نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، ص. ۴۸۷-۴۸۰
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 27, No. 4, Winter 2014, P. 480-487
ISSN: 2008 - 4730

تجزیه ارتباطی برخی صفات مورفولوژیکی مهم با نشانگرهای RAPD در ۱۵ رقم خرمای ایران

منیره مارصفری[۱*]- علی اشرف مهرابی[۲]- زهرا طهماسبی[۳]- عبدالامیر راهنما[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۷

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی پیوستگی ۱۱ صفت مورفولوژی مهم با نشانگرهای مولکولی RAPD در ۱۵ رقم خرمای جمع‌آوری شده از مناطق جنوب و جنوب غرب ایران به صورت آنالیز جمعیت و با استفاده از روش رگرسیون گام به گام انجام گرفت. نتایج حاصل از رگرسیون ساده و چندگانه نشان داد که در مجموع ۸۴ نشانگر RAPD با حداقل یکی از صفات مورد بررسی پیوستگی معنی‌دار داشته‌اند. در این نشانگر ضریب تبیین در مجموع نشانگرهای آگاهی-بخش از ۳۲ (قطر هسته) الی ۷۵/۶ (شکل میوه) درصد متغیر بود. نشانگر Oligo ۲۱۴ در صفت قطر هسته (۲۶ درصد) و پس از آن الیگو ۲۱۱ در صفت شکل میوه (۲۴/۱درصد) بیشترین ضریب تبیین را به عنوان نشانگر سرگروه به خود اختصاص دادند. مقدار قابل توجهی از تغییرات مورفولوژیکی با استفاده از آغازگرهای Oligo ۴۲ با محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) ۰/۲۳ توجیه شدند. این نتایج گویای آن است که با توجه به توزیع بسیار مناسب DNA چندشکل تکثیر شده تصادفی (RAPD) در ژنوم خرما و نشانگرهایی که پیوستگی بالایی با صفات زراعی دارند، می‌توان از آن‌ها در شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش پیوسته با صفات زراعی مهم بهره جست.

واژه‌های کلیدی: خرما، صفات زراعی، RAPD، نشانگرهای آگاهی‌بخش

مقدمه

درخت خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera* L. یک درخت دائمی، تک‌لپه، دوپایه، هتروزیگوت، با سرعت رشد بسیار اندک و فاز تولید مثل دیر هنگام است (۸). خرما دومین محصول باغی ایران است که قدمت کشت آن در این کشور به بیش از ۴۰۰۰ سال پیش می رسد و بیش از ۴۰۰ رقم از آن در کشور موجود می‌باشد. از نظر تنوع رقم، ایران با دارا بودن ۴۰۰ رقم (برخی منابع ۶۰۰ رقم را هم ذکر کرده‌اند) از مجموع بیش از ۴۰۰۰ رقم مختلف موجود در جهان، غنی-ترین منبع ژرم‌پلاسم خرما را دارا است که در میان آن‌ها ارقام مختلف با درجه پاسخ متفاوت به انواع تنش‌ها موجود است و بدین منظور استفاده از ارقام مقاوم به تنش‌های زنده و غیر زنده و دارای ویژگی‌های مطلوب کمی و کیفی تنها روش حفظ آن‌ها به شمار می-رود (۳).

نشانگرهای مورفولوژیکی دارای توارث غالب و مغلوب هستند. تا چند سال اخیر، نشانگرهای ژنتیکی مورد استفاده برای ایجاد نقشه‌ها در گیاهان، صفات مورفولوژیکی از قبیل پاکوتاهی، آلبینیسم، شکل برگ و غیره بودند. متاسفانه مشکلاتی در استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی وجود دارد، از قبیل: نشانگرهای مورفولوژیکی چنان اثرات بزرگی بر روی فنوتیپ ایجاد می‌کنند که برای برنامه‌های اصلاحی نامطلوب هستند؛ اثرات ژن‌های کوچک اثر متصل را می-پوشانند که این امر تشخیص لینکاژهای مطلوب برای گزینش را تقریبا غیر ممکن می‌سازد؛ شدیدا تحت تاثیر محیط قرار می‌گیرند (۶). نشانگرهای مولکولی ابزارهای بسیار مهمی برای مدیریت نمونه‌های ژرم‌پلاسم در بانک ژن، ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف می-باشند، که برای دستیابی به این اهداف از نشانگرهای مولکولی متعددی استفاده می‌شود (۱۰). در بین نشانگرهای مولکولی، RAPD احتیاج به تجهیزات آزمایشگاهی ساده‌تری دارد و روش نسبتاً مطلوبی برای شناخت و مطالعه تنوع ژنتیکی می‌باشد. البته این تکنیک دارای محدودیت‌هایی از جمله عدم تکرارپذیری و حساسیت به شرایط آزمایشی می‌باشد که می‌توان با تکرار آزمایش از صحت نتایج اطمینان بیشتری پیدا کرد (۱۹). یکی از کاربردهای مهم نشانگرهای مولکولی، گزینش به کمک نشانگر[5] است که این جنبه کاربردی از

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران، گروه اصلاح نباتات دانشگاه ایلام
(*- نویسنده مسئول: Email: mmarsafari@yahoo.com)
۴- دانشیار و رئیس مرکز تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری کشور

5- Marker assistance selection

نشانگرهای مولکولی از اهمیت خاصی در برنامه‌های اصلاحی گیاهان برخوردار است. از آنجایی‌که در پروژه‌های اصلاح نباتات، هدف گزینش گیاهان مطلوب از نظر صفت مورد نظر است، بنابراین هر تکنیکی که به انتخاب زود هنگام آن صفت کمک نماید، می‌تواند دوره اصلاحی را کوتاهتر و کارایی انتخاب را بالا ببرد. این پدیده مخصوصا زمانی که نیاز به مدت طولانی برای بروز صفت باشد و یا اینکه گیاه دگرگشن بوده و صفت موردنظر پس از تلاقی بروز یابد، موثر است. در این روش پیوستگی ژنتیکی یا پیوستگی بین ژن مورد-نظر و یک نشانگر مولکولی دستمایه انتخاب است. در روش گزینش به کمک نشانگر می‌توان بر اساس حضور نشانگر پیوسته با ژن مورد نظر به حضور آن پی برد (۱).

زی‌سیانگ و همکاران (۲۱) از نشانگرهای SSR برای پیداکردن نشانگرهای پیوسته با ۱۶ صفت زراعی و کیفی گونه‌های زراعی و وحشی سویا استفاده نمودند که به ترتیب ۲۷ و ۳۴ نشانگر پیوسته با این صفات در گونه‌های زراعی و وحشی شناسایی نمودند. برات-شوشتری و همکاران (۲) به منظور مطالعه ارتباط ۳۰ آغازگر چندشکل از نشانگر RAPD و سری آغازگرهای OPM با ۳۰ صفت مورفولوژیکی در شرایط مزرعه و کشت هیدروپونیک گیاه نیشکر از تجزیه رگرسیون گام به گام استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که هریک از آغازگرهای ۱۵ OPM و ۲۰ OPM با ۴ صفت مورد بررسی رابطه نزدیک و قابل توجهی داشتند و ضریب تبیین مربوط به این دو آغازگر در محدوده‌ای از ۰/۱۰ الی ۰/۹۷ قرار گرفت. سایر صفات نیز با حداقل یک و حداکثر ۳ آغازگر از سری OPM و با ضریب تبیین حدود ۰/۱۰ الی ۰/۹۹ رابطه نزدیک و قابل توجه داشتند. رنجبر و همکاران (۵) ارتباط بین ۱۳ صفت کمی و ۱۴۰ نشانگر مولکولی SSR را در ۷۰ نمونه *Aegilops* بومی ایران بررسی نمودند و در نهایت ۸۷ نشانگر آگاهی بخش که حداقل با یکی از این صفات ارتباط داشت معرفی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که نشانگر Xgwm271-5D در اندازه ۱۴۰ جفت باز بیشترین R^2 با مقادیر ۳۷/۷، ۲۹/۵ و ۱۱ درصد به ترتیب تغییرات صفات طول سنبله، تعداد سنبلچه در سنبله و طول گره‌های محور سنبله را توجیه کرد.

متاسفانه با وجودی که ایران از نظر ذخایر ژرم‌پلاسم خرما قوی می‌باشد اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد ارتباط نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی مهم در این درخت صورت نگرفته است. هدف از این پژوهش شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش[1] مرتبط با صفات زراعی موردنظر در ۱۵ رقم خرمای ایران با استفاده از سیستم نشانگری RAPD می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۱۵ رقم خرمای ایران (جدول ۱) هر رقم با ۵ تک‌درخت استفاده شد (در مجموع ۷۵ ژنوتیپ مورد مطالعه قرار گرفت). مواد گیاهی از نخلستان‌های موجود در جنوب و جنوب غرب کشور جمع‌آوری شد و صفات عملکرد محصول، وزن ده دانه هسته، نوع بافت میوه، وزن میوه، طول و قطر میوه، شکل میوه، طول و قطر هسته، نسبت وزن میوه به هسته تک دانه خرما و نسبت طول به عرض هسته اندازه‌گیری شد. صفات انتخاب شده برخی از صفات با ارزش جهت تمایز ارقام هستند که توسط مرکز ثبت و گواهی نهال و بذر اندازه‌گیری شده‌اند (۴). برای اندازه‌گیری عملکرد محصول از هر رقم ۱۰ درخت به طور تصادفی انتخاب شد و پس از رسیدگی کامل و برداشت محصول، عملکرد هر درخت اندازه‌گیری شد. مشاهدات مربوط به میوه و هسته روی ۲۵ عدد میوه که به طور تصادفی از هر درخت و از وسط خوشه‌ها برداشت شده‌اند، انجام شد. اندازه‌گیری شکل میوه، نوع بافت میوه، طول و قطر میوه و هسته مطابق دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری"خرما" (۴) تهیه شده از مرکز ثبت و گواهی نهال و بذر انجام شد. برای کلیه اندازه‌گیری‌ها از ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم و کولیس‌ورنیه با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر استفاده شد.

به منظور آنالیز مولکولی و ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام مورد بررسی و نیز ارتباط میان نشانگرهای مولکولی با هریک از صفات زراعی، از هر رقم، ۵ درخت به طور تصادفی انتخاب شد و پس از برداشت، توده محصول هر رقم از میان هر توده ۵ بذر انتخاب گردید و پس از جوانه زنی بذور استخراج DNA از ۲۰۰ میلی‌گرم بافت سالم و جوان برگ با روش سقایی‌معروف (۱۸) با کمی تغییر و برای هر یک از گیاهان حاصل از هر رقم به صورت جداگانه، انجام شد. در نهایت DNA استخراج شده از ژنوتیپ‌های هر رقم در قالب جمعیت و به صورت بالک جهت انجام مراحل بعدی، مورد ارزیابی قرار گرفت. ۲۰ آغازگر RAPD مورد استفاده قرار گرفت که فقط ۱۰ آغازگر (جدول ۳) تکثیر شده و چندشکلی نشان‌دادند. نشانگرهای RAPD توسط شرکت Metabion آلمان (۱۳) ساخته شده و در مطالعات تنوع ژنتیکی به‌کار گرفته شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در دستگاه Bio Rad انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی بود که ۱۰ چرخه اول آن به صورت تاچ داون[2]، بدین صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو پنج درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد، برنامه‌ریزی شده بود.

1- Informative markers

1- Touch down

جدول ۱- مشخصات و محل جمع‌آوری ۱۵ رقم خرمای بومی ایران مورد استفاده در این تحقیق

شماره رقم	نام رقم	کد رقم	محل جمع‌آوری	ویژگی‌های ژئوگرافیکی محل جمع‌آوری طول جغرافیایی(N)- عرض جغرافیایی (E)
۱	برحی	A	آبادان	۲۴´ ۱۲´-۴۸° ۳۰°
۲	بریم	B	اهواز	۳۷´ ۱۵´-۴۸° ۳۱°
۳	خضراوی	C	اهواز	۳۷´ ۱۵´-۴۸° ۳۱°
۴	دیری	D	اهواز	۳۷´ ۱۵´-۴۸° ۳۱°
۵	زاهدی	E	اهواز	۳۷´ ۱۵´-۴۸° ۳۱°
۶	استعمران	F	اهواز	۳۷´ ۱۵´-۴۸° ۳۱°
۷	عویدی	G	اهواز	۳۷´ ۱۵´-۴۸° ۳۱°
۸	فرسی	H	آبادان	۲۴´ ۱۲´-۴۸° ۳۰°
۹	کبکاب	I	بهبهان	۱۴´ ۳۵´-۵۰° ۳۰°
۱۰	گنتار	J	اهواز	۳۷´ ۱۵´-۴۸° ۳۱°
۱۱	دگلت‌نور	K	اهواز	۳۷´ ۱۵´-۴۸° ۳۱°
۱۲	مجول	L	اهواز	۳۷´ ۱۵´-۴۸° ۳۱°
۱۳	پیارم	M	جهرم	۳۳´ ۲۹´-۵۳° ۲۸°
۱۴	شاهانی	N	اهواز	۳۷´ ۱۵´-۴۸° ۳۱°
۱۵	مضافتی	P	بم	۲۱´ ۰۶´-۵۸° ۲۹°

در ۲۵ چرخه بعد دمای اتصال (بسته به دمای آغازگر) ثابت بود. سپس جداسازی محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در بافر 1X TBE و ولتاژ ۹۰ اجرا گردید. نمونه‌ها پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط اشعه ماوراء بنفش ملاحظه و عکس‌برداری شدند. شاخص اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر آغازگر از طریق فرمول $PIC= \sum (1-p_i^2) /n$ محاسبه شد، که p_i فراوانی آلل iام و n تعداد کل ژنوتیپ‌هاست (۱۵). شاخص نشانگر از حاصلضرب تعداد نوارهای چندشکل در شاخص محتوای چندشکلی محاسبه شد (۱۲). تجزیه رگرسیون چندگانه به روش گام به گام برای ده صفت زراعی در ۱۵ رقم خرما با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد به طوری که در هر بار انجام تجزیه یکی از صفات مورفولوژیکی به عنوان متغیر وابسته (Y) و کلیه نشانگرها به عنوان متغیرهای مستقل (X) در تجزیه وارد شدند. با تعیین نشانگرهایی که درصد بالایی از تغییرات را توجیه کردند موقعیت آن‌ها بر روی ژل مشخص گردید.

نتایج و بحث

نتایج مورفولوژیکی

جدول ۲ ماتریس همبستگی پیرسون بین صفات مختلف را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که وزن ده هسته با عملکرد محصول و نسبت وزن میوه به هسته همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و با طول میوه، شکل میوه، بافت میوه، طول هسته و قطر هسته در سطح احتمال ۱ درصد و با نسبت طول به قطر میوه در سطح احتمال ۵ درصد همبستگی مثبت و معنی‌دار نشان داد. همبستگی مثبت و معنی‌داری میان نسبت وزن میوه به هسته، طول میوه، قطر میوه، شکل میوه با وزن میوه در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده شد، همچنین وزن میوه با بافت میوه همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد. نسبت وزن میوه به هسته همبستگی مثبت و معنی‌دار با عملکرد محصول و وزن میوه در سطح احتمال ۱ درصد و با قطر میوه در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد در صورتی‌که با وزن ده هسته و بافت میوه در سطح احتمال ۱ درصد و با نسبت طول به قطر میوه و طول هسته در سطح احتمال ۵ درصد همبستگی منفی و معنی‌دار داشته است. الفرچیچی- اواردا و همکاران (۱۱) گزارش نمودند که میان وزن ۳۰ دانه و نسبت وزن میوه به هسته با وزن هسته همبستگی مثبت و معنی‌دار وجود دارد. همچنین همبستگی منفی و بالا میان ارتفاع درخت، وزن ۳۰ دانه و نسبت وزن ۳۰ هسته به میوه وجود دارد.

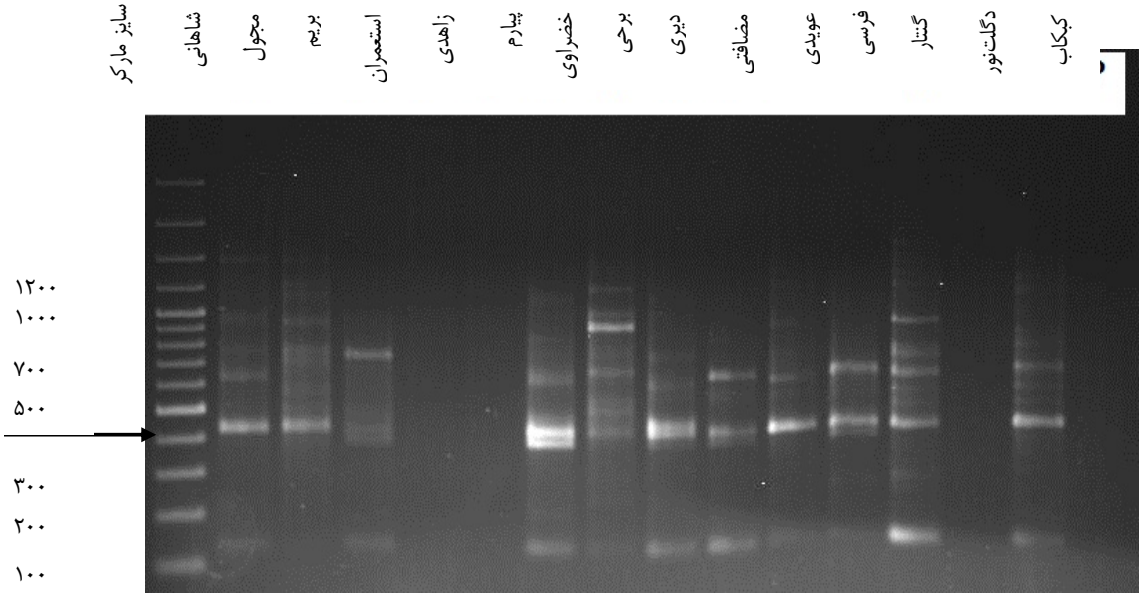
نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی RAPD در ۷۵ ژنوتیپ مورد مطالعه

از ۱۰ آغازگر RAPD مورد استفاده ۱۳۲ باند تولید شد که ۱۲۲ باند از آن‌ها چند شکل و ۱۰ باند دیگر مونومورف بودند. اندازه باندها از ۱۰۰ الی ۲۵۰۰ جفت‌باز (bp) در نوسان بود. توزیع مقدار PIC برای

آغازگرهای RAPD در محدوده‌ی ۰/۱۴۴ (Oligo ۳۴۲) الی ۰/۳۰۴ (Oligo ۲۱۱) با میانگین ۰/۲۲۸ قرار داشت. شاخص نشانگر نیز از ۰/۸۶۴ برای Oligo ۳۴۲ الی ۶/۹۹۲ برای Oligo ۲۱۱ با میانگین ۲/۹۱۵ در نوسان بود (جدول ۳). المشیله و همکاران (۹) به منظور شناسایی برخی از واریته‌های درخت خرمای عربستان سعودی از انگشت‌نگاری RAPD در ۵ واریته استفاده نمودند. آن‌ها گزارش نمودند که از ۱۲ آغازگر RAPD مورد استفاده ۶۴ باند تولید شد. در پژوهش دیگری راواشدی و امری (۱۶) به منظور ارزیابی ارتباط ژنتیکی واریته‌های درخت خرما از نشانگرهای RAPD برای توصیف ۵ واریته درخت خرما استفاده نمودند. ۳۰ آغازگر استفاده شد که از میان آن‌ها ۷ آغازگر چندشکل بود. موقائب و همکاران (۱۴) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین جنسیت درختان خرما، تنوع و ارتباط ژنتیکی ۶ ژنوتیپ نر و ماده درخت خرما را با استفاده از نشانگر RAPD و ISSR انجام دادند. مقدار پلی‌مورفیسم حاصل از این نشانگرها به ترتیب ۶۰/۲ و ۷۳ درصد برایRAPD و ISSR محاسبه شد.

نتایج بدست آمده از رگرسیون داده‌های مولکولی و مورفولوژیکی

نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون نشانگر RAPD ارتباط معنی‌دار میان ۸۴ نشانگر را با صفات بررسی شده نشان داد. در شکل ۱ یک نمونه از نشانگر آگاهی بخش RAPD مرتبط با صفت شکل میوه نشان داده شد. بیشترین و کمترین تعداد نشانگر RAPD به ترتیب مربوط به صفت شکل میوه (۱۲ نشانگر) و صفت قطر میوه (۴ نشانگر) بود. در این نشانگر ضریب تبیین در مجموع نشانگرهای آگاهی‌بخش از ۳۲ (قطر بذر) الی ۷۵/۶ (شکل میوه) درصد متغیر بود. نشانگر oligo ۲۱۴ در صفت قطر بذر (۲۶ درصد) و پس از آن oligo ۲۱۱ در صفت شکل میوه (۲۴/۱ درصد) بیشترین ضریب تبیین را به عنوان نشانگر سرگروه به خود اختصاص دادند (جدول ۴). ارتباط معنی‌دار ۸۴ نشانگر از ۱۲۲ نشانگر چندشکل RAPD به تفکیک صفات و تعداد متفاوت نشانگر RAPD (۱۲-۴ نشانگر) و معنی‌دار بودن مدل رگرسیون آن‌ها برای نشانگر اول (متغیر مستقل اول) و نیز کل نشانگرهای پیوسته با صفت زراعی مورد نظر (کل متغیرهای مستقلی که وارد مدل رگرسیونی شده‌اند) در جدول ۵ نشان داده شد. در این نوع نشانگر معنی‌داری مدل رگرسیون در صفت قطر میوه با ۴ نشانگر، عملکرد محصول، نسبت وزن میوه به هسته و قطر بذر با ۵ نشانگر، طول بذر با ۶ بذر، وزن ده هسته، بافت میوه، وزن میوه و نسبت طول به قطر میوه با ۹ نشانگر، طول میوه با ۱۱ نشانگر و شکل میوه با ۱۲ نشانگر را نشان می‌دهد. همه مدل‌های رگرسیونی برای نشانگر RAPD و برای تمام صفات در سطح یک درصد معنی-دار بود.



شکل ۱- جهت پیکان ردیف نشانگرهای آگاهی‌بخش مرتبط با شکل میوه و آغازگر Oligo ۲۱۱ را نشان می‌دهد

جدول ۲- ماتریس همبستگی پیرسون بین صفات مختلف در ۱۵ واریته درخت خرما

صفات	علائم اختصاری	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
عملکرد محصول	X1	۱										
وزن ده هسته	X2	-۰/۵۰۶**	۱									
وزن میوه	X3	۰/۲۱۰	۰/۱۵۷	۱								
نسبت وزن میوه به هسته	X4	۰/۵۸۰**	-۰/۴۵۳**	۰/۷۸۱**	۱							
طول میوه	X5	۰/۰۱۵	۰/۴۳۵**	۰/۳۰۶**	۰/۰۱۱	۱						
قطر میوه	X6	۰/۳۰۶**	۰/۰۰۵	۰/۳۰۳**	۰/۲۸۲*	۰/۲۴۷*	۱					
نسبت طول به قطر میوه	X7	-۰/۲۶۰*	۰/۲۸۴*	-۰/۱۰۹	-۰/۲۷۴*	۰/۳۴۰**	-۰/۷۷۹**	۱				
شکل میوه	X8	-۰/۰۲۶	۰/۴۱۱**	۰/۳۶۰**	-۰/۰۰۶	۰/۴۶۸**	۰/۲۷۴*	۰/۰۴۴	۱			
بافت میوه	X9	-۰/۴۲۵**	۰/۳۱۸**	-۰/۲۹۰*	-۰/۳۹۳**	۰/۲۰۷	-۰/۰۴۷	۰/۱۵۲	-۰/۰۵۲	۱		
طول هسته	X10	-۰/۵۹۷**	۰/۵۴۱**	۰/۰۸۹	-۰/۲۴۸*	۰/۱۱۲	-۰/۲۶۴*	۰/۳۱۰**	۰/۱۸۵	۰/۳۴۸**	۱	
قطر هسته	X11	۰/۰۹۴	۰/۳۷۶**	۰/۱۶۶	-۰/۰۶۹	۰/۱۷۲	۰/۰۹۳	۰/۰۰۲	۰/۱۱۱	۰/۰۲۲	-۰/۰۵۸	۱

*: همبستگی معنی دار در سطح احتمال α =۰/۰۵ **: همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال α =۰/۰۱

جدول ۳- شاخص‌های اندازه‌گیری شده برای نشانگرهای RAPD در بررسی تنوع ژنتیکی ۷۵ ژنوتیپ از ۱۵ رقم مختلف خرما

نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد کل الل‌های تکثیر شده	تعداد الل‌های چندشکل	اندازه الل‌ها	درصد چندشکلی (POL)	شاخص محتوای چندشکلی (PIC)	شاخص نشانگر (MI)
oligo۲۰۲	۵'- CAC GGC GAG T-۳'	۱۳	۱۲	۱۵۰-۱۵۰۰	۹۲/۳	۰/۲۰۴	۲/۴۴۸
oligo۳۳	۵'- CCG GCT GGA A-۳'	۱۵	۱۵	۲۵۰-۱۲۰۰	۱۰۰	۰/۱۹۵	۲/۹۲۵
oligo۲۹	۵'- CCG GCC TTA C-۳'	۶	۶	۳۰۰-۷۵۰	۱۰۰	۰/۲۳۳	۱/۳۹۸
oligo۳۴۵	۵'-GCG TGA CCC G-۳'	۱۳	۱۳	۲۰۰-۱۷۵۰	۱۰۰	۰/۲۸۱	۳/۶۵۳
oligo۳۴۹	۵'-GGA GCC CCC T-۳'	۱۳	۱۱	۲۰۰-۱۰۰۰	۸۴/۶	۰/۲۲۴	۲/۴۶۴
oligo۲۱۲	۵'- CAG CGA ACT A-۳'	۱۱	۱۰	۲۰۰-۱۰۰۰	۹۰/۹	۰/۲۰۹	۲/۰۹
oligo۲۱۴	۵'- CAT GTG CTT G-۳'	۱۷	۱۳	۲۰۰-۲۵۰۰	۷۶/۴	۰/۲۵۶	۳/۳۲۸
oligo ۴۲	۵'- TTA ACC CGG C-۳'	۱۳	۱۳	۳۰۰ -۱۷۵۰	۱۰۰	۰/۲۳۰	۲/۹۹
oligo۳۴۲	۵'-GAG ATC CCT C-۳'	۸	۶	۱۵۰-۱۱۰۰	۷۵	۰/۱۴۴	۰/۸۶۴
oligo۲۱۱	۵'- GAA GCG CGA T-۳'	۲۳	۲۳	۱۰۰-۲۰۰۰	۱۰۰	۰/۳۰۴	۶/۹۹۲

دمای اتصال: ۳۴، ۳۴، ۳۴، ۳۶، ۳۶، ۳۰، ۳۰، ۳۲، ۳۲، ۳۲

جدول ٤- نشانگرهای آگاهی بخش پیوسته با صفات و میزان تغییرات توجیه شده این صفات به کمک نشانگرهای RAPD

صفات	تعداد نشانگر	R^2_{max}	R^2_T	نشانگر سرگروه	طول نشانگر (جفت باز)
وزن ده دانه	۹	۰/۱۳۱	۰/۵۷۳	oligo ۳۴۹	۷۰۰
عملکرد محصول	۵	۰/۱۴۵	۰/۳۷۳	oligo ۲۱۳	۲۰۰
بافت میوه	۹	۰/۱۰۵	۰/۵۰۶	oligo ۴۲	۷۰۰
نسبت وزن میوه به هسته	۵	۰/۱۶۴	۰/۴۰۷	oligo ۲۱۳	۲۰۰
نسبت طول به قطر میوه	۹	۰/۱۳۱	۰/۵۷۳	oligo ۳۴۹	۷۰۰
وزن میوه	۹	۰/۰۹۶	۰/۵۲۹	oligo ۲۱۳	۳۵۰
طول میوه	۱۱	۰/۱۳۳	۰/۶۷۱	oligo ۴۲	۶۰۰
قطر میوه	۴	۰/۱۱۲	۰/۳۴۸	oligo ۲۹	۳۰۰
شکل میوه	۱۲	۰/۲۴۱	۰/۷۵۶	oligo ۲۱۱	۶۰۰
طول بذر	۶	۰/۲۲۱	۰/۴۰۹	oligo ۳۴۵	۳۵۰
قطر بذر	۵	۰/۲۶۰	۰/۳۲۰	oligo ۲۱۴	۱۲۰۰

R^2_{max}: بیشترین ضریب تبیین مربوط به یک نشانگر R^2_T: ضریب تبیین در مجموع نشانگرها

جدول ۵- تجزیه رگرسیون چندگانه با روش گام به گام برای ۱۱ صفت زراعی به عنوان متغیرهای وابسته و نشانگرهای آگاهی بخش به عنوان متغیرهای مستقل با استفاده از ۱۲۲ باند چندشکل RAPD

صفت	منبع واریانس	df	RAPD $_{max}$	df	RAPD $_{complete}$
وزن ده دانه	x^{***}	۱	۲۰/۲۸۴ **	۹	۹/۸۳۳**
	y^{***}	۷۳	۱/۸۳۹	۶۵	۱/۰۱۶
عملکرد محصول	X	۱	۵۳۴۰/۰۲۵**	۵	۲۷۴۱/۰۲۹**
	Y	۷۳	۴۲۹/۹۲۰	۶۹	۳۳۳/۶۰۹
بافت میوه	X	۱	۱۵/۶۸۴ **	۹	۸/۳۶۶**
	Y	۷۳	۱/۸۲۲	۶۵	۱/۱۲۹
وزن میوه	X	۱	۴۵/۳۱۴ **	۹	۲۷/۸۶۲**
	Y	۷۳	۵/۸۷۴	۶۵	۳/۴۳۷
نسبت وزن میوه به هسته	X	۱	۳۳۸/۷۲۶**	۵	۱۶۸/۴۷۸**
	Y	۷۳	۲۳/۷۰۲	۶۹	۱۷/۷۷۷
طول میوه	X	۱	۲/۳۸۱ **	۱۱	۱/۰۹۳**
	Y	۷۳	۰/۲۱۳	۶۳	۰/۰۹۳
قطر میوه	X	۱	۱/۳۷۸ **	۴	۱/۰۷۴**
	Y	۷۳	۰/۱۵۰	۷۰	۹/۱۱۵
نسبت طول به قطر میوه	X	۱	۲۰/۲۸۴**	۹	۹/۸۳۳**
	Y	۷۳	۱/۸۳۹	۶۵	۱/۰۱۶
شکل میوه	X	۱	۲۳/۷۵۸**	۱۲	۶/۲۱۷**
	Y	۷۳	۱/۰۲۶	۶۲	۰/۳۸۸
طول بذر	X	۱	۳۷/۸۴۱ *	۶	۳۷/۰۲۱ **
	Y	۷۳	۶/۹۲۵	۶۸	۴/۷۲۵
قطر بذر	X	۱	۱/۸۱۵*	۵	۱/۸۴۱**
	Y	۷۳	۰/۳۷۰	۶۹	۰/۲۸۴

* و **- به ترتیب معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد هستند. x^{***} رگرسیون و y^{***} باقیمانده (خطا) می‌باشند.

RAPD max: درصدی از تغییرات که توسط متغیر مستقل اول توجیه می‌شود.

RAPD $_{complete}$: درصدی از تغییرات که توسط کل متغیرهای مستقلی که وارد رگرسیون شده اند توجیه می‌شود.

جدول ٦- نشانگرهای RAPD مورد استفاده در دو نوع رگرسیون ساده و چندگانه

صفات فنوتیپی	نشانگرهای آگاهی بخش
وزن ده هسته	oligo ۳۴۹، oligo ۲۱۱، oligo ۲۱۳، oligo ۴۲، oligo ۳۴۲
عملکرد محصول	oligo ۲۱۳، oligo ۳۴۵، oligo ۳۳، oligo ۲۱۴، oligo ۴۲
بافت میوه	oligo ۴۲، oligo ۳۳، oligo ۳۴۲، oligo ۲۱۱، oligo ۳۴۹، oligo ۳۴۵
وزن میوه	oligo ۲۱۳، oligo ۳۴۵، oligo ۳۳، oligo ۲۰۳، oligo ۴۲
نسبت وزن میوه به هسته	oligo ۲۱۳، oligo ۳۴۲، oligo ۲۱۱، oligo ۳۴۹، oligo ۴۲
طول میوه	oligo ۴۲، oligo ۲۱۱، oligo ۳۴۹، oligo ۲۰۳، oligo ۳۳، oligo ۲۱۴، oligo ۲۱۳
قطر میوه	oligo ۲۹، oligo ۴۲، oligo ۳۳، oligo ۲۰۳
نسبت طول به قطر میوه	oligo ۲۱۳، oligo ۳۴۹، oligo ۳۳، oligo ۲۰۳، oligo ۴۲
شکل میوه	oligo ۲۱۱، oligo ۳۳، oligo ۲۰۳ ، oligo ۳۴۹، oligo ۴۲، oligo ۲۱۳
طول بذر	oligo ۲۹، oligo ۲۱۴، oligo ۳۴۵، oligo ۲۱۳
قطر بذر	oligo ۲۹، oligo ۳۴۹، oligo ۳۳، oligo ۲۱۴، oligo ۴۲

از میان ۱۲۲ نشانگر DNA بررسی شده در مجموع ۸۴ آغازگر RAPD با حداقل یکی از ۱۱ صفت مربوط به ویژگی‌های میوه، هسته و عملکرد محصول در هر دو سیستم نشانگری پیوستگی نشان دادند. آغازگر oligo ۴۲ از نشانگر RAPD با تمامی صفات غیر از طول بذر پیوستگی نشان داد (جدول ۶).

روی و همکاران (۱۷) تجزیه ارتباطی بین ۱۱ صفت زراعی و ۵۱۹ نشانگر SSR (۲۲۱ نشانگر)، SAMPL (۴۳ نشانگر) و AFLP (۲۵۵ نشانگر) را در گندم انجام دادند. در نشانگرهای SSR بیشترین میزان R^2 برای صفت شاخص برداشت با ۲۸ درصد و طول bp ۲۹۱ در آغازگر Xwmc44، در نشانگرهای SAMPL بیشترین میزان R^2 برای صفت شاخص برداشت با ۲۰ درصد و طول bp ۲۵۰ در ترکیب آغازگری $X_{CCS}S_6M_{CAG}$ و در نشانگرهای AFLP بیشترین میزان R^2 برای صفت تعداد گلچه در خوشه با ۲۹ درصد و bp ۱۶۰ در ترکیب آغازگری $X_{CCS}E_{AA}CM_{CTC}$ مشخص شد. آنان گزارش کردند که نشانگرهای بالا توزیع یکنواختی در اطراف صفات زراعی مورد بررسی داشتند که با توالی‌یابی نشانگرهای دارای R^2 بالا به یافتن ژن‌های کنترل‌کننده صفات زراعی و همچنین نشانگرهایی که دارای ارتباط فراوان با آن صفات هستند جهت اشباع نقشه‌های لینکاژی امیدوار بود. یو و همکاران (۲۰) 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 گام به گام دو نشانگر 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 نمودند. محمدی و همکاران (۷) با بررسی تجزیه ارتباطی ۱۱ صفت مورفولوژیکی در یونجه‌های زراعی از طریق روش رگرسیون گام به گام قادر به شناسایی ۱۷ نشانگر SSR شدند که با حداقل یکی از صفات ارتباط داشت. آن‌ها بیان داشتند که مقدار قابل توجهی از تغییرات مورفولوژیکی (صفات وزن تر و خشک برگ، وزن خشک ساقه، وزن خشک کل، و وزن تر کل) توسط نشانگر B14B03 توجیه شد. همچنین پیشنهاد نمودند که از این نشانگرها می‌توان در برنامه‌های اصلاح به کمک نشانگر استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که تعدادی از نشانگرها با بیش از یک صفت در ارتباط می‌باشند. با توجه به وجود همبستگی معنی‌دار بین تعدادی از صفات مورفولوژیک می‌توان نتیجه‌گیری نمود که همبستگی برخی از این صفات با یکدیگر بسیار زیاد است. نتایج این تحقیق در تأمین اطلاعات اولیه برای انتخاب غیر مستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید می‌باشد. بنابراین در برنامه‌های اصلاحی بکارگیری این آغازگرها ممکن است در شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخشی که همبستگی بالایی با صفات مهم زراعی دارند، مفید باشد. برخی از نشانگرها مانند Oligo ۴۲ با بیش از یک صفت پیوستگی داشتند و همبستگی دو به دوی بیشتر این صفات نیز معنی‌دار بود. نتایج رگرسیون گام به گام نیز نشان داد که مقدار قابل توجهی از تغییرات توسط این دو نشانگر توجیه می‌شوند و احتمالا ژن‌های مربوط به این صفات ژن‌های نزدیک به هم در مکان‌های کروموزومی بوده و ممکن است در فراهم آوردن اطلاعات اولیه در خصوص انتخاب غیر مستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید باشند.

منابع

۱- باقری ع.، شریفی ا.، و مشتاقی ن. ۱۳۸۶. بیوتکنولوژی گیاهی. نشر جهاد دانشگاهی مشهد.

۲- برات شوشتری م.، سلطانی م.، شیران ب.، ارزانی ا.، احمدیان س. و ربیعی ک. ۱۳۸۴. مطالعه ارتباط نشانگر RAPD با صفات مورفولوژیکی در شرایط مزرعه و کشت هیدروپونیک در گیاه نیشکر. خلاصه مقالات چهارمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. کرمان.

۳- حاجیان س. ۱۳۸۶. سیمای خرمای خوزستان. چاپ اول. انتشارات کردگار. اهواز.

۴- دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری خرما.۱۳۹۰. www.spcri.org/Pages/guideline.aspx

۵- رنجبر م.، نقوی م.ر.، زالی ع.ع.، آقایی م. ج. و مردی م. ۱۳۸۸. شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش ریزماهواره در *Aegilops crassa* بومی ایران. کشاورزی. شماره ۱۱.

۶- فارسی م.، و ذوالعلی ج. ۱۳۸۷. اصول بیوتکنولوژی گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. چاپ سوم.

۷- محمدی ر.، نقوی م.ر.، معالی‌امیری ر. و رضایی م. ۱۳۸۹. شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش ریزماهواره در بخشی از یونجه‌های زراعی (*Medicago sativa* L.) ایران. ژنتیک نوین.شماره ۵.

8- Adawy S.S., Hussein H.A.E., Ismail E.S. and EL-Itiby H.A. 2004. Genotyping Egyptian Date palm cultivars using RAPD, ISSR, AFLP markers and estimation of genetic stability among tissue culture derived plants. Arab Journal of Biotechnology, 8(1): 99-114.

9- Al-Moshile A.M., Motawei M.I., Al- Wasel A. and Abdel- latif T. 2004. Identification of some date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Saudi Arabiya Using RAPD fingerprinting, Journal of Agriculture and Marine Sciences, 9(1):1-3.

10- Botstein D.R., White R.L., Skolmick M. and Davis R.W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Human Genetic Journal, 32: 314-332.

11- El-Ferchichi Ouarda H., J-Walker D. and Larbi Khouja M. 2012. Phenotypic and nuclear DNA variation in Tunisian cultivars of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). African Journal of Biotechnology, 11(22): 6034- 6042.

12- Kumar M., Mishra G.P., Singh R., Kumar J., Niak P.K. and Singh S.B. 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. Journal of Physiology and Molecular Biology of Plants, 15(3): 225- 236.

13- Metabion. 2010. Available at www.metabion.com

14- Moghaieb R.E.A., Abdel- Hadi A.A., Ahmed M.R.A. and Hassan A.G.M. 2010. Genetic diversity and sex determination in date palms (*Phoenix dactylifera* L.) based on DNA markers. Arab Journal of Biotechnology, 13(2): 143-156.

15- Powell W., Morgante M., Ander C., Hanafey M., Vogel J., Tingy S. and Rafalaski A. 1996. The comparision of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. Journal of Molecular Breeding, 2: 225-238.

16- Rawashdeh I. and Amir A. 2006. Genetic characterization of date palm varieties using RAPD Markers. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 2(3).234-241.

17- Roy J.K., Bandopadhyay R., Rustgi1 S., Balyan1 H.S. and Gupta1 P.K. 2006. Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Journal of Curent science, 90:5-10

18- Saghai-Maroof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A. and Allard R.W. 1984. Ribosomal spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Journal of Proceedings of the National Academy of Sciences, 83: 1757–1761.

19- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Journal of Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535.

20- Yu K., Park S.J. and Poysa V. 2000. Markers-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. Journal of Plant Breeding, 119: 411-415.

21- Zi-Xiang W., Tuan-Jie Z., Yong-Zhan Z., Shun-Hu L., Chun-E W., Fang W. and UN-I C .2008. Association analysis of agronomic and quality traits with SSR markers in *Glycine max* and *Glycine soja* in China: Population Structure and Associated Markers. Journal of Acta Agronomica Sinica, 34: 1169-1178.