

مقایسه کارایی نشانگرهای مولکولی SSR و RAPD در برنامه گزینش به کمک نشانگر (MAS) در برنج

Comparison of the Efficiency of SSR and RAPD Markers in Marker-Assisted Selection (MAS) Program in Rice

مهدی میرعرب^۱، اسدالله احمدی خواه^{۲*} و محمدهادی پهلوانی^۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۲۷

چکیده

گزارش‌های متعددی از مقایسه کارایی نشانگرهای مولکولی برای برآورد پارامترهای ژنتیکی گیاهان در مطالعات تنوع ژنتیکی منتشر شده است. اغلب تحقیقات بر روی ژنوم‌های گیاهی مختلف و برنامه‌های اصلاحی گوناگونی انجام گرفته است، ولی در این میان گزارشی مبنی بر مقایسه کارایی نشانگرهای SSR و RAPD در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر (MAS) در ژنوم برنج مشاهده نشده است. به همین منظور، در این تحقیق کارایی دو سیستم نشانگری فوق جهت تخمین برخی پارامترهای ژنتیکی در لاین‌های تلاقی برگشتی پیشرفته در برنج مورد مقایسه قرار گرفت. از ۱۰۰ جفت آغازگر SSR و ۲۰ آغازگر RAPD برای انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌ها استفاده شد. چندشکلی نشانگرهای RAPD بیشتر از نشانگرهای SSR، اما میزان اطلاعات چندشکلی نشانگر SSR بیش از دو برابر نشانگر RAPD به دست آمد. همبستگی ضعیفی میان دو سیستم مختلف نشانگری برای تخمین شباهت ژنتیکی نتاج به والد تکراری مشاهده گردید. همچنین نتایج نشان داد که افزایش تعداد نشانگر RAPD تأثیری در افزایش دقت برآوردها نداشت. با توجه نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود که از نشانگر SSR در برنامه‌های گزینش استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: برنج، گزینش به کمک نشانگر، RAPD، SSR

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران

۳. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

Email: ahmadikhaha@gmail.com

*: نویسنده مسوول

مقدمه

نشانگرهای مولکولی DNA جهت تخمین تنوع ژنتیکی و نیز تشخیص ژرم پلاسماهای جدید به منظور بهره‌مندی در برنامه‌های اصلاحی گونه‌های گیاهی مختلف استفاده می‌شوند پنوار و همکاران (Panwar et al., 2010). این نشانگرها از نظر هزینه، مقدار DNA مورد نیاز، سرعت آشکارسازی، درجه چندشکلی و دقت تخمین فاصله ژنتیکی از تفاوت‌های منحصر به فردی برخوردارند گارسیا و همکاران (Garcia et al., 2004). بر همین اساس نشانگرهای مولکولی متنوعی نظیر RFLP، AFLP، RAPD و SSR (ریزماهورها) توسعه یافته و در آنالیزهای ژنومی مورد استفاده پژوهشگران قرار می‌گیرد پالمویی و دامیانو (Palombi and Damiano, 2002).

در راستای مطالعات تنوع ژنتیکی، گزارش‌های متعددی از مقایسه کارآیی نشانگرهای مولکولی در تخمین فاصله ژنتیکی گیاهان منتشر شده است لاگهید و همکاران؛ جونز و همکاران؛ پالمویی و دامیانو، نقوی و همکاران؛ رن و همکاران؛ اگراما و توئینسترا، پنوار و همکاران؛ ساکر و همکاران؛ حنیف و همکاران؛ داتا و همکاران؛ لیل و همکاران؛ دمیر و همکاران؛ کرمی و همکاران؛ چولاستوا و همکاران (Jones et al., 1997؛ Ren؛ Agrama and Tuinstra, 2003؛ Loughed et al., 2000؛ Garcia et al., 2004؛ Naghavi et al., 2004؛ Saker et al., 2005؛ Karami et al., Hanif et al., 2008؛ Leal et al., Demir et al., 2010؛ Datta et al., 2010؛ 2010؛ Cholastova et al., 2011). به‌عنوان مثال لیل و همکاران (2010) از ۹ نشانگر RAPD و ۱۴ نشانگر SSR که باندهای چندشکل تولید نمودند جهت مقایسه کارآیی نشانگرهای RAPD و SSR در تعیین تنوع ژنتیکی ۱۰ لاین ذرت پاپ گرن استفاده نمودند. اغلب تحقیقات فوق‌الاشاره بر روی ژنوم‌های گیاهی مختلف و برنامه‌های اصلاحی گوناگونی انجام شدند، ولی در این میان گزارشی مبنی بر مقایسه کارآیی نشانگرهای SSR و RAPD در برنامه اصلاحی MAB (تلاقی برگشتی به کمک نشانگرهای مولکولی) در ژنوم برنج مشاهده نشد.

یکی از تکنیک‌های قدرتمند در کاوش DNA نشانگرهای SSR می‌باشند. میکروساتلایت‌ها از تکرارهای نوکلئوتیدی ۲ الی ۶ جفت بازی تشکیل شده و آلل‌های آنها معمولاً در تعداد واحدهای تکراری متفاوت می‌باشند اوپیدیای و همکاران (Upadhyay et al., 2011). تعداد این نشانگرها در ژنوم بسیار فراوان و جهش‌پذیر بوده و به دلایل چند آلی بودن، همبازری، تکرارپذیری، تفسیر نسبتاً آسان، توزیع مناسب در ژنوم و قدرت

آشکارسازی چندشکلی بالا، جونز و همکاران، اگراما و توئینسترا، گارسیا و همکاران، دمیر و همکاران، دمیر و همکاران، چولاستوا و همکاران، جاتوی و همکاران (Jatoi et al., 2006) استفاده از این نوع نشانگرها در مطالعات تکاملی، تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی گیاهان و حتی شناسایی ارقام امکان‌پذیر می‌باشد. هزینه مورد نیاز و تلاش لازم برای توسعه میکروساتلایت‌ها (ساخت کتابخانه ژنومی ریزماهورها و ...) محدودیت‌هایی را برای استفاده از این نشانگر ایجاد نموده به طوری که کاربرد آنها را به تعدادی از گیاهان مهم زراعی که برنامه توالی‌یابی آنها تکمیل شده محدود می‌نماید (کرمی و همکاران، 2010؛ جاتوی و همکاران، 2006). به‌عنوان نمونه برنج یکی از گیاهانی است که نشانگرهای SSR فراوانی در آن شناسایی شده است. میکروساتلایت‌های برنج در بین و درون جمعیت‌های برنج بسیار چندشکل بوده به طوری که داده‌های حاصل از آنالیز SSR ایزاری آسان، سریع و مناسب را جهت آزمایشات ژنومی این گیاه در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهد اوپیدیای و همکاران. همچنین در خصوص کارآیی این نشانگر وی و تنسکلی (1993) در تحقیقات خود نتیجه گرفتند که هتروزیگوسیتی میکروساتلایت‌ها بسیار بالاتر از نشانگرهای معروف دیگر بوده و به‌عنوان مثال میزان آن ۷ الی ۱۰ بار بیشتر از نشانگرهای RFLP می‌باشد (به نقل از گارسیا و همکاران، 2004). اما با تمام فواید اشاره شده برای نشانگرهای SSR همان‌طور که ذکر شد توسعه آن نیاز به توالی‌یابی ژنوم دارد. بنابراین جهت کاوش ژنوم‌های ناشناخته نیاز به استفاده از نشانگرهای تصادفی مانند RAPD احساس می‌شود.

RAPD نشانگری غیراختصاصی بوده و مبتنی بر استفاده از آغازگر منفرد تصادفی می‌باشد و به‌منظور تکثیر چندین قطعه از DNA که هر قطعه از یک محل از ژنوم مشتق و به‌صورت دو قطعه کوتاه آغازگری با جهت معکوس طراحی می‌شود (جونز و همکاران، 1997). مطالعات متعددی نشان می‌دهند که تغییر پارامترهای مختلف از جمله نسبت نمونه DNA به آغازگر، غلظت Taq پلیمرز و حتی دستگاه‌های متفاوت ترموسایکلر می‌توانند بر باندهای به‌دست آمده از نشانگر RAPD اثر بگذارند. بنابراین جهت افزایش تکرارپذیری این نوع نشانگر، لازم است که شرایط استاندارد برای واکنش آن در نظر گرفته شود. اما با این حال نشانگرهای RAPD عموماً در تحقیقات ژنتیکی به دلیل سرعت فرآیند و سهولت کاربرد مورد استفاده قرار می‌گیرند (اگراما و توئینسترا، 2003؛ پنوار و همکاران، 2010). از دیگر خصوصیات نشانگر RAPD آن است که غالب بوده و توانایی ردیابی اختلاف تک نوکلئوتیدی در میان ژنوم‌ها

(Ahmadikhah, 2008). ابتدا یکدور انتخاب فنوتیپی برای شباهت مورفولوژیکی بیشتر به والد تکراری (صفاتی مانند ارتفاع بوته، زمان خوشه‌دهی، تعداد پنجه و ...) بر روی نتاج تلاقی برگشتی صورت گرفت و سپس ۸ لاین انتخابی وارد ارزیابی‌های مولکولی شدند. پس از تهیه خزانه و کشت نتاج BC₅F₁ در زمین اصلی، در مرحله شروع پنجه‌زنی نمونه‌گیری و استخراج DNA انجام شد. DNA ژنومی از برگ گیاهان جوان هر یک از نتاج BC₅F₁ و والدین با استفاده از روش تغییر یافته CTAB استخراج شد / احمدی‌خواه (Ahmadikhah, 2009). کنترل کیفیت و کمیت DNA به وسیله الکتروفورز ژل آگارز یک درصد انجام شد.

آنالیز نشانگرها

در این آزمایش ۱۰۰ جفت آغازگر SSR برای غربال والدین تلاقی و ۳۵ جفت آغازگر SSR که بین والدین چندشکلی نشان دادند استفاده شد (جدول ۱). در مورد نشانگر RAPD به منظور بررسی اثر تعداد نشانگر بر میزان دقت گزینش ابتدا نتایج بر اساس ۱۰ نشانگر RAPD (RAPD_{set1}) استخراج شد و سپس داده‌های ۱۰ نشانگر دیگر (RAPD_{set2}) با نتایج امتیازدهی باندهای ۱۰ نشانگر قبلی ادغام شد و در نهایت نتایج فاصله ژنتیکی بر اساس ۲۰ نشانگر RAPD به دست آمد (جدول ۲).

جهت تکثیر آغازگرهای SSR، مخلوط واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۶ میکرولیتر PCR Master Mix (شرکت سیناژن)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر (برای هر کدام از آغازگرهای پیشرو و معکوس ۰/۲۵ میکرولیتر) و ۰/۷۵ میکرولیتر DNA الگو تهیه شد. هر واکنش در یک تیوب ۰/۲ میلی‌لیتری انجام شد. تکثیر PCR با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه شروع شد و با ۳۵ سیکل (واشرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سنتز و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه) ادامه یافت. تکمیل سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. جهت تکثیر آغازگرهای RAPD نیز مخلوط واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۶ میکرولیتر PCR Master Mix (شرکت سیناژن)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر (برای هر کدام از آغازگرهای پیشرو و معکوس ۰/۲۵ میکرولیتر) و ۰/۷۵ میکرولیتر DNA الگو تهیه شد. هر واکنش در یک تیوب ۰/۲ میلی‌لیتری انجام شد. تکثیر PCR با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه شروع شد و با ۳۵ سیکل (واشرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت

را دارد و بنابراین می‌توان از این نشانگر در تفکیک گونه‌های یک جنس بر پایه میزان شباهت ژنومی و قرابت جغرافیایی با موفقیت استفاده نمود شری و همکاران (Sherry et al., 2011). دلیل علاقه‌مندی پژوهشگران در استفاده از این نشانگر در مزایای منحصر به فردی از جمله نامحدود بودن تعداد نشانگر، عدم استفاده از مواد رادیواکتیو، نیاز کم به DNA ژنومی، آسان و سریع بودن تجزیه و تحلیل و اقتصادی‌تر بودن نسبت به سایر نشانگرها می‌باشد. به خصوص اینکه کاربرد آنها در گونه‌های کمتر شناخته شده به دلیل عدم نیاز به سابقه توالی ژنومی برای طراحی آغازگرها بسیار مناسب می‌باشد فولاد و همکاران، ۲۰۰۳؛ حنیف و همکاران، ۲۰۰۸؛ د/تا و همکاران، ۲۰۱۰؛ دمیر و همکاران، ۲۰۱۰؛ چولاستوا و همکاران، ۲۰۱۱؛ سلوارج و همکاران؛ ایلیبی (Foolad et al., 1993; Selvaraj et al., 2011; Ilbi, 2003). بنابراین در پژوهش حاضر به منظور تعیین کارایی تخمین فاصله ژنتیکی و شباهت به والد تکراری در نتاج نسل پیشرفته تلاقی برگشتی در گیاه برنج (جهت ایجاد لاین نرعیتم سیتوپلاسمی جدید) از دو سیستم نشانگری مختلف SSR و RAPD استفاده شد. هدف از انتخاب نشانگر SSR این بود که نشانگر مذکور در برنج به دلیل توالی‌یابی کامل ژنوم آن به خوبی توسعه یافته و اطلاعات بسیار مناسبی از این سیستم نشانگری در این گیاه موجود است و مقصود از انتخاب نشانگر RAPD پاسخ به این پرسش است که آیا می‌توان راهی یافت که نشانگر اخیر بر پایه استفاده از نشانگر میکروساتلایت به نوعی کالبره شده تا بتوان بر نتایج داده‌های حاصل از آن اعتماد بیشتری نمود؟ همان‌طور که در برخی از تحقیقات استفاده از داده‌های جغرافیایی در کنار نتایج آنالیز نشانگر RAPD برای تفسیر بهتر نتایج توصیه شده است (شری و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین منظور از این کار نوعی شاخص-گذاری برای داده‌های تولید شده توسط این نشانگر به شمار می‌رود. در نتیجه، هدف از این پژوهش مقایسه کارایی نشانگرهای RAPD و SSR و مقایسه اطلاعات تولید شده به-وسیله دو سیستم نشانگری برای تخمین برخی پارامترهای ژنتیکی مانند شباهت ژنتیکی لاین‌های تلاقی برگشتی با والد تکراری، بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از نتاج تلاقی برگشتی پیشرفته (نسل BC₅F₁) حاصل از تلاقی دو والد یوسن و IR68897A (لاین نرعیتم سیتوپلاسمی) استفاده شد. یوسن یک لاین بالقوه نگهدارنده برای سیتوپلاسم نرعیتم نوع WA در برنج می‌باشد / احمدی‌خواه

نتایج

نشانگرهای SSR

از بین ۱۰۰ جفت آغازگر SSR، ۳۵ جفت چندشکلی بین دو والد را آشکار ساختند که نمونه‌ای از الگوی باندهای یکی از آنها در شکل ۱ نشان داده شده است.

میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) نشانگرهای SSR در دامنه ۳۷/۵ تا ۶۳/۹ درصد و متوسط آن برابر ۴۵/۴ درصد محاسبه شد (جدول ۱). شاخص تنوع ژنی نئی لاین‌های مورد مطالعه در لوکوس‌های مختلف بین ۳۲/۰ تا ۴۸/۰ درصد و به‌طور متوسط برابر ۴۱/۳ درصد محاسبه شد.

تعداد کل باندهای حاصل از آغازگرهای RAPD_{set1} برابر ۱۴۵ عدد (۱۴/۵ باند به ازای هر آغازگر) بود که از این میان ۷۸ باند چند شکل وجود داشت و متوسط درصد چندشکلی معادل ۵۳/۸ درصد محاسبه شد. تعداد کل باندهای حاصل از آغازگرهای RAPD_{set2} برابر ۸۹ عدد (۸/۹ باند به ازای هر آغازگر) بود که از این میان ۴۴ باند چند شکل وجود داشت و متوسط درصد چندشکلی معادل ۴۹/۴ درصد محاسبه شد؛ تعداد کل باندهای حاصل از آغازگرهای RAPD در مجموع ۲۳۴ عدد بود که ۱۲۲ عدد از آنها چند شکل بودند و متوسط درصد چندشکلی ۵۲/۱ درصد محاسبه شد. شاخص PIC برای RAPD_{set1} بین ۸ تا ۳۲/۵ درصد و به‌طور متوسط برابر ۱۹/۶ درصد و برای RAPD_{set2} بین ۶/۴ تا ۲۶/۱ درصد و به‌طور متوسط برابر ۱۸/۷ درصد محاسبه شد. متوسط این شاخص در مجموع برای کل نشانگرهای RAPD برابر ۱۹/۲ درصد به‌دست آمد (جدول ۲). بررسی شاخص تنوع ژنی نیز نشان داد که متوسط این شاخص برای RAPD_{set1} و RAPD_{set2} به‌ترتیب معادل ۴۲/۵ و ۴۴/۱ درصد و در مجموع معادل ۴۳/۱ درصد بود.

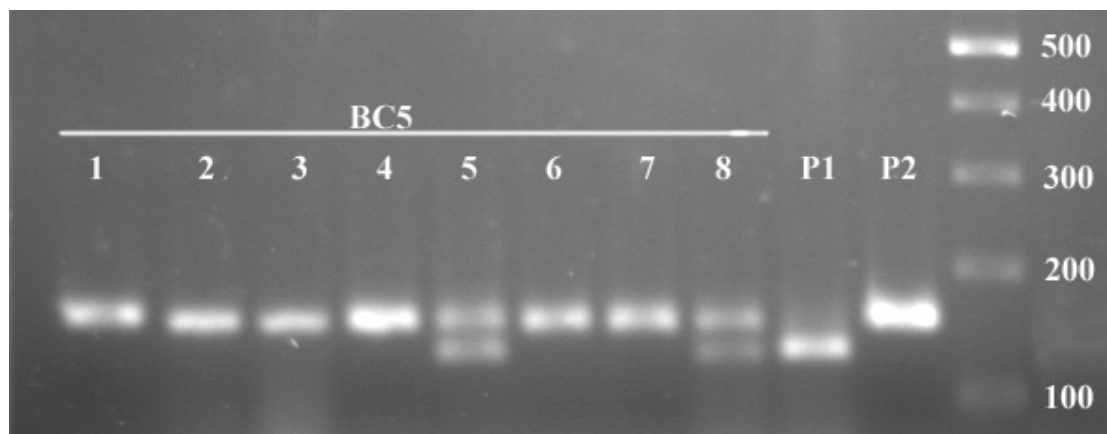
نشانگرهای RAPD

همه آغازگرهای RAPD توانستند چندشکلی بین دو والد و نتاج BC₅ را نشان دهند که نمونه‌ای از الگوی باندهای آنها در شکل ۲ نشان داده شده است.

۳۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۳۸ الی ۴۵ درجه سانتی‌گراد (براساس دمای ذوب آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه و سنتز و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه) ادامه یافت. تکمیل سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ۲ بار برای هر نمونه تکرار شد. فرآورده‌های PCR مربوط به آغازگرهای SSR با الکتروفورز ژل آگارز ۴ درصد در بافر ۱X TBE محتوی ۰/۵ μg/ml اتیدیوم بروماید جدا شدند. فرآورده‌های PCR مربوط به آغازگرهای RAPD با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر ۱X TBE محتوی ۰/۵ μg/ml اتیدیوم بروماید جدا شدند. برای مشخص کردن طول قطعات از نشانگر اندازه مولکولی (100 bp Ladder) استفاده شد. باندها به وسیله رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل رویت شده و تحت اشعه فرابنفش با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت عکس‌برداری شدند.

ارزش‌گذاری باندها و آنالیز داده‌ها

باندهای SSR براساس حضور باند مشابه با والد تکراری (A) یا بخشنده (B) و یا دارای هر دو آلل (AB) امتیازدهی شدند. باندهای RAPD نیز بر حسب حضور و عدم حضور باندهای تکرارپذیر به‌ترتیب به‌صورت یک و صفر امتیازدهی شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Popgene 32 یه و همکاران (Yeh *et al.*, 1997) انجام شد و شاخص‌های بررسی تنوع ژنتیکی مانند میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) و تنوع ژنی نئی محاسبه شدند. از ماتریس تشابه/عدم تشابه محاسبه شده براساس مقادیر ناریب نئی (Nei, 1978) برای محاسبه شباهت و فاصله ژنتیکی استفاده شد. تجزیه همبستگی با استفاده از نرم‌افزار SPSS کینیر و کولین (Kinneer and Colin, 2000) انجام شد.



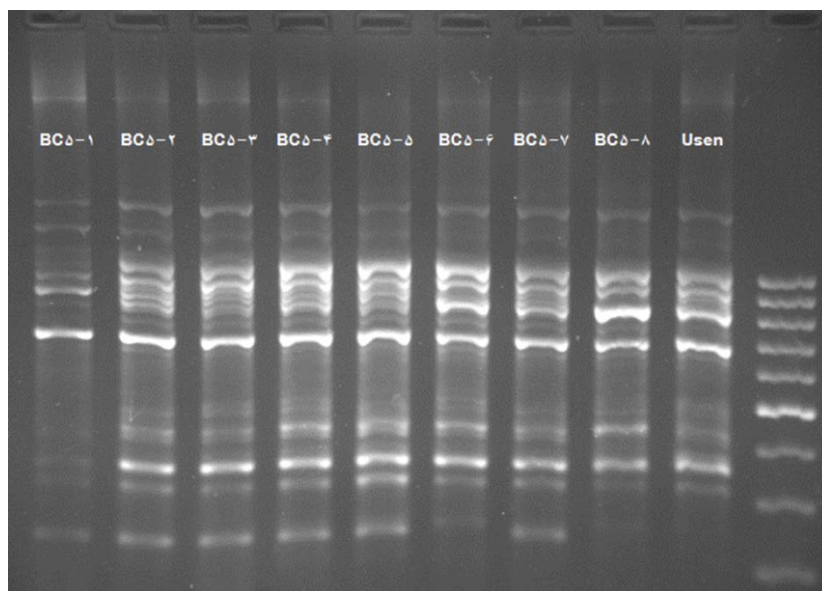
شکل ۱: الگوی باندهای حاصل از الکتروفورز DNA تکثیر شده نتاج BC₅ به همراه والدین توسط جفت آغازگر SSR (RM224). P1: لاین نرعیتم IR68897A، P2: والد تکراری یوسن

Fig. 1: Electrophoretic banding pattern of amplified DNA of BC₅ lines along with parents using SSR primer pair RM224. P1: male sterile line IR68897A, P2: recurrent parent Yusen

جدول ۱: شاخص‌های محاسبه شده برای نشانگرهای SSR چندشکل

Table 1: Calculated indices for polymorphic SSR markers

تنوع ژنی Gene diversity	PIC (%)	نشانگر Marker	ردیف Row	تنوع ژنی Gene diversity	PIC (%)	نشانگر Marker	ردیف Row
37.5	63.9	RM206	19	32.0	37.5	SPRF01	1
42.0	37.5	RM215	20	45.5	37.5	RM311	2
32.0	50.0	RM224	21	45.5	46.9	MRG0335	3
48.0	37.5	RM273	22	45.5	46.9	MRG2773	4
42.0	37.5	RM279	23	32.0	37.5	RM131	5
47.5	50.0	RM317	24	44.4	56.6	RM1003	6
37.5	54.7	RM334	25	48.0	37.5	RM151	7
32.0	46.9	RM415	26	45.5	46.9	RM302	8
42.0	37.5	RM457	27	45.5	46.9	RM1146	9
37.5	50.0	RM481	28	42.0	50.0	SSR923	10
37.5	46.9	RM505	29	37.5	46.9	RM118	11
37.5	46.9	RM527	30	45.5	46.9	RM1335	12
32.0	46.9	RM563	31	32.0	37.5	RM339	13
37.5	37.5	RM566	32	37.5	46.9	RM152	14
42.0	46.9	RM5373	33	48.0	37.5	RM159	15
45.5	50.0	RM7180	34	45.5	46.9	RM162	16
48.0	37.5	RM5841	35	48.0	37.5	RM173-1	17
41.3	45.4	میانگین Mean		45.9	37.5	RM173-2	18



شکل ۲: الگوی باندهای حاصل از الکتروفورز DNA تکثیر شده نتاج BC₅ به همراه والد تکراری توسط آغازگر RAPD (OPA03).
 Fig. 2: Electrophoretic banding pattern of amplified DNA of BC₅ lines along with recurrent parent using RAPD primer OPA03

جدول ۲: شاخص‌های محاسبه شده برای نشانگرهای RAPD

Table 2: Calculated indices for RAPD markers

تنوع ژنی (%)	PIC (%)	چندشکلی (%)	تعداد باندها	آغازگر	ردیف	تنوع ژنی (%)	PIC (%)	چندشکلی (%)	تعداد باندها	آغازگر	ردیف
Gene diversity		Polymorphism	Number of bands	Primer	Row	Gene diversity		Polymorphism	Number of bands	Primer	Row
44.9	20.0	50.0	4	OPB09	11	43.3	19.7	50.0	22	OPD02	1
46.9	22.5	50.0	8	OPB10	12	44.9	26.3	62.5	24	OPB05	2
44.6	20.8	50.0	14	OPC05	13	42.2	27.1	75.0	8	OPB06	3
46.9	11.2	25.0	8	OPC10	14	42.0	18.8	50.0	16	OPA03	4
43.6	25.0	62.5	16	OPD03	15	46.4	20.0	45.5	11	OPA04	5
29.9	6.4	60.0	5	OPD04	16	47.5	32.5	71.4	14	OPA05	6
44.4	17.0	41.6	12	OPD05	17	41.4	15.1	41.2	17	OPA09	7
47.2	14.6	33.3	6	OPD06	18	27.2	12.2	25.0	8	OPA10	8
46.1	26.1	60.0	5	OPD07	19	40.8	8.0	25.0	8	OPB03	9
46.0	23.9	54.5	11	OPD10	20	47.0	16.0	35.3	17	OPB07	10
44.1	18.7	49.4	8.9			42.5	19.6	53.8	14.5		میانگین Mean

توجه: از ردیف ۱ تا ۱۰ به عنوان RAPD_{set1} و از ردیف ۱۱ تا ۲۰ به عنوان RAPD_{set2} می‌باشند

Note: rows from 1 to 10 and from 11 to 20 represent as RAPD_{set1} and RAPD_{set2}

مقایسه دو سیستم نشانگری

این دو سیستم نشانگری نیز بسیار متفاوت بود (۱۰۰ درصد در مقابل ۴۸/۷ درصد). اما، تنوع ژنتیکی برآورد شده با این دو سیستم نشانگری تفاوت چندانی با هم نداشت.

به‌طور کلی، شباهت بین والدین تلاقی برآورد شده با دو سیستم نشانگری، متفاوت بود. براساس نشانگرهای SSR این شباهت معادل ۶۵ درصد و براساس نشانگرهای RAPD معادل ۴۷/۹ درصد برآورد شد (جدول ۳). چندشکلی آشکار شده بین نتاج با

جدول ۳: مقایسه دو سیستم نشانگری جهت بررسی برخی شاخص‌های مولکولی لاین‌های تلاقی برگشتی

Table 3: Comparison of two marker system for assessing some molecular indices of backcross lines

SSR	RAPDs	RAPD _{set2}	RAPD _{set1}	شاخص Index
200	234	89	145	تعداد کل باندها Number of total bands
70	122	44	78	تعداد باندهای چند شکل بین والدین Polymorphic bands between parents
65.0	47.9	50.6	46.2	شباهت بین والدین تلاقی (%) Parents similarity
100	114	42	72	تعداد باندهای چند شکل بین نتاج Polymorphic bands between progenies
100	48.7	47.2	49.7	چندشکلی بین نتاج (%) Polymorphism between progenies
45.4	19.2	18.7	19.6	PIC نشانگرهای چندشکل (%) Polymorphic markers PIC
41.3	43.1	44.1	42.5	تنوع ژنتیکی (%) Genetic variation

کمترین و بیشترین شباهت به والد تکراری مربوط به لاین‌های ۱ و ۸ بوده است (به ترتیب با ۶۸/۲ و ۸۰/۵ درصد). با توجه به اطلاعات این جدول ملاحظه می‌شود که با انجام برآورد بر اساس نشانگر SSR متوسط شباهت ژنتیکی لاین‌های تلاقی برگشتی با والد تکراری بیشتر از زمانی است که برآورد توسط نشانگر RAPD صورت گرفت (به طور متوسط ۸۷/۱ در مقابل ۷۵/۱ درصد). همبستگی بین نتایج دو سیستم نشانگری SSR و RAPD_{set2} منفی و معنی‌دار بود، ولی همبستگی بین نتایج دو سیستم نشانگری SSR و RAPD به‌طور کلی بسیار ناچیز و غیرمعنی‌دار بود (جدول ۵). همچنین هیچ گونه همبستگی معنی‌داری میان دو مجموعه RAPD_{set1} و RAPD_{set2} مشاهده نشد.

دو سیستم نشانگری مورد استفاده برآورد متفاوتی از میزان شباهت لاین‌های تلاقی برگشتی با والد تکراری به‌دست دادند، به طوری که نتایج حاصل از نشانگر SSR نشان داد که کمترین شباهت به والد تکراری متعلق به لاین ۳ با ۸۴/۴ درصد شباهت و بیشترین شباهت متعلق به لاین‌های ۶ و ۷ با ۹۱/۱ درصد شباهت بوده است (جدول ۴). این درحالی است که براساس نتایج حاصل از RAPD_{set1} کمترین شباهت به والد تکراری متعلق به لاین ۱ (با ۶۱/۵ درصد) و بیشترین شباهت متعلق به لاین ۸ (با ۸۰/۸ درصد) و طبق نتایج حاصل از RAPD_{set2} کمترین شباهت متعلق به لاین ۶ (با ۷۰/۸ درصد) و بیشترین شباهت متعلق به لاین ۳ (با ۸۰ درصد) به‌دست آمد و در مجموع طبق نتایج به‌دست آمده با کل نشانگرهای RAPD

جدول ۴: تشابه ژنتیکی لاین‌های نسل BC₅ با والد تکراری برای سیستم‌های نشانگری مختلف

Table 4: Genetic similarity of BC5 lines to recurrent parent for different marker systems

میانگین Mean	BC#8	BC#7	BC#6	BC#5	BC#4	BC#3	BC#2	BC#1	سیستم نشانگری Marker system
87.1	85.7	91.1	91.1	86.5	87.4	84.4	85.0	85.5	SSR
74.4	80.8	76.6	77.0	73.8	76.6	70.1	79.1	61.5	RAPD _{set1}
76.3	80.0	71.9	70.8	77.4	73.6	80.5	76.2	80.0	RAPD _{set2}
75.1	80.5	74.8	74.6	75.1	75.4	74.0	78.0	68.2	RAPDs

جدول ۵: نتیجه تجزیه همبستگی بین سیستم‌های نشانگری مختلف

Table 5: Result of analysis of correlation between different marker systems

RAPDs	RAPD _{set2}	RAPD _{set1}	
		-0.444	RAPD _{set2}
	0.076	0.927**	RAPDs
0.047	-0.890**	0.295	SSRs

بحث

بندی ژنوتیپ‌ها با یکدیگر متفاوت بود، به طوری که براساس نشانگرهای RAPD جمعیت مذکور به سه گروه و براساس نشانگرهای ریزماهواره جمعیت مورد مطالعه به دو گروه تقسیم شد. در مجموع نتایج تحقیق حاضر با سایر تحقیقات ذکر شده در خصوص همبستگی پایین نتایج آنالیز مولکولی دو سیستم RAPD و SSR همخوانی دارد. اما لیل و همکاران (2010) جهت تخمین تنوع ژنتیکی لاین‌های ذرت از دو سیستم نشانگری RAPD و SSR استفاده نمودند و نتایج حاصل حاکی از همبستگی حدود ۵۰ درصدی بین داده‌های حاصل از آنها در ژنوم ذرت بود. کریم و همکاران (2009) نیز در پژوهش خود که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نیشکر انجام شد بین ضریب تشابه ژنتیکی حاصل از نشانگر RAPD و SSR همبستگی معنی‌داری در سطح ۵ درصد ($r=0/46$) مشاهده نمودند. این نتایج می‌تواند حاکی از آن باشد که در ترکیبات ژنتیکی مختلف، نشانگرهای مختلف کارایی متفاوتی را نشان می‌دهند. اما به هر حال تفاوت بین نتایج حاصل از دو نشانگر SSR و RAPD در تحقیقات مختلف می‌تواند موجب تردید در استفاده از نشانگر RAPD شود (لیل و همکاران، 2010).

از آنجایی که در این تحقیق لاین‌های مورد بررسی متعلق به نسل تلاقی برگشتی پیشرفته بودند و شباهت ژنتیکی مورد انتظار آنها بالا است، سیستم نشانگری که بتواند این شباهت بالا را آشکار نماید و از لحاظ تکرارپذیری در سطح مطلوبی قرار داشته باشد مناسب‌تر خواهد بود و این مسئله با نتایج حاصل از نشانگر مولکولی SSR همخوانی نشان می‌دهد. در نتایج تحقیق *اگرما و توئینستر* گزارش شده است که فاصله ژنتیکی محاسبه شده براساس آغازگرهای SSR نسبت به آغازگرهای RAPD همبستگی بالایی را با فاصله منشأ جغرافیایی ژنوتیپ‌های سورگوم داشت که این مطلب نیز نشان‌دهنده کارایی و اطمینان بالا به نتایج حاصل از نشانگر SSR می‌باشد.

از طریق محاسبه میزان اطلاعات چندشکلی می‌توان ارزش دو سیستم نشانگری مختلف جهت بررسی چند شکلی ژنتیکی را با یکدیگر مقایسه نمود. این شاخص مستقیماً به تنوع آلی در هر لوکوس وابسته است و می‌تواند در یک مجموعه از افراد مورد بررسی قرار گیرد شهید و همکاران (Shahid et al., 2011). در پژوهش حاضر، میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) نشانگرهای SSR در نسل تلاقی پنج‌گانه در دامنه ۳۷/۵ تا ۶۳/۹ درصد (با میانگین ۴۵/۴ درصد) قرار داشت. این میزان برای نشانگر RAPD نسبت به نشانگر SSR بسیار کمتر و برابر ۱۹/۲ درصد محاسبه شد. در مطالعات دیگر نیز نتیجه‌گیری شد که ارزش نشانگرهای ریزماهواره برای بررسی فاصله ژنتیکی

در این تحقیق قبل از گزینش برای پس‌زمینه ژنتیکی در نسل تلاقی برگشتی، افرادی که شباهت مورفولوژیکی بیشتر (نظیر همانندی در شکل ظاهری، ارتفاع گیاه، متوسط تعداد پنجه، تاریخ خوشه‌دهی و ...) با والد تکراری داشتند، انتخاب شدند. بنابراین هشت ژنوتیپ از مجموع لاین‌های موجود در نسل تلاقی برگشتی پنجم انتخاب شد و سپس وارد ارزیابی‌های مولکولی گردیدند پن و همکاران (Pan et al., 2009) نیز قبل از ارزیابی شباهت نتایج تلاقی برگشتی با والد تکراری، اقدام به غربال فنوتیپی نتایج تلاقی برگشتی نمودند. جونز و همکاران (1997) در پژوهشی جهت تعیین قابلیت تکرارپذیری نشانگرهای مولکولی در میان شبکه آزمایشگاه‌های اروپا از سه نشانگر RAPD، SSR و AFLP استفاده نمودند و نشان دادند که نشانگر RAPD از قابلیت تکرارپذیری کمتری برخوردار می‌باشد. در مورد نشانگر AFLP تنها یک باند متفاوت در تکرارهای مختلف در بین آزمایشگاه‌ها مشاهده شد درحالی‌که همه آل‌های نشانگر SSR در میان همه آزمایشگاه‌ها تکثیر گردید. به‌طور کلی همبستگی ضعیفی بین سیستم‌های نشانگری مختلف در گندم پن و همکاران، 2009؛ سویا پاول و همکاران (Powell et al., 1996)، گزارش شده است. کریم و همکاران (Kraim et al., 2009) نشان دادند که نشانگرهای ریزماهواره قدرت بیشتری برای آشکارسازی سطح تنوع بین جمعیت‌ها دارند و گزارش نمودند که همبستگی میان نتایج حاصل از نشانگرهای RAPD و ریزماهواره برای برآورد میزان شباهت ژنوتیپ‌های مختلف، در حد پایینی ($r=0/19$) قرار دارد. در مطالعه حاضر نیز همبستگی بسیار پایینی بین نشانگر RAPD و SSR مشاهده شد که با نتایج تحقیق مذکور همخوانی دارد (پاول و همکاران، 1996). نیز در تحقیق خود که به منظور مقایسه نشانگرهای AFLP، RAPD، RFLP و SSR در آنالیز ژرم‌پلاسم سویا اجرا شد، نشان دادند که ماتریس شباهت ژنتیکی محاسبه شده براساس سه سیستم نشانگری SSR، RFLP و AFLP برای آنالیز ژرم‌پلاسم سویای زراعی و وحشی همبستگی بالایی با یکدیگر دارند، درحالی‌که نشانگر RAPD همبستگی پایین‌تری را نسبت به سایر سیستم‌های نشانگری نشان داد. در پژوهش چولاستوا و همکاران (2011) نشان داده شد که نشانگرهای SSR نسبت به RAPD از کارایی بالاتری در تعیین هویت هیبریدهای ذرت برخوردارند نقوی و همکاران (Naghavi et al., 2009). در پژوهشی جهت تعیین تنوع ژنتیکی گندم دیپلوئید وحشی از دو نوع نشانگر RAPD و SSR برای تجزیه کلاستر جمعیت استفاده نمودند که نتایج گروه-

(Hernandez et al., 2002). به عنوان مثال، احمدی خواه (2008) در پژوهشی به منظور غربال DNA لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی و نگهدارنده برنج با استفاده از نشانگرهای RAPD مشخص نمود که دو نشانگر OPH₀₃ و OPC₀₅ قادر به ایجاد نوارهای اختصاصی در سیتوپلاسم نرعقیم می‌باشند و پس از همسانه‌سازی نوار چندشکل ۱۹۰۰ جفت بازی و توالی‌یابی آن، یک نشانگر جدید اختصاصی SCAR جهت شناسایی لاین‌های نرعقیم طراحی نمود.

موفقیت روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگرهای مولکولی (MAB) بستگی به طرح آزمایشی، موقعیت و تراکم نشانگرها، اندازه جمعیت و استراتژی گزینش دارد فریچ و ملچینگر (Frisch and Melchinger, 2005). اما براساس نتایج تحقیق حاضر نوع سیستم نشانگری که انتخاب بر پایه آن صورت گرفت، بیشترین تأثیر را در موفقیت این روش نشان داده است. براساس جستجوی اینترنتی تاکنون هیچ پژوهش مشابهی جهت مقایسه نشانگرهای RAPD و SSR به منظور کاربرد در برنامه اصلاحی تلاقی برگشتی به کمک نشانگرهای مولکولی (MAB) در گیاه برنج گزارش نشده است. در تحقیق حاضر همبستگی بالایی (۰/۹۲۷) بین نتایج حاصل از RAPD_{set1} و RAPD_{set2} در تعیین میزان شباهت ژنتیکی نتاج نسل تلاقی برگشتی پنجم با والد تکراری مشاهده شد. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که افزایش تعداد نشانگر RAPD (از ۱۰ به ۲۰ آغازگر) در ایجاد نتایج قابل اعتمادتر می‌تواند سودمند واقع شود. اما به هر حال بین دو سیستم نشانگری RAPD و SSR همبستگی بسیار ضعیفی مشاهده شد و فرضیه اثربخشی افزایش تعداد نشانگر RAPD برای حصول نتایج دقیق‌تر تأیید نگردید. یکی از مزیت‌های اصلی استفاده از نشانگر SSR در برنامه MAB این است که این نشانگر همباز بوده و بنابراین برخلاف نشانگر RAPD قادر به تفکیک نتاج هموزیگوت از هتروزیگوت می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه تکرار آزمایش جهت تأیید تکرارپذیری نشانگرهای تولید شده به وسیله آغازگرهای RAPD ضرورت دارد، هزینه آزمایشات MAS و MAB توسط این نشانگر بالا می‌باشد. با عنایت به گزارشات تحقیقات متعدد مبنی بر عدم همبستگی و یا همبستگی اندک بین دو نشانگر RAPD و SSR و از طرفی شناسایی تعداد بسیار زیادی نشانگر SSR در گیاه توالی‌یابی شده برنج، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که استفاده از نشانگر SSR در برنامه‌های اصلاح مولکولی در گیاه برنج کارآمد می‌باشد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۳-۵ متن انگلیسی مراجعه شود.

بیشتر است. برای مثال، ساکر و همکاران قابلیت هشت آغازگر RAPD، شش جفت ریزماهواره و هشت ترکیب AFLP را برای گروه‌بندی و تعیین تنوع ژنتیکی ارقام برنج مصری مقایسه کردند که سطح چندشکلی آشکار شده با نشانگرهای ریزماهواره بیشتر از دو سیستم آغازگری چند لوکوسی RAPD و AFLP بود. نقوی و همکاران (2009) در پژوهشی جهت تعیین تنوع ژنتیکی گندم دیپلوئید وحشی، از ۱۷ نشانگر SSR و ۱۴ نشانگر RAPD استفاده نمودند که میزان PIC محاسبه شده برای نشانگرهای SSR معادل ۸۱ درصد به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از نشانگر RAPD (۴۵ درصد) بود و این نشان‌دهنده قدرت بالاتر نشانگر SSR در آشکارسازی چندشکلی می‌باشد. نتایج تحقیق پنوار و همکاران در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی *Eleusine coracana* براساس ۱۸ نشانگر RAPD و ۱۰ نشانگر SSR نیز نشان داد که میانگین PIC محاسبه شده برای نشانگر SSR (۵/۵ درصد) بیشتر از RAPD (۱۳/۵ درصد) بود.

در تحقیق حاضر درصد چندشکلی نشانگر SSR در لاین‌های تلاقی برگشتی پیشرفته بیشتر از این شاخص برای نشانگر RAPD به دست آمد (۱۰۰ درصد در مقابل ۴۸/۷ درصد). در پژوهش شهید و همکاران (2011) برتری نشانگر SSR نسبت به RAPD در آشکارسازی چندشکلی مشهود بود به طوری که چندشکلی آشکار شده توسط نشانگر SSR برابر ۶۷/۳ درصد و برای نشانگر RAPD برابر ۳۹/۲ درصد بود. از سوی دیگر رن و همکاران (2003) نشان دادند که نشانگر RAPD نسبت به SSR در آشکارسازی چندشکلی روابط خویشاوندی میان گونه‌های ژنوم AA برنج موفق‌تر عمل می‌نماید. این محققان کاربرد تعداد بیشتری از این نشانگر را برای آشکارسازی مطلوب‌تر چندشکلی پیشنهاد نمودند. البته نشانگر RAPD در جمعیت‌های بسیار بزرگ به منظور شناسایی زود هنگام لاین مورد نظر می‌تواند مؤثر واقع شود (شهید و همکاران، 2011). همچنین زمانی که ژنوم گیاه ناشناخته باشد، در شرایطی که تعداد و توزیع مناسبی از نشانگر در ژنوم در نظر گرفته شود و تکرارپذیری مطلوب باشد، استفاده از نشانگرهای RAPD قابل توجه می‌باشد (حنیف و همکاران، 2008). پس از شناسایی یک نشانگر غیراختصاصی RAPD می‌توان آن را تبدیل به یک نشانگر اختصاصی SCAR کرد. نشانگرهای SCAR مبتنی بر PCR، عموماً همباز هستند و امکان تفکیک انواع ژنوتیپ‌ها را میسر می‌کنند هرناندز و همکاران