تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۴ شماره‌ی ۲ الف، اسفند ماه ۹۰

قابلیت استفاده‌ی بین گونه‌ای نشانگرهای ریزماهواره ی سورگوم در نیشکر و ذرت

ثریا کرمی[1]* و فرحناز ایمانی خواه[2]

*۱- **نویسنده‌ی مسؤول**: عضو هیأت علمی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه پیام نور ، ص.پ. ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران.
(karamisoraya@gmail.com)

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، پژوهشکده‌ی منابع طبیعی و زیست محیطی دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۴/۱۵

چکیده

نشانگرهای ریزماهواره ابزاری بسیار ارزشمند برای اهدافی از جمله نقشه یابی، انگشت نگاری و برنامه های اصلاحی می باشند. با وجود این ، این نشانگرهای ارزشمند تنها برای برخی از گیاهان مهم از نظر اقتصادی، قابل دسترس می باشد که دلیل آن هزینه های زیاد و مدت زمان طولانی در اجرای فرایند ساخت کتابخانه ی ریزماهواره و طراحی آغازگر می باشد. مقایسه نقشه های نشانگرهای ریزماهواره ای بین گونه ها و جنس های خویشاوند و خانواده گراس ها هم ردیفی بالایی را نشان می دهد بدین ترتیب می توان از نشانگرهای ریزماهواره ای شناخته شده برای سایر گونه های خویشاوند استفاده کرد. هدف این تحقیق ارزیابی قابلیت انتقال نشانگرهای ریزماهواره ای سورگوم (*Sorghum ssp*) بر روی نیشکر (*Saccharum spp*) و ذرت (*Zea mays*) بود. از ۲۹ جفت آغازگر ریزماهواره ای سورگوم، به ترتیب ۲۰/۷٪ و ٦/۹٪ بر روی ژنوم نیشکر و ذرت قابلیت انتقال نشان دادند. نشانگرهای ریزماهواره ای این تحقیق مؤثر بودند با این که تنها شش واریته از هرگونه استفاده شد. تعداد قطعات تکثیر یافته توسط نشانگرهای چندشکل در گونه های نیشکر و ذرت به ترتیب ۹-٤ (متوسط ٦/۲) و۳-۲ (متوسط ۲/۵) بود. اندازه ی قطعات تکثیری در گونه های هدف، تفاوت هایی را در مقایسه با سورگوم نشان دادند. یک نشانگر با قابلیت تکثیر در هر سه گونه دیده شد که نشان دهنده ی حفظ نواحی آللی جایگاه اتصال نشانگر در بین این سه گونه می باشد. این نشانگرها با قابلیت استفاده بین گونه ای، در حال حاضر می توانند برای مطالعات ژنتیکی و اصلاحی در این گونه ها مورد استفاده قرار گیرند.

کلید واژه ها: قابلیت استفاده ی بین گونه ای، ریزماهواره، نیشکر، سورگوم، ذرت

مقدمه

خانواده ی غلات در بین سایر خانواده های گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار هستند؛ چرا که منابع غذایی با ارزشی برای انسان و حیوانات می باشند. از جمله گیاهان متعلق به این خانواده می توان به نیشکر، ذرت، سورگوم، جو، ارزن، یولاف، برنج، گندم، چاودار، تریتیکاله و غیره اشاره نمود. برای مثال نیشکر به عنوان یک گیاه تک لپه ی چند ساله ی متعلق به خانواده ی غلات، یکی از مهم ترین منابع کربوهیدرات در جهان می باشد که بیش از ۷۷/۷۳٪ از شکر جهان را تأمین می کند. در سال ۲۰۰۷-۲۰۰۶ کل شکر تولید شده در جهان ۱۵۰ میلیون تن بوده که بر اساس آمار موجود در سال ۲۰۰۷- ۲۰۰۶ میزان تولید در ایران ۵۷۲۲۰۰۰ تن گزارش گردیده است (سازمان خواربار جهانی). بررسی ساختار و میزان تنوع ژنتیکی در ذخایر توارثی گیاهی به منظور طبقه بندی ذخائر ژنتیکی از نظر مقاومت به انواع تنش های زیستی و غیرزیستی و همچنین جلوگیری از فرسایش ژنتیکی یکی از قدم های اساسی و اولیه در اکثر برنامه های اصلاحی می باشد. یکی از مناسب ترین راه ها برای شناسایی و

تشخیص قرابت های ژنتیکی ارقام و حذف مواد گیاهی مشابه استفاده از نشانگرهای مبتنی بر دی.ان.ا[1] می باشد؛ این نشانگرها امکان شناسایی مستقیم تنوع توالی ژنومی را در بین ارقام بوجود می آورند که در تکمیل اطلاعات شجره نامه مورد استفاده قرار می گیرد.

در بین تمام تکنیک ها، نشانگرهای ریزماهواره به دلیل داشتن مزایایی همچون چند شکلی زیاد، هم بارزی، پراکندگی یکنواخت در سرتاسر ژنوم، دقت بالا و نشان دادن حداکثر اختلاف بین ارقام، به طور مؤثرتری در مطالعات ژنتیکی و ارزیابی تنوع ژنتیکی در خانواده ی غلات استفاده می شوند که می توان به مطالعات آلوالا و همکاران[2] (۳)؛ تمنیخ و همکاران[3] (۲۸) و شاروپووا و همکاران[4] (۲۵) اشاره نمود. همچنین نشانگرهای ریزماهواره کاربرد وسیعی در مطالعات مربوط به ارزیابی ارتباط بین گونه های خویشاوند و همچنین ارتباط بین زیرجمعیت های یک گونه خاص دارند (۵)؛ متأسفانه یکی از معایب این نشانگر که استفاده از این سیستم را برای تعداد زیادی از گونه های گیاهی محدود نموده است، هزینه های زیاد و مدت زمان طولانی در اجرای برنامه های ساخت کتابخانه ی ریزماهواره و طراحی آغازگر می باشد و این امر موجب شده است که این نشانگر تنها برای گیاهانی استفاده شود که برنامه های توالی یابی ژنوم آن ها انجام شده و یا در حال اجرا می باشد (۲۴).

اخیراً، ژنتیک مقایسه ای در مورد حفظ محتوی و ترتیب ژن بین گونه های خویشاوند در طول تکامل اطلاعاتی را نشان داده است (۴). همچنین بر اساس نقشه های مقایسه ای، هم ردیفی نشانگرهای مشترک اثبات شده است بدین ترتیب می توان بر اساس این یافته ها پیشنهاد کرد که یک نشانگر از یک گونه/جنس در دیگر گونه/جنس های خویشاوند تظاهر پیدا خواهد کرد (۱۷). چندین گیاه زراعی نیز، وجود همولوژی کافی بین ژنوم ها در نواحی احاطه کننده ی جایگاه های ریزماهواره را نشان داده است؛ بدین ترتیب آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی های ژنومی یک گیاه (بخشنده) می تواند برای کشف، تعیین و شناسایی ریزماهواره در گونه های خویشاوندی که اطلاعات موجود در خصوص ریز ماهواره برای آن ها کافی نیست و یا این که اصلاً وجود ندارد استفاده شود (۲۴). کاربرد نشانگرهای ریزماهواره یک گونه برای گونه ی دیگر را "قابلیت انتقال" می نامند که درتعداد زیادی ازگونه ها و حتی جنس ها به طور موفقیت آمیزی ثابت شده است (۱،۷، ۱۱، ۲۶). نقشه های مقایسه ای نشان دادند که در طی ۶۵ میلیون سال تکامل، هنوز قطعات کروموزومی بزرگی در بین ژنوم اعضای خانواده ی غلات وجود دارد که ترتیب ژن ها در آن ها حفظ شده است (۲۰). در مطالعه ای جهت تشخیص نواحی هم ردیفی بین سه ژنوم ذرت، نیشکر و سورگوم، اثبات شد که نیشکر و سورگوم در مقایسه با ذرت از نظر سازماندهی کروموزومی شباهت و خویشاوندی نزدیک تری نسبت به هم دارند (۱۲). مطالعات بعدی نیز هم ردیفی کاملی بین ژنوم سورگوم و نیشکر بر اساس نقشه های مقایسه ای ژنوم گزارش دادند (۱۰، ۱۳، ۱۴).

در این تحقیق سعی بر آن بود که با استفاده از وجود هم ردیفی بین اعضای خانواده ی غلات قابلیت استفاده بین گونه ای نشانگرهای ریزماهواره ی سورگوم در ذرت و نیشکر مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و استخراج دی.ان.ا

به منظور ارزیابی قابلیت استفاده بین گونه ای نشانگرهای ریزماهواره ی سورگوم از شش واریته ی نیشکر (*Cristalina*، *SP۴۰-۱۱۴۳*، *N۳۰*، *۴۱۰*-*CP۷۰*، *CP۸۲-۱۵۹۲*، *SP۷۱-۶۱۶۳*) و ذرت

1- DNA
2- Alwala *et al.*
3- Temnykh *et al.*
4- Sharopova *et al.*

(*SC۷۰۴*، *KSC۴۰۴*، *Opaque۲*، *Opaque۱*، آجیلی، شیرین) استفاده گردید. در این مرحله از آزمایش برگ‌های مربوط به هر واریته برداشت شده و بعد از انتقال به آزمایشگاه نمونه‌های برگی به طور مختصر با آب مقطر شستشو داده شدند و قسمت‌های زائد و رگبرگ اصلی را جدا کرده و بعد از وزن کردن با ترازوی دیجیتالی در فویل بسته‌بندی و در فریزر ۸۰- درجه ی سانتی گراد نگه داری شدند. دی.ان.ا ژنومی هر یک از واریته ها بر اساس دستورالعمل پن و همکاران[1] (۱۹) با کمی تغییرات جزئی استخراج گردید و دی.ان.ا استخراج شده در بافر TE[2] حل گردید. در ادامه برای تعیین کمیت و کیفیت دی.ان.ا استخراجی از روش اسپکتروفتومتری و بارگذاری دی.ان.ا بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ و مشاهده زیر نور لامپ ماوراء بنفش استفاده شد. برای اطمینان از صحت طراحی آغازگرهای ریزماهواره ای سورگوم، از سه واریته ی سورگوم (*Keller*، *Sorfa*، سورگوم جارویی) نیز به عنوان شاهد در تمام مراحل استفاده شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز [3]

برای تکثیر دی.ان.ا ژنومی نیشکر و ذرت از ۲۹ جفت آغازگر طراحی شده از کتابخانه ی ژنومی سورگوم، طراحی شده توسط براون و همکاران[4] (۶) و تارامینو و همکاران[5] (۲۷) استفاده گردید (جدول ۱). واکنش زنجیره ای پلیمراز بر اساس دستورالعمل کوردیرو و همکاران[6] (۸) با کمی تغییرات در حجم µl ۱۰ شامل ng ۲۰ از دی.ان.ا الگو، ng۳۰ از هر آغازگر (ساخت شرکت MWG BIOTECH)، µM ۲۰۰ از هر dNTP، Mm ۱۰ از Tris-HCl (PH=۸/۳)، ۵۰Mm از KCl، mM ۱/۵ از $MgCl_2$, ۰/۰۱ ٪ ژلاتین و ۰/۵ واحد Taq DNA Polymerase (Cinnagen, Iran) انجام گردید. برنامه ی واکنش های زنجیره ای پلیمراز نیز به صورت Touchdown بر روی دستگاه ترموسیکلر (Plam-Cycler ساخت شرکت Corbett Research) به شرح زیر انجام گرفت: ۳ دقیقه در ۹۴°C جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه هرکدام شامل ۱ دقیقه در ۹۴°C، ۱ دقیقه در ۶۵°C-۵۵ و ۲ دقیقه در ۷۲°C و ۱۰ دقیقه در ۷۲°C جهت بسط نهایی انجام پذیرفت. طبق برنامه ی Touchdown مرحله اتصال آغازگرها به دو چرخه ۱۰ و ۲۵ تایی تقسیم گردید که در طی ۱۰ چرخه ی اولیه، به ازاء هر چرخه، °C ۰/۵ از دمای اتصال اولیه کاهش می یافت.

محصولات تکثیر یافته بعد از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز روی ژل پلی اکریل آمید واسرشته ساز ۸٪ (w/v) در بافر TAE (۱ Mm EDTA، استات سدیم ۲۰mM، ۴۰ mM Ttis-HCL) در ولتاژ ۳۰۰ به مدت ۳ ساعت بارگذاری شد. برای رنگ آمیزی از روش اتیدیوم بروماید (۱µg/ml) به مدت ۱۵ دقیقه، استفاده گردید. سپس از ژل رنگ آمیزی شده زیر نور لامپ ماوراء بنفش توسط دستگاه ژل داکیومنت مدل۷۰۰ GAS عکس برداری شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز برای هر نمونه بیش از ۲ بار تکرار شد.

امتیازدهی باندها و آنالیز آماری

برای ارزیابی اندازه ی مولکولی محصولات تکثیر یافته از سایز مارکر bp ۱۰۰ (MBI Fermentas) و نرم افزار آماری ONE-Dscan استفاده شد. قطعات تکثیر یافته در چهار گروه بر اساس شدت وضوح و سهولت در امتیاز دهی دسته بندی شدند: ۱) قطعاتی با وضوح بالا و سهولت در امتیاز دهی ۲) وضوح ضعیف اما قابل امتیاز دهی ۳) وضوح خیلی ضعیف و امتیاز دهی مشکل ۴) بدون تکثیر. گروه های ۱ و ۲ تکثیر های مثبت و گروه های ۳ و ۴ به عنوان تکثیر های منفی در نظر

1- Pan *et al.*
2- Tris-EDTA
3- Polymeras Chain Reaction
4- Brown *et al.*
5- Taramino *et al.*
6- Cordiro *et al.*

گرفته شدند. معیار لازم در این تحقیق برای معرفی یک نشانگر ریزماهواره با قابلیت تکثیر مثبت در بین

جدول ۱- الگوی تکثیر نشانگرهای ریزماهواره ی سورگوم در نیشکر و ذرت

کد مارکر	موتیف	دمای اتصال	سورگوم		نیشکر			ذرت		
			اندازه ی قطعات [1]	اندازه ی قطعات [2]	اندازه ی قطعات	تعداد قطعات تکثیر یافته	نوع تکثیر [3]	اندازه ی قطعات	تعداد قطعات تکثیر یافته	نوع تکثیر
Sb۱-۱	$(AG)_{۱۶}$	۶۰	۲۷۰-۲۷۵	۲۶۰-۳۰۰	۲۱۰-۲۴۰	۱۰	+	-	-	-
Sb۱-۱۰	$(AG)_{۲۷}$	۶۵	۳۶۰-۴۰۰	۳۵۰-۴۰۰	-	-	-	-	-	-
Sb۴-۱۵	$(AG)_{۱۹}$	۵۷	۱۲۰-۱۲۷	۱۲۰-۱۳۰	-	-	-	-	-	-
Sb۴-۲۲	$(ACGAC)_{۴}/(AG)_{۶}$	۵۹	۲۷۰-۳۰۰	۲۷۰-۳۰۰	-	-	-	-	-	-
Sb۴-۳۲	$(AG)_{۱۵}$	۵۹	۱۶۵-۱۷۳	۱۶۰-۱۸۰	-	-	-	-	-	-
Sb۴-۱۲۱	$(AC)_{۱۴}$	۶۰	۲۰۰-۲۲۰	۲۰۰-۲۵۵	-	-	-	-	-	-
Sb۵-۸۵	$(AG)_{۱۲}$	۶۰	۲۰۰-۲۱۰	۲۰۰-۲۲۵	-	-	-	-	-	-
Sb۵-۲۰۶	$(AC)_{۱۳}/(AG)_{۲۰}$	۵۷	۱۲۰-۱۳۰	۱۱۵-۱۳۰	-	-	-	-	-	-
Sb۵-۲۱۴	$(AG)_{۱۴}$	۵۹	۱۷۰-۱۸۰	۱۷۴-۳۰۰	-	-	-	-	-	-
Sb۵-۲۳۶	$(AG)_{۲۰}$	۵۷	۱۶۰-۱۸۰	۱۶۵-۱۸۵	-	-	-	-	-	-
Sb۶-۳۶	$(AG)_{۱۹}$	۶۰	۱۶۰-۱۷۵	۱۵۵-۱۹۰	-	-	-	-	-	-
Sb۶-۵۷	$(AG)_{۱۸}$	۶۰	۲۸۵-۲۹۶	۲۸۵-۳۰۵	-	-	-	-	-	-
Sb۶-۸۴	$(AG)_{۱۴}$	۵۸	۱۷۵-۱۹۳	۱۷۰-۱۹۰	-	–	-	-	-	-
Sb۶-۳۲۵	$(AAG)_{۲۲}$	۵۶	۱۲۴-۱۴۲	۱۱۰-۱۴۰	۱۱۰-۳۶۰	۴	#،+	-	-	-
Sb۶-۳۴۲	$(AC)_{۲۵}$	۵۶	۲۵۰-۳۵۰	۳۲۰-۲۵۰	۲۶۰-۵۰۰	۹	+	-	-	-
SbAGA۰۱	$(AG)_{۳۳}$	۵۴	۹۰-۱۰۵	۸۸-۱۰۶	-	-	-	-	-	-
SbAGE۰۱	$(AG)_{۳۰}$	۵۴	۲۱۰-۲۴۰	۱۰۶-۲۰۸	-	-	-	-	-	-
SbAGB۰۲	$(AG)_{۳۵}$	۵۴	۱۱۵-۱۲۰	۱۰۱-۱۲۱	-	-	-	-	-	-

ادامه ی جدول ۱

کد مارکر	موتیف	دمای اتصال	سورگوم		نیشکر			ذرت		
			اندازه ی قطعات	اندازه قطعات	اندازه ی قطعات	تعداد قطعات تکثیر یافته	نوع تکثیر	اندازه ی قطعات	تعداد قطعات تکثیر یافته	نوع تکثیر
SbAGB۰۳	$(AG)_{۴۱}$	۵۴	۱۱۰–۱۲۱	۹۴–۱۸۵	۱۰۰–۱۹۹	۶	+	-	-	-
SbAGE۰۳	$(AG)_{۳۴}GA(CA)_{۶}$	۵۴	۱۲۵–۱۵۰	۸۴–۱۵۱	۱۹۰–۴۹۰	۴	+	-	-	-
SbAGF۰۶	$(AG)_{۳۵}$	۵۴	۱۴۵–۱۸۰	۱۱۰–۱۸۰	-	-	-	-	-	-
SbAGF۰۸	$(AG)_{۳۴}$	۵۴	۱۳۴–۱۷۶	۱۳۴–۱۷۶	-	-	-	-	-	-
SbAGH۰۴	$(AG)_{۳۹}$	۵۴	۱۱۵–۱۶۶	۱۱۰–۱۷۰	-	-	-	-	-	-
SvPEPCAA	$(AT)_{۱۰}$	۵۴	۲۲۰–۲۵۰	۲۱۰–۲۵۰	-	–	–	-	-	-
SvHPRGPG	$(AT)_{۱۰}$	۵۴	۲۴۸–۲۵۵	۲۴۶–۲۵۵	-	-	–	-	-	-
SBKAFGK۱	$(ACA)_{۹}(AAC)_{۹}$	۵۴	۱۵۰–۱۷۰	۱۴۲–۱۶۶	-	-	-	۱۳۰–۱۵۳	۲	+
ZMADH۲ N	$(AG)_{۷}$	۶۰	۱۴۵–۱۶۰	۱۱۰–۱۲۰	۱۲۰–۳۶۰	۵	+	۱۰۵ –۱۱۵	۳	+

۱– اندازه ی قطعات مشاهده شده در سورگوم بر اساس جفت باز در مطالعه ی حاضر

۲– اندازه ی قطعات گزارش شده در سورگوم بر اساس مطالعات بروان و همکاران، ۱۹۹۶؛ تارامینو و همکاران، ۱۹۹۷

۳– + (تکثیر)، – (عدم تکثیر)، # (عدم چندشکلی)

گونه/جنس، مشاهده ی قطعات تکثیریافته در حداقل چهار واریته از شش واریته بود. درصد تکثیر برابر است با تعداد نشانگرهای تکثیر یافته در یک گونه بر تعداد کل نشانگرها.

نتایج و بحث

در این مطالعه از ۲۹ نشانگر ریزماهواره سورگوم استفاده شد که در کل ۷ نشانگر قابلیت تکثیر و انتقال نشان دادند. شکل ۱ و ۲ به ترتیب، الگوی باندی ایجاد شده توسط آغازگر Sb۱-۱ (تکثیر مثبت)، SbAGD۰۲ (تکثیر منفی) و ZMADH۲N را بر روی مواد گیاهی استفاده شده در این مطالعه نشان می دهد. از بین نشانگرهای تکثیر شده، نشانگر ZMADH۲N در هر دو ژنوم نیشکر و ذرت تکثیر نشان داد (جدول ۱). این نشانگر بر اساس توالی های بانک ژن ذرت توسط سینیور و همکاران[1] (۲۳) طراحی گردیده بود و در مطالعه ای که توسط براون و همکاران (۶) انجام شد، این نشانگر از بین ۲۳ جفت آغازگر طراحی شده به دلیل نشان دادن قابلیت انتقال و تکثیر در سورگوم به عنوان یک منبع جدید نشانگری برای سورگوم معرفی گردید؛ تکثیر این نشانگر در بین هر سه گونه به احتمال قوی دلیلی بر ارتباط خویشاوندی آن ها می باشد.

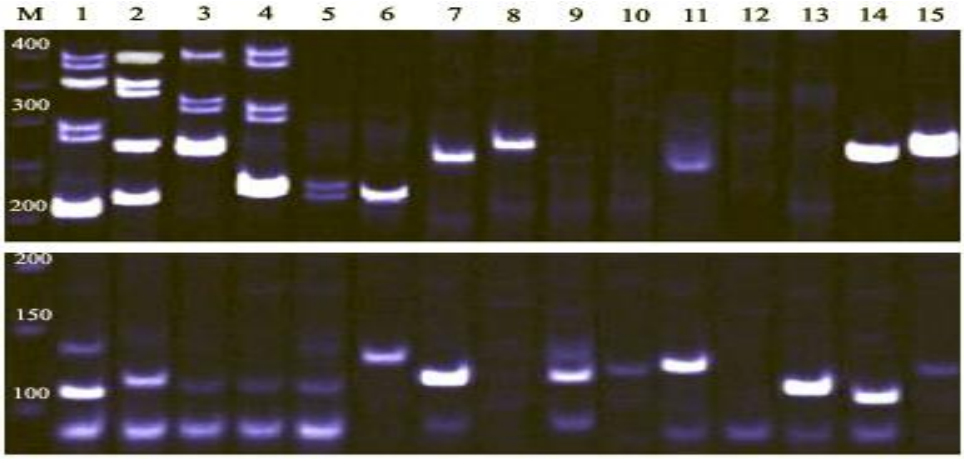
از ۲۹ جفت آغازگر استفاده شده، شش و دو نشانگر ریزماهواره به ترتیب بر روی ژنوم نیشکر و ذرت تکثیر مثبت نشان دادند. این امر نشان دهنده‌ی وجود نواحی آللی ویژه ای است که به شدت در طول تکامل در گونه های خویشاوند حفظ شده اند و هیچ تنوعی در ریزماهواره یا توالی احاطه کننده ی آن ها رخ نداده است (۷). بهینه سازی وضعیت واکنش زنجیره ای پلیمراز، کاهش در دمای اتصال و مقدار $MgCl_2$ تأثیری بر روی افزایش میزان قابلیت انتقال و تکثیر نداشت. از نشانگرهای تکثیر شده مثبت بر روی ژنوم نیشکر، یک نشانگر چند شکلی نشان نداد؛ در حالی که در مطالعات براون و همکاران (۶)؛ آگراما و همکاران[2] (۲) و تارامینو و همکاران (۲۷)، همه ی آغازگرهای مندرج در جدول ۱، بر روی ژنوم سورگوم چند شکلی نشان دادند. با در نظر گرفتن این نکته که صحت و دقت قابلیت چند شکلی نشانگرها به عوامل متعددی از جمله تعداد نشانگرهای مورد استفاده، توزیع آن ها در ژنوم (۲۲)، تعداد و ماهیت ژنتیکی نمونه های مورد استفاده (۱۸) بستگی دارد در این مورد نیز امکان دارد که، در صورت استفاده از تعداد نمونه ها و آغازگرهای بیشتر به دلیل پوشش بیشتر و بهتر ژنوم شانس یافتن مجموعه ای از آغازگرهای ریزماهواره با قابلیت استفاده ی بین گونه ای و چندشکلی افزایش می یافت.

تعداد زیادی از نشانگرها بر روی هر دو ژنوم هدف (نیشکر و ذرت)، تکثیری نشان ندادند. دلیل عدم تکثیر می تواند نشان دهنده ی این امر باشد که آغازگرها احتمال دارد نواحی از دی.ان.ا را تکثیر دهند که در یک گونه اجدادی نقش توسعه ی نواحی ریزماهواره را به عهده دارد ولی در گونه خویشاوند دیگر، اصلاً وجود نداشته باشد. همچنین متفاوت بودن توالی های احاطه کننده ی ریزماهواره در گونه های خویشاوند می تواند دلیل دیگری برای عدم قابلیت تکثیر بین گونه ای باشد.

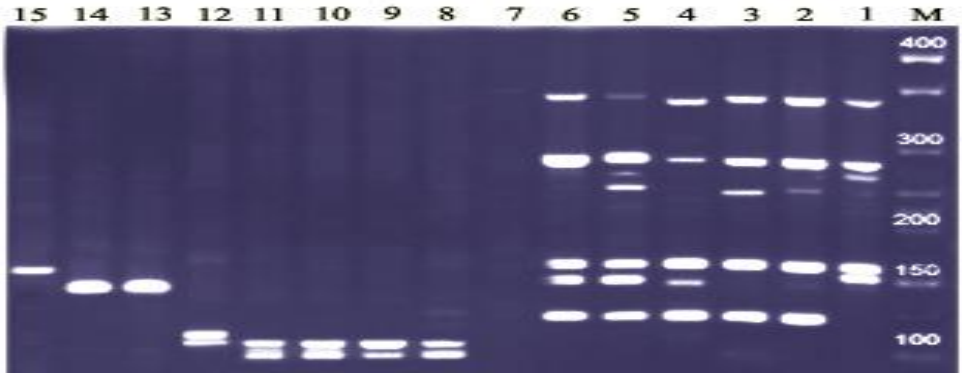
علاوه بر این، دو نشانگر نیز در ژنوم نیشکر تنها یک قطعه تکثیر دادند که با توجه به اکتاپلوئید بودن این گیاه، این قطعات نیز در گروه ۴ قرار گرفتند و از نتایج کلی حذف گردیدند.

1-Senior *et al.*

2- Agrama *et al.*



شکل ۱- الگوی تکثیر دی.ان.ا ژنومی نیشکر از شماره ی ۱ الی ٦ (از چپ به راست *Cristalina*، *۱۱٤۳-SP٤۰*، *N۳۰*، *CP۷۰-٤۱۰*، *CP۸۲-۱٥۹۲*، *SP۷۱-٦۱٦۳*)، ذرت از شماره ی ۷ الی ۱۲ (*SC۷۰٤*، *KSC٤۰٤*، *Opaque۲*، *Opaque۱*، آجیلی، شیرین) و سورگوم از شماره ی ۱۳ الی ۱٥ (*Keller*، *Sorfa*، جارویی) بوسیله ی نشانگر Sb۱-۱ (بالا، تکثیر مثبت) و SbAGD۰۲ (پایین، تکثیر منفی).M ، سایز مارکر دی.ان.ا.



شکل ۲- الگوی تکثیر دی.ان.ا ژنومی نیشکر از شماره ی ۱ الی ٦ (*Cristalina*، *۱۱٤۳-SP٤۰*، *N۳۰*، *CP۷۰-٤۱۰*، *CP۸۲-۱٥۹۲*، *SP۷۱-٦۱٦۳*)، ذرت از شماره ی ۷ الی ۱۲ (*SC۷۰٤*، *KSC٤۰٤*، *Opaque۲*، *Opaque۱*، آجیلی، شیرین) و سورگوم از شماره ی ۱۳ الی ۱٥ (*Keller*، *Sorfa*، جارویی) بوسیله ی نشانگر M . ZMADH۲N، سایز مارکر دی.ان.ا

چندین مطالعه ی دیگر از جمله مطالعات ژو و همکاران (۳۱)؛ وان دنزی و همکاران[1] (۳۰)؛ تیخانوو و همکاران (۲۹)؛ رالو و همکاران[2] (۲۱)؛ پن و همکاران (۱۸) و ادونینا و همکاران[3] (۱) در خانواده ی غلات و دیگر خانواده های گیاهی نیز نشان دادند که جفت آغازگرهای ریزماهواره ای طراحی شده برای یک گونه می تواند دی.ان.ا گونه های خویشاوند را تکثیر دهند. برای مثال قابلیت انتقال نشانگرهای ریزماهواره ای ذرت در نیشکر در مطالعه ی سلوی و همکاران[4] (۲۴)، ۷۴/۵ درصد گزارش گردید. قابل ذکر است که منبع بخشنده ی نشانگرهای ریزماهواره ای، علاوه بر این که بر روی میزان چند شکلی ریزماهواره ای گیاه هدف موثر است، عموماً انعکاسی از فاصله ژنتیکی نیز می باشد. البته فاکتورهایی همانند سطح پلوئیدی و موتاسیون ممکن است ارتباط بین قابلیت انتقال و فاصله ی ژنتیکی را پیچیده تر نمایند (۹). بیش ترین تعداد قطعات تکثیر یافته توسط نشانگرهای چند شکل در هر دو گونه، مربوط به تکرارهای دوتایی و کم ترین مربوط به تکرارهای سه تایی و مرکب بود. از پنج جفت آغازگری که در نیشکر قطعات چند شکل تکثیر دادند، یک آغازگر تکرار AC، سه آغازگر تکرار AG و یک آغازگر محتوی تکرار مرکب بودند و در ذرت یک آغازگر حاوی تکرار AG و دیگری محتوی تکرار مرکب بود. در نیشکر بیش ترین تعداد قطعات به وسیله ی تکرار ساده $(AC)_{۲۵}$ در حالی که تکرار مرکب $(CA)_{۶}GA_{۳۴}$ (AG) کم ترین تعداد قطعه را تکثیر داد و در ذرت نیز به ترتیب بیش ترین و کم ترین تعداد قطعات توسط آغازگرهایی با تکرارهای دوتایی و مرکب دیده شد که این نتیجه با گزارش های سلوی و همکاران (۲۴) مطابقت نشان داد. این نکته قابل ذکر است که در نیشکر، تکرارهای دوتایی از نوع AC ، GA و سه تایی از نوع $(CGG)_n$ به ترتیب تکرارهای غالب در کتابخانه ی دی.ان.ا ژنومی و کتابخانه نشانه های توالی های بیان شده[5] می باشند و در مطالعات صورت گرفته شده آشکار گردید که بین تعداد قطعات تکثیری و فراوانی تکرارهای غالب نوعی ارتباط مثبت وجود دارد (۷، ۱۸، ۲۴). در این مطالعه به منظور بررسی رابطه ی بین تعداد قطعات تکثیری و فراوانی تکرارهای ریزماهواره ای، همبستگی ساده بین این دو متغیر محاسبه شد و میزان همبستگی، $R^۲$ =۰/۰۸ برآورد گردید. اگرچه بیش ترین تعداد قطعات در هر دو گونه توسط آغازگرهایی با تکرارهای دوتایی تکثیر داده شد اما چون تعداد نشانگرها با تکرارهای سه تایی و مرکب در مقایسه با تکرارهای دوتایی بسیار کم بود ما صراحتاً ارتباط مثبتی بین تعداد قطعات تکثیری و تکرارهای دوتایی پیشنهاد نمی کنیم.

تعداد نشانگرهای تکثیر یافته و چند شکل در گونه های هدف (ذرت و نیشکر) در مقایسه با گونه بخشنده (سورگوم) کم تر بود؛ در مطالعه آگراما و همکاران (۲) که با استفاده از مجموعه نشانگرهای ریزماهواره جدول ۱، انجام شده بود، سطح بالایی از تکثیر و چندشکلی بر روی ژنوم سورگوم گزارش شد. در مطالعه ای دیگر با نتیجه ای مشابه نتایج این تحقیق، از بین بیست نشانگر ریزماهواره نیشکر تنها سه نشانگر (۱۵٪) در سورگوم و ایریانتوس[6]، جنس خویشاوند نیشکر، تکثیر نشان دادند (۷). مطالعات انجام شده نشان دادند که قابلیت انتقال نشانگرهای ریزماهواره گیاهی در مقایسه با نشانگرهای RFLP، معمولاً کم تر است (۱۵ و۳۰)، اگرچه این موضوع همیشه برقرار نیست و مطالعه انجام شده توسط دارلی ونگر و همکاران[7] (۹)، قابلیت انتقال بسیار بالایی از نشانگرهای ریزماهواره را در هلو[8] نشان داد.

1- Van denz *et al.*
2- Rallo *et al.*
3 - Adoni *et al*
4 -Selvi *et al.*.

5- Expressed Sequence Tags
6- Erianthus
7- Dirle wanger *et al.*
8- *Prunus spp*

اندازه ی قطعات تکثیر یافته در نیشکر و ذرت به ترتیب در محدوده ۵۰۰-۱۰۰ و ۱۵۳-۱۰۵ جفت باز بود که از نظر اندازه تفاوت هایی را در مقایسه با سورگوم نشان داد. تنوعات طولی مشاهده شده بین جنس های متفاوت، می تواند به این دلیل باشد که در بین جنس های خویشاوند جهش در ناحیه ی ریزماهواره و نواحی احاطه کننده تجمع یافته است در حالی که در داخل یک جنس، تنوعات طولی عمدتاً ناشی از انبساط یا انقباض ریزماهواره ها است (۶). بنابراین برای درک اساس تنوع اندازه ی قطعات، به توالی یابی هر یک از این قطعات نیاز است. اختلاف اندازه ی قطعات به دلیل موتاسیون در توالی نواحی احاطه کننده ی ریزماهواره، در مطالعات کوردیرو و همکاران (۷)، براون و همکاران (۶) و کاستیا و همکاران[1] (۱۶) نیز، گزارش شده است. مشابه با نتایج این تحقیق، تنوع در اندازه ی محصولات تکثیر یافته توسط جفت آغازگرهای ریزماهواره ای ذرت بر روی دی.ان.ا نیشکر و ایریانتوس نیز گزارش شد (۲۴).

نشانگرهای ریزماهواره این تحقیق قابلیت انتقال داشتند با این که تنها شش واریته از هرگونه استفاده شد.

متوسط تعداد قطعات تکثیر یافته به وسیله ی آغازگرهای چند شکل بر روی ژنوم نیشکر و ذرت به ترتیب ۶/۲ و ۲/۵ بود. در مطالعه ای مشابه، ۹ جفت آغازگر ریزماهواره ای چند شکل ذرت بر روی نیشکر، ۱۰ تا ۱۴ (متوسط ۱۰) قطعه تکثیر دادند (۲۴)، که این تفاوت، احتمالا به دلیل تعداد کم واریته های استفاده شده در این مطالعه می باشد.

دانستن این نکته مفید است که اگر آغازگرهای ریزماهواره گونه های خویشاوند در دسترس باشد، می توان با غربال کردن تعداد زیادی از آغازگرهای یک گونه بر روی گونه ی خویشاوند دیگر، به مجموعه ای از آغازگرهای چندشکل معتبر دست یافت. اگر چه نتایج ما سطح بالایی از قابلیت انتقال نشانگرهای سورگوم را در نیشکر و ذرت نشان نداد؛ ولی همین تعداد آغازگرهای تکثیر شده می توانند به عنوان منابع نشانگری جدید برای مطالعات ژنتیکی و اصلاحی، مفید و قابل استفاده باشند. در این تحقیق به دلیل وجود تعداد محدودی از آغازگرهای ریزماهواره ای سورگوم، از ۲۹ جفت آغازگر استفاده گردید ولی از آن جا که شباهت بین نیشکر، ذرت، گندم و سورگوم بر اساس نقشه های مقایسه ای به اثبات رسیده است با غربالگری آغازگرهای ریزماهواره ای هر یک از این گیاهان می توان قابلیت استفاده ی بین گونه ای ریزماهواره ها را در این خانواده بررسی کرد. به طور مثال به ترتیب بیش از ۱۰۰۰ و ۷۵۰ جفت آغازگر ریزماهواره ای ذرت و گندم موجود است[1] که می توان با ارزیابی قابلیت استفاده ی بین گونه ای این نشانگرها، منبع نشانگری پربازده و مؤثری برای استفاده در برنامه های اصلاحی و ژنتیکی گونه های خویشاوند هدف معرفی نمود.

سپاس گزاری

بدین وسیله از مسئولان محترم دانشگاه پیام نور استان خوزستان برای تأمین هزینه های اجرای طرح صمیمانه قدردانی می‌گردد. همچنین از مسئولان محترم مرکز تحقیقات کشت و توسعه ی نیشکر اهواز برای در اختیار قرار دادن نمونه های گیاهی صمیمانه سپاس گزاری می شود.

1- Kostia *et al.*

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 g*ermplasm collections. Crop Sciences, 46: 448-455.

4. Andrew, H., Paterson, J.E., Bowers, M.D., Burow, X.D., Christin, G.E., and Robert, J.W. 2000. Comparative genomics of plant choromosomes. Plant Cell Reports, 12: 1523-1539.

5. Bowcock, A.M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, A., Minch, E., Kidd, J.R., and Cavalla-Sforza, L.L. 1994. High-resolution human evolutionary trees from polymorphic microsatellites. Nature, 368: 455-457

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 identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) moench]. Theoretical and Applied Genetics, 93: 190-198.

7. Cordeiro, G.M., Casu, R., McIntyre, C.L., Manners, J.M., and Henry, R.J. 2001. Microsatellite markers from sugarcane ESTs cross transferable to *Erianthus* and *Sorghum*. Plant Sciences, 160: 1115-1123.

8. Cordeiro, G.M., Taylor, G.O., and Henry, R.J. 2000. Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum sp*.) a highly polyploidy species. Plant Sciences, 155: 161-168.

9. Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranazana, M.J., Poizat, C., Zanetto, A., Arus, P., and Laigret, F. 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). Theoretical and Applied Genetics, 85: 649-652.

10. Dufour, P., Grivet, L., D'Hont, A., Deu, M., Trouch, G., Glaszman, J.C., and Hamon, P. 1996. Comparative genetic mapping between duplicated segments on *maize* chromosomes 3 and 8 and homoeologous regions in *sorghum* and *sugarcane*. Theoretical and Applied Genetics, 92: 1024-1030.

11. Gong, L., Sftft, G., Kofler, R., Pachner, M., and Leyyey, T. 2008. Microsatellites for the genus cucurbita an ssr-based gebetic linkage map of *cucurbita pepo* L. Theoretical and Applied Genetics, 117:37-48.

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

13. Guimaraes, C.T., Sills, G.R., and Sobral, B.W.S. 1997. Comparative mapping of *Andropogoneae*: *Saccharum* and its relation to *sorghum* and *maize*. Crop Sciences, 94: 14261-14266.

14. 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*. Theoretical and Applied Genetics, 102: 616-622.

15. Korzun, V., Malyshev, S., Kartel, N., Westermann, T., Weber, W.E., and Borner, A .1998. A genetic linkage map of ray. Theoretical And Applied Genetics, 96: 203:208.

16. Kostia, S., Sirkaa, V., Vakkari, P., and Pulkkinen, P. 1995. Microsatellite sequences in s conifer, Pinus sylvestris. Genome, 38: 1244-1248.

17. Palop, M., Palacios, C., and Gonzalez-Candelas, F. 2000. Development and across-species transferability of microsatellite markers in the genus *Limonium* (*Plumbaginaceae*). Conservation Genetics, 1: 177-179.

18. 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.

19. Pan, Y.B., Burner, D.M., and Legendre, B.L. 2000. An assessment of the phylogenetic relationship among sugarcane and related taxa based on the nucleotide sequence of 5S rRNA intergenic spacers. Genetica, 108: 285-295.

20. 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.

21. Rallo, P., Tenzer, I., Gessler, C., Baldoni, L., Dorado, G., and Martin, A. 2003. Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. Theoretical and Applied Genetics, 107: 940-946.

22. Schut, J.W., Qi, X., and Stam, P. 1997.Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barely. Theoretical and Applied Genetics, 95:1161-1168.

23. 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.

24. 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.

25. Sharopova, N., McMullan, M.D., and Schultz, L. 2002. Development and mapping of SSR markers for maize: Plant Molecular Biology Reporter, 48: 463-481

26. Stiff, G., Zraiadi, A., and Lelley, T .2004. Development and characterization of microsatellite markers (SSR) in *Cuburbita* species. Cucurbit Genetic Crop, 27: 61-65.

27. Taramino, G., Tarchini, R., and Ferrario, S. 1997. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSR) in *sorghum bicolor*. Theoretical and Applied Genetics, 95: 66-72.

28. Temnykh, S., Declerck, G., and Lukashova, A. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*oryza sativa L.*): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Research, 11: 1441-1452

29. Tikhanov, A.P., SanMiguel, P.J., Nakajima, Y., Gorenstein, N.M., Bennetzen, J.F., and Avramova, Z.1999. Colinearity and its exception in orthologous and regions of the maize and sorghum. Crop Science, 96: 7409-7414.

30. Van Deynze, A.E., Sorrella, M.E., Park, W.D., Ayres, N.M., Fu, H., Cartinhour, S.W., Paul, E., and McCouch, SR. 1998. Anchor probes for comparative mapping of grass genera. Theoretical and Applied Genetics, 97: 356-369.

31. Zhao, X., and Kochert, G. 1993. Phylpgenetic distribution and genetic mapping of a (GGC) microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). Plant Molecular Biology Reporter, 21: 607-614.