Iranian Rice

محمد ميردريكوند[۱]، قربانعلي نعمت‌زاده[۲]، علي اعلمي[۳]، بهزاد قره ياضي[٤]

چكيده

آيزوزايم‌ها از نشانگرهاي مهم و مفيد براي مطالعه ساختار ژنتيك و بهنژادي برنج مي‌باشند. ميزان چندشكلي، يكي از ويژگي‌هاي مهم هر نشانگر مي‌باشد كه ارزش و اهميت نسبي آن را بيان مي‌نمايد. از سوي ديگر، فراواني‌هاي آللي نشان‌دهنده ساختار ژنتيك جوامع هستند. بنابراين، پژوهش حاضر به منظور بررسي ساختار ژنتيك و تعيين اهميت نسبي مكان‌هاي ژني آيزوزايم در برنج‌هاي ايراني انجام گرفت. در اين مطالعه تعداد ۱۲۰ نمونه از برنج‌هاي موجود در بانك ژن ايران انتخاب شدند. در هر نمونه، عصاره آنزيمي از چهار تا شش گياهچه جوان (پلومول + كلئوپتيل) شش تا هشت روزه تهيه‌گرديد. جداسازي و رنگ‌آميزي آيزوزايم‌ها با اندكي تغييرات در روش گلازمن و همكاران (Glaszman et al., 1988) انجام گرفت. نتايج نشان داد كه فراواني آللي برنج‌هاي ايراني در اكثر مكان‌هاي ژني آيزوزايم با متوسط برنج‌هاي آسيايي (گزارش شده توسط گلازمن) تفاوت معني‌داري دارد. هم‌چنين در هر مكان ژني، يك يا دو آلل داراي فراواني غالب بودند. پنج مكان ژني Amp3 ، Pgi2 ، Est2 ، Amp1 و Amp2 به ترتيب با ۶۰، ۵۵/۳، ۵۴/۸، ۵۱ و ۴۸ درصد داراي تنوع (چندشكلي) بيشتري بودند. در سه مكان Amp4 ، Est5 و Est9 تنوعي مشاهده نشد و بنابراين استفاده از آن‌ها به عنوان نشانگر براي گياه برنج توصيه نمي‌شود. تنوع ژني برنج‌هاي ايران و آسيا در مكان‌هاي ژني Cat1 ، Pgi2 ، Amp2 ، Amp3 ، Amp4 و Est5 تا حد زيادي با هم مطابقت داشت، اما تنوع ژني Pgi1 ، Est9 ، Est1 و Amp1 در برنج‌هاي ايران و آسيا اختلاف فاحش داشت. شاخص تنوع ژنوتيپي در برنج‌هاي ايراني معادل ۳/۴۶ بود كه در مقايسه با برنج‌هاي ساير كشورهاي آسيايي مقدار فراواني مي‌باشد. مجموع نتايج اين پژوهش نشان داد كه برنج‌هاي ايران داراي ساختار ژنتيك خاص هستند و تنوع ژنتيك آن‌ها نيز بسيار زياد است. اين امر مي‌تواند به دليل تكامل مستقل اين گياه زراعي در زيست‌بوم نسبتاً منحصر به فرد ايران باشد كه تفاوت‌هاي قابل ملاحظه‌اي با زيست‌بوم اصلي اين گياه در آسياي جنوب‌شرقي، هند و چين دارد.

واژه‌هاي كليدي: آيزوزايم، برنج ، الكتروفورز ژل نشاسته، نشانگر، چندشكلي (پلي‌مورفيسم)، تنوع آللي

تاريخ دريافت: ۱۳۸۰/۱۲/۵ تاريخ پذيرش: ۱۳۸۳/۶/۲۶

۱ـ پژوهشگر مؤسسه تحقيقات بيوتكنولوژي
۲ـ استاديار – دانشگاه مازندران
۳ـ مربي ـ دانشگاه گيلان
٤ـ پژوهشيار مؤسسه تحقيقات بيوتكنولوژي كشاورزي

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

مقدمه

هر گونه نشانه، علامت و یا صفت بیان‌کننده یک خصوصیت خاص را به شرط وراثتی بودن آن می‌توان نشانگر (Marker) نامید (قره‌یاضی، ۱۳۷۷). انواع مختلفی از نشانگرها در عرصه علوم ژنتیک، رده‌بندی و بهنژادی به کار رفته است. اصول کاربرد همه آن‌ها تفاوت چندانی ندارد، ولی هر کدام دارای مزایا و معایب خاص خود هستند و البته اطلاعات تمام آن‌ها نیز به نوبه خود ارزشمند می‌باشد.

یک نشانگر ژنتیکی حداقل باید دو ویژگی کلی داشته باشد (قره‌یاضی، ۱۳۷۷):

۱ـ در بین افراد جامعه متفاوت باشد و به عبارتی چندشکلی (Polymorphism) کافی داشته باشد. بنابراین یک صفت در صورتی نشانگر محسوب می‌شود که میزان چندشکلی در آن زیاد باشد.

۲ـ منشاء ژنتیکی داشته باشد و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار گیرد.

نشانگرهای مولکولی، ابزارهای مفید در دست به‌نژادگران هستند و روش‌های مبتنی بر آن‌ها به عنوان مکمل روش‌های سنتی (کلاسیک) در کمک و سرعت‌بخشی به برنامه‌های به‌نژادی نقش چشمگیری دارند (قره‌یاضی، ۱۳۷۷). اگر چه اکنون فناوری دی-ان-آ (DNA Technology)درسطح وسیعی گسترش یافته است و دقیق‌ترین ابزار برای بررسی ساختار ژنتیک موجودات به شمار می‌آید، ولی پروتئین‌ها به عنوان فرآورده‌های مستقیم حاصل از ترجمه و تغییرات پس از ترجمه ژن‌ها (Post-translational) و به عنوان اجزای ساختمانی و آنزیمی سلول، هنوز از اهمیتی خاص برخوردار هستند (Kephart, 1990). از بین نشانگرهای بیوشیمیایی (مبتنی بر پروتئین)، مطالعه آیزوزایم‌ها (Isozymes or Isoenzymes) به خاطر مزایای متعدد و از جمله همبارز بودن (Co-dominant)، سادگی، کارایی نسبی، سرعت زیاد و هزینه مناسب به طور فراوان مورد استفاده قرار می‌گیرند (نعمت‌زاده و کربلایی، ۱۳۷۵؛ Tanksley & Orton, 1983; Kephart, 1990; Brar, 1991; May, 1992; Murphy et al., 1996). استفاده از این نشانگرها در طول دهه ۱۹۷۰ میلادی متداول شد و امروزه بعد از نشانگرهای دی-ان-آ در درجه دوم اهمیت قرار دارند. آیزوزایم‌ها یا آیزوآنزیم‌ها از نشانگرهای مهم و مفید برای مطالعه ساختار ژنتیک و به‌نژادی برنج می‌باشند. به طور کلی، آیزوزایم‌ها انواع مختلف مولکولی یک آنزیم هستند که فعالیت بیوشیمیایی مشابهی دارند ولی توسط مکان‌های ژنی مختلف رمزگذاری می‌شوند. هم‌چنین تغییراتی در اسیدهای آمینه آن‌ها وجود دارد که از نظر وزن مولکولی، بار الکتریکی و ساختمان فضایی با هم تفاوت دارند و در میدان الکتریکی دارای سرعت حرکت مختلفی هستند. آلوزایم‌ها نیز زیرگروهی از آیزوزایم‌ها هستند که توسط آلل‌های مختلف یک ژن رمزگذاری می‌شوند (حق‌نظری، ۱۳۷۳؛ نعمت‌زاده و کربلایی، ۱۳۷۵؛ Kephart, 1990; Brar, 1991; May, 1992; Murphy et al., 1996). پژوهش‌های گسترده‌ای توسط آیزوزایم‌ها برای شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایرتوارثی، تهیه نقشه‌ژنی، تعیین جریان ژنی، دورگ‌گیری و تشخیص گونه‌ها، بررسی روند طبیعی گونه‌زایی و تعیین روابط خویشاوندی انجام شده است (حق‌نظری، ۱۳۷۳؛ اعلمی، ۱۳۷۵؛ Akimoto et al. 1998 Tanksley & Orton, 1983; Takahashi,1997; Murphy et al., 1996; Morishima, 1997b; Akimoto et al. 1997).

با گذشت حدود چهل سال از نخستین مطالعات ژنتیک بر روی آیزوزایم‌های گیاهی، امروزه اطلاعات مفید و فراوان در علوم پایه و کاربردی گیاهان فراهم آمده است. نحوه توارث و کنترل اکثر آنزیم‌های قابل مطالعه در بسیاری از گیاهان زراعی مهم از قبیل ذرت، گندم، گوجه‌فرنگی و برنج مشخص شده و نقشه مکان‌های ژنی مسئول رمزگذاری آن‌ها بر روی نقاط خاص کروموزومی تعیین گردیده است. اکنون بسیاری

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

از ژن‌های آیزوزایم، توالی‌یابی و تکثیر شده‌اند (Kephart, 1990; Tanksley & Orton, 1983). اگر چه بیش از چهار دهه است که از مطالعات آیزوزایم-آلوزایم استفاده می‌شود، ولی به خاطر مزایای بسیار از جمله کارایی و دقت نسبی زیاد، سرعت و هزینه مناسب، هنوز هم اهمیت خود را حفظ نموده‌اند و همانند گذشته به طور وسیع از طریق الکتروفورز ژل نشاسته به خصوص برای ارزیابی ساختار ژنتیک، طبقه‌بندی ذخایرتوارثی و مطالعات فیلوژنتیک برنج و سایر گیاهان به کار می‌روند. به عنوان مثال می‌توان به مطالعات سکند و تروسولت (۱۹۸۰) و سکند (Second, 1982 & 1985) بر روی گونه‌های زراعی و وحشی (Second, 1991)، گلازمن (Glaszman a,b, 1987 & 1988) بر روی برنج‌های زراعی آسیا، دکوچکو (۱۹۸۷) بر روی برنج‌های آفریقا (Second, 1991). شاتا و همکاران (Shatta et al., 1993)، نعمت‌زاده و کوش (Nematzadeh & Khush, 1993)، کای و همکاران (Cai et al., 1995 & 1996)، کای و موریشیما (Cai & Morishima, 1997)، مالک و کوش (Malik & Khush, 1966 a,b)، سا و همکاران (Suh et al., 1997)، اندو و همکاران(Endo et al., 1997)، تنگ و کوش (Tang & Khush, 1998)، آکیموتو و همکاران (Akimoto et al., 1997 & 1998) و فونتس و همکاران (Fuentes et al., 1999) بر روی برنج اشاره نمود.

همان طور که گفته شد، یک صفت در صورتی نشانگر محسوب می‌شود که دارای چندشکلی کافی باشد و هر چه درجه چندشکلی بیشتر باشد، میزان ارزش آن نشانگر زیادتر خواهد بود. از طرفی فراوانی‌های آللی، بیان‌کننده ساختار ژنتیک جوامع هستند. بنابراین پژوهش حاضر به منظور بررسی ساختار ژنتیک و تعیین اهمیت نسبی مکان‌های ژنی آیزوزایم در برنج‌های ایران انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، فراوانی آللی و میزان چندشکلی آیزوزایم‌ها در ۱۲ مکان ژنی کنترل‌کننده آیزوزایم‌های کاتالاز-۱ (Cat1)، فسفوگلوکز ایزومراز-۱ (Pgi1)، فسفوگلوکز ایزومراز- ۲ (Pgi2)، آمینوپپتیداز-۱ (Amp1)، آمینوپپتیداز-۲ (Amp2)، آمینوپپتیداز-۳ (Amp3)، آمینوپپتیداز- ۴ (Amp4)، استراز-۱ (Est1)، استراز- ۲ (Est2)، استراز- ۵ (Est5)، استراز- ۹ (Est9) و شیکمیت دهیدروژناز-۱ (Shd1) مطالعه شدند.

تعداد ۱۲۰ نمونه برنج ایرانی از میان ذخایر توارثی بانک ژن ملی گیاهی ایران انتخاب شدند. تعداد ۱۰ بذر از هر نمونه در یک ظرف پتری بر روی کاغذ صافی مرطوب کشت شدند. پتری‌ها به مدت شش تا هشت 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 معرض نور معمولی قرار گرفتند. از هر نمونه، چهار تا شش گیاهچه سبز به طول ۲/۵-۲ سانتیمتر برای عصاره‌گیری انتخاب شدند. قسمت محور ساقه‌چه و غلاف گیاهچه‌ها (Plumule & Coleoptile) در مقدار مناسب از بافر استخراج (۱۲ میکرولیتر به ازای هر سانتیمتر طول گیاهچه) هموژنیزه شدند. سپس مخلوط حاصل به مدت پنج دقیقه و با سرعت پنج هزار دور در دقیقه و در داخل یخچال سانتریفیوژ شد و محلول رویی (عصاره آنزیمی) به لوله‌های اپندورف منتقل گردید. عصاره آنزیمی تا زمان استفاده در درون فریزر $-20^{\circ}C$ نگهداری شد. 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 ماده ۲- مرکاپتواتانول به آن اضافه شد. الکتروفورز افقی ژل نشاسته با تغییراتی در سیستم I بافری از روش استاندارد گلازمن و همکاران (Glaszmann et al., 1998) به شرح زیر انجام گرفت:

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

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 لود شد و در شکاف ژل قرار گرفت. از دو رقم آی‌آر۳۶ (IR36) و تایچونگ ۶۵ (TC65) به عنوان شاخص در طرفین و وسط هر ژل استفاده گردید. عمل الکتروفورز ابتدا به مدت یک ساعت با شدت جریان ثابت ۴۰ میلی‌آمپر و سپس شش ساعت با شدت ۳۰ میلی‌آمپر در داخل یخچال دو درجه سانتیگراد انجام گرفت. تغییرات انجام شده در روش استخراج آنزیمی و الکتروفورز به منظور بهتر نمودن آشکارسازی باندها و بر اساس توصیه‌های منابع شماره ۴،۲، ۸، ۱۲، ۲۱، ۲۵، ۲۹، ۴۱ و ۴۳ انجام شدند. پس اتمام الکتروفورز، برش‌های با ضخامت یک میلیمتر از ژل تهیه گردید و به روش استاندارد گلازمن و همکاران (Glaszmann et al., 1988) رنگ‌آمیزی شدند. نمره‌دهی باندها بر اساس الگوی نامگذاری استاندارد آیزوزایم‌های برنج و با در نظر گرفتن آخرین تغییرات آللی به‌صورت ۰ و ۱ انجام گرفت (Malik et al, 1995; Morishima & Glaszmann, 1990; Glaszmann et al, 1988; Vaughan & Juliano, 1992; Tang et al. 1996, 1997; Iwata, 1996; Sun et al. 1995).

فراوانی آللی از فرمول مقابل محاسبه گردید (Endo & Morishima, 1983):

$$p_i = n_i \times n_t^{-1}$$

n_i = تعداد افراد دارای آلل مورد نظر

n_t = تعداد کل افراد (نمونه‌ها)

برای محاسبه میزان چندشکلی از دو معیار شاخص تنوع ژنی (Gene diversity) و درجه چندشکلی (Degree of Polymorphism) استفاده شد:

شاخص تنوع ژنی (Endo & Morishima, 1983):

$$HG = 1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2$$

k= تعداد کل آلل‌ها در هر مکان ژنی

درجه چندشکلی (Ghareyazie et al., 1996)

$$Np = \sum_{i=1}^{k-1} (Xi \cdot \sum_{j=i+1}^{K} Xj)$$

Np = تعداد جفت‌های چندشکل (پلی‌مورفیک)

Xi و Xj = تعداد نمونه‌های دارای آلل iام و jام.

P = درجه چندشکلی (فراوانی افراد چندشکل)

N = تعداد کل مقایسات جفتی ممکن

$$P = N_p \cdot N^{-1}$$

$$N = 0.5\, n_t\, (n_t - 1)$$

در نهایت فراوانی، تنوع ژنی و میزان چندشکلی با متوسط برنج‌های آسیایی (حاصل از بررسی نتایج گلازمن بر روی ۱۶۸۸ توده از ۲۰ کشور آسیایی) مقایسه گردید.

شاخص تنوع ژنوتیپی (Genotype diversity) نیز طبق فرمول زیر محاسبه شد (Endo & Morishima, 1983; Cai & Morishima 1997):

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

p_i= فراوانی ژنوتیپ iام

k = تعداد کل ژنوتیپ‌های مشاهده شده

نتایج و بحث

جدول ۱ نتایج فراوانی آللی و چندشکلی مکان‌های ژنی آیزوزایم در برنج‌های ایران و آسیا را نشان می‌دهد. مکان‌های ژنی مورد مطالعه در مجموع ۵۵ آلل را رمزگذاری می‌کنند. اما در برنج‌های ایرانی تنها ۳۰ آلل از آن‌ها با متوسط ۲/۴ آلل در هر مکان ژنی مشاهده شد. متوسط تنوع ژنی در کل ژن‌ها معادل ۳۴/۷ درصد بود. در برنج‌های ۲۰ کشور آسیایی حدود ۴۲ آلل از آن‌ها با متوسط ۳/۵ آلل در هر ژن مشاهده گردیده است. تنوع ژنی آن‌ها نیز ۳۹/۵ درصد بوده است (Glaszmann, 1988). در مجموع ۴۳ ژنوتیپ مختلف آیزوزایم (متوسط ۲/۹ فرد در هر ژنوتیپ) مشاهده گردید. شاخص تنوع ژنوتیپی نیز معادل ۳/۴۶ بود.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

کای و موریشیما (Cai & Morishima, 1997) با بررسی ۱۴۴ نژاد محلی از برنج‌های بنگلادش، مقدار تنوع در ۲۱ مکان ژنی را ۵/۶ بیان کرده‌اند و ادعا نمودند، بالاترین مقداری است که تا به حال گزارش شده است. بنابراین شاخص تنوع ۳/۴۶ برای ۱۲ مکان ژنی، نشان‌دهنده وجود تنوع زیاد در برنج‌های ایران می‌باشد. بسیاری از نمونه‌های دارای نام مشابه از نظر ژنوتیپ آنزیمی با هم فرق داشتند. به عنوان مثال، نمونه‌های دارای نام غریب و بینام در بین اکثر گروه‌های ژنوتیپی قرار داشتند و این نیز دلیل دیگری بر تنوع زیاد برنج‌های ایران می‌باشد.

فراوانی‌های آللی در بیشتر مکان‌های ژنی با فراوانی آللی برنج‌های آسیایی، اختلاف فاحشی نشان دادند و در چند مکان ژنی نیز اختلاف زیادی نداشتند (جدول ۱). در برنج‌های ایران آلل Cat1-2 با اختلاف فاحش، غالب بود و اما در برنج‌های آسیا آلل Cat1-1 غالب بوده است (بیش از سه برابر). البته در مطالعه گلازمن که ۳۴ نمونه برنج ایرانی را بر اساس تیپ دانه انتخاب کرده بود، نیز ۱۹ نمونه (۵۶٪) آلل Cat1-2 را داشتند (نمودار ۱). در توده‌های ایران آلل Pgi1-2 با حدود ۹۰٪ غالب بود، ولی در برنج‌های آسیا آلل‌های ۱ و ۲ با نسبت مساوی وجود دارند (نمودار ۳). فراوانی مشاهده شده آلل Pgi2-1 در برنج‌های ایران و آسیا با هم مساوی (حدود ۶۰٪) می‌باشد (جدول ۱). در حالی که آلل‌های Amp1-1 و Amp1-2 در برنج‌های ایرانی با نسبت مساوی (حدود ۵۰٪) وجود داشتند ولی در آسیا آلل Amp1-1 با حدود ۸۷٪ غالب است (نمودار ۲). نسبت مشاهده شده برای Amp2-1 و Amp2-2 در برنج‌های ایران و آسیا به صورت معکوس می‌باشد. فراوانی Amp3-0 در برنج‌های ایران بیش از ۵۰٪ و در برنج‌های آسیا تنها حدود ۴٪ است. در مطالعه گلازمن (Glaszmann, 1988) نیز ۲۰ رقم از ۳۴ رقم ایرانی (۵۶٪) دارای این آلل بودند. آلل ۱ و ۲ نیز در ایران به ترتیب با نسبت ۲۸٪ و ۱۸٪ دیده شدند و اما در آسیا این دو آلل با نسبت مساوی بیش از ۴۰٪، غالب هستند (نمودار ۴). در مورد Amp4 هیچ اختلافی با برنج‌های آسیا مشاهده نشد و Amp4-1 با فراوانی ۱۰۰٪ به صورت تک‌شکل (Monomorph) وجود داشت. آلل Shd1-1 در ایران با فراوانی حدود ۷۰٪ غالب بود و بر عکس در آسیا، Sdh1-2 با ۶۰٪ غالب می‌باشد. در بررسی گلازمن (Glaszmann, 1988) نیز ۲۷ نمونه (۷۹٪) از برنج‌های ایرانی دارای آلل ۱ بودند. فراوانی آلل Est1-1 در برنج‌های ایران و آسیا زیاد می‌باشد. البته در برنج‌های ایران آلل Est1-0 نیز با فراوانی حدود ۳۰٪ مشاهده گردید. در حالی که Est2-0 در بین برنج‌های ایران با حدود ۶۰٪ غالب می‌باشد، در آسیا Est2-0 و Est2-1 با نسبت مساوی وجود دارند. تانگ و همکاران (Tang et al., 1996) نیز فراوانی Est2-0 را در ذخایر توارثی تایوان و چین ۵۴/۴٪ گزارش کردند. در مکان ژنی Est5 نیز نتایج ایران و آسیا با هم مطابقت داشتند و Est5-1 با فراوانی ۱۰۰٪ به صورت تک‌شکل وجود دارد. در مکان ژنی Est9، تفاوت بسیاری بین ایران و آسیا مشاهده شد، به طوری که برنج‌های ایرانی به جز رقم اصلاح‌شده سپیدرود دارای آلل ۱ بودند و بنابراین منومورف می‌باشد. اما فراوانی آلل ۱ و ۲ در آسیا تا حدودی یکسان بوده است (جدول ۱). همان طور که مشاهده شد، فراوانی آلل‌های آیزوزایم به جز در مورد Amp4 و Est5 در سایر موارد با متوسط برنج‌های آسیا تفاوت دارند و این موضوع نشاندهنده تفاوت زیاد در ساختار ژنتیک برنج‌های ایران و آسیا می‌باشد.

به منظور بررسی میزان چندشکلی آیزوزایم‌ها، دو معیار تنوع ژنی و درجه چندشکلی محاسبه شدند (جدول ۱). هر دو معیار در جوامع بزرگ، نتایج مشابهی از میزان چندشکلی ارایه می‌نمایند. اما هنگامی که تمام افراد مورد مطالعه دارای ژنوتیپ آنزیمی مختلف باشند و یا به عبارتی میزان چندشکلی ۱۰۰٪ باشد، معیار تنوع ژنی کمتر از صددرصد را نشان می‌دهد. در این حالت حتی میزان تنوع بسته به تعداد افراد مورد بررسی، مقادیر متفاوتی خواهد داشت. این تفاوت به خصوص زمانی بارز می‌شود که اندازه جامعه کوچک باشد. بنابراین

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

جدول ۱- مقایسه فراوانی آللی و چندشکلی مکان‌های ژنی آیزوزایم در برنج‌های ایران و آسیا

Table 1.Comparison of allelic frequency and polymorphism of isozyme loci in rice germplasm of Iran And Asia

مکان ژنی آیزوزایم (Isozym loci)	آلل[1] (Allele)	فراوانی آللی (درصد) (Allelic frequency%)		شاخص تنوع ژنی (درصد) (Gene diversity,%)		درجه چندشکلی[2] (درصد) Degree of polymorphism
		ایران[2] (Iran)	آسیا[3] (Asia)	ایران[2] (Iran)	آسیا[3] (Asia)	
کاتالاز ۱ Catalase 1	Cat1-0	0.0	00.0	35	41	35.26
	Cat1-1	22.6	71			
	Cat1-2	77.4	29			
	Cat1-3	0.0	< 0.5			
فسفو گلوکز ایزومراز۱ Phosphoglucose isomerase1	Pgi1-0	0.0	0.0	26	50	27
	Pgi1-1	12.5	49			
	Pgi1-2	84.5	51			
	Pgi1-3	1.5	0.0			
	Pgi1-4	1.5	0.0			
فسفو گلوکز ایزومراز۲ Phosphoglucose isomerase2	Pgi2-1	60.8	60	55	55	55.32
	Pgi2-2	27.2	29			
	Pgi2-3	4.8	8			
	Pgi2-4	7.2	3			
آمینو پپتیداز۱ Amino peptidase 1	Amp1-0	0.0	0.0	50.7	37	51.06
	Amp1-1	48.5	78			
	Amp1-2	50.7	13			
	Amp1-3	0.0	4			
	Amp1-4	0.7	5			
	Amp1-5	0.0	< 0.5			
	Amp1-6	0.0	0.0			
آمینو پپتیداز۲ Amino peptidase 2	Amp2-0	0.0	0.0	48	48	49
	Amp2-1	59.5	39			
	Amp2-2	40.6	61			
	Amp2-3	0.0	< 0.5			
	Amp2-4	0.0	< 0.5			
	Amp2-5	0.0	0.0			
آمینو پپتیداز۳ Amino peptidase 3	Amp3-0	53.8	4	60	58	60.36
	Amp3-1	28.3	48			
	Amp3-2	17.9	43			
	Amp3-3	0.0	1			
	Amp3-4	0.0	3			
	Amp3-5	0.0	< 0.5			
	Amp3-6	0.0	1			
آمینو پپتیداز۴ Amino peptidase 4	`Amp4-0	0.0	0.0	0.0	5	0.0
	Amp4-1	100	97			
	Amp4-2	0.0	3			
	Amp4-3	0.0	< 0.5			
	Amp4-4	0.0	0.0			
شیکمیت دهیدروژناز ۱ Shikmate dehydrogenase1	Sdh1-1	74.3	37	39	48	48
	Sdh1-2	23.9	62			
	Sdh1-3	0.0	1			
	Sdh1-4	1.7	1			

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

ادامه جدول ۱

مکان ژنی آیزوزایم (Isozyme loci)	آلل[1] (Allele)	فراوانی آللی (درصد) (Allelic frequency%)		شاخص تنوع ژنی (درصد) (Genotype diversity,%)		درجه چندشکلی[2] (درصد) Degree of polymorphism
		ایران[2] (Iran)	آسیا[3] (Asia)	ایران[2] (Iran)	آسیا[3] (Asia)	
استراز ۱ Estrase 1	Est1-0	31.94	9	43.5	17	44
	Est1-1	68.05	91			
	Est1-2	0.0	0.0			
استراز ۲ Estrase 2	Est2-0	62	36	53.9	65	54.8
	Est2-1	15.1	42			
	Est2-2	22.7	22			
استراز ۵ Estrase 5	Est5-0	0.0	< 0.5	0.0	2	0.0
	Est5-1	100	99			
	Est5-2	0.0	1			
استراز ۹ Estrase 9	Est9-0	0.0	0.0	2	48	2
	Est9-1	99.2	40			
	Est9-2	0.8	60			
میانگین (Average)				34.67	39.5	34.7

۱- نمادگذاری آلل‌ها به روش استاندارد و با در نظر گرفتن آخرین تغییرات آللی انجام گرفته است (۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۲، ۲۶، ۳۶، ۴۰، ۴۲).

۲-نتایج این پژوهش بر روی ۱۲۰ نمونه برنج ایرانی.

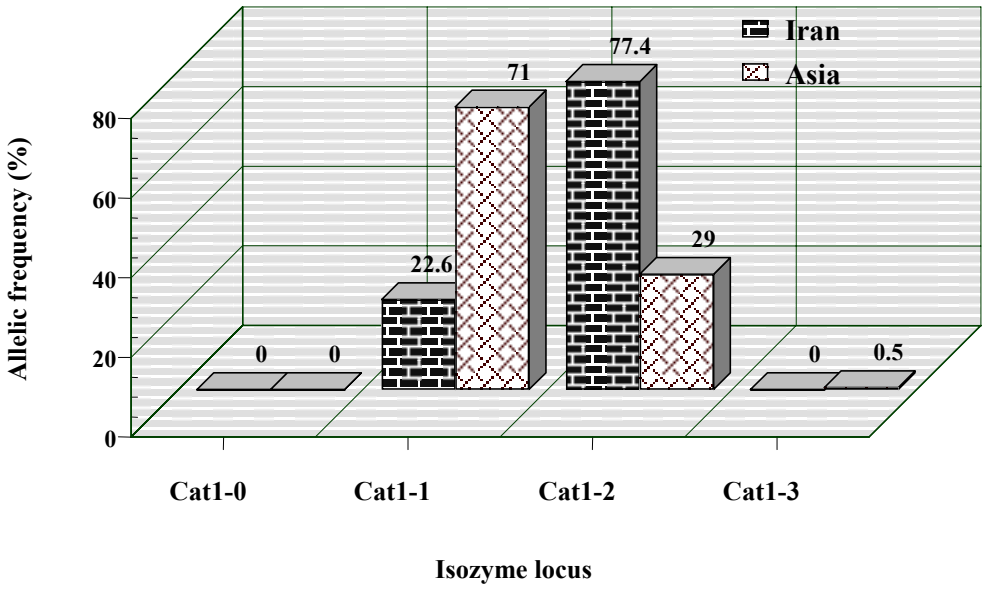
۳- نتایج گلازمن بر روی ۱۶۸۸ توده برنج از ۲۰ کشور آسیا (۱۷).

درجه چندشکلی، یک معیار دقیق‌تر از میزان تنوع هر ژن را بیان می‌نماید و مستقل از تعداد نمونه مورد مطالعه می‌باشد. به هر حال همان طور که در نمودار ۵ مشاهده می‌شود به ترتیب مکان‌های ژنی Amp3 (۶۰٪)، Pgi2 (۵۵/۳٪)، Est2 (۵۴/۸٪)، Amp1 (۵۱٪) و Amp2 (۴۸٪) دارای چندشکلی زیاد بودند. چندشکلی در نمونه‌های مورد بررسی برای مکان‌های ژنی Shd1، Cat1 و Pgi1 به ترتیب معادل ۳۹، ۳۵ و ۲۶ درصد بود. اما سه مکان ژنی Amp4،Est5 و Est9 منومورف بودند و میزان چندشکلی، مساوی صفر بود. لذا به کارگیری آن‌ها به عنوان نشانگر در برنج توصیه نمی‌شود. البته این موضوع برای Est9 فقط برای برنج‌های ایرانی صادق است.

درجه چندشکلی برنج‌های ایران و آسیا در مکان‌های ژنی Cat1، Pgi2، Amp2، Amp3، Amp4، Est5 و Shd1 تا حد زیادی با هم مطابقت داشتند. اما چند مورد اختلاف عمده نیز مشاهده گردید (نمودار ۵). چندشکلی Pgi1 و به خصوص Est9 در برنج‌های ایران بسیار کمتر می‌باشد. بر عکس تنوع ژنی Est1 و Amp1 در ایران بسیار بیشتر از آسیا می‌باشد.

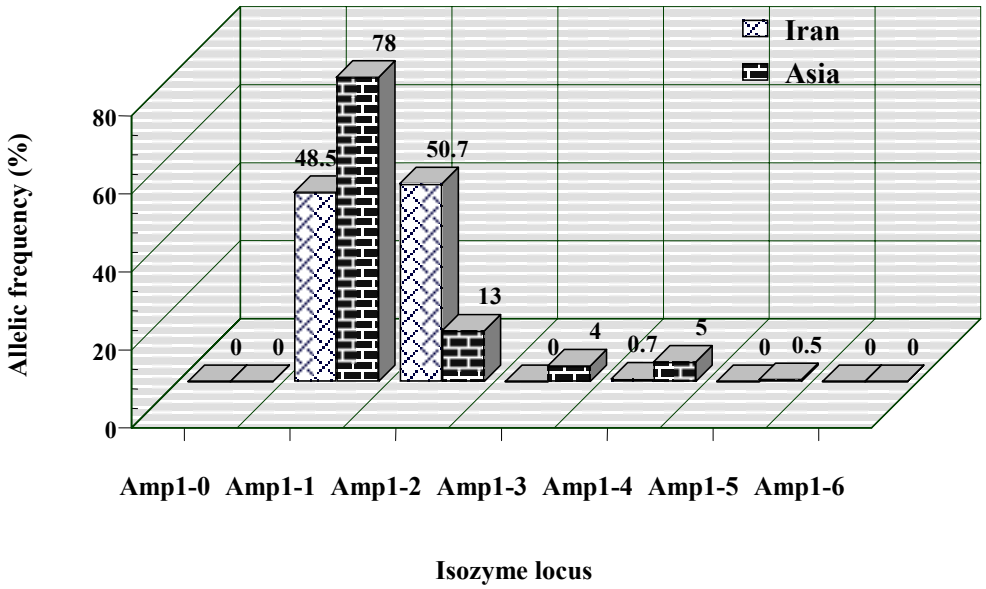
مجموع نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، برنج‌های ایران علاوه بر داشتن تنوع ژنتیک بسیار زیاد، دارای ساختار ژنتیک خاص و متفاوت از دیگر برنج‌های آسیایی می‌باشند. این تفاوت احتمالاً به این دلیل است که ارقام و توده‌های بومی ایران طی سالیان متمادی به طور مستقل در یک زیست‌بوم نسبتاً منحصر به فرد (دارای تفاوت قابل‌ملاحظه با زیست‌بوم اصلی این گیاه در آسیای جنوب شرقی، هند و چین) تکامل یافته‌اند. بنابراین دور از انتظار نخواهد بود که در مسیر نوترکیبی و انتخاب طبیعی، دستخوش تغییرات شده باشند. ناکاگارا و همکاران (Nakagara et al., 1975) با بررسی الگوی پراکندگی استرازها مشاهده نمودند که توزیع فراوانی

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]



شکل ۱- مقایسه فراوانی‌های آللی در مکان ژنی کاتالاز-۱ میان ذخایر توارثی برنج‌های آسیا (گلازمن، ۱۹۸۸) و ایران

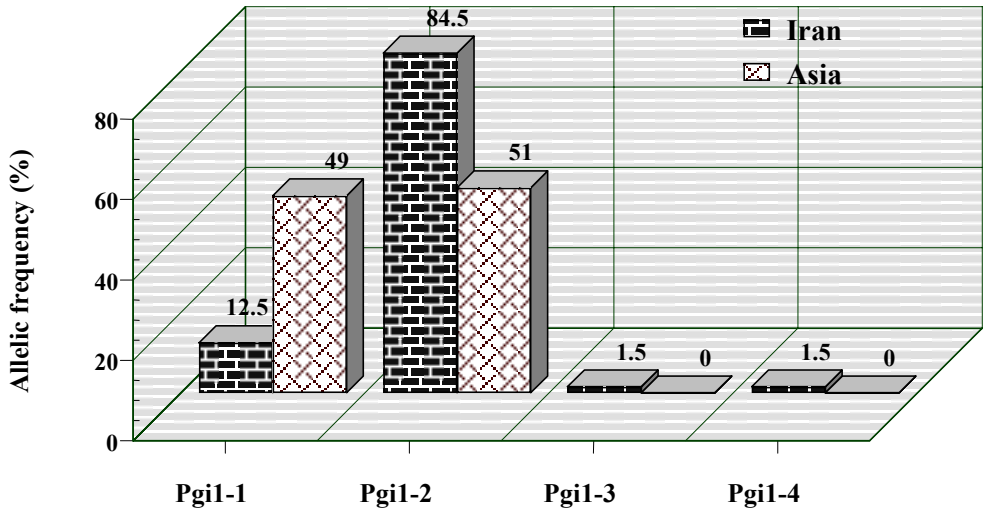
Fig. 1- Comparison of allelic frequencies at isozyme locus Cat1 among Asian (Glaszmann, 1988) and Iranian rice germplasm



شکل ۲- مقایسه فراوانی‌های آللی در مکان ژنی آمینوپپتیداز-۱ میان ذخایر توارثی برنج‌های آسیا (گلازمن، ۱۹۸۸) و ایران

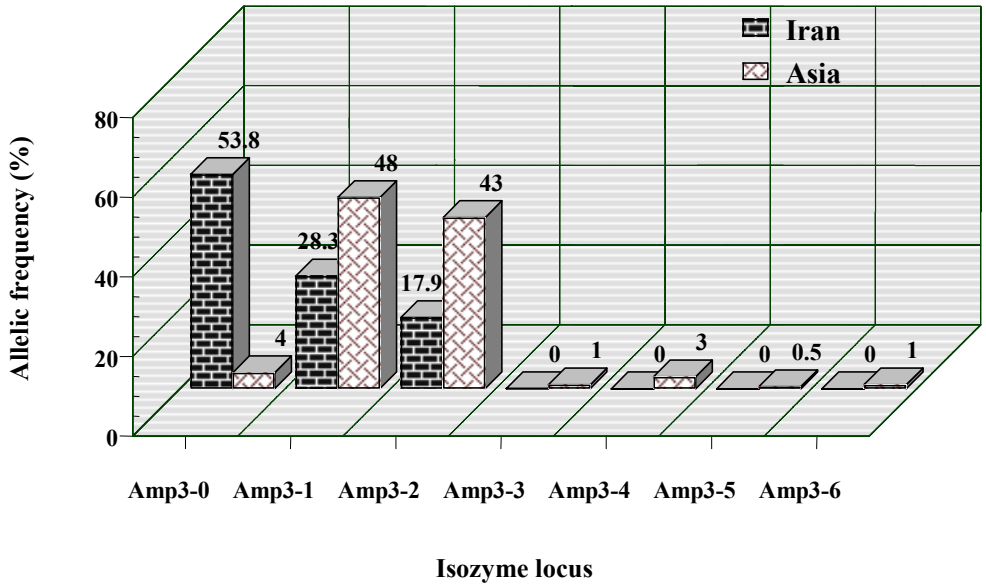
Fig. 2- Comparison of allelic frequencies at isozyme locus Pgi1 among Asian (Glaszmann, 1988) and Iranian rice germplasm

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]



شکل ۳- مقایسه فراوانی‌های آللی در مکان ژنی فسفوگلوکزایزومراز-۱ میان ذخایر توارثی برنج‌های آسیا (گلازمن، ۱۹۸۸) و ایران

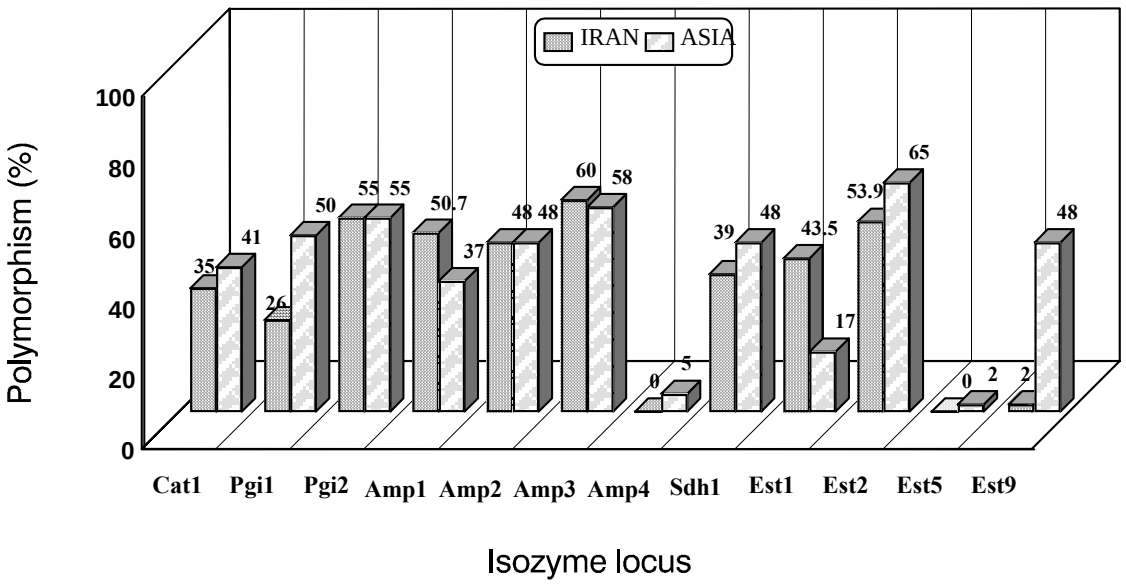
Fig. 3- Comparison of allelic frequencies at isozyme locus Amp1 among Asian (Glaszmann, 1988) and Iranian rice germplasm



شکل ۴-مقایسه فراوانی های آللی در مکان ژنی آمینوپپتیداز -۳ میان ذخایر توارثی برنج های آسیا (گلازمن ۱۹۸۸)و ایران

Fig. 4-comparison of allelic frequencies at isozime locus amp3 among asian (glaszmann 1988)and iranian rice germplasm

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

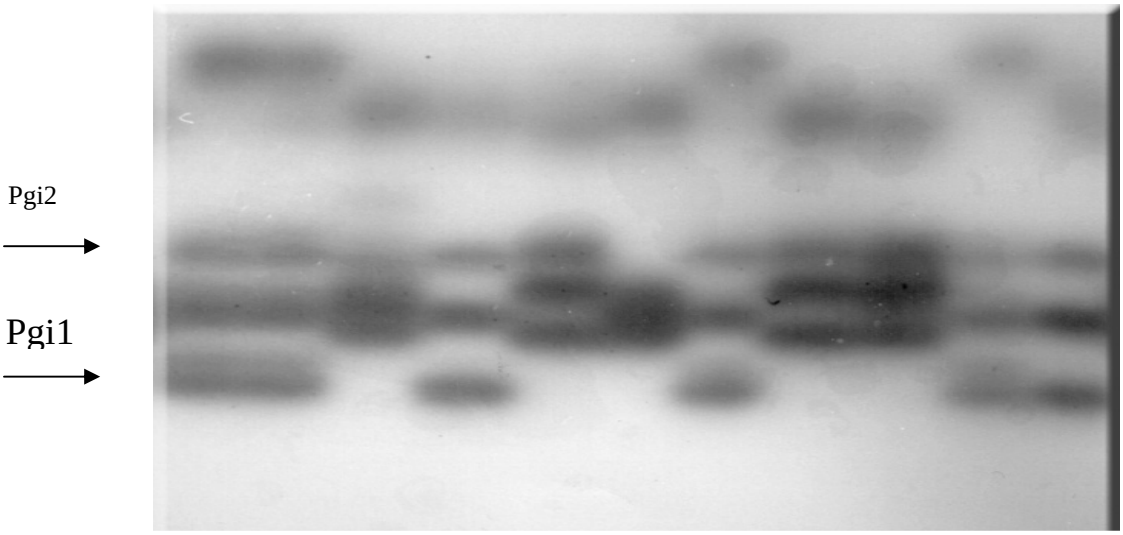


شکل ۵- مقایسه چندشکلی (تنوع ژنی) مکان‌های ژنی آیزوزایم میان ذخایر توارثی برنج‌های آسیا (گلازمن ۱۹۸۸) و ایران

Fig. 5- Comparison of polymorphism (Gene diversity) at isozyme loci among Asian (Glaszmann, 1988) and Iranian rice germplasm

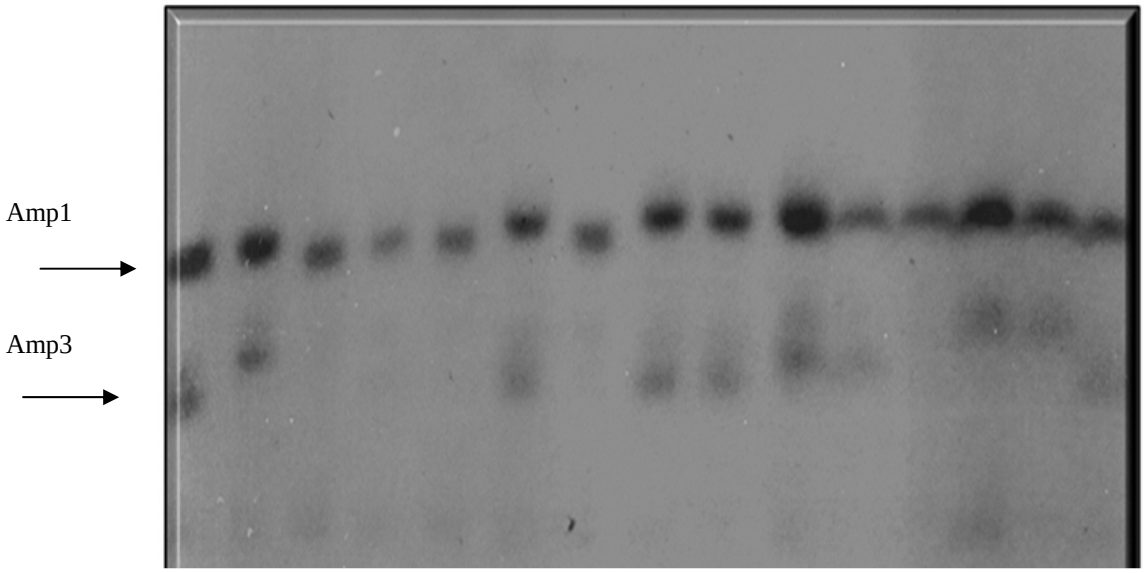
آللی و تنوع در مناطق مختلف جغرافیایی یکسان نیست و آلل‌های خاصی در برخی مناطق غالب هستند (Morishima, 1997b; Second, 1991). گلازمن (Glaszmann, 1988) در بررسی ۱۶۸۸ توده برنج از ۲۰ کشور آسیا، پراکندگی غیرتصادفی برخی از آللوزایم‌ها (وجود همبستگی ناحیه‌ای) و تمرکز نقطه‌ای آلل‌ها در بعضی از مناطق را گزارش کرد. ایشان هم‌چنین به پیچیدگی روند پراکندگی جغرافیایی آلل‌ها در گروه V (که اکثر برنج‌های ایرانی را نیز شامل می‌شد) اشاره نمود. در بررسی گلازمن، رقم‌های ایرانی که از نظر جغرافیایی از سایر مناطق آسیا جدا می‌باشند، به خصوص در مکان‌های ژنی Pgi2 و Cat1 دارای آلل‌های خاص بودند. حدود ۲۰ نمونه از ۳۴ رقم ایرانی، آلل Amp3 را نشان دادند. روند پراکندگی آلل‌ها در این مکان ژنی نیز به طول جغرافیایی وابسته بود (Glaszmann, 1988). ایشیکاوا (Ishikawa, 1991)، وابستگی اکوتیپی آلل‌های آیزوزایم در بین برنج‌های ژاپنی را گزارش نمود. احمدی و همکاران (Ahmadi et al., 1991) نیز گزارش کردند، فراوانی آیزوزایم‌ها در ذخایر توارثی ماداگاسکار با آسیا و آفریقا تفاوت دارد. دلیل این امر را نوترکیبی درون زیرگروه‌های برنج عنوان می‌کنند. سکند (Second, 1991) و کای و همکاران (۱۹۹۵ و ۱۹۹۶ Cai et al.,) نیز تفاوت فراوانی آللی و تنوع ژنی آیزوزایم‌ها را در بین برنج‌های وحشی مناطق مختلف مشاهده نمودند.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]



شکل ۶- زایموگرام آنزیم فسفوگلوکز ایزومراز (Pgi) گیاهچه‌های برنج بر روی ژل نشاسته

Fig 6. Zymogram of phosphoglocose isomerase (pgi) in plumuls of Iranian rice on Starch gel



شکل ۷- زایموگرام آنزیم لوسین آمینوپپتیداز (Leu-Amp) گیاهچه‌های برنج بر روی ژل نشاسته

Fig 7. Zymogram of lucine aminopeptidase (Leu-Amp) in plumuls of Iranian rice on Starch gel

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

تشکر و سپاسگزاري

نگارندگان لازم می‌دانند از تمام افرادی که زمینه‌ساز انجام این مطالعه بودند و همکاری‌های صمیمانه آقایان مهندس شفیعی، مهندس حسینی سالکده و آقای عادلی نسب جهت انجام هماهنگی‌های لازم در تأمین برخی از امکانات مورد نیاز، کمال سپاسگزاری وامتنان 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.

منابع مورد استفاده: References

اعلمی، ع. ۱۳۷۵. کاربرد آیزوزایم‌ها به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام پسته ایرانی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس.

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

قره‌یاضی، ب. ۱۳۷۷. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات.مجموعه مقالات کلیدی چهارمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، ۷-۴ شهریور ۱۳۷۵، اصفهان. ص ۳۸۱-۳۲۸

میردریکوند، م. ۱۳۷۸. بررسی تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی توده برنج‌های ایرانی با استفاده از نشانگرهای (مارکرهای) بیوشیمیایی. پایان‌نامه کارشناسی، دانشگاه گیلان.

Ahmadi, N., Glaszmann, J. C. & Rabary, E. 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". Manila, Philippines.

Akimoto, M., Shimamoto, Y. & Morishima, H. 1997. Genetic differentiation in *Oryza glumaepatula* and its phylogenetic relationships with other AA genome species. RGN **14:** 37-38.

Akimoto, M., Shimamoto, Y. & Morishima, H. 1998. Comparison between phynotype variation and isozyme diversity within and between AA genome wild rice species. RGN **15:** 78-80.

Brar, D. S. 1991. Isozyme: technique and applications in rice improvement. Handout of Second Rice Biotechnology Training Course, 15 Oct. - 27 Dec. IRRI, Philippines.

Cai, H. W. & Morishima, H. 1997. Indica- Japonica differentiation of Bangladesh rice cultivars detected by isozyme analysis. RGN **14:** 29-30.

Cai, H., Wang, X. K. & Morishima, H. 1995. Isozyme variation in Asian common wild rice *Oryza rufipogon*. RGN **12:** 178-180.

Cai, H., Wang, X. K. & Morishima, H. 1996. Geographical variation of *Oryza rufipogon* with reference to prennial-annual differentiation. RGN **13:** 67-69.

Endo, T. & Morishima, H. 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.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

Endo, N., Ogawa, T. & Khush, G. S. 1997. Isozyme classification of Myanmar rice cultivars resistant to bacterial blight. Breeding science **47:** 27-32.

Fuentes, J. L., Escobar, F., Alvarez, A., Gallego, G., Duque, M. C., Ferrer, M., Deus, J. E. & Tohme, J. M. 1999. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD & AFLP markers. Euphytica **109:** 107-115.

Ghareyazie, B., Huang, G., Second, G., Bennet, J. & Kush, G. S. 1996. Classification of rice germplasm: fingerprinting rice germplasm using ALP & PCR-based RFLP. IRRN **21:** 10-12.

Glaszmann, J. C. 1987. Isozyme & classification of Asian rice varieties. Theor. Appl. Genet. **74:** 21-30.

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.

Glaszmann, J. C., De Los Reyes, B. G., & Khush, G. S. 1988. Electrophoretic variation of isozymes in plumules of rice- a key to the identification of 76 alleles in 24 loci. IRRI. 14 pp.

Ishikawa, R. 1991. Isozyme variations and ecotype-specific alleles found among Japanes rice varieties RGN **13:** 12-19.

Iwata, N. 1996. Report of commitee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. RGN **13:** 12-19.

Kephart, S. R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: A comparative analysis of techniques. Amer. J. Bot. **77(5):** 693-712.

Malik, S. S., Brar, D. S. & Khush, G. S. 1995. Identification of two new alleles in traditional rice germplasm of Philippines. RGN **12:** 206-207.

Malik, S. S. & Khush, G. S. 1996a. A simplified procedure for classification of rice germplasm based on single isozyme locus. RGN **13:** 42-43.

Malik, S. S. & Khush, G. S. 1996b. Isozyme classification of Philippines & Thailand rice germplasm. RGN **13:** 43-44.

May, B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. In "Hoezel, A. R. (ed.), Molecular Genetic Analysis of Population , pp. 1-12". Oxford University Press.

Morishima, H. & Glaszmann, J. C. 1990. Current statue of isozyme gene symbols. RGN **7:** 51-57.

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.

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.

Murphy, R. W., Sites, J. W., Donald, Tr., Buth, G. & Haufler, C. H. 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.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

Nematzadeh, GH. A. & Khush, G. S. 1993. Classification of rice germplasm from Iran through isozyme analysis. RGN **10:** 74-75.

Shatta, A. M., Reyes, B. G., Brar, D. S. & Khush, G. S. 1993. Isozyme classification of Myanmar rice germplasm based on isozyme polymorphism. RGN **10:** 73-74.

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.

Second, G. 1985. Evelutionary relationships in the *Sativa* group of *Oryza* based on isozyme data. Genet. Sel. Evol. **17(1):** 89-114.

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.

Suh, H. S., Sato, Y. I. & Morishima, H. 1997. Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morphophysiology, isozyme & RAPD markers. Theor. Appl. Genet. **94:** 316-321.

Sun, X. L., Cai, H. W., Xu, J. C., Zhu, L. H. & Wang X. K. 1995. Two newly found aminopeptidase loci and allelic variation in Asian cultivars. RGN **12:** 189-190.

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.

Tang, S. X. & Khush, G. S. 1998. Isozyme classification of Taiwan and Yannan rice germplasm of China. RGN **15:** 77.

Tang, S. X., Khush, G. S. & Brar, D. S. 1996. Identification of a null allele in traditional rice germplasm of Taiwan, China. RGN **13:** 53-54.

Tang, S. X., Khush, G. S. & Brar, D. S. 1997. A new allele at Amp4 locus in a traditional rice cultivar. RGN **14:** 75-76.

Tanksley, S. D. & Orton, T. J. 1983. Isozyme in Plant Genetic & Breeding, Part A. Elsveier Scientific Publishers B. V., Amsterdam. 516 pp.

Vaughan, D. A. & Juliano, A. 1992. Silent allele for Amp-2 found among Sulawesi varieties. RGN **9:** 107-108.

Wendel, J. F. & Weeden, N. F. 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.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

Study of Allelic Frequency and Polymorphism of Isozyme Markers in Iranian Rice

Mir Drikvand, M[1], GH. A. Nematzadeh[2], A. Aalamy[3], and B. Ghareyazie[4]

ABSTRACT

Isozymes are useful and important markers for studying genetic structure and breeding of rice. The level of polymorphism is an important character of each marker that represents its validation and relative importance. Allelic frequencies represent genetic structure of populations. Therefore, this investigation was conducted for evaluation of genetic structure and identifying of relative importance of isozyme loci in Iranian landraces of rice. One hundred twenty rice accessions were selected from National Plant Gene Bank of Iran (NPGBI). In each sample, enzyme extract was extracted from 4-6 seedlings. Separation and visualization of isozymes was carried out using Glaszman et al. (1988) protocol, with some minor modifications. In most isozymic loci, allelic frequencies of Iranian landraces had significant differences with average of other Asian rices. Also in each locus, one or two alleles were frequent. Five loci including Amp3, Pgi2, Est2, Amp1 and Amp2 with 60, 55.3, 54.8, 51 and 48 percent were more polymorphic, respectively. Three loci, Amp4, Est5 and Est9 were monomorphic and they are not useful markers for rice. Genetic diversity of Iranian landraces and Asian rices on Cat1, Pgi2, Amp3, Amp4 and Est5 loci have not significant diffrences, however, Pgi1, Est9, Est1 and Amp1 were reverse. Genotypic diversity index was 3.46, which is high in comparison with other Asian rices. These results showed a very high genetic variability and special genetic structure in Iranian landraces of rice. These can be due mainly to independent evolution of Iranian land races in unique ecological region of Iran which differes with the ecological conditions in the origin of rice in Southeast of Asia, India and China.

Key words: Isozymes, Rice, Starch gel electrophoresis, Marker, Polymorphism, Allelic diversity.

1. Biotechnology Research Institute of Iran.
2. Department of Science, University, Sari.
3. Department of Science, University, Rasht.
4. Biotechnology Research Institute of Iran.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]