Archive of SID

بررسی روابط ژنتیکی رقمهای ایرانی و خارجی نیشکر با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR وRAPD

ثریا کرمی[1*]، محمد برات شوشتری[2]، بهرام ملکی زنجانی[3] و بهروز شیران[2]

[1] اهواز، دانشگاه پیام نور خوزستان، گروه زراعت

[2] شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[3] زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۸۷/٤/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۲۵

چکیده

این مطالعه به منظور ارزیابی میزان تنوع موجود بین رقمهای نیشکر ایرانی و رقمهای خارجی، همچنین شناسایی نمونه های جمع آوری شده از سراسر ایران به ترتیب با استفاده از ٦٥ و ۷ نشانگر مولکولی RAPD و SSR انجام شد. در مجموع ۲۸ نشانگر RAPD و ۷ نشانگر SSR تکثیر و چندشکلی نشان دادند و تعداد قطعات تکثیر یافته به ترتیب برای نشانگر RAPD و SSR ، ۲۷-٦ (متوسط ۱۵/۱) و ۱٤-۵ (متوسط ۹/۳۳) قطعه بود. هر دو نشانگر مولکولی درجه بالایی از تنوع ژنتیکی را در ذخائر ژنتیکی نیشکر نشان دادند و نشانگرهای SSR و RAPD توانستند نمونه های جمع آوری شده از ایران را تفکیک و شناسایی نمایند. برای هر دو نشانگر تشابه بالایی در توپولوژی دندروگرام با مقداری تفاوت دیده شد. در دندروگرام کلی حاصل از ترکیب داده های هر دو نشانگر، ارتباط بین رقمها بر اساس اطلاعات شجره ای یا ناحیه جغرافیائی بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تفاوت ژنتیکی بین رقمهای داخل هر ناحیه بیشتر از تفاوت ژنتیکی رقمهای بین هر ناحیه بود. همچنین از ۷ و ۱ نشانگر SSR سورگوم و ذرت به منظور بررسی قابلیت انتقال نشانگرهای SSR بر روی ژنوم نیشکر استفاده شد که هیچ کدام تکثیر نشان ندادند.

واژه های کلیدی: RAPD، SSR، تنوع ژنتیکی، نیشکر، تجزیه واریانس.

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱٦۳۹۰۸۱۲۸، پست الکترونیکی:karamisoraya@gmail.com

مقدمه

نیشکر یک گیاه تک لپه چند ساله متعلق به خانواده غلات، جنس ساکاروم (*Saccharum*) و قبیله اندروپوگونه (*Andropogonea*) است و یکی از مهمترین منابع کربوهیدرات در جهان که بیش از ۷۳/۷۷ درصد از شکر جهان را تأمین می کند. در سال ۲۰۰۷-۲۰۰٦ کل شکر تولید شده در جهان ۱۵۰ میلیون تن بوده که بر اساس آمار موجود در سال ۲۰۰۷- ۲۰۰٦ میزان تولید در ایران ۵,۷۲۲,۰۰۰ تن گزارش گردیده است (سازمان خواربار جهانی). از جمله گونه های اجدادی جنس ساکاروم می توان به *S. officinarum*، *S. spontaneum*، *S. sinense*، *S. barberi*، *S. robustum*، *S. edule* اشاره کرد (۱۲). تمامی رقمهای تجاری نیشکر در سراسر جهان آنیوپلی پلوئید/ آلوپلوپلوئید با ۱٤۰-۸۰ کروموزوم و تعداد کروموزوم پایه ۸ یا ۱۰ (x = ۸ یا x = ۱۰) می باشند (۲۱). رقمهای تجاری اصلاح شده نقش کلیدی و اساسی در صنعت تولید شکر ایفا می کنند ولی از آنجا که این ارقام اصلاح شده حاصل تلاقی بوده، بنابراین ارزیابی و آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی در ذخایر توارثی این گیاه به عنوان یکی از ابزارهای اساسی و بسیار دقیق در اصلاح ترکیب ژنتیکی ارقام اصلاحی و تجاری از جایگاه ویژه ای برخوردار است

www.SID.ir

زیرا تنوع ژنتیکی بین والدین تعیین کننده سطح تفرق و تنوع بین نتاج حاصل از تلاقی است. در گیاه نیشکر از تعداد محدود و مشخصی از والدین متعلق به گونه *S.officinarum* (والد برگردنده) و *S.spontaneum* (والد بخشنده) به صورت مکرر در برنامه های تلاقی اولیه جهت دستیابی به تلاقیهای مطمئن و مطلوب استفاده می شود که بر اساس مطالعات انجام شده بر روی DNA کلروپلاستی و میتوکندریایی محدود شدن سطح تنوع ژنتیکی این گیاه اقتصادی مهم اثبات شده است (۱۱). یکی از شیوه های ابتدایی برای ارزیابی میزان تنوع در ذخایر توارثی گیاهی اندازه گیری صفات زراعی (کمی و کیفی) می باشد (۳٤). از جمله معایب این نوع ارزیابی اثرات شدید محیط بر صفات زراعی است و این امر موجب می گردد، صفات زراعی نتوانند انعکاس دقیق و درستی از میزان تنوع ژنتیکی جنس ساکاروم در اختیار اصلاح گر قرار دهد. در مقابل نشانگرهای DNA فرصت جدیدی را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و مطالعات تنوع زیستی در نیشکر ایجاد نموده است. سیستم نشانگری که اخیراً در مطالعات مربوط به گیاه نیشکر کاربرد فراوان دارد، نشانگر SSR می باشد. همه مطالعات انجام شده نشان دادند که این نشانگر در بررسی تنوع ذخائر ژنتیکی نیشکر، آزمون های شناسایی واریته، ارزیابی والدین وغیره مفید بوده است (۸، ۱۰، ۲٤ و ۲۸). همچنین قابلیت انتقال و تکثیر بین گونه ای/جنسی این نوع نشانگر در خانواده غلات به اثبات رسیده است (۱ و ۱۹). با این وجود یکی از معایب نشانگرهای SSR که استفاده از این نوع نشانگر را برای تعداد زیادی از گونه های گیاهی محدود نموده است، هزینه های گزاف و مدت زمان طولانی در اجرای برنامه های ساخت کتابخانه ریزماهواره و طراحی پرایمر می باشد و این امر موجب شده است که این نشانگر تنها برای گیاهانی استفاده شود که برنامه های توالی یابی ژنوم آنها انجام شده و یا در حال اجرا می باشد (۳۱).

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی مشخصات ژنتیکی، تنوع و ارتباط بین رقمهای ایرانی و خارجی نیشکر با استفاده ٦٥ نشانگر RAPD و ۷ نشانگر SSR (طراحی شده از کتابخانه ژنومی نیشکر) به طور همزمان بوده است. همچنین به دلیل پیچیدگی و سطح پلوئیدی بالای ژنوم نیشکر، تعداد محدودی نشانگر SSR برای این گیاه طراحی گردیده است که اکثراً در انحصار کنسرسیوم بین المللی ریزماهواره نیشکر (ISMC) می باشند ولی با توجه به قابلیت انتقال و تکثیر بین گونه ای/جنسی نشانگر SSR، در این تحقیق از ۷ و ۱ نشانگر SSR سورگوم و ذرت به منظور بررسی قابلیت انتقال بین گونه ای/ جنسی نشانگرهای SSR و معرفی منابع نشانگری جدید برای گیاه نیشکر استفاده گردید.

مواد و روشها

در این مطالعه در مجموع از ۲۳ نمونه گیاهی شامل ۲۱ رقم نیشکر (۳ رقم امید بخش آزادسازی شده توسط ایران، ۱۷ رقم خارجی، که اغلب آنها در حال حاضر در سطح وسیع در مزارع نیشکر ایران به منظور تولید شکر کشت می گردند، و یک نمونه رقم مادری متعلق به گونه *S. officinarum*) و ۲ نمونه خودرو متعلق به گونه *S. spontaneum* استفاده گردید. کلیه ارقام از بانک ذخائر ژنتیکی مرکز تحقیقات نیشکر اهواز جمع آوری گردیدند (جدول۱). DNA ژنومی نمونه های گیاهی بر اساس روش تغییر یافته CTAB استخراج گردید (۲۲). برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از روش اسپکتروفتومتری و بارگذاری DNA بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. DNA نمونه ها به نسبت ۲ درصد (۱۰ میکرولیتر محلول DNA + ٤۹۰ میکرولیتر بافر TE) رقیق و غلظت DNA با طول موج ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه بیوفتومتر (اپندرف) اندازه گیری گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- لیست نمونه های نیشکر استفاده شده در این مطالعه

نام رقم	والدین	نام گونه	منشاء
COLK-۸۰۰۱	۱۱٤۸ × Co۱۷٥-٦۲Co	*Saccharum* hybrid	هند
NCo۳۱۰	۳۱۲ × Co٤۲۱Co	*Saccharum* hybrid	هند
RB۸۳ -٥٥۲۹	ناشناختهNA × ٦۲-٥٦	*Saccharum* hybrid	برزیل
-SP۷۰۱۱٤۳	× Polycross٦٥-٤۸IAC	*Saccharum* hybrid	برزیل
SP۷۱-٦۱٦۳	× Polycross۷۹-٥٦NA	*Saccharum* hybrid	برزیل
C۹۰-٥۳۰	٤۲۱ × Co۱٤-٥٥My	*Saccharum* hybrid	کوبا
J٦٤-۲۰	۳۰۹-٥٤ × Ja٦٦۳-٥٥Ja	*Saccharum* hybrid	کوبا
CP٥۷-٦۱٤	۱۷-٥۳ × CP۱٤۳-٤۷CL	*Saccharum* hybrid	فلوریدا
CP٦۹-۱۰٦۲	٦۳-٥٦ × CP۷٤-٦۲CP	*Saccharum* hybrid	فلوریدا
CP۷۳-۲۱	ناشناخته	*Saccharum* hybrid	فلوریدا
L٦۲-۹٦	۱٥٤-٤٤ × CP٦۸-٥۲CP	*Saccharum* hybrid	فلوریدا
CP٤۸-۱۰۳	۲۹۰ × Co۳۲۰-۲۹CP	*Saccharum* hybrid	فلوریدا
TUC٦۸-۱۹	۷۹-٥٦ × NA۲۸-٥۸CP	*Saccharum* hybrid	آرژانتین
TRITON	× EROS۲۷۰Co	*Saccharum* hybrid	استرالیا
MEX٥۷-٤۷	۷٤-٤۳ × CP۷۷-٤۰CB	*Saccharum* hybrid	مکزیک
N۳۰	۱۰۲٥F۷۸ × ٦۳۷FO۷۷	*Saccharum* hybrid	آفریقا
B٤۲-۲۳۱	۱۱-۲۸ × CP۳۳٥٤B	*Saccharum* hybrid	باربادوس
IR۱/۲٦	۲٥۸-٦۲ × CP۱۰۳-٤۸CP	*Saccharum* hybrid	ایران
IR۱/۹۳	۲٥۸-٦۲ × CP۱۰۳-٤۸CP	*Saccharum* hybrid	ایران
IR٦/۲٦	۱۱۳۳-۷۰ × CP٤۳-٥۲CP	*Saccharum* hybrid	ایران
CRISTALINA		*Saccharum officinarum*	آفریقا
Spont-۱		*Saccharum spontaneum*	ایران
Sopnt-۲		*Saccharum spontaneum*	ایران

همچنین از نسبت A۲٦۰/A۲۸۰ برای اندازه‌گیری خلوص DNA استفاده شد و بهترین مقادیر برای این نسبت بین ۲-۱/۸ می باشد، که بیانگر خلوص DNA است. آلودگی با فنل کلروفرم این نسبت را افزایش و آلودگی با پروتئین آن را کاهش می دهد. نمونه‌هایی که دارای نسبتی خارج از دامنه ۲-۱/۸ بودند، حذف شده و استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی مربوطه مجدداً صورت پذیرفت.

ارزیابی نشانگر های RAPD و SSR : ٦٥ نشانگر RAPD (ساخت شرکت MWG BIOTECH، آلمان) مورد بررسی مقدماتی قرار گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمراز بر اساس روش ویلیامز و همکاران (۳۷) با تغییر جزئی در ۲٥µM مخلوط واکنش شامل ۲/٥ µl بافرx ۱۰ PCR، ۲۰۰ µM از dNTPs، ۱٥ng پرایمر، ۰/۷ واحد Taq DNA Polymerase و ٥۰ng از DNA الگو انجام شد. تکثیر در دستگاه ترموسیکلر (اپندرف) بدین شرح صورت گرفت: ۳ دقیقه در ۹۲ درجه سانتی گراد جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ٤٤ چرخه هرکدام شامل ۱ دقیقه در ۹۲ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۳٥ درجه سانتی گراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد با ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد جهت بسط نهایی انجام پذیرفت. فرآورده های تکثیر توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید غلظت ۱µg/ml در ۰/٥x بافر TBE با ولتاژ ۸٥ به

www.SID.ir

Archive of SID

مدت ۲/۵ ساعت از یکدیگر تفکیک شدند. سپس ژل تحت نور لامپ ماوراء بنفش توسط دستگاه ژل داکیومنت (Gel-documentation) عکس برداری شد. کلیه واکنشهای زنجیره ای پلیمراز بیش از دو بار تکرار گردید و از ٦٥ نشانگر RAPD اولیه، ۲۸ نشانگر که باند های واضح و پایدار تولید نمودند انتخاب گردیدند (جدول ۲).

جدول ۲- اطلاعات مربوط به تعداد باندهای مشاهده شده، باندهای چندشکل ، درصد چندشکلی و توالی نشانگرهای تصادفی RAPD

نشانگر	توالی	تعداد باند مشاهده شده	تعداد باند چندشکل	درصد چندشکلی
$OPM_{۲}$	٥′-GTGAGGCGTC-۳′	٦	٤	٦٦/٦٧
$OPM_{٤}$	٥′-CCGCATCTAC-۳′	۱۸	۱۸	۱۰۰
$OPM_{٥}$	٥′-GATGACCGCC-۳′	۲۱	۲۱	۱۰۰
$OPM_{٨}$	٥′-TGGACCGGTG-۳′	۱۹	۱۹	۱۰۰
$OPM_{۱۱}$	٥′-AAAGCTGCGG-۳′	۱۱	۸	۷۲/۷۲
$OPM_{۱٥}$	٥′-GACGGATCAG-۳′	۹	۹	۱۰۰
$OPM_{۱٦}$	٥′-CACACTCCAG-۳′	۱۲	۱۲	۱۰۰
$OPM_{۱۷}$	٥′-TTCCCCCCAG-۳′	۱٤	۱٤	۱۰۰
$OPM_{۱۸}$	٥′-TGAGTGGGT G-۳′	٦	٥	۸۳/۳۳
$OPM_{۱۹}$	٥′-GTTGCCAGCC-۳′	۱۰	۹	۹۰
$OPM_{۲۰}$	٥′-ACTTCGCCAC-۳′	۱۸	۱۸	۱۰۰
$OPM_{۲۱}$	٥′-GGTCGGAGAA-۳′	۲۱	۲۱	۱۰۰
$OPM_{۲۲}$	٥′-TCGGACGTGA-۳′	۱۸	۱۷	۹٤/٤٤
$OPM_{۲۳}$	٥′-AGACGTCCAC-۳′	۱٦	۱٥	۹۳/۷٥
$OPM_{۲٥}$	٥′-AGTCGTCCCC-۳′	۱٤	۱۲	۸٥/۷۱
$OPM_{۲۷}$	٥′-CTGCATCGTG-۳′	۱۰	۱۰	۱۰۰
$OPM_{۲۹}$	٥′-TGTAGGTGGG-۳′	۹	۹	۱۰۰
$OPM_{۳۲}$	٥′-GGACCCAACC-۳′	۱٤	۱۳	۹۲/۸٦
$OPM_{۳۳}$	٥′-GTCGCCGTCA-۳′	۲۷	۲۷	۱۰۰
$OPM_{۳٥}$	٥′-TGAGCGGACA-۳′	۲۲	۲۲	۱۰۰
$OPM_{۳٦}$	٥′-ACCTGAACGG-۳′	۱٦	۱٦	۱۰۰
$OPM_{۳۷}$	٥′-TTGGCACGGG-۳′	۱٥	۱٥	۱۰۰
$OPM_{۳۸}$	٥′-GTGTGCCCCA-۳′	۱۷	۱٥	۸۸/۲۳
$OPM_{٤۲}$	٥′-CACCGTATCC-۳′	۱٥	۱٥	۱۰۰
$OPM_{٤۸}$	٥′-GAGAGCCAAC-۳′	۲۰	۲۰	۱۰۰
$OPM_{٥۰}$	٥′-CACTCTCCTC-۳′	۱۰	٦	٦۰
$OPM_{٥٥}$	٥′-AATGGCGCAG-۳′	۲۱	۲۱	۱۰۰
$OPM_{٦۰}$	٥′-GGGAGACATC-۳′	۱٤	۱۰	۷۱/٤۲
جمع کل		٤۲۳	٤۰۲	۹۲/۸۲

برای تکثیر DNA ژنومیک نیشکر توسط نشانگر SSR، از ۱٥ جفت پرایمر طراحی شده از کتابخانه ژنومیک نیشکر، سورگوم و ذرت که به ترتیب توسط کوردیرو و همکاران (۷)، بروان و همکاران (٦) و سینیور و همکاران (۳۲) طراحی گردیده، استفاده شد (جدول ۳). واکنش زنجیره ای پلیمراز بر اساس دستورالعمل کوردیرو و همکاران (۷) با

www.SID.ir

Archive of SID

تغییرات جزئی در حجم ۱۰ µl شامل ۲۰ ng از DNA الگو، ۳۰ng از هر پرایمر (ساخت شرکت MWG BIOTECH)، ۲۰۰ µM از هر dNTP، ۱۰mM از Tris-HCl (PH ۸.۳)، ۵۰mM از KCl ، ۱/۵ mM از $MgCl_2$ ، ۰/۰۱ درصد ژلاتین، و ۰/۵ واحد Taq DNA Polymerase (Cinnagen, Iran) انجام شد و برنامه واکنش های زنجیره ای پلیمراز به صورت Touch down بر روی دستگاه ترموسیکلر (Plam-Cycler ساخت شرکت Corbett Research) بشرح زیر انجام گرفت: ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه هرکدام شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۶۰-۵۵ درجه سانتی گراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد جهت بسط نهایی انجام پذیرفت. طبق برنامه Touch down مرحله اتصال پرایمرها به دو چرخه ۱۰ و ۲۵ تایی تقسیم گردید که در طی ۱۰ چرخه اولیه، به ازاء هر چرخه، ۰/۵ درجه سانتی گراد از دمای اتصال اولیه کاهش می یافت. همچنین برای پرایمرهایی که طبق این برنامه تکثیری نشان ندادند، دمای اتصال تا ۴۸ درجه سانتی گراد کاهش داده شد. بعد از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز، ۵ میکرولیتر دای فرمامید (EDTA ۱۰ mM ، Xylem cyanol ۱mg/ml، Bromophenol blue ۱mg/ml، Formamid ۸۰٪ (V/V)) به هر نمونه اضافه شد. سپس نمونه ها به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا دو رشته DNA از هم باز شوند و بلافاصله روی یخ قرار گرفتند. سپس نمونه ها بر روی ژل پلی اکریل آمید واسرشته ساز ۶ درصد (w/v) (محلول اکریلامید ۴۰ درصد، ۷M اوره) در بافر TBE (۸۹mM Tris-borat، EDTA۱mM) به مدت ۲ ساعت و ولتاژ ۸۰ بارگذاری شدند. برای نمایان شدن باندها از نیترات نقره، دستورالعمل باسام و همکاران (۵) استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز برای هر نمونه بیش از ۲ بار تکرار گردید.

جدول ۳- اطلاعات مربوط به تعداد آلل مشاهده شده، آللهای چندشکل، اندازه آلل بر حسب bp ، PIC ، Va، Vb و F_{ST} نشانگر های SSR

شماره	نشانگرSSR[1]	تکرار	تعداد آلل	تعداد آلل چند شکل	اندازه آلل بر حسب bp	PIC	Va	Vb	F_{ST}	P-value
۱	SMC۲۲۲CG	$(CA)_{۲۴}$	۶	۴	۲۱۰-۴۰۰	۰/۵۹	۰/۰۵	۰/۴۴	۰/۱۰	۰/۰۴
۲	SMC۲۲۶CG	$(CA)_{۱۰}$	۱۲	۱۰	۱۳۵-۱۸۷	۰/۷۰	۰/۰۱	۰/۴	۰/۰۲	۰/۰
۳	SMC۲۴۸CG	$(TTA)_{۶}$	۵	۳	۱۵۵-۲۵۰	۰/۶۶	۰/۰۲	۰/۴۱	۰/۰۵	۰/۰۱
۴	SMC۳۱۹CG	$(CA)_{۱۷}$	۱۳	۱۲	۱۵۴-۲۲۳	۰/۶۴	۰/۰۳	۰/۴	۰/۰۷	۰/۰۱
۵	SMC۴۷۷CG	$(CA)_{۳۱}$	۸	۷	۱۲۳-۲۰۱	۰/۷۸	۰/۰۲	۰/۴	/۰۶	۰/۰۱
۶	SMC۸۶۳CG	$(TC)_{۶}$	۸	۵	۲۷۵-۳۸۶	۰/۶۷	۰/۰۲	۰/۴۲	۰/۰۵	۰/۰۱
۷	SMC۱۰۳۹CG	$(TG)_{۱۷}$	۱۴	۱۳	۱۱۰-۲۷۰	۰/۷۸	۰/۰۹	۰/۴۰	۰/۱۸	۰/۰
۸	Sb۴-۱۲۱	$(AC)_{۱۴}$	–	-	-	-	-	-	-	-
۹	Sb۵-۸۵	$(AG)_{۱۲}$	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۰	Sb۵-۲۱۴	$(AG)_{۱۴}$	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۱	Sb۶-۳۶	$(AG)_{۱۹}$	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۲	Sb۶-۵۷	$(AG)_{۱۸}$	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۳	Sb۶-۸۴	$(AG)_{۱۴}$	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۴	SBkAFGK۱	$(AAC)_{۹}$	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۵	ZM-ADH۲N	$(AG)_{۷}$	-	-	-	-	-	-	-	-
جمع کل			۶۶	۵۴						

[1] نشانگرهای ۷-۱، ۱۴-۸ و ۱۵ به ترتیب مربوط به کتابخانه ژنومی نیشکر، سورگوم و ذرت می باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه داده های مولکولی: به خاطر کیفی بودن داده ها، نخست جدول توافقی صفر و یک برای هر یک از نشانگرها تشکیل گردید. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard) و ضریب تشابه تطابق ساده (SM) به ترتیب برای هر یک از نشانگرها و داده های ترکیبی هر دو نشانگر به دست آمد و رسم دندروگرام به روش UPGMA جهت گروه بندی رقمهای مختلف نیشکر و محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک با استفاده از نرم افزار NTSYS نگارش ۲/۰۲ انجام گردید (۲۹). تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای به دست آوردن سهم هر جایگاه ریزماهواره در محاسبه تمایز ژنتیکی و همچنین درک روابط ارقام داخل نواحی و بین نواحی (آسیا، آمریکای شمالی، آمریکای مرکزی، آمریکای جنوبی و آفریقا) بر اساس هر دو نشانگر توسط نرم افزار ARLEQIN نگارش ۳/۰۰ انجام شد (۳۰). برای به دست آوردن یک مفهوم آماری از تجزیه واریانس این کار با انجام ۱۶۰۰۰ نمونه برداری تصادفی انجام شد. تنوع ژنتیکی (هتروزیگوسیتی) برای جایگاههای ریزماهواره بر طبق فرمول ویر و همکاران (۳۶) با استفاده از نرم افزارExcel برآورد گردید:

$PIC = 1 - \Sigma P^{2}_{ij}$ P_{ij}: فراوانی j امین الگو برای i امین نشانگر ریزماهواره

نتایج و بحث

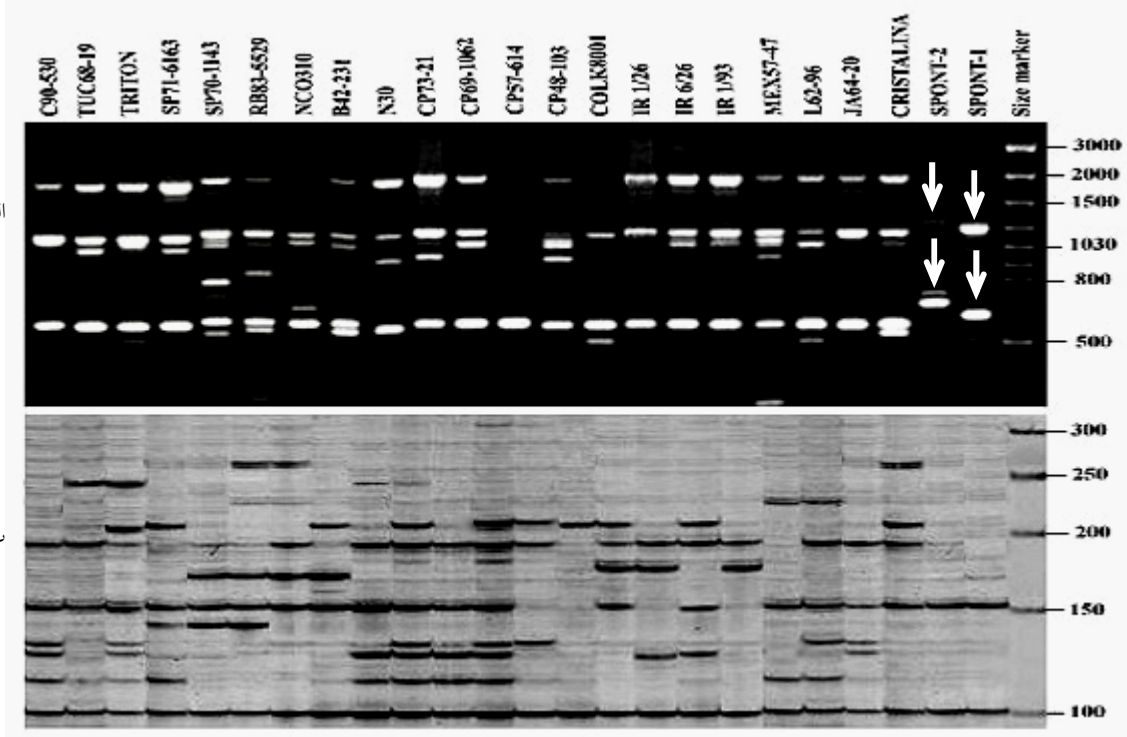
تجزیه نشانگر RAPD: از ٦٥ نشانگر تصادفی مورد آزمایش، ۲۸ نشانگر در بین کلیه نمونه های گیاهی محصولات قابل تکثیر و چندشکلی نشان دادند (جدول ۲). همه رقمهای نیشکر و نمونه های خودرو توسط نشانگر RAPD از یکدیگر تفکیک گردیدند که نتایج به دست آمده با گزارشات پن و همکاران (۲۵) و هاروی و همکاران (۱۵) در خصوص توانایی نشانگر RAPD در تفکیک نیشکرهای خودرو از رقمهای الیت، مطابقت نشان داد. این اطلاعات ثابت می کند که نشانگر RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی نیشکر کارآمد می باشد. اندازه باندها بین bp ۲۹۲ تا bp ۲۸۲۲ و تعداد باندها از ٦ تا ۲۷ (متوسط ۱۵/۱) در هر نشانگر متغیر بود. در مجموع ٤۲۳ قطعه باند تکثیر گردید که ٤۰۲ قطعه در بین کلیه نمونه های گیاهی مورد آزمایش چندشکل بودند و نشانگر $OPM_{۳۳}$ و $OPM_{٤}$ با ۲۷ و ٤ باند چندشکل به ترتیب بیشترین و کمترین باند چندشکل را به خود اختصاص دادند. تعداد باندها در نمونه های مختلف، متفاوت بود زیرا تعداد باندهای RAPD آشکار شده توسط هر نشانگر بستگی به توالی نشانگر و میزان تنوع در نمونه های مورد استفاده دارد. متوسط چندشکلی برای رقمهای نیشکر ١٤/٣٦ برآورد گردید که از ٤۰۲ باند چندشکل، ٦۳ باند منحصراً در نمونه های خودرو دیده شد. برای نمونه نشانگرهای $OPM_{۱۸}$ (باند ۱۵۵۰bp)، $OPM_{۱۹}$ (باند ۱۲٤۲bp)، $OPM_{۲۲}$ (باند ۱٤۰۱bp)، $OPM_{۲۷}$ (باند ۹۳۰bp و ۱۰۸۱bp)، $OPM_{۳۲}$ (باند ۷۸۸bp و ۱۹٤۹bp)، $OPM_{٥۰}$ (باند ۱۷۰۰bp، ۱۸٤۹ bp، ۱۹۹۰bp) و $OPM_{٤۲}$ (باند ٦۱۰bp، ٦۸۰ bp، ۷۰۰bp، ۱۲۰۰ bp، ۱۳۰۰ bp) (شکل ۱، الف) باندهای اختصاصی و چندشکل در نمونه های خودرو تکثیر دادند. این نتایج نشان می دهد که این باندهای منحصر بفرد می توانند به عنوان نشانگرهای مخصوص گونه در برنامه های آتی اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند. مطابق با نتایج حاضر، قابلیت توارث باندهای RAPD در جنس ساکاروم و استفاده موفقیت آمیز از آنها به عنوان نشانگرهای مولکولی توسط هوکات و همکاران (۱۸) گزارش شد.

تجزیه نشانگر SSR : الف – قابلیت انتقال نشانگرهای ریزماهواره ذرت و سورگوم: نقشه های مقایسه ای نشان دادند که در طی ٦٥ میلیون سال تکامل، هنوز قطعات کروموزومی بزرگی در بین ژنوم اعضای خانواده غلات وجود دارد که ترتیب ژنها در آنها حفظ شده است (۲۷). بر اساس نقشه های مقایسه ای شباهت زیادی بین ژنوم سورگوم، نیشکر و ذرت گزارش شد (١٦،١٤) و مطالعات گرویت و همکاران (۱۳) نشان داد که نیشکر و سورگوم از

www.SID.ir

Archive of SID

نظر سازماندهی کروموزومی شباهت و خویشاوندی نزدیکتری در مقایسه با ذرت نسبت به یکدیگر دارند. همچنین اطلاعات توالی یابی شده از چندین گیاه زراعی، وجود همولوژی کافی بین ژنومها در نواحی احاطه کننده جایگاههای ریزماهواره را نشان داد (۱۹).



شکل ۱- الگوی تکثیر نمونه های نیشکر توسط نشانگرRAPD و SSR به ترتیب نشانگر $OPM_{۴۲}$ (فلش نشان دهنده باندهای اختصاصی ایجاد شده در نمونه های خودرو نیشکر می باشد) (الف) و SMC۱۰۳۹CG (ب)

بدین ترتیب پرایمرهای SSR طراحی شده بر اساس توالیهای ایجاد شده از یک گیاه می تواند برای تکثیر جایگاههای ریزماهواره در گونه های خویشاوند، گونه هایی که اطلاعات موجود در خصوص ریزماهواره برای آنها کافی نیست و یا اینکه اصلاً وجود ندارد، استفاده شود (۳۱). بنابراین بخشی از مطالعه حاضر به منظور بررسی قابلیت انتقال و تکثیر نشانگرهای ریزماهواره ذرت و سورگوم در ژنوم نیشکر جهت معرفی منابع نشانگری جدید برای جنس ساکاروم انجام شده است. از ۸ نشانگر SSR طراحی شده بر اساس ژنوم سورگوم و ذرت (جدول ۲) که قابلیت تکثیر و چندشکلی آنها بر روی ژنوم سورگوم و ذرت توسط آگراما و همکاران (۲) و بروان و همکاران (٦) به اثبات رسیده بود، هیچ کدام محصولات قابل تکثیر را در ژنوم نیشکر نشان ندادند و بهینه سازی وضعیت واکنش زنجیره ای پلیمراز، تغییر در دمای هم سرشته سازی و مقدار $MgCl_۲$ نیز تأثیری بر روی قابلیت تکثیر نداشت. سه دلیل برای فقدان تکثیر و قابلیت انتقال نشانگرهای ریزماهواره سورگوم و ذرت جهت تکثیر نواحی ریزماهواره نیشکر پیشنهاد می شود: ۱- ناکافی بودن تعداد نشانگرهای SSR سورگوم و ذرت. با افزایش تعداد نشانگرهای گونه های خویشاوند، شانس یافتن مجموعه ای از نشانگرهای SSR با قابلیت انتقال و چندشکلی در گونه هدف افزایش خواهد یافت. ۲- پرایمرها احتمال دارد نواحی از DNA را تکثیر دهند که در یک گونه اجدادی نقش توسعه نواحی ریزماهواره را به عهده دارد ولی در گونه خویشاوند دیگر، اصلا وجود نداشته باشد (۸) و ۳- متفاوت بودن توالیهای احاطه کننده نواحی SSR در گونه های خویشاوند. استفاده از نشانگرهای SSR طراحی شده

www.SID.ir

Archive of SID

بر اساس ژنوم ذرت به عنوان یک روش مؤثر و با پتانسیل بالا برای آشکارسازی روابط ژنتیکی بین جنس و گونه های مختلف ساکاروم و تنوع ژنتیکی نیشکر اثبات شده است (۳۱). همچنین در مطالعه ای دیگر از بین ۲۰ نشانگر ریزماهواره نیشکر سه نشانگر (۱۵ درصد) در سورگوم و ایریانتوس (*Erianthus*)، جنس خویشاوند نیشکر، تکثیر نشان دادند (۸). لذا پیشنهاد می گردد که از این سری نشانگرها در برنامه های انگشت نگاری و شناسایی واریته ای نیشکر استفاده نگردد و از آنجا که در موفقیت تکثیر بین گونه ای/ جنسی نشانگرهای SSR، می توان تعداد نشانگر یک فاکتور مهم می باشد (٦)، تعداد نشانگرها را تا حدی که امکانات آزمایشگاهی و اقتصادی اجازه دهد، افزایش داد.

ب - چندشکلی نشانگر های SSR طراحی شده از کتابخانه ژنومی نیشکر: درجه بالایی از چندشکلی در SSR های نیشکر به کار برده شده در این آزمایش مشاهده شد. از مجموع ۷ جفت پرایمر طراحی شده بر اساس ژنوم نیشکر (۷)، همگی چندشکل بودند و ٦٦ آلل تکثیر گردید. تعداد آللها برای هر جایگاه از ۵ تا ١٤ آلل با متوسط ۹/۳۳ آلل متغیر بود (جدول ۳). تعداد آللهای مشاهده شده با گزارشات پن و همکاران (٢٦) و کوردیرو و همکاران (۷) مطابقت بالایی نشان داد و تفاوتهای جزئی در نتایج می تواند به دلیل منابع ژنی متفاوت و همچنین تغییر در طول واحدهای تکراری ریزماهواره ها بر اثر وقوع جهش باشد. در مطالعه ای مشابه توسط مایکو و همکاران (۲۳)، ۱۹-۵ آلل با استفاده از ۸ نشانگر SSR بر روی ۸۱ رقم نیشکر گزارش داده شد. میزان اطلاعات چند شکلی یا PIC (Polymorphism Information Content) معیاری برای اندازه گیری چندشکلی نشانگر می باشد (۳) و با محاسبه این شاخص می توان بهترین جایگاه را برای مطالعات آتی گزینش و معرفی نمود. میزان PIC بین ۰/۵۹ تا ۰/۷۸ محاسبه گردید. بیشترین مقدار PIC مربوط به جایگاههای SMC١٠٣٩CG و SMC٤٧٧CG به میزان ۰/۷۹ می باشد که نشان دهنده کارآیی بالای آنها در تمایز نمونه های مورد استفاده در این تحقیق می باشد و می توان آنها را جهت مطالعات مشابه پیشنهاد کرد. این نتایج با گزارشات کوردیرو و همکاران (۷) مطابقت بالایی نشان داد علی رغم اینکه تعداد نمونه های مورد استفاده در هر دو مطالعه با هم متفاوت بودند; البته ارزش PIC برای هر نشانگر SSR ثابت نیست، وقتی تعداد یا ماهیت ژنتیکی نمونه های مورد آزمایش تغییر می کند، پارامتر PIC نیز به دنبال آن تغییر خواهد کرد (٢٦). تکرارهای دوتایی ریزماهواره ای در کتابخانه ژنومی نیشکر، تکرارهای غالب می باشند; به منظور بررسی رابطه بین قطعات تکثیری و فراوانی تکرارهای دوتایی همبستگی ساده محاسبه شد. پن و همکاران (٢٤)، کالینگو و همکاران (۱۹) نوعی ارتباط مثبت بین این دو متغییر گزارش دادند ولی در مطالعه حاضر همبستگی مشاهده نشد (R^2 =۰/۰۰۰۱). همچنین در این تحقیق از نشانگرهای SSR طراحی شده بر اساس ژنوم نیشکر به منظور شناسایی دو نمونه جمع آوری شده از ایران (Spont-۱ و Spont-۲) که شباهت زیادی به گونه خودرو نیشکر داشتند، استفاده گردید. گزارشات منتشر شده، نشان می دهد که ایران جزء سه منطقه خاستگاه نیشکر خودرو (*S.spontaneum*) می باشد (۳۵). از مجموع ۷ نشانگر مورد استفاده، نشانگرهای SMC٣١٩CG، SMC٤٧٧CG و SMC٢٢٦CG، ۵-۲ قطعه در این دو نمونه تکثیر دادند. این نتایج با گزارشات کوردیرو و همکاران (۹، ۸) که با استفاده از نشانگر SSR نیشکر، تعداد قطعات تکثیری کمتری در گونه های خودرو نیشکر در مقایسه با رقمهای تجاری و گونه والدی (*S.officinarum*) مشاهده کردند، مطابقت داشت. همچنین پروفایلهای آللی منحصر بفرد می تواند به منظور شناسایی رقمهای تجاری نیشکر و گونه های اجدادی، که به وفور در برنامه های هیبریداسیون بین گونه ای نیشکر استفاده می گردد، به کار گرفته شود (۹). از بین ۷ نشانگر SSR نیشکر، نشانگر SMC٢٢٢CG در کلیه رقمهای تجاری تکثیر نشان داد اما در نمونه های خودرو و گونه والدی تکثیری نشان نداد که می توان از این نشانگر برای شناسایی رقمهای

www.SID.ir

Archive of SID

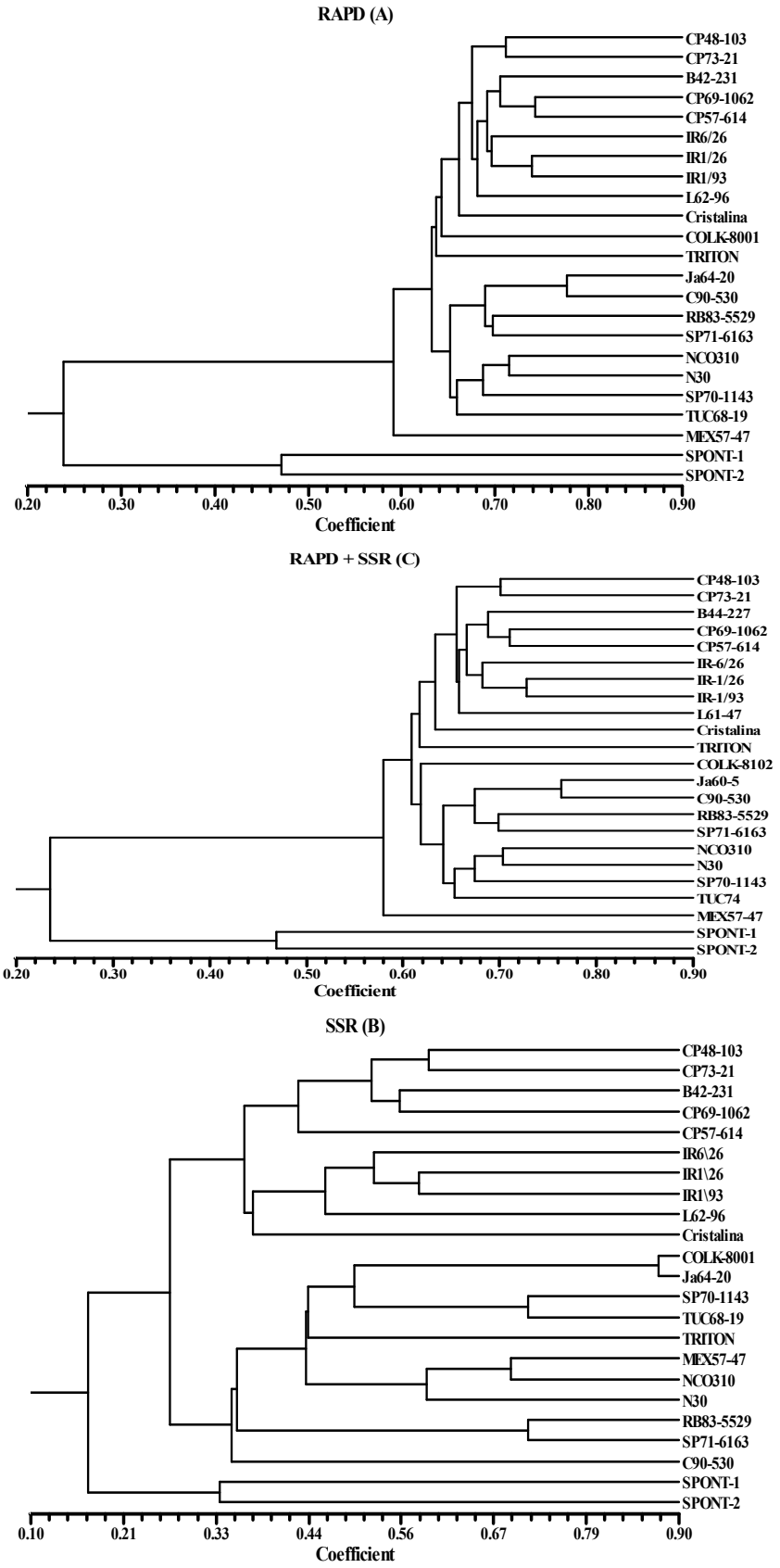
تجاری از گونه های اجدادی استفاده کرد. همچنین نشانگر SMC۲۲٦CG دو باند ۱۵۰bp و ۱٦۵bp در نمونه های خودرو تکثیر داد که در هیچ یک از رقمهای تجاری و گونه والدی دیده نشد.

شباهت ژنتیکی و روابط خویشاوندی: ضریب تشابه ژنتیکی بین رقمهای نیشکر و دو نمونه خودرو نیشکر بر اساس نشانگر RAPD و SSR، به ترتیب در محدوده ۰/۲۱ (بین MEX۵۷-٤۷ و Spont-۱،۲) تا ۰/۷۸ (بین Ja٦٤-۲۰ و C۹۰-۵۳۰) و ۰/۰۵ (بین Spont-۱،۲ و CP٤۸-۱۰۳ و SP۷۱-٦۱٦۳) تا ۰/۸۷ (بین Colk-۸۰۰۱ و Ja٦٤-۲۰) بود که نشان دهنده سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در بین نمونه های مورد آزمایش می باشد. بیشترین فاصله جفتی در هر دو سیستم نشانگری بین رقمهای هیبرید و Spont-۱،۲ بود. ضریب بالای تشابه ژنتیکی آشکار شده توسط RAPD در مقایسه با SSR، حاکی از چندشکلی بالای نشانگر SSR در مقایسه با RAPD می باشد و این می تواند بیانگر این نکته باشد که نشانگر RAPD برای ارزیابی و تعیین روابط ژنتیکی بین رقمها به اندازه SSR کارآیی ندارد (۳۳). در مطالعه ای مشابه توسط آگراما و همکاران (۲)، نتیجه ای مشابه به دست آمد و نشانگر SSR در مقایسه با RAPD چندشکلی و توانایی بیشتری در ارزیابی تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپهای مختلف سورگوم نشان داد. به منظور مقایسه ماتریس های تشابه به دست آمده از هر دو نشانگر، آزمون مانتل انجام گردید و میزان همبستگی در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود (P = ۱/۰۰۰، t = ۳/۹۳٦۲، r = ۰/٤٦). ضریب کوفنیتیک برای دندروگرام نشانگر RAPD و SSR همبستگی مناسبی نشان داد (به ترتیب r = ۰/۹۸ و r = ۰/۷۹). دو نشانگر میزان بالایی تشابه در توپولوژی دندروگرام با مقداری تفاوت در محل بعضی از رقمها در گروههای اصلی، نشان دادند (شکل ۲). کلیه دندروگرام ها انعکاسی از روابط خویشاوندی بین رقمها بر اساس ناحیه پراکنش نشان دادند. در دندروگرام SSR (شکل۲B)، یک گروه اصلی شامل کلیه رقمهای ایرانی، خارجی و گونه والدی مشاهده گردید درحالی که دو نمونه Spont-۱،۲ متعلق به گونه *S.spontaneum* با ضریب تشابه ۰/۱۷ به طور جداگانه گروه بندی گردید. در مطالعه ای مشابه هیبرید های ساکاروم و گونه *S. officinarum* از گونه *S. spontaneum* با ضریب تشابه ۰/۱٦ بطور جداگانه گروه بندی شد (۷) که با نتایج این مطالعه مطابقت بالایی نشان داد.

دندروگرام ایجاد شده با نشانگر RAPD (شکل ۲A) با کمی اختلاف، توپولوژی مشابهی با SSR نشان داد. برای مثال، رقم استرالیایی، Triton، با رقم Cristalina و رقمهای آمریکایی گروه بندی گردید، درحالی که در دندروگرام SSR در یک گروه دیگر و جدای از آنها قرار گرفت. علاوه بر این تعدادی روابط جالب توجه و مشترک با استفاده از هر دو نشانگر در بین رقمها مشاهده گردید. برای مثال گونه های *S. spontaneum* به طور جداگانه از رقمهای تجاری و گونه *S. officinarum* گروه بندی گردید که این نتایج با گزارشات آلوالوا و همکاران (۳) ، آرو (٤) و سلوی و همکاران (۳۱) به ترتیب با استفاده از نشانگر TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) و SRR، جایی که جنس و گونه های مختلف ساکاروم در دندروگرام به صورت جداگانه گروه بندی شدند، مطابقت نشان داد. در هر دو سیستم نشانگری رقمهای ایرانی (کلونهای امید بخش)، رقمهای آمریکای شمالی و Cristalina با یکدیگر در یک زیر گروه قرار گرفتند. نتایج به دست آمده در دندروگرام کلی (شکل ۲C) که حاصل ترکیب کلیه داده های حاصل شده از دو سیستم نشانگری می باشد، بسیار شبیه به نتایج ایجاد شده توسط هر یک از نشانگرها به طور جداگانه بود; البته این دندروگرام با وجود تفاوتهای اندک تصویر بهتری از روابط خویشاوندی بین اغلب رقمها بر اساس نواحی جغرافیایی محل پراکنش یا اطلاعات شجره ای نمایان ساخت. در دندروگرام C ۲، نمونه های *S. spontaneum* جدا از دیگر رقمها با ضریب ۰/٤۷ گروه بندی گردید که این نتیجه نشان دهنده توانایی این دو سیستم نشانگری در جداسازی و تفکیک گونه های جنس ساکاروم می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- دندروگرام حاصل از نشانگر RAPD (A) ، SSR (B) و ترکیب SSR و RAPD (C) با استفاده از ضریب تشابه Jaccard (A,B) و SM (C) و روش UPGMA.

www.SID.ir

Archive of SID

در گروه اصلی، کلاستر کوچکی شامل رقمهای ایرانی (IR۱/۹۳، IR۱/۲٦، IR٦/۲٤)، آمریکای شمالی و Cristalina تشکیل شد که نشان دهنده ارتباط خویشاوندی بسیار نزدیک بین این نمونه ها و همچنین گروه بندی آنها بر اساس اطلاعات شجره بود; زیرا بر اساس اطلاعات شجره ای Cristalina به عنوان والد مادری در برنامه های اصلاحی ناحیه آمریکای شمالی استفاده شده است و در ایران نیز رقمهای ناحیه آمریکای شمالی، CP٤٨-۱۰۳، CP٦۲-۲٥۸ و CP٥۲-٤۳، CP۷۰-۱۱۳۳ به ترتیب، به عنوان والدین IR۱/۹۳، IR۱/۲٦ و IR٦/۲٤ استفاده شده است که همگی در یک زیر گروه قرار دارند. از طرفی شباهت ژنتیکی بین IR۱/۹۳ و IR۱/۲٦، IR٦/۲٦ و IR۱/۲٦، IR۲٦/٦ و IR۱/۹۳ به ترتیب ۰/۷۳، ۰/۷۲ و ۰/٦٥ محاسبه گردید که این شباهت احتمالاً به دلیل والدین آمریکایی مشترک (رقمهای CP)، می باشد.

جدول٤- تجزیه واریانس مولکولی برای مطالعه روابط ژنتیکی با استفاده نشانگر RAPD و SSR

منابع تغییرات	df	SS	Variance components	Percentage variance
بین نواحی (RAPDs)	٤	٥٥/۸۸۳	۰/۳٦۱^{ns}	۲/۷۹
داخل نواحی (RAPDs)	۱٥	۱۸۸/٥٦۷	۱۲/٥۷۱*	۹۷/۲۱
کل	۱۹	۲٤٤/٤٥۰	۱۲/۹۳٥	
بین نواحی (SSRs)	٤	۷/٥۰۰	۰/۱٦۹*	۱۲/۱۷
داخل نواحی (SSRs)	۱٥	۱۸/۳۰۰	۱/۲۲۰*	۸۷/۸۳
کل	۱۹	۲٥/۸۰۰	۱/۳۸۹	

تجزیه واریانس مولکولی: تجزیه واریانس مولکولی برای نشانگر SSR محاسبه گردید (جدول ۳). در این جدول Va (تنوع ژنتیک بین جمعیتی)، Vb (قسمتی از تنوع کل که توسط افراد، داخل جمعیت، توجیه می شود)، F_{ST} یاGenetic Differentiation (میزان تفاوت در فراوانی آللی بین جمعیتها از نظر آللهای هر نشانگر) و P-value (سطح احتمال معنی دار بودن) آورده شده است. نشانگر SMC۱۰۳۹CG بیشترین تنوع بین جمعیتی را توجیه کرد ولی در داخل جمعیتها اکثر نشانگرهای SSR به یک میزان تنوع موجود را توجیه کردند. بیشترین F_{ST} به ترتیب مربوط به نشانگر SMC۱۰۳۹CG و SMC۲۲۲CG و به میزان ۰/۱۸ و ۰/۱۰ است که نشان دهنده قابلیت بالای آن در تمایز و شناسایی جمعیتها است. تمامی مقادیر F_{ST} معنی دار بودند. همچنین تجزیه واریانس مولکولی برای هر نشانگر جداگانه در بین پنج ناحیه پراکنش شامل آسیا، آمریکای شمالی، آمریکای مرکزی، آمریکای جنوبی و آفریقا محاسبه گردید (جدول ٤). قابل ذکر است که از ۲۳ نمونه گیاهی، نمونه های خودرو (Spont-۱،۲) و Triton (تنها نمونه استرالیایی) در تجزیه وارد نشدند. حدود ۱۲/۱۷ درصد از واریانس کل جزء واریانس بین ناحیه ای و ۸۷/۸۳ درصد جزء واریانس درون جمعیتی توسط نشانگر SSR توجیه گردید درحالی که هیچ تفاوت معنی داری بین نواحی پنجگانه توسط نشانگر RAPD مشاهده نشد؛ لذا این نتیجه بیانگر توانایی بالای نشانگر SSR نسبت به RAPD در تفکیک نواحی (جمعیتها) می باشد. درصد بالای واریانس درون جمعیتی نشان دهنده سطح بالای

www.SID.ir

Archive of SID

هتروزیگوسیتی در افراد مورد مطالعه و همچنین طبیعت پلی پلوئیدی نیشکر است (۳). سطح بالای تنوع بین کلونهای داخل جمعیت در گونه علف بوفالو (*Buchloe dactyloides*) و علف گندم (*Agropyron spp*) که مانند نیشکر طبیعت دگر بارور و پلی پلوئیدی دارند به ترتیب توسط هاف و همکاران (۱۷) و ملیش و همکاران (۲۰) گزارش گردید. با توجه به معنی دار شدن واریانس بین جمعیتی، میزان F_{ST} که نشان دهنده تفاوت در فراوانیهای آللی بین جمعیتها می باشد محاسبه گردید. بر این اساس بیشترین مقدار F_{ST} بین جمعیتهای آفریقا و آمریکای جنوبی (F_{ST} = ۰/۳۰) مشاهده شد که در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود و نشان می دهد رقمهای مربوط به این دو ناحیه دارای زمینه ژنتیکی متفاوتی بوده که می تواند مواد اصلاحی خوبی به شمار آیند درحالیکه میزان F_{ST} بین جمعیت آفریقا و آمریکای شمالی صفر بود که حاکی از وجود شباهت ژنتیکی بالا بین این دو جعیت می باشد. بین جمعیتهای آمریکای شمالی و آسیا، آمریکای مرکزی و آسیا، آفریقا و آسیا، آمریکای مرکزی و آفریقا هیچگونه تمایز معنی داری وجود نداشت درحالیکه مقدار F_{ST} بین آمریکای جنوبی و کلیه جمعیتها و همچنین آمریکای مرکزی و شمالی معنی دار بود که این نتایج با گروه بندی رقمها بر اساس دندروگرام تطابق بالایی نشان داد؛ برای مثال همانگونه که در دندروگرام (۲B) مشاهده شد رقمهای آمریکای شمالی، آفریقایی (Cristalina) و آسیایی (IR۱/۹۳، IR۱/۲٦، IR٦/۲٤) در یک گروه قرار گرفتند که نشان دهنده نزدیکی این رقمها از لحاظ ژنتیکی نسبت به هم می باشد که این نتیجه در تطابق با نتایج حاصل از بررسی تنوع بین جمعیتی (F_{ST}) می باشد.

طبق تحقیقات، تا کنون هیچ مطالعه مشابهی با استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت بررسی ذخائر ژنتیکی نیشکر در ایران گزارش نگردیده است. این مطالعه برای اولین بار کارآیی استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR و RAPD را به صورت توأمان جهت ارزیابی ذخائر ژنتیکی نیشکر و ارتباط بین رقمهای ایرانی و خارجی گزارش داد. هر دو نشانگر اطلاعات مفیدی را در خصوص سطح چندشکلی و تنوع در ذخائر ژنتیکی نیشکر نشان دادند و این وضعیت توانایی آنها را در ارزیابی نمونه های ذخائر ژنتیکی ثابت می کند همچنین کارآیی بالای نشانگر SSR نسبت به RAPD در تمایز بین جمعیتها ثابت گردید.

سپاسگزاری: بدین وسیله از مسئولین محترم دانشگاه زنجان و شهرکرد برای تأمین وسایل و امکانات و هزینه اجرای این طرح صمیمانه قدردانی می‌گردد، همچنین از مسئولین محترم مرکز تحقیقات شرکت کشت و توسعه نیشکر اهواز آقایان مهندس حمدی، مهندس آمیلی، مهندس بنی‌عباسی و سایر عزیزان به پاس کمکهای بی‌دریغ ارزنده علمی و همکاری در زمینه اجرای طرح، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Adonina, I.G.; Salina, E.A.; Restsova, E.G. and Roder, M.S. (2005). Transferability of wheat microsatellite to diploid Aegilops species and determination of chromosomal localization of microsatellites in the S genome. Genome. 48: 959-970.

2. Agrama, H.A. and Tuinstra, M.R. (2003). Phylogenetic diversity and relationship among *sorghum* accessions using SSRs and RAPDs. Africa Journal Biotechnical. 2: 334-340.

3. Alwala, S.; Suman, A.; Arro, J.A.; Veremis, J.C. and Kimbeng, C.A. (2006). Target region amplification (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. Crop Sci. 46: 448-455.

4. Arro, J. (2005). Genetic diversity among sugarcane clones using Trarget Region Amplification Polymorphism (TRAP) markers and pedigree relationships. University of the Louisiana State. 78pp.

5. Bassam, B.J. and Caetano-Anolles, G. (1993). Silver staining of DNA in polyacrilamide gels. Appl Biochem Biotechnol. 42:181-188

6. Brown, S.M.; Hopkins, M.S.; Mitchell, S.E.; Senior, M.L.; Wang, T.Y. and Duncan, R.R. (1996). Multiple methods for the idetification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in

www.SID.ir

Archive of SID

sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) *moench*], Theor Appl Genet. 93. 190-198.

7. Cordeiro, G.M.; Taylor, G.O. and Henry, R.J. (2000). Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum spp*.) a highly polyploidy species. Plant Sci. 155:161-168.

8. Cordiero, G.M.; Casu, R. ; McIntyre, C.L.; Manners, J.M. and Henry, R.J. (2001). Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum spp*.) ESTs cross transferability to erianthus and sorghum. Plant Sci. 160:1115 - 1123.

9. Cordeiro, G.M.; Pan, Y.B. and Henry, R.J. (2003). Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. Plant Sci. 165: 181-189.

10. da Silva, J. (2001). Preliminary analysis of microsatellite markers derived from sugarcane expressed sequence tags (ESTs). Genet Mol Biol. 24: 155-159.

11. Deren, C.W. (1995). Genetic base of U.S. mainland sugarcane. Crop Sci. 35:1195-1199.

12. D'Hont, A.; Lu, Y.H.; Feldmann, P. and Glaszmann, J.C. (1993). Cytoplasmic diversity in sugarcane revealed by heterologous probes. Sugarcane. 1: 12-15.

13. Grivet, L.; D'Hont, A.; Dufour, P.; Hamon, P.; Roques, D. and Glaszmann, J.C. (1994).Comparative genome mapping of sugarcene with other species within the *Andropogoneae* tribe. Heredity. 73: 500-508.

14. Guimaraes, C.T.; Sills, G.R. and Sobral, B.W.S. (1997). Comparative mapping of *Andropogoneae*: *Saccharum* and its relation to sorghum and maize. Proc Natl Acad Sci (U.S.A). 94: 14261-14266.

15. Harvey, M.; Huckett, B.I. and Botha, F.C. (1994). Use of polymerase chain reaction (PCR) and random amplification of polymorphic DNAs (RAPDs) for the determination of genetic distances between 21 sugarcane varieties. Proc Sci Afr Sugar Technol Assn. 68: 36-40.

16. Hernandez, P.; Cordeiro, G.; Laurie, D.; Martin, A. and Snape, J. (2001). Microsatellite and RFLP probes from maize are efficient source of molecular markers for the biomass energy crop *Miscanthus*. Theor Appl Genet. 102: 616-622.

17. Huff, D.R.; Peaka, R. and Smouse, P.E. (1993). Rapd variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloe dactyloides)*. Theor Appl Genet. 86: 927-934.

18. Huckett, B.I. and Botha, F.C. (1995). Stability and potential use of RAPD markers in a sugarcane genealogy. Euphytica. 86 :117-125.

19. Kuleung, C.; Baenziger, P.S. and Dweilat, I. (2004). Transferability of ssr markers among wheat, rye and triticale. Theor Appl Genet. 108: 1147-1150

20. Mellish, A.B.; Couluman, B. and Ferdinandez, Y. (2002). Genetic relationships among selected crested wheatgrass cultivars and species determined on the basis of aflp markers. Crop Sci. 42: 1662-1668.

21. Ming, R.; Liu, S.C.; Moore, P.H.; Irvine, J.E. and Paterson, A.H. (2001). QTL analysis in a complex autopolyploid: genetic control of sugar content in sugarcane. Genome Res. 11: 2075-2084

22. Murry, H.C. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant. DNA. Nucleic Acid Res. 8:4321-4325.

23. Muyco, R.R. (2002). Genetic diversity in sugarcane (*Saccharum spp* L) from the active germplasm collection of philsurin based on coefficient of parentage, agromorphological traits and DNA microsatellite markers. University of the Philippines Los Banos College Laguna Philippines. 231 pp

24. Pan, Y.B. ; Cordeiro, G.M. ; Richard, E.P. and Henry, R.J. (2003). Molecular genotyping of sugarcane clones with microsatellite DNA markers. Maydica. 48: 319-329.

25. Pan, Y.B. ; Burner, D. ; Legendre, B.L. ; Grisham, M.P. and White, W.H. (2004). An assessment of the genetic diversity within a collection of *Saccharum spontaneum* with RAPD-PCR. Genet. Res Crop Evol. 51: 895-903.

26. Pan, Y.B. ; Comstock, J. and Scheffler, B. (2005). Highly polymorphic microsatellite DNA markers for U.S sugarcane germplasm evaluation and variety fingerprinting, Plant and Animal Genome. XIII., P. 36.

27. Paterson, A.H. ; Lin, Y.R. ; Li, Z. ; Schertz, K. ; Doebley, J.F. ; Pinson, S.R.M. ; Liu, S.C. ; Stansel, J.W. and Irvine, J.E. (1995). Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. Science (Washington. D.C). 269: 1714-1718

28. Pinto, L.R. ; Oliveira, K.M. ; Ulian, E.C. ; Garcia, A.A.F. and de Souza, A.P. (2004). Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. Genome. 47: 795-804.

www.SID.ir

Archive of SID

29. Rohlf, F.J. (1998). NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.00. Exeter Software. Setauket. NY.

30. Schneider, S. ; Roessli, D. and Excoffier, L. (2001). Arlequin: A software for population genetics data analysis. Version 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dep. Of Athropology, University of Geneva, Geneva.

31. Selvi, A. ; Nair, N.V. ; Balasundaram, N. and Mohapatra, T. (2003). Evaluation of maize microsatellite markers for genetic diversity analysis and fingerprinting in sugarcane. Genome. 46:394-403.

32. Senior, M.L. and Heun, M. (1993). Mapping microsatellites and polymerase chain confirmation of the targeted repeats using a CT primer. Genome. 36: 884-889.

33. Staub, J.E. ; Danin-Poleg, Y. ; Fazio, G. ; Horejsi, T. ; Reis, N. and Katzir, N. (2000). Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. Euphytica. 115: 225–241.

34. Stevenson, G.C. (1965). Genetic and breeding of sugarcane. Longmans. London.

35. Tai, P.Y.P. and Miller, J.D. (2001). A core collection for saccharum spontaneum L. from the world collection of sugarcane. Crop science society of America. 41:879-885

36. Weir, B.S. (1990). Genetic-data Analysis Method for Discrete Genetic Data. Sinauer Association Inc Sunderland, MA, USA.

37. Williams, J.G.K.; Kubelike, A.R.; Levak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplification by arbitary primers is useful as genetic markers. Nucleic Acids Res.18: 6531-6535.

Assessment of Genetic Relationships Clones of Iranian and Foreign Sugarcane by SSR and RAPD Molecular Markers

Karami S. [1], Barat Shoshtari M.[2], Maleki Zanjani B.[3], and Shiran B.[4]

[1] Agronomy Dept., Payame Noor University, Ahwaz, I.R. of IRAN

[2]Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of IRAN

[3]Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, I.R. of IRAN

Abstract

This study aims to assessment of genetic diversity between Iranian sugarcane clones (released clones) and foreign cultivars and also identifies unknown accessions collected from Iran by 65 and 7 RAPD markers and SSR markers, respectively. Twenty-eight RAPD and seven SSR markers were polymorphic and produced a PCR product and number of fragments amplified by the RAPD and SSR polymorphic markers ranged from 6-27 (with an average of 15.1) and 5-14 (with an average of 9.33), respectively. Both molecular markers revealed a high degree of genetic diversity in sugarcane germplasm also; RAPD and SSR markers could separate identify accessions collected from Iran. For both markers a high similarity in dendrogram topologies was obtained although some differences were observed. All dendrograms, including that obtained by the combined use of both types of marker data, depicted relationships among the cultivars, depending upon their geographic region and/or pedigree information. The results of analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that genetic differentiation among cultivars within each region was greater than between regions. We also used 6 sorghum and 1 maize SSR primers pair for exploring the cross transferability of sorghum and maize SSR markers to sugarcane but none of them, showed amplification products.

Keywords: RAPD, SSR, Genetic diversity, Sugarcane, Variance analysis.

www.SID.ir