مقایسه کارآیی 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 احمدی‌خواه[۲*] و محمدهادی پهلوانی[۳]

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

چکیده

گزارش‌های متعددی از مقایسه کارآیی 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 کارآیی نشانگرهای SSR و RAPD در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر (MAS) در ژنوم برنج مشاهده نشده است. به همین منظور، در این تحقیق کارآیی 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 و۲۰ 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 به‌دست 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، SSR، RAPD

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

*: نویسنده مسوول Email: ahmadikhaha@gmail.com

مقدمه

نشانگرهای مولکولی DNA جهت تخمین تنوع ژنتیکی و نیز تشخیص ژرم‌پلاسم‌های جدید به‌منظور 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 (ریزماهواره‌ها) توسعه یافته و در آنالیزهای ژنومی مورد استفاده پژوهشگران قرار می‌گیرد *پالومبی* 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؛ *پالومبی 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 *et al.*, 2003؛ Lougheed *et al.*, 2000؛ Agrama and Tuinstra, 2003؛ Naghavi *et al.*, 2004؛ Garcia *et al.*, 2004؛ Saker *et al.*, 2005؛ Hanif *et al.*, 2008؛ Karami *et al.*, 2010؛ Datta *et al.*, 2010 ؛ Demir *et al.*, 2010؛ Leal *et al.*, 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 کُرن استفاده نمودند. اغلب تحقیقات فوق‌الاشاره بر روی ژنوم‌های گیاهی مختلف و برنامه‌های اصلاحی گوناگونی انجام شدند، ولی در این میان گزارشی مبنی‌بر 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 *اوپدیای* و همکاران (Upadhyay *et al.*, 2011). تعداد این نشانگرها در ژنوم بسیار فراوان و جهش‌پذیر بوده و به دلایل چند آللی بودن، همبارزی، 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 ریزماهواره و ...) محدودیت‌هایی را برای استفاده از این نشانگر ایجاد نموده به‌طوری‌که 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 ابزاری آسان، سریع و مناسب را جهت آزمایشات ژنومی این گیاه در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهد *اوپدیای 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 همان‌طورکه 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 ازجمله نسبت نمونه DNA به آغازگر، غلظت Taq پلیمراز 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 استانداردی برای واکنش آن در نظر گرفته شود. اما با این حال نشانگرهای RAPD عموماً در تحقیقات ژنتیکی به‌دلیل 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

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 ازجمله 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. به‌خصوص اینکه کاربرد آنها در گونه‌های کمتر شناخته شده به‌دلیل عدم نیاز به سابقه توالی ژنومی برای طراحی آغازگرها بسیار مناسب می‌باشد *فولاد* و همکاران، ؛ *رن* و همکاران، 2003؛ *حنیف* و همکاران، 2008؛ *داتا* و همکاران، 2010؛ *دمیر* و همکاران، 2010؛ *چولاستوا* و همکاران، 2011؛ *سلوارج* و همکاران؛ *ایلبی* (Foolad *et al.*, *1993;* Selvaraj *et al.*, 2011; Ilbi, 2003). بنابراین در پژوهش حاضر به‌منظور تعیین کارآیی تخمین فاصله ژنتیکی و شباهت به والد تکراری در نتاج نسل پیشرفته تلاقی برگشتی در گیاه برنج (جهت ایجاد لاین نرعقیم سیتوپلاسمی جدید) از دو سیستم نشانگری مختلف SSR و RAPD استفاده شد. هدف از انتخاب نشانگر SSR این بود که نشانگر مذکور در برنج به‌دلیل توالی‌یابی کامل ژنوم آن به‌خوبی 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 کالیبره شده تا بتوان بر نتایج داده‌های حاصل از آن اعتماد بیشتری نمود؟ همان‌طورکه در برخی از تحقیقات استفاده از داده‌های جغرافیایی در کنار نتایج آنالیز نشانگر RAPD برای تفسیر بهتر نتایج توصیه شده است (*شری* و همکاران، 2011). 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 کارآیی نشانگرهای RAPD و SSR و مقایسه اطلاعات تولید شده به-وسیله دو سیستم نشانگری برای تخمین برخی پارامترهای ژنتیکی مانند شباهت ژنتیکی لاین‌های تلاقی‌برگشتی با والد تکراری، بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از نتاج تلاقی برگشتی پیشرفته (نسل BC_5F_1) حاصل از تلاقی دو والد یوسن و IR68897A (لاین نرعقیم سیتوپلاسمی) استفاده شد. یوسن یک لاین بالقوه نگهدارنده برای سیتوپلاسم نرعقیم نوع WA در برنج می‌باشد/*احمدی‌خواه* (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 BC_5F_1 در زمین اصلی، در مرحله شروع پنجه‌زنی نمونه‌گیری و استخراج DNA انجام شد. DNA ژنومی از برگ گیاهان جوانِ هر یک از نتاج BC_5F_1 و والدین با استفاده از روش تغییریافته CTAB استخراج شد /*احمدی‌خواه* (Ahmadikhah, 2009). کنترل کیفیت و کمیت DNA به‌وسیله 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 به‌منظور 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 براساس ۲۰ نشانگر RAPD به‌دست 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 هرکدام 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 به‌مدت ۵ دقیقه شروع شد و با ۳۵ سیکل (واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و سنتز و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه) ادامه یافت. تکمیل سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 هرکدام 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 به‌مدت ۵ دقیقه شروع شد و با ۳۵ سیکل (واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت

۳۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۳۸ الی ۴۵ درجه سانتی‌گراد (براساس دمای ذوب آغازگر) به‌مدت ۳۰ ثانیه و سنتز و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه) ادامه یافت. تکمیل سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 داکیومنت عکس‌برداری شدند.

ارزش‌گذاری باندها و آنالیزداده‌ها

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 عدم‌حضور 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 نااریب *نئی* (Nei, 1978) برای محاسبه شباهت و فاصله ژنتیکی استفاده شد. تجزیه همبستگی با استفاده از نرم‌افزار SPSS *کینیر و کولین* (Kinnear and Colin, 2000) انجام شد.

نتایج

نشانگرهای SSR

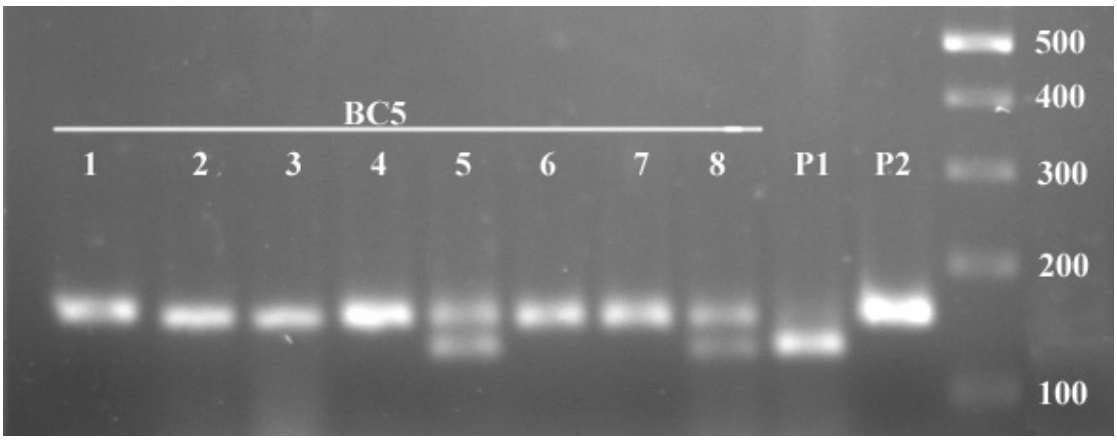
از بین ۱۰۰جفت آغازگرSSR، ۳۵ جفت چندشکلی بین دو والد را آشکار ساختند که نمونه‌ای از الگوی باندهی یکی از آنها در شکل ۱ نشان داده شده است.

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 ۱۲۲عدد 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 $RAPD_{set2}$ بین۶/۴ 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 BC_5 را نشان دهند که نمونه‌ای از الگوی باندهی آنها در شکل ۲ نشان داده شده است.



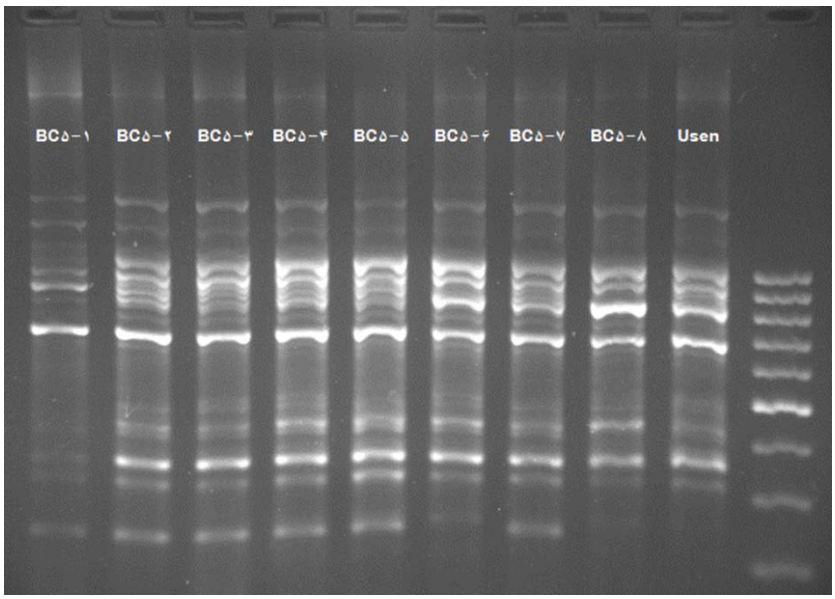
شکل ۱: الگوی باندهای حاصل از الکتروفورز DNA تکثیر شده نتاج BC_5 به‌همراه والدین توسط جفت آغازگر SSR (RM224). P1: لاین نرعقیم IR68897A، P2: والد تکراری یوسن

Fig. 1: Electrophoretic banding pattern of amplified DNA of BC_5 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 BC_5 به‌همراه والد تکراری توسط آغازگر RAPD (OPA03).

Fig. 2: Electrophoretic banding pattern of amplified DNA of BC_5 lines along with recurrent parent using RAPD primer OPA03

جدول ۲: شاخص‌های محاسبه شده برای نشانگرهای RAPD

Table 2: Calculated indices for RAPD markers

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

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

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

مقایسه دو سیستم نشانگری

به‌طورکلی، 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 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.

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	$RAPDset_2$	$RAPDset_1$	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

دو سیستم نشانگری مورد استفاده برآورد متفاوتی از میزان شباهت لاین‌های تلاقی برگشتی با والد تکراری به‌دست دادند، به‌طوری‌که 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 کمترین و بیشترین شباهت به والد تکراری مربوط به لاین‌های ۱ و ۸ بوده است (به‌ترتیب 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 (به‌طور 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 به‌طورکلی بسیار ناچیز و غیرمعنی‌دار بود (جدول ۵). همچنین هیچ گونه همبستگی معنی‌داری میان دو مجموعه $RAPD_{set1}$ و $RAPD_{set2}$ مشاهده نشد.

جدول ۴: تشابه ژنتیکی لاین‌های نسل BC_5 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	RAPDset2
	0.076	0.927^{**}	RAPDs
0.047	-0.890^{**}	0.295	SSRs

بحث

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 نتاج تلاقی برگشتی با والد تکراری، اقدام به غربال فنوتیپی نتاج 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 آلل‌های نشانگر SSR در میان همه آزمایشگاه‌ها تکثیر گردید. به‌طورکلی 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=۰/۱۹) 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 به‌منظور مقایسه نشانگرهای RFLP، RAPD، AFLP 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 کارآیی 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 SSR و RAPD برای تجزیه کلاستر جمعیت استفاده نمودند که نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با یکدیگر متفاوت بود، به‌طوری‌که براساس نشاگرهای 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 به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نیشکر انجام شد بین ضریب تشابه ژنتیکی حاصل از نشانگرRAPD و SSR همبستگی معنی‌داری در سطح ۵ درصد (r=۰/۴۶) مشاهده نمودند. این نتایج می‌تواند حاکی از آن باشد که در ترکیبات ژنتیکی مختلف، نشانگرهای مختلف کارآیی 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 آنجایی‌که 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 *اگراما و توئینسترا* 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 کارآیی 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 آللی 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 برگشتی پنجم 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

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 به‌دست آمد که به‌طور 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 (۵۰/۵ 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 به‌دست 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 به‌طوری‌که 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 به‌منظور شناسایی زودهنگام لاین موردنظر 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 توجیه 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 همبارز هستند و امکان تفکیک انواع ژنوتیپ‌ها را میسر می‌کنند *هرناندز* و همکاران (Hernandez *et al.*, 2002). به‌عنوان مثال، *احمدی‌خواه* (2008) در پژوهشی به‌منظور غربال DNA لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی و نگهدارنده برنج با استفاده از نشانگرهای RAPD مشخص نمود که دو نشانگر OPH_{03} و OPC_{05} 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 به‌منظور 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 مشاهد 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 همبارز 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 به‌وسیله آغازگرهای RAPD ضرورت دارد، هزینه آزمایشات MAS و MAB توسط این نشانگر بالا می‌باشد. با عنایت به گزارشات تحقیقات متعدد مبنی‌بر عدم‌همبستگی 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.