

مطالعه ارتباط نشانگر RAPD با صفات مورفولوژی در شرایط مزرعه و کشت هیدروپونیک در گیاه نیشکر

محمد برات شوشتری^{۱***}، مهدی سلطانی^۲، شیران بهروز^۳، ارزانی احمد^۴، سولماز احمدیان^۵، کرامت ربیعی^۶
۵. دانشجو کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد ۲. کارشناسی ارشد اصلاح نباتات صنعتی اصفهان ۳. عضو هیئت علمی دانشگاه
شهرکرد ۴. عضو هیئت علمی دانشگاه صنعتی اصفهان ۶. دانشجو دکتری اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد
شهرکرد-دانشگاه شهرکرد-دانشکده کشاورزی- تلفن: ۰۶۱۱-۵۰۳۳۵۹۵ همراه ۰۶۱۱-۲۲۱۷-۰۹۱۶۳۰۰

behzadshoshtary@yahoo.com

soolmazahmadian@yahoo.com

k_rabiei@yahoo.com

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی رابطه نشانگر مولکولی RAPD با صفات مورفولوژی کیفی و نتایج فیزیولوژی و مورفولوژی کشت هیدروپونیک در گیاه نیشکر توسط رگرسیون مرحله ای با نرم افزار SAS روی شش واریته تجاری و امیدبخش که به طور وسیع در ایران کشت می شوند انجام شد. آزمایشات با استفاده از مارکر مولکولی RAPD صورت گرفت که از ۶۵ آغازگر مورد استفاده ۳۰ آغازگر در بین ارقام، پلی مورف بودند. طبق نتایج به دست آمده ۳۸۳ باند تشکیل گردید. تعداد نوارهای چندشکل ۲۵۶ عدد و تعداد نوارهای مونومورف ۱۲۷ عدد بودند که در مجموع ۶۸/۸۴ درصد چندشکلی به وجود آمد. در مرحله بعد صفات کیفی مورد بررسی قرار گرفتند، در این بررسی بعد از کمی سازی داده ها هر صفت به صورت مجزا و به عنوان متغیر وابسته و داده های مولکولی (۰ و ۱) به عنوان متغیر مستقل وارد مدل رگرسیونی شدند، این کار برای صفات به دست آمده از کشت هیدروپونیک نیز انجام شد و با انجام این کار باندهای وارد شده به مدل که بالاترین ضریب تبیین را دارا بودند و توانستند صفت مورد نظر را توجیه نمایند، مشخص گردیدند. نتایج نشان می دهد که با انجام این مطالعه می توان تصمیمات بهتری در مورد انتخاب ژنوتیپ ها در برنامه اصلاحی و حتی گروه بندی آنها اتخاذ نمود. ولی با این وجود انجام مطالعات مولکولی با مارکر RAPD و بدست آوردن نوارها با این ضریب تبیین فقط به صورت احتمال می باشند و با اطمینان خاطر صد در صد نمی توان باندهای گرفته شده را برای این صفات توجیه نمود. برای این کار نیاز به مارکرهای اختصاصی تر می باشد، که در مطالعه صورت گرفته به علت حجم زیاد کار و هزینه بر بودن آزمایشات قادر نبودیم از مارکرهای اختصاصی همچون AFLP، RFLP، SSR استفاده نماییم.
کلمات کلیدی: نیشکر، نشانگر مولکولی RAPD، رگرسیون مرحله ای

Study of relationships between RAPD markers and morphological traits in field and hydroponics conditions

Barat shooshtary, Mohammad¹; Soltani, Mahdi²; Shiran, Behrooz³; Rabiei, Keramat⁴; Ahmadian, Soolmaz⁵

1,5- Msc students of plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord
(behzadshoshtary@yahoo.com)

2- Plant breeding, Faculty of Agriculture, Isfahan University of technology

3- Plant breeding department, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord

4- Ph.D student of plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord (k_rabiei@yahoo.com)

Abstract

This study was conducted to evaluate the relationship between RAPD markers and morphological traits in sugarcane (*Saccharum spp*) using 6 important commercial varieties of Iran. 383 band were obtained (256 polymorph and 127 monomorph) and 30 out of 65 primers revealed polymorphism among cultivars. Associations between the RAPD and the phenotypic means of genotypes for the various quantitative were established using the multiple regression approach (stepwise method). Each quantitative trait was treated as a dependent variable and the variation molecular marker genotypes (scored 1 for presence and 0 for absence) as independent variables. The bands that finally were entered on the model and had high R² were discussed. The results showed that there is close relationship between each of the traits and the first band that were entered on the model. Therefore in the future studies, we could extract and use part of the genome that is in near relationship with the specific trait in sugarcane varieties.

Key words: Sugarcane (*Saccharum spp*), RAPD molecular marker, Stepwise regression

مقدمه

قبل از شناسایی و معرفی روش های نوین کار با مارکرهای مولکولی در ارزیابی روابط بین ژنوتیپ ها در یک گونه خاص غالباً صفات مورفولوژیک نقش عمده را ایفا می نمودند. اخیراً علم بیوتکنولوژی کمک شایانی در تشخیص روابط ژنتیکی و فیلوژنی در اصلاح گیاهان نموده است. نشانگر های مولکولی و صفات مورفولوژی هر دو می توانند تکمیل کننده یکدیگر باشند و نمی توانند به تنهایی ابزار مفید و سودمندی در متدهای مختلف اصلاحی محسوب شوند. گزارشات مختلف مبنی بر ارتباط توأم صفات مورفولوژی و مولکولی با استفاده از روش های آماری بیان شده است (۳، ۲، ۱ و ۴). یو و همکاران (۸) ارتباط بین صفت مقاومت به بیماری بلایت باکتریایی در لوبیا زراعی، با ژنوم این گیاه را توسط مارکر مولکولی RAPD بررسی کردند. در این میان با انجام تجزیه رگرسیون مرحله ای دو مارکر eAAEmCAG183 و eAAEmCAG333 در مجموع میزان ۵۱/۱ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه نمودند و نهایتاً همبستگی بالایی بین ژنوم گیاهی و صفت مقاومت به بیماری باکتریایی با این مارکر را گزارش دادند.

ویرک و همکاران (۶) با انجام آزمایش روی ۴۷ رقم زراعی برنج آسیایی و بکار گیری ۶۳ پرایمر چندشکل RAPD تعداد پنجه در بوته را تا ۰/۵۰ گلدی مورد ارزیابی قرار دادند. تجزیه رگرسیونی نشان داد که ۰/۸۵ از تنوع برای تعداد پنجه و کل تنوع برای زمان ۰/۵۰ گلدی که در آن مجموعه های مارکر RAPD به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شده را توجیه مینماید.

مواد و روشها:

در این آزمایش از شش رقم نیشکر مشتمل بر واریته های تجاری که به طور وسیع در منطقه خوزستان کشت می شوند و برخی از واریته های امید بخش که کارهای تحقیقاتی روی خصوصیات زراعی، عملکرد و بیماریها در حال انجام است، استفاده شد. در ابتدا صفات کیفی در شرایط مزرعه باتوجه به صفات مورفولوژیک کیفی که عبارتند از: طرز قرار گیری برگ، چسبندگی غلاف ساقه، رنگ برگ، حالت مومی ساقه، شکل میانگره ساقه، ترک چوب پنبه ای و رنگ ساقه انجام شد. بعد از این مرحله DNA ژنومی از ۳- ۱/۵ گرم برگ جوان، بر اساس روش تغییر یافته CTAB استخراج شد. کیفیت DNA استخراج شده به کمک الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش زنجیره ای پلی مرز بر اساس روش ویلیامز و همکاران (۷) با تغییر جزئی در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۲/۵ μL، ۱۰x بافر PCR، ۲۰ μM dNTPs، ۱۵ ng آغازگر ۰/۷ واحد Tag DNA Polymerase و ۵۰ ng از DNA الگو بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (پندر ف) که برای ۴۵ سیکل برنامه ریزی شده بود صورت گرفت. فرآورده های تکثیر توسط الکتروفورز ژل آگارز ۰/۱۰/۲ حاوی اتیدیوم بروماید ۰/۵x بافر TBE از یکدیگر تفکیک شدند. پس از الکتروفورز فرآورده های تکثیر در نور UV توسط gel doc عکس برداری شد. ژنوتیپ ها برای حضور (۱) و عدم حضور (۰) امتیاز بندی شدند. بعد از این دو مرحله قلمه هایی از ارقام مورد نظر تهیه شده و پس از ضد عفونی با سموم قارچکش قلمه ها را به گلخانه انتقال داده و به قطعات تک جوانه ای تقسیم شدند. سپس این قطعات در گلدانهای پلاستیکی کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام گردید. پس از جوانه زنی و سبز شدن قلمه ها گیاهانی که دو برگ کامل داشتند و از لحاظ ظاهری مشابه هم بودند به محیط هیدروپونیک حاوی محلول غذایی منتقل شد. محلول غذایی بر اساس روش تانیمو و همکاران تهیه گردید (۵). هر واحد آزمایش یک ظرف پلاستیکی ۷ لیتری درب دار بود که در آن ۵/۵ لیتر محلول غذایی جای گرفت. این آزمایش دو فاکتور داشت، تیمار شوری با سه سطح (۰/۰۵ و ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد) نمک NaCl و رقم با شش سطح فاکتورهای مورد استفاده بودند. در طول آزمایش ۳۰ صفت مختلف برای کشت هیدروپونیک مورد بررسی قرار گرفت که از میان این صفات: وزن خشک ساقه چه، وزن خشک برگ، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک کل، نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه، ارتفاع، تعداد پنجه در هر گیاه، سطح برگ، سدیم برگ، پتاسیم برگ، کلر برگ و کلسیم برگ به صورت دلخواه انتخاب و با داده های حاصل از نشانگر مولکولی RAPD تطبیق داده شدند. داده های حاصل از کار با مارکر مولکولی RAPD بعد از یکنواخت سازی به کمک نرم افزار NTsys 2.02 تجزیه و تحلیل شدند و محاسبات آماری خصوصیات کیفی و صفات حاصل از کشت هیدروپونیک به کمک نرم افزار SAS انجام شد.

ارتباط نشانگر مولکولی RAPD با صفات مورفولوژی کیفی و نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی و فیزیولوژی کشت هیدروپونیک برای هر صفت به صورت مجزا انجام شده است. در این مرحله برای تمام صفات رگرسیون به روش Stepwise انجام شد. در مدل مورد نظر صفات بررسی شده به عنوان متغیر تابع و داده های مولکولی (۱ و ۰) به عنوان متغیر ثابت وارد مدل رگرسیونی شدند. با توجه به صفات وارد شده به مدل، باندهایی که مقدار R² بالایی داشتند مورد بحث و بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث:

در بررسی مولکولی از ۶۵ آغازگر مورد استفاده ۳۰ آغازگر تولید الگوهای نواری چندشکل واضح نمودند و مجموعاً ۳۸۳ باند تشکیل شد. تعداد نوارهای چند شکل ۲۵۶ عدد و تعداد نوارهای مونومورف ۱۲۷ عدد می باشد، که مجموعاً ۶۶/۸۴ درصد چندشکلی مشاهده شد. در مرحله بعد رگرسیون مرحله ای با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. به ترتیب و به صورت مجزا داده های مولکولی با داده های حاصل از صفات کیفی مورفولوژیک وارد مدل شدند، تا باندهایی که بالاترین ضریب تشخیص را دارند مشخص شوند. اولین صفت کیفی فرم قرار گرفتن برگ است که نوار ۶۵ با ضریب تشخیص ۰/۸۶ بالاترین توجیه کننده ایستادگی برگ شد. دومین صفت، چسبندگی غلاف به ساقه است که نوار ۴۵۵ با مقدار R^2 برابر با ۰/۷۵ دارای ارتباط نزدیکی با این صفت بود. صفت سوم ترک چوب پنبه ای است که نوار ۲۳۲ به میزان ۰/۹۲ بالاترین R^2 را به خود اختصاص داد و بیانگر اصلی صفت مورد نظر بود. صفت بعدی فرم ساقه است که نوار ۴۹ بالاترین ضریب تشخیص را داشت و به صورت ۱۰۰ درصد ژنوتیپ فرم ساقه را توجیه نمود. در ادامه کار نوار ۴۹۶ با رنگ برگ ($R^2=0/86$) و نوار ۲۳۲ با مومی بودن ساقه ($R^2=0/86$) رابطه نزدیک و قابل توجهی داشتند (جدول ۱). در مرحله بعد صفات بررسی شده در کشت هیدروپونیک همانند صفات کیفی وارد مدل شدند و R^2 هایی که بالاترین ضریب تشخیص را داشتند برای هر صفت مشخص شدند (جدول ۲).

با توجه به موارد ذکر شده و نتایج مندرج در جداول می توان استنباط نمود که رابطه زیادی بین هر کدام از صفات مورفولوژی و باندهای تشکیل شده توسط پرایمرهای خاص RAPD وجود دارد. پیشنهاد می شود در مطالعات بعد با بکارگیری پرایمر های معرفی شده در جداول مذکور، قسمتهایی از ژنوم که ارتباط نزدیک با صفت مورفولوژی مورد مطالعه دارند، با تکنیک های مولکولی ویژه جدا شده و در مطالعات مولکولی از جمله آنالیز QTL استفاده شود. با این روش، ابزارهای مناسبی برای اصلاح نباتات در نیشکر بدست می آید.

جدول ۱- ضرایب تبیین اولین متغیر (مارکر) وارد شده به مدل رگرسیونی در روش step wise به تفکیک صفات مورفولوژی کیفی در شرایط مزرعه

صفت	شماره باند	پرایمر	R^2	صفت	شماره باند	پرایمر	R^2
۱- فرم قرار گرفتن برگ	۶۵	Opm35	۰/۸۶	۲- چسبندگی غلاف به ساقه	۴۵۵	Opm455	۰/۷۵
۳- فرم ساقه	۴۹	Opm20	۰/۱۰۰	۴- ترک چوب پنبه ای	۲۳۲	Opm8	۰/۹۲
۵- رنگ ساقه	۴۹۶	Opm15	۰/۸۶	۶- رنگ برگ	۴۹۶	Opm15	۰/۸۶
۷- مومی بودن ساقه	۲۳۲	Opm8	۰/۸۰				

جدول ۲- ضرایب تبیین اولین متغیر (مارکر) وارد شده به مدل رگرسیونی در روش step wise به تفکیک صفات مورفولوژی و فیزیولوژی در کشت هیدروپونیک

سطح شوری ۰/۵			سطح شوری ۰/۲۵			سطح شاهد			صفت
R2	پرایمر	شماره باند	R ²	پرایمر	شماره باند	R2	پرایمر	شماره باند	
۰/۷۹	Opm11	۱۸۵	۰/۷۱	Opm60	۴۷۴	۰/۷۵	Opm60	۴۷۴	۱-وزن خشک ساقه
۰/۸۸	Opm60	۴۷۴	۰/۷۱	OPM42	۱۴۲	۰/۷۳	Opm25	۳۴۷	۲-وزن خشک برگ
۰/۹۵	Opm20	۴۹	۰/۷۳	OPM60	۴۷۴	۰/۷۰	Opm20	۴۹	۳-وزن خشک اندام هوایی
۰/۹۲	Opm60	۴۷۴	۰/۷۴	OPM42	۱۴۲	۰/۷۵	Opm42	۱۴۲	۴-وزن خشک کل
۰/۷۶	OPM38	۱۰۲	۰/۶۴	OPM57	۴۸۲	۰/۸۷	Opm15	۴۹۲	۵-نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه
۰/۸۹	OPM60	۴۷۴	۰/۹۴	OPM20	۴۹	۰/۹۷	Opm20	۴۹	۶-ارتفاع
۰/۸۷	OPM55	۴۵۴	۰/۸۰	OPM35	۷۴	۰/۷۹	Opm29	۲۲۵	۷-تعداد پنجه
۰/۸۸	OPM33	۴۱۸	۰/۶۷	OPM20	۵۰	۰/۶۵	Opm57	۴۸۳	۸-سطح برگ
۰/۷۱	OPM15	۴۹۰	۰/۶۷	OPM35	۶۷	۰/۸۳	Opm20	۴۹	۹-سدیم برگ
۰/۹۹	OPM55	۴۵۶	۰/۸۵	OPM37	۱۷۱	۰/۷۳	Opm35	۶۷	۱۰-پتاسیم برگ
۰/۶۸	OPM60	۴۷۴	۰/۷۸	OPM22	۹۲	۰/۱۰۰	Opm15	۴۹۰	۱۱-کلر برگ
۰/۶۷	OPM21	۳۸۹	۰/۸۹	OPM15	۴۹۷	۰/۷۳	OPM16	۲۵۸	۱۲-کلسیم برگ

References

- Martinez, L., Caragnaro, P., Masuekki, R. And Rodriguez, J., 2003, Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Journal of Biotechnology*, Vol. 6, No. 3, pp. 241-250.
- Mcharo, M., Labonte, D. R., Oard, J. H., Kays, S. J. and Mclaurin, W. J., 2004, Linking quantitative traits with AFLP markers in sweetpotatoes using discriminant analysis, *Acta Hort.* Vol. 637, pp. 285-293.
- Mwamburi, M. T., 2005, Associating molecular markers which phenotypes in sweetpotatoes and liriopogons using multivariate statistical modeling, Ph.D dissertation Louisiana State Univ.
- Roldan-ruiz, L., Vaneeuwijk, F. A., Gilliland, T. J., Dubreil, P., Dillman, c., 2001, A comparative study of molecular and morphological method of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium prene* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genome*, Vol. 103, No. 8, p. 1138-1150.
- Tanimoto, T. T. 1969. Differential Physiological Response of sugarcane varieties to osmotic pressure of saline media. *Crop Sci.* Vol. 9, pp. 683-688.
- Virk, P. S., Ford-Lloyd, B. V., Jakson, M. T. and pooni, H. S., 1995. Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. *Rice Genetics III Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium*.
- Williams, J. G., kubelik, A. R., livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V., 1990, DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *nucl. Acids. Res.*, Vol. 18, pp. 6531-6535.
- Yu, K., Park S. J. and poysa, V., 2000, Markers-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. *Plant Breeding*, Vol. 119, pp. 411-415.