بررسی تنوع ژنتیکی مهم ترین ارقام نیشکر در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

محمد برات شوشتری[1*]، بهروز شیران[2]، شهرام محمدی[3] و سید عطاء الله سیادت[4]

[*]۱- نویسنده مسئول: دانشجو سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد(behzadshoshtary@yahoo.com)
۲و۳- دانشیاران گروه اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد
۴- استاد گروه زراعت دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۲۴

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و میزان خویشاوندی ۳۵ رقم نیشکر با استفاده از ٦٥ آغازگر RAPD برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی و خویشاوندی در برخی از واریته‌های تجاری *S. officinarum* و همچنین دو رقم وحشی *S. spontaneum* در ایران استفاده شد. DNA ژنومی هر رقم از برگ‌های جوان تازه روئیده بر اساس روش تغییر یافته CTAB استخراج شد و در حجم مناسبی از بافر TE حل گردید و غلظت آن توسط دستگاه بیوفتومتر اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل نشانگر RAPD به کمک آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی انتخابی انجام گردید. تمام ژنوتیپ ها برای حضور نوار و عدم حضور آن نمره گذاری شدند و به کمک نرم افزار NTSYS 2002 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از ٦٥ آغازگر مورد استفاده، ۳۰ آغازگر در بین ارقام چند شکلی نشان دادند و ٤٦٤ نوار چند شکل تولید شد. تجزیه کلاستر بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA واریته‌ها را در ۲ گروه مجزا قرارداد. در این تقسیم‌بندی دو رقم وحشی ازگونه *S. spontaneum* از بقیه واریته‌ها کاملاً جدا شدند و الگوی نواربندی کاملاً متفاوتی در مقایسه با سایر واریته‌ها نشان دادند. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نشانگر RAPD ابزار مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در نیشکر است و توصیه می‌شود به منظور افزایش کارایی برنامه‌های اصلاحی جهت بررسی دقیق تنوع ژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی، مورد استفاده قرار بگیرد.

کلید واژه ها: نیشکر، نشانگر مولکولی RAPD، تنوع ژنتیکی

مقدمه

نیشکر متعلق به خانواده غلات (گرامینه[1])، جنس ساکاروم[2] می‌باشد (۲و۵). در این جنس سه گونه زراعی ساکاروم افیسیناروم[3]، ساکاروم باربری[4] و ساکاروم ساینس[5] و دو گونه وحشی ساکاروم اسپونتانئوم[6] و ساکاروم روبوستوم[7] وجود دارد. تعداد کروموزوم در گونه‌های نیشکر متفاوت است؛ ولی با این حال تلاقی بین گونه‌ای امکان پذیر است (۵).

نیشکر از مهم ترین گیاهان قندی در جهان محسوب می شود. این گیاه پتانسیل تولید شکر با کیفیت بالا و به مقدار زیاد در واحد سطح زمین را داراست (۲و۳). علاوه بر شکر، برگ ها و سر شاخه های بریده، باگاس، ملاس، گل صافی و فراورده‌های شیمیایی از محصولات جانبی نیشکر هستند (۲و۶). بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین فاصله ژنتیکی نسبی موجود بین افراد یا جمعیت‌ها در نیشکر در برنامه های اصلاحی اهمیت ویژه‌ای دارد؛

1- *Gramineae*
2- *Saccharum*
3- *Saccharum Officinarum*
4- *Saccharum Barberi*
5- *Saccharum Sinense*
6- *Saccharum Spontaneum*
7- *Saccharum Robustum*

زیرا سازمان دهی ژرم پلاسم و گزینش به صورت موثر انجام می‌شود. همچنین اطلاع از شباهت‌های ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها، تکمیل کننده اطلاعات فنوتیپی در پیشبرد اصلاح جمعیت می‌باشد.

با توجه به این که ارزیابی منابع ژنتیکی کلکسیون‌های بذر و سازمان دهی و شناسایی ارقام مستلزم هزینه بالایی است، استفاده از مارکرهای ملکولی ارزان و ساده از قبیل RAPD[1] برای کسب اطلاعات سازمان دهی شده تا حد زیادی راهگشا می‌باشد (۱۶). در این روش توالی‌های نوکلئوتیدی در داخل DNA ژنومی در نواحی خاص هدف با استفاده از آغازگرهای اختیاری ده نوکلئوتیدی توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز[2] ارزیابی می‌شوند (۱۹).

با وجود غالب بودن و تکرارپذیری پایین نشانگر RAPD این تکنیک برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان متعدد در سطح گونه و جمعیت به کار رفته است (۱۳). فلیپ‌لئون و همکاران[3] (۱۰) با استفاده از نشانگر RAPD تنوع ژنتیکی بالایی بین ۳۹ رقم نیشکر را تشخیص دادند و از آن برای برنامه های اصلاحی و معرفی والد مناسب استفاده نمودند. نایر و همکاران[4] (۱۹) برای شناسایی و تنوع ژنتیکی ارقام نیشکر هندی با استفاده از نشانگر RAPD تعدادی نوارهای چند شکل اختصاصی برای واریته‌ها تشخیص دادند. کارپ و همکاران[5] (۱۵) با انجام مطالعه روی این نشانگر ارتباط بین ژنوتیپ‌های مختلف و همچنین تنوع ژرم‌پلاسم در جنس ساکاروم را بررسی نمودند و ارتباط کلی بین گونه‌های جنس ساکاروم در این بررسی را بسیار ناچیز گزارش دادند. از دلایلی که باعث شده که تنوع پایینی در سطوح ژنوتیپ نیشکرهای هندی گزارش شود، این است که تمام نیشکرها منشاء یکسانی داشته و تاریخچه آنها احتمالاً ناشی از استفاده مکرر تعداد اندکی از نیشکرهاست که به عنوان والد در نظر گرفته می‌شود (۲۲).

با توجه به اهمیت نیشکر در تولید قند و کشت و کار این محصول در نواحی جنوبی و شمالی کشور شناخت تنوع ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌ها جهت استفاده آنها در برنامه‌های به نژادی ضروری است. شناسایی ارقام پر محصول و مستعد برای مناطق جنوبی کشور این امکان را فراهم می‌آورد تا برنامه اصلاحی به ژنوتیپ‌های برتر محدود شده و منابع محدود مالی به صورت بهینه به اصلاح کمی و کیفی این ژنوتیپ‌ها اختصاص یابد. شناسایی ژنوتیپ‌هایی‌که با ارقام پر محصول شباهت بیشتری دارند و درک تنوع میان واریته‌های موجود می‌تواند منجر به تولید ارقام اصلاح شده در محدوده زمانی کمتر و عملکرد بالاتر شود.

این مطالعه با هدف گروه‌بندی مناسب و پیدا کردن ارتباط خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها و نیز بررسی شباهت و اختلاف در مواد ژنتیکی برای استفاده مطلوب در برنامه‌های اصلاحی و به نژادی انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

مواد ژنتیکی مورد استفاده در این مطالعه شامل ۳۳ رقم از بیش از ۲۰۰ رقم نیشکر اهلی (ساکاروم آفیسیناروم) و ۲ رقم وحشی (ساکاروم اسپونتانئوم) بود که از کشورهای مختلف وارد ایران شده‌اند. این مواد شامل، قدیمی‌ترین و جدیدترین ارقام موجود در کلون تحقیقاتی مرکز توسعه نیشکر اهواز می‌باشند که بر اساس عملکرد، تنوع، سازگاری و قرابت خانوادگی انتخاب و در این مطالعه بررسی شدند (جدول۱).

1- Random Amplified Polymorphism DNA
2- Polymerase Chain Reaction (PCR)
3- Felipeleon *et al.*
4- Nair *et al.*
5- Karp *et al.*

جدول ۱- نام و منشاء ۳۵ واریته و رقم مورد مطالعه در آزمایش های مولکولی (۹ و ۱۱)

شماره	نام رقم	والدین	منشاء
۱	B42-231	B3354×CP28-11	باربادوس
۲	CL73-239	مشخص نشد	فلوریدا-آمریکا
۳	Co1148	CO301×P4383	کویمباتور-هند
۴	COLK8001	CO62-175×CO1148	فلوریدا-آمریکا
۵	CP48-103	CP29-320×CO290	فلوریدا-آمریکا
۶	CP56-69	مشخص نشد	فلوریدا-آمریکا
۷	CP57-614	CL47-473×CP57-17	فلوریدا-آمریکا
۸	CP63-588	CL54-191×CP57-120	فلوریدا-آمریکا
۹	CP69-1062	مشخص نشد	فلوریدا-آمریکا
۱۰	CP70-321	CP57-614×CP61-39	فلوریدا-آمریکا
۱۱	CP72-2086	CP62-347×CP63-588	فلوریدا-آمریکا
۱۲	CP73-231	مشخص نشد	فلوریدا-آمریکا
۱۳	CRISTALINA	هیبرید طبیعی *S.officinarum*	گینه نو
۱۴	Ja64-20	Ja55-663×Ja54-309	مارونو-کوبا
۱۵	L62-96	CP52-68×CP44-154	لویزینا-آمریکا
۱۶	MEX57-473	CB40-77×CP43-47	مکزیک
۱۷	Spont1	وحشیORIGINAL	جنوب آسیا- وحشی
۱۸	My55-14	CP34-79×B45181	کوبا
۱۹	N30	77FO633×78F1025	جنوب آفریقا
۲۰	NCo310	CO421×CO312	آفریقا جنوبی
۲۱	NI9	NCO310×Poly cross . com Okinawa island	ژاپن
۲۲	PINDAR	Co270×MQ157	استرالیا
۲۳	RB83-5529	نامشخص؟×NA56-62	برزیل
۲۴	SP70-1143	IAC48-65×Poly cross. Decreas Brazil	برزیل
۲۵	SP71-6113	مشخص نشد	برزیل
۲۶	SP71-6163	NA5679×Poly cross former main com SP Brazil	برزیل
۲۷	TRITON	CO270×EROS	استرالیا
۲۸	TUC68-19	CP58-28×NA56-79	آرژانتین
۲۹	VESTA	مشخص نشد	استرالیا
۳۰	C86-456	مشخص نشد	کوبا
۳۱	C90-530	مشخص نشد	کوبا
۳۲	COK32	POJ2878×CO331	کویمباتور-هند
۳۳	CSG88-358	مشخص نشد	کوبا
۳۴	CSG88-365	مشخص نشد	کوبا
۳۵	Spont2	وحشی ORIGINAL	جنوب آسیا- وحشی

استخراج DNA

در این مرحله از آزمایش برگ‌های مربوط به هر رقم از مرکز توسعه و نیشکر امیرکبیر اهواز در تیر ماه سال ۱۳۸۴ برداشت شد و به منظور حفظ طراوت و شادابی، برگ‌ها روی یخ طی مدت یک روز به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد انتقال داده شدند. 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- و یا ازت مایع ۱۹۸- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند.

تعیین کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA

DNA ژنومی از ۳g-۱/۵ برگ جوان، بر اساس روش تغییر یافته CTAB (موری و تامپسون[1]) استخراج گردید (۱۸). DNA استخراج شده در بافر TE[2] حل گردید و غلظت آن در بافر توسط بیوفتومتر (اپندرف) اندازه‌گیری شد. برای این کار نمونه ها به نسبت ۲ درصد (۱۰ میکرولیتر محلول DNA + ۴۹۰ میکرولیتر بافر TE) رقیق و غلظت DNA هر نمونه با طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه بیوفتومتر (اپندرف) اندازه گیری و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{غلظت DNA (نانوگرم در میکرولیتر)} = \frac{\text{۵۰} \times \text{OD ۲۶۰ nm}}{\text{۲\%}}$$

همچنین از نسبت A۲۶۰/A۲۸۰ برای اندازه‌گیری خلوص DNA استفاده گردید.

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 (۲۳). نمونه‌هایی که دارای نسبتی خارج از دامنه ۲-۱/۸ بودند، حذف شده و استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی مربوطه مجدداً صورت پذیرفت.

همچنین کیفیت DNA استخراج شده به کمک الکتروفورز ژل آگارز نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، در مورد هر نمونه، ۲ میکرولیتر از محلول DNA با ۱ میکرولیتر محلول بافر بارگذاری و ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل شده در لوله های ۱/۵ میکرولیتری به خوبی مخلوط شدند. بعد از آماده شدن نمونه ها، ۱۰ میکرولیتر محلول حاصل در چاهک‌ها بارگذاری شده و الکتروفورز در بافر ۱X TAE با ولتاژ ۷۰ ولت، به مدت یک ساعت انجام شد. از الگوی الکتروفورزی به‌دست آمده برای تعیین کیفیت نمونه‌های DNA و نیز تأیید غلظت به دست آمده از دستگاه بیوفتومتر استفاده شد.

مشاهده نوارهای قوی با وزن مولکولی بالا نشان دهنده ی کیفیت مطلوب DNA استخراج شده می‌باشد. وجود نوار اسمیر نشان دهنده کیفیت نامناسب DNA و وجود هاله در قسمت انتهای محصول الکتروفورز نشان‌دهنده وجود RNA هضم نشده می‌باشد (۲۰).

ارزیابی نشانگر های RAPD

آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه از شرکت MWG BIOTECH، آلمان بودند، که ۶۵ آغازگر استفاده شد و مورد بررسی مقدماتی قرار گرفت و از بین آنها ۳۰ آغازگر که نوارهای واضح و پایدار تولید نمودند انتخاب شدند. واکنش زنجیره ای پلیمراز بر اساس روش ویلیامز و همکاران[3] (۲۷) با تغییر جزئی در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۲/۵ µl بافر PCR (۱۰X)، ۲۰۰ µM، dNTPs، ۱۵ng آغازگر، ۰/۷ واحد Polymerase و ۵۰ng از DNA الگو بود. تکثیر در دستگاه ترموسیکلر (اپندرف) که Taq DNA برای ۴۴

1- Murry & Thompson
2- Tris-EDTA
3- Williams *et al.*

سیکل برنامه ریزی شده بود به شرح زیر صورت گرفت:

۳ دقیقه در $۹۲^{o}C$ جهت واسرشت سازی آغازین و به دنبال آن ۴۴ سیکل هرکدام شامل ۱ دقیقه در $۹۲^{o}C$، ۱ دقیقه در ۳۵ و ۲ دقیقه در $۷۲^{o}C$ با ۱۰ دقیقه در $۷۲^{o}C$ جهت بسط نهایی انجام پذیرفت (۲۴). فراورده‌های تکثیر توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید در ۰/۵x بافر TBE با ولتاژ ۸۵ به مدت ۲/۵ ساعت از یکدیگر تفکیک شدند. سایز مارکر bp ۱۰۰ به عنوان نشانگر استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳). سپس ژل در زیر نور UV توسط دستگاه ژل داکیومنت[1] عکس برداری شد. حضور یا عدم حضور هر باند خاص با اعداد یک و صفر برای هر واریته نمره گذاری شد. به کمک نرم‌افزار آماری SEQUID داده ها یکنواخت شدند. نوارهای ضعیف و نوارهایی که تکرارپذیر نبودند در نظر گرفته نشدند. ماتریس داده‌های خام که در آن ستون‌ها برای ژنوتیپ‌ها و سطرها به نوارها اختصاص یافته بودند، تشکیل شد. ماتریس فاصله و ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد محاسبه و گروه بندی به روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYS 2002 انجام گرفت.

یکی از روش های مقایسه کارآیی الگوریتم های مختلف خوشه بندی، تخمین ضریب همبستگی کوفنتیک، معیار نکویی برازش گروه‌بندی (۱۶) می باشد که در آن همبستگی بین ماتریس شباهت یا فاصله (Y)، با ماتریس کوفنتیک (X) با استفاده از گزینه های COPH و MAXCOMP نرم افزار NTSYS برآورد می گردد. روشی که دارای بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک باشد، می‌تواند به عنوان مناسب‌ترین روش تجزیه و تحلیل تلقی گردد و به کار رود.

1- Gel-documentation

نتایج و بحث

از ۶۵ آغازگر مورد استفاده در این مطالعه ۳۰ آغازگر الگوهای نواری چند شکل واضح تولید نمودند و مجموعاً ۴۸۹ نوار تولید شد (شکل ۳). تعداد باندهای در نمونه های مختلف، متفاوت بود؛ زیرا تعداد باندهای RAPD آشکار شده توسط هر آغازگر به توالی آغازگر و میزان تنوع در نمونه های مورد استفاده بستگی دارد. اندازه نوارها بین ۲۹۲ تا bp ۲۸۲۲ متغیر بود. در بیشتر آغازگرهای مورد استفاده دو رقم وحشی ساکاروم اسپونتانئوم الگوی نواری کاملاً متفاوت با ۳۳ واریته ساکاروم آفیسیناروم تولید نمودند. با احتساب دو رقم وحشی Spont1, Spont2 تعداد ۴۶۶ نوار چند شکل تولید گردید و ۹۳/۹۸٪ چند شکلی وجود داشت و بدون در نظر گرفتن دو رقم وحشی تعداد نوارها ۳۳۹ و چند شکلی ۶۶/۴۹٪ شد (جدول ۲). این نتایج نشان می دهد که این باندهای منحصر به فرد می توانند به عنوان نشانگرهای مخصوص گونه در برنامه های آتی اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند.

این نتایج با گزارش های هاسکت و همکاران[2] (۱۴)، بارانکی و همکاران[3] (۸) و شیران و همکاران[4] (۲۶) در ارتباط با این حقیقت که تعدادی از باندهای RAPD به ترتیب در خانواده نیشکر و بادام قابلیت توارث نشان داده و می توان از آنها به طور موفقیت آمیزی به عنوان نشانگرهای مولکولی استفاده نمود، مطابقت نشان داد.

ضریب همبستگی کوفنتیک در این مطالعه R=۰/۰۹۸ برآورد گردید (شکل ۱) که نشان دهنده برازش بسیار خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اولیه بین واریته ها می باشد (۲۱). ضرائب کوفنتیک R≥ ۰/۹ برازش خیلی خوب، ۰/۹>R≥ ۰/۸ برازش خوب، ۰/۸>R≥ ۰/۷ برازش ضعیف و

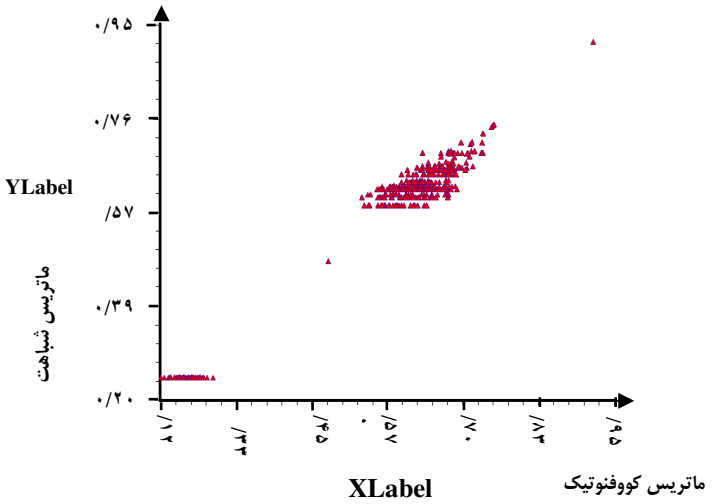
2- Huckett *et al.*
3- Baranek *et al.*
4- Shiran *et al.*

جدول ۲- اطلاعات مربوط به تعداد باندهای مشاهده شده، باندهای چند شکل و درصد چند شکلی آغازگرهای تصادفی RAPD در بین ۳۵ رقم و خویشاوند وحشی نیشکر

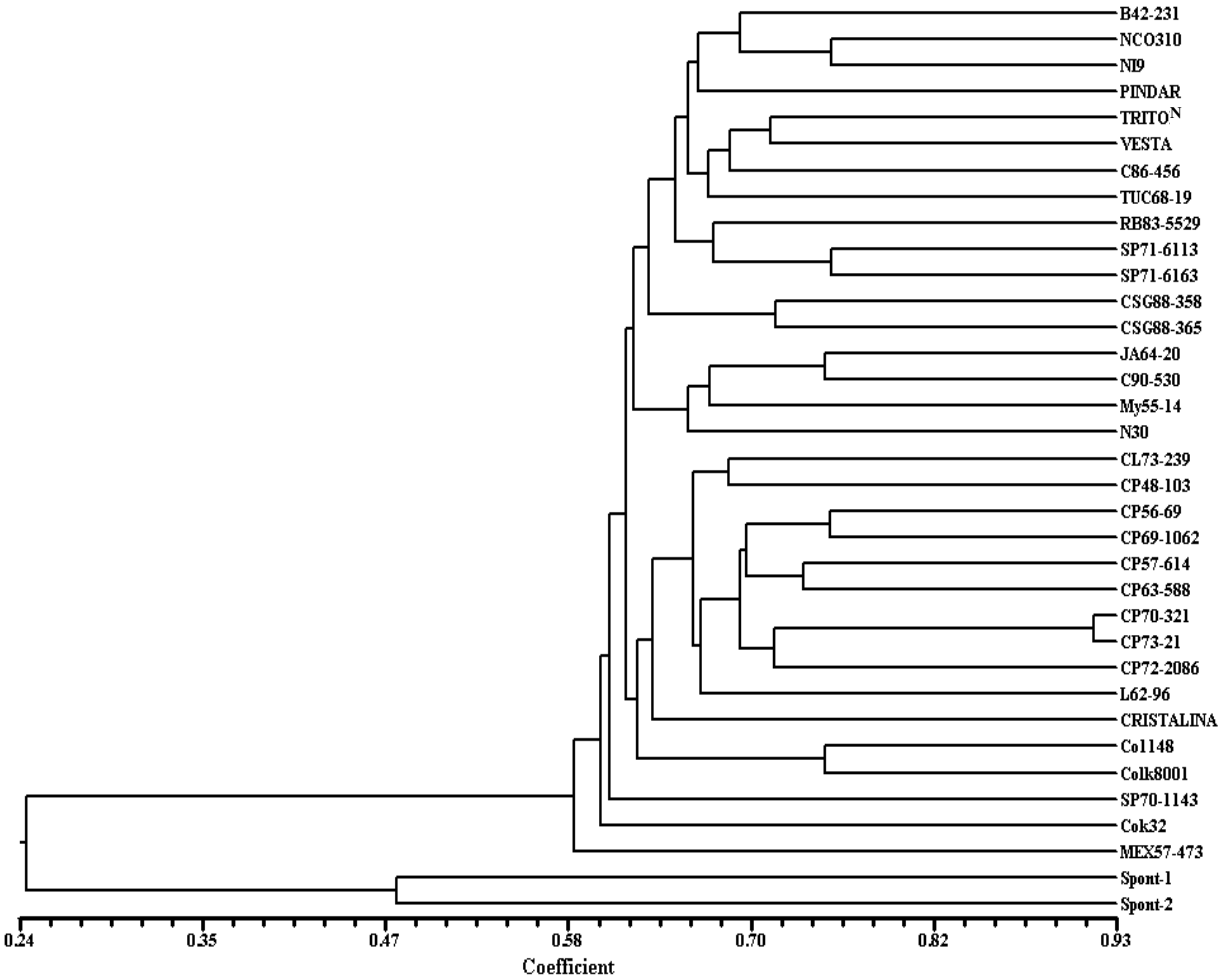
شماره ردیف	نام آغازگر	تعداد کل باند	تعداد باندهای چند شکل	درصد باندهای چند شکل
۱	OPM2	۶	۴	۶۶/۶۶
۲	OPM4	۱۸	۱۸	۱۰۰
۳	OPM5	۲۲	۲۲	۱۰۰
۴	OPM8	۱۹	۱۹	۱۰۰
۵	OPM11	۱۱	۸	۷۲/۷۲
۶	OPM15	۹	۹	۱۰۰
۷	OPM16	۱۶	۱۵	۹۳/۷۵
۸	OPM17	۱۸	۱۸	۱۰۰
۹	OPM18	۱۲	۱۱	۹۱/۶۶
۱۰	OPM19	۱۱	۱۰	۹۰/۹۰
۱۱	OPM20	۱۸	۱۸	۱۰۰
۱۲	OPM21	۲۱	۲۱	۱۰۰
۱۳	OPM22	۱۸	۱۷	۹۴/۴۴
۱۴	OPM23	۱۶	۱۵	۹۳/۷۵
۱۵	OPM25	۱۷	۱۵	۸۸/۲۳
۱۶	OPM27	۱۱	۱۱	۱۰۰
۱۷	OPM29	۱۵	۱۵	۱۰۰
۱۸	OPM32	۱۵	۱۳	۸۶/۶۶
۱۹	OPM33	۲۷	۲۷	۱۰۰
۲۰	OPM35	۲۲	۲۲	۱۰۰
۲۱	OPM36	۱۶	۱۶	۱۰۰
۲۲	OPM37	۱۶	۱۶	۱۰۰
۲۳	OPM38	۱۷	۱۵	۸۲/۲۳
۲۴	OPM40	۱۳	۱۱	۸۴/۶۱
۲۵	OPM42	۱۷	۱۷	۱۰۰
۲۶	OPM48	۲۰	۲۰	۱۰۰
۲۷	OPM50	۲۲	۲۲	۱۰۰
۲۸	OPM55	۲۱	۲۱	۱۰۰
۲۹	OPM57	۱۰	۶	۶۰
۳۰	OPM60	۱۴	۱۰	۹۳/۳۳

R< ۰/۷ برازش خیلی ضعیف را نشان می‌دهد. با این حال ضریب کوفنتیک پائین برای داده‌های مولکولی به مفهوم عدم کارائی آن الگوریتم نیست؛ بلکه نشان‌دهنده اختلاف در داده‌ها به علت وجود داده‌های گمشده می‌باشد (۱۷).

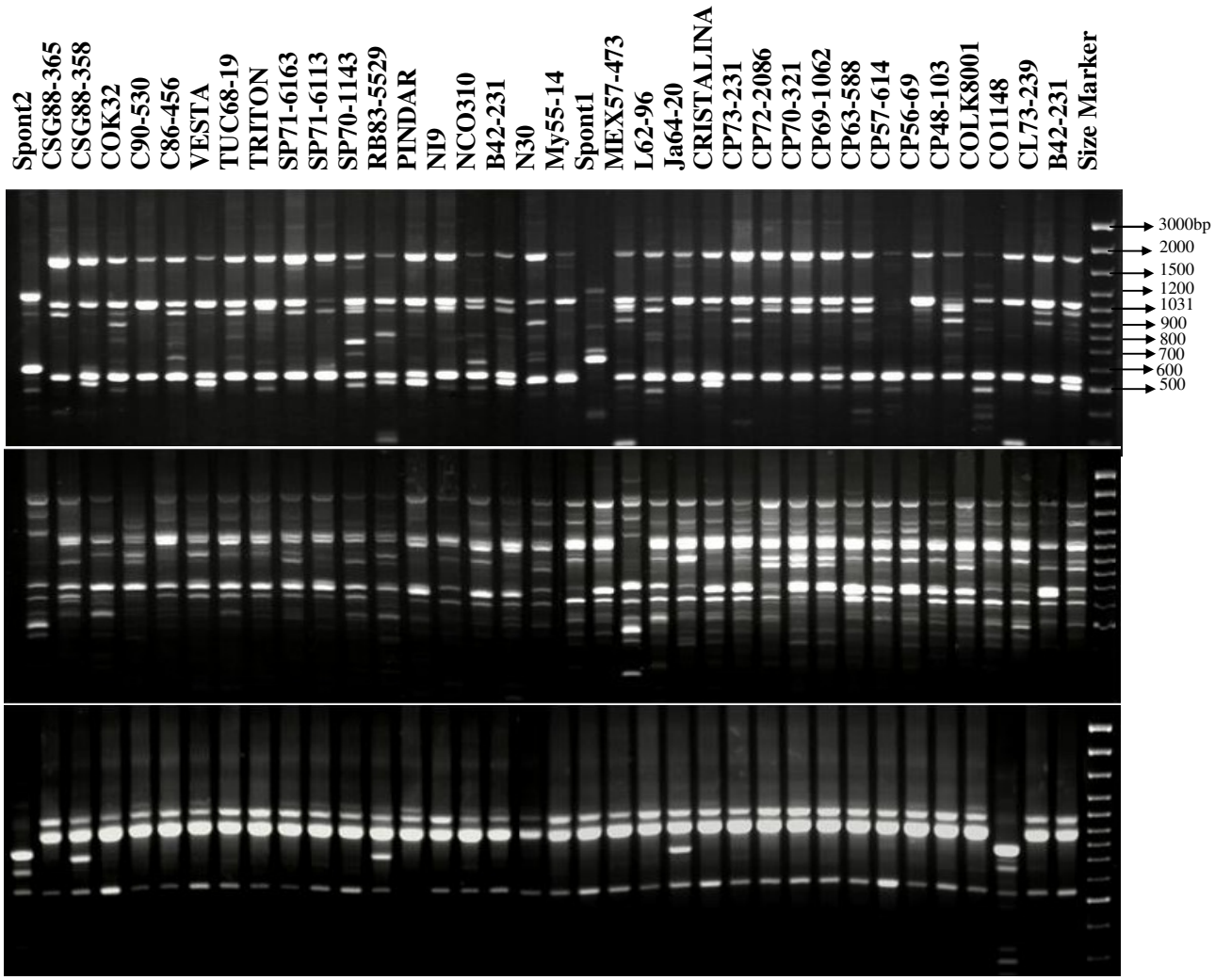
دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ارقام مورد مطالعه را در فاصله ۷۶٪ به دو گروه اصلی مجزا تقسیم کرد (شکل ۲).



شکل ۱- مقایسه ماتریس تشابه و ماتریس ضرایب همبستگی کوفنتیک



شکل ۲- دندروگرام ۳۵ رقم نیشکر رسم شده براساس ضریب تشابه جاکارد برای دادهای حاصل از نشانگر ملکولی RAPD



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای تصادفی به ترتیب از بالا به پائین OPM(55)، OPM(42) و OPM(27)

در کلاستر حاصل ۳۵ رقم و واریته به دو گروه اصلی تفکیک شدند.

در گروه اول ده زیر گروه داریم که به ترتیب در زیر گروه اول ارقام PINDAR ، NI9 ، NCo310 و B42-231 بودند، واریته NI9 از ژاپن و NCo310 از کویمباتور هند با فاصله ژنتیکی ۲۵٪ در یک مجموعه قرار گرفتند، که والد مادری رقم NI9 رقم NCo310 است (۱۱). فاصله ژنتیکی رقم PINDAR با منشاء استرالیا از رقم NI9 ۳۱٪ است. در این زیر گروه همگی ارقام بجز رقم B42-231 دارای یک جد مشترک می‌باشند.

در زیر گروه دوم ارقام VESTA و TRITON از استرالیا، TUC68-19 از آرژانتین و C86-456 از کوبا قرار دارند. در این کلاستر VESTA و TRITON با فاصله ژنتیکی ۲۹٪ و رقم های TUC68-19 و C86-456 با فاصله ی ۳۴٪ جای گرفتند.

در زیر گروه سوم ارقام SP71-6163، SP71-6113 و RB83-5529 با منشاء برزیل از بقیه ارقام جدا گردیدند. فاصله ژنتیکی رقم SP71-6163 با SP6113 ،۲۵٪ است.

زیر گروه چهارم به ارقام CSG88-265 و CSG88-258 با منشاء کوبا و با فاصله ۲۸٪ اختصاص پیدا کرد.

در قسمت دیگری از کلاستر در زیر گروه پنجم ارقام My55-14 ، C90-530 و JA64-20 از کوبا به همراه واریته N30 از جنوب آفریقا در یک مجموعه تقسیم‌بندی شدند.

فاصله ژنتیکی Ja64-20 با C90-530 برابر ۲۶٪ و فاصله Ja64-20 با واریته My55-14 ، ۲۹٪ می‌باشد.

در این زیر گروه رقم N30 با Ja64-20 در فاصله ۳۱٪ قرار دارند. زیر گروه ششم دارای ۱۰ واریته از منطقه فلوریدا و لویزینیای آمریکاست، که همراه واریته کریستالینا از گینه‌نو در یک زیر گروه کلاستربندی شدند. واریته کریستالینا هیبرید طبیعی از جنس ساکاروم افیسیناروم است که از اجداد این ۱۰ واریته محسوب می‌شود. در زیر گروه هفتم دو رقم COLK8001 و CO1148 از کویمباتور هند قرار دارند که والد مادری COLK8001 واریته Co1148 می‌باشد. در زیر گروه هشتم، نهم و دهم به ترتیب: MEX57-473 ، COK32 و SP70-1143 به صورت جداگانه از بقیه ارقام قرار گرفتند.

در گروه دوم اصلی دو رقم وحشی از گونه ساکاروم اسپونتانئوم از بقیه ارقام زراعی به طور کاملاً مجزا هستند و این دو رقم در فاصله ژنتیکی ۵۲٪ از هم قرار دارند.

فاصله‌های ژنتیکی رقم MEX57-473 با دو رقم وحشی ساکاروم اسپونتانئوم ۷۷٪ شده است (شکل ۲).

کلاستربندی حاصل از داده‌های مولکولی در این مطالعه، ارقام اهلی ساکاروم افیسیناروم را از ارقام وحشی جنس ساکاروم اسپونتانئوم تفکیک نمود. تفکیک ارقام ساکاروم اسپونتانئوم از ارقام ساکاروم افیسیناروم مشابه نتایج مطالعات به دست آمده از گلازمن و همکاران[1] (۱۲) و اسچینک و همکاران[2] (۲۴) با نشانگرهای دیگر است که کار با نشانگر RAPD و این تجزیه کلاستر را تأیید می‌نماید.

همچنین این نتایج با گزارش های سلوی و همکاران[3] (۲۵)، کرمی (۴) و الوالا و همکاران[4] (۷) به ترتیب با استفاده از نشانگرهای SSR و TRAP جایی که جنس و گونه های مختلف ساکاروم در دندروگرام به صورت جداگانه گروه بندی شدند، مطابقت نشان داد.

با دقت به این دندروگرام متوجه خواهیم شد که علاوه بر این که ارقام اهلی و وحشی از هم جدا

1- Glazmann *et al.*
2- Schenck *et al.*
3- Selvi *et al.*
4- Alwala *et al.*

شدند، ارقام نیز بر اساس والدین، منشاء و نام‌های مشابه با استدلال کافی در کنار هم قرار می‌گیرند؛ اما در بین ۳۵ واریته، بعضی از ارقام نا متجانس با این که از نظر منشأ و یا این که اسم واریته تشابه دارند، نیز در بین ارقام کلاستر قرار گرفتند. اسچینک و همکاران (۲۴) گزارش دادند، که با مطالعه روی گونه‌های نیشکر بومی و زراعی ارقامی که بعضاً نام‌های مشابه داشتند و انتظار می‌رفت که از نظر ژنتیکی در کنار هم قرار گیرند، در کلاستربندی در گروه‌های مختلف قرار گرفتند. در ضمن ارقام جدیدی که تولید می‌شوند محصول سطوح بالای پلی‌پلوئیدی هستند که احتمال دارد بین کروموزوم‌ها به مقدار خیلی زیاد همپوشانی به وجود آید؛ به همین دلیل رقابت بین جایگاه های مختلف متعدد برای یک پرایمر RAPD فوق العاده زیاد است و استفاده از این گونه پرایمر ها به دلیل تکرار ناپذیری برای شناسایی ارقام مفید نیست؛ ولی برای بررسی تنوع می تواند مفید واقع شود.

استفاده از آغازگرهای زیادتر کمک بیشتری به تفکیک و گروه‌بندی ارقام می‌نماید؛ ضمن این که استفاده از تکنیک‌های دیگر مانند:AFLP و SSR برای تشخیص تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام نیشکر توصیه می‌شود. ارزیابی صحیح تنوع ژنتیکی امکان شناسایی ترکیب‌های مختلف به منظور ایجاد نتایج با حداکثر تنوع ژنتیکی برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی مختلف را فراهم می‌کند.

در این مطالعه تنوع مطلوبی بین ارقام به دست آمد و می توان با فواصل ژنتیکی به دست آمده والدین مناسب را جهت تلاقی در برنامه‌های به نژادی انتخاب نمود. از آنجا که ارقامی که فاصله ژنتیکی بیشتری دارند، امکان هتروزیس بیشتری را خواهند داشت، بنابراین انجام تلاقی بین والدین که فاصله ژنتیکی بیشتری دارند، کارایی بهتر در زمینه تولید ارقام هیبرید خواهند داشت. بنابراین بر اساس نتیجه به دست آمده از این تحقیق بهترین تلاقی جهت دستیابی به ارقام هیبرید مطلوب، بین واریته زیر گروه دهم، نهم، هشتم به ترتیب-MEX57 473، COK32 ، SP70-1143 با واریته های زیر گروه اول کلاستر اصلی PINDAR، NI9، NCo310 و B42-231 حاصل خواهد شد. مطالعات دیگری نیز در همین راستا با استفاده از نشانگر RAPD و صفات مورفولوژیک (۱) و نشانگر SSR و صفات مورفولوژیک (۴) صورت گرفت و در استفاده توام از دو روش مولکولی و مورفولوژیک برای بررسی تنوع ژنتیکی، معرفی و انتخاب بهترین والدین جهت تلاقی به منظور بهره برداری از پدیده هتروزیس و تفکیک متجاوز، والدین معرفی شده از نظر صفت مورد مطالعه، بر اساس دندروگرام مربوط به صفات مورفولوژیک در دو کلاستر جداگانه قرار گرفتند و بر اساس داده های مولکولی حداکثر فاصله ژنتیکی را از هم داشتند و نتیجه فوق را تایید می کنند.

نتایج این تحقیق به طور کلی نشان می‌دهد، که نشانگر RAPD ابزار مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی در نیشکر است و توصیه می‌شود به منظور افزایش کارایی برنامه‌های اصلاحی ارقامی که فاصله ژنتیکی بیشتری دارند مانند: NCo310 با MEX57-473 تلاقی داده شوند.

سپاسگزاری

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

منابع

۱. برات شوشتری، م. ۱۳۸۴. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نیشکر با استفاده از صفات مورفولوژی و نشانگر مولکولی RAPD. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، ۱۱۲ ص.

۲. برات شوشتری، م. احمدیان، س. اصفیاء، ق. ۱۳۸۷. نیشکر در ایران. انتشارات کتابیران (آییژ)، چاپ اول.۳۷۶، ص.

۳. خواجه پور، م. ر. ۱۳۷۷. تولید نباتات صنعتی. انتشارات جهاد دانشگاهی، دانشگاه صنعتی اصفهان، چاپ چهارم، ۲۵۰ ص.

۴. کرمی، ث. ۱۳۸۵. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نیشکر با استفاده از نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیک. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، ۱۰۵ ص.

۵. یزدی صمدی، ب. و عبد میشانی، س. راهی، م.ر. ۱۳۸۶. اصلاح نباتات زراعی. مرکز نشر دانشگاهی، چاپ ششم، ۲۸۳ ص.

۶. یوسف آقلی، ن. ۱۳۷۹. خواص دارویی شکر و نیشکر. مجله شکر شکن، شماره ۴۰، صص ۳۴-۳۷.

7. 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 Science, 46: 448-455.

8. 8- Baránek, M.J., Raddová, J., and Pidra, M. 2006. "Comparative analysis of genetic diversity in Prunus L. as revealed by RAPD and SSR markers". Scientia Horti, 108: 235-259.

9. Don, J., and Heinz, I. 1987. Sugarcane improvement through breeding. (Developments in crop science 11), 562: 578-582.

10. Felipeleon, J.R., Cesar, A., Domingo, A., Jose, Q., and Melgar, M. 2001.Use of RAPD markers to detect genetic variability among 39 sugarcane varicties. Proc. International Society Cane Technol (International Society of Sugarcane Technologists), 24: 634-636.

11. Gelasio prez, D.R. 1997. Recursos genecicos, de la cana De Azucar. INICA, Cuba, 116-249.

12. Glazmann, J.C., Noyer, J.L., Feautret, A., Feldmann, P. and Panaud. C. 1989: Biochemical genetic markers in sugarcane. Theor. Appl. Genet, 78: 537-543.

13. Greene, S.L., Gritsenko, M., and Van demark, G. 2004. Relating morphologic and RAPD marker variation to collection site environment in wild populations of red clover (Trifolium Pratense L.). Genetic Resources and Crop Evolution, 51(6): 643-653.

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

15. Karp, A., Seberg, O., and Buiatti, M. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. Annals of Botany, 78: 143-149.

16. Katsiotis, A., Hagidimitiou, M., Orossou, A., Copontikis, T., and Loukas, M. 2003. Genetic relationship among species and cultivars of pistachio using RAPDs and AFLPs. Euphytica, 123:179-286.

17. Mohammadi, S.A., and Prasanna, B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants statistical tools and considerations. Crop Science, 43: 1235-1248.

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

19. Nair, N.V., Salvi, A. Sreenivasan, T.V., and Pushpalatha, K.N. 2002. Molecular diversity in Indian sugarcane cultivars as revealed by randomly amplified DNA polymorphism. Euphytica, 127: 219-22.

20. Popi, J., Rajnpreht, J., Kanneberg, L.W., and Pauls, K.P. 2000. Random amplified polymorphism diversity in the hierarchical, open-ended population enrichment maize breeding system. Crop. Science, 40:619-625.

21. Rohlf FJ. 1998. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.02Exeter Software, Setauket, NY.

22. Roy, D. 2000. Plant breeding: Analysis and exploitation of variation. Alpha Science International Ltd, Pang Bourne, India. pp: 163–195.

23. Samboork, J., Maniatis, T., and Fritsch, E.F. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, CSH Press.

24. Schenck, S., Crepeau, M.W., Wu, K.K., Moore, P.H., Yu, Q., and Ming, R. 2004. Genetic diversity and relationships in native Hawaiian *Saccharum officinarum* sugarcane. Journal of Heredity, 95(4): 327-331.

25. 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.

26. Shiran, B., Ameirbakhtiar, N., Kiani, S., Mohamadi, Sh., Tabatabaei, BES. and Moradi, H. 2007. Molecular characterization and genetic relationships among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. Scientia Horticulturae, 111: 280–292.

27. Williams, G.K.J., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers is useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18 (22): 6531-6535.