Archive of SID

"نهال و بذر"
جلد ۱۹، شماره ٤ ، اسفند ۱۳۸۲

استفاده از تکنیک AFLP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در کلزا (*Brassica napus* L.)*

Study of Genetic Diversity in Canola (*Brassica napus* L.) Using AFLP Technique

مهدی رهایی، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری، سیروس عبدمیشانی و محمدعلی ملبوبی

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و مرکز ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

تاریخ دریافت: ۸۱/۱۲/۲٦

چکیده

رهایی، م.، سیدطباطبائی، ب. ا.، شاه‌نجات بوشهری، ع. ا.، عبدمیشانی، س.، و ملبوبی، م. ع. ۱۳۸۲. استفاده از تکنیک AFLP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در کلزا (*Brassica nupus* L.). **نهال و بذر** ۱۹: ٤۸۱-٤٦۹.

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی بین ارقام کلزا از تکنیک AFLP استفاده گردید. در کل ۲۱٤٥ باند با استفاده از ۲۰ آغازگر انتخابی AFLP حاصل شد که از این تعداد ۱۰٥۸ باند چند شکل بود. تشابه ژنتیکی بین ارقام، با استفاده از ضریب جاکارد تعیین گردید. دامنه تغییر تشابه ژنتیکی بین ۰/۳۸ تا ۰/۸٤ و میانگین ۰/٦۱ بود. دندروگرام‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش Complete Linkage و همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، ارقام را از یکدیگر تفکیک کردند. نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که ارقام در چهار گروه قرار می‌گیرند. بر اساس این نتایج چنین استنباط شد که می‌توان از تکنیک AFLP به عنوان ابزاری کارا و مؤثر در تعیین روابط ژنتیکی در بین ارقام کلزا استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، تنوع ژنتیکی، AFLP، تجزیه خوشه‌ای.

مقدمه

در برنامه‌های به‌نژادی و حفظ ذخایر توارثی، اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی از اهمیت خاصی برخوردار است. نشانگرهای مبتنی بر DNA مناسب‌ترین روش برآورد تنوع ژنتیکی به شمار می‌روند (Odonougue *et al.*, 1999). نشانگرهایی که سطوح بالاتری از تنوع را نشان می‌دهند از کارایی بیشتری برخوردار می‌باشند.

در حال حاضر در بررسی تنوع ژنتیکی محصولات زراعی‌و باغی، از دو تکنیک AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) و SSR (Simple Sequence Repeat)، بیشتر از سایر روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده می‌گردند (Maguire *et al.*, 2002). AFLP که تکثیر انتخابی DNA برش یافته از طریق واکنش

* قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول که به گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ارائه گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشد، تکرارپذیری RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) و قدرت و سهولت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز را به طور توأم به همراه دارد (Vos *et al.*, 1995). نشانگرهای AFLP در خصوص هر نوع DNA با هر پیچیدگی بدون نیاز به اطلاع قبلی از توالی‌های ژنوم، سنتز آغازگر، تهیه خزانه ژنی و یا تهیه پروب، قابل استفاده می‌باشند (Zabeau and Vos, 1993). با توجه به این ویژگی‌های منحصر به فرد، تکنیک AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی گروه متنوعی از موجودات از جمله میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات به کار رفته است (Janssen *et al.*, 1996; Karp *et al.*, 1997). لیما و همکاران (Lima *et al.*, 2002) با استفاده از نشانگرهای AFLP، ۷۹ رقم نیشکر مورد استفاده در برنامه‌های اصلاحی و چهار گونه دیگر را بررسی نموده و میزان تنوع ژنتیکی بین ارقام را با این تکنیک ارزیابی نمودند. سلیمانی و همکاران (Solimani *et al.*, 2002) ارقام گندم دوروم را بر اساس AFLP و شجره آن‌ها بررسی کردند. آن‌ها پی بردند علیرغم فشار گزینشی، هنوز تنوع قابل توجهی در بین این ارقام وجود دارد. لومبارد و همکاران (Lombard *et al.*, 2000) پتانسیل نشانگرهای AFLP را در شناسایی ارقام یک کلکسیون کلزا بررسی نمودند. میاشیتا و همکاران (Miyashita *et al.*, 1999) با استفاده از تکنیک AFLP فواصل ژنتیکی ٤٧ توده از گونه‌های داتوره را تعیین نمودند. علاوه بر مطالعات فوق از AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی بادمجان (Mace *et al.*, 1999b)، سویا (Maughan *et al.*, 1996)، عدس (Sharma *et al.*, 1996)، آفتابگردان (Hongtrakul *et al.*, 1997)، چای (Paul *et al.*,1997)، کاهو (Hill *et al.*,1996)، جو (Russel *et al.*, 1997)، برنج (Zhu *et al.*, 1998) و کاساوا (Chavarriaga-Aguirre *et al.*,1999) استفاده شده است. هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان خویشاوندی ارقام کلزای مرسوم در کشور با تکنیک AFLP بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعداد ۲۰ رقم کلزا در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

استخراج DNA

استخراج نمونه‌های گیاهی با روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1983) صورت گرفت. تعیین کمی و کیفی DNA با استفاده از دو روش الکتروفورز ژل و اسپکتوفتومتری انجام گردید.

تکنیک AFLP

واکنش AFLP براساس روش ووس و همکاران (Vos *et al.*, 1995) به شرح زیر انجام شد:

www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات مرفولوژیکی ارقام مورد استفاده

Table 1. Morphological characteristics of cultivars used in the experiment

ردیف No.	رقم Cultivar	منشأ Origin	شروع گلدهی از کاشت B. F. (days)	اتمام گلدهی از کاشت E. F. (days)	طول دوره گلدهی F. P. (days)	رسیدگی از کاشت M (days)	ارتفاع گیاه P. H. (cm)	تعداد شاخه B. N.	تعداد غلاف در گیاه P/P	تعداد دانه در غلاف S/P	وزن بذر S. W. (g)	شاخص برداشت H. I. (%)	عملکرد دانه Y ($kgha^{-1}$)
1	Slm-046	Germany	193	220	27	253	166	5	104	27	3.30	23.00	3873
2	Modena	Denmark	196	220	24	251	166	7	191	25	3.25	21.5	3963
3	Sponsor	Sweden	147	173	26	234	147	6	149	20	3.07	22.0	4623
4	L-2	Yaguslavia	192	213	21	243	113	7	128	24	3.12	22.0	3042
5	Herald	Denmark	197	219	22	250	156	5	134	23	2.84	23.0	2742
6	Hopper	Denmark	197	221	24	249	169	5	177	24	2.86	24.5	3065
7	Colvert	France	191	216	25	249	156	6	136	23	3.76	24.8	3109
8	Cobra	Mexico	198	208	20	261	166	7	170	25	3.98	20.5	3076
9	Parade	Netherlands	196	217	21	248	165	5	118	25	3.20	23.5	3816
10	Cyclon	Canada	148	172	24	236	164	7	128	21	3.32	22.0	4300
11	Excel	Canada	180	216	36	244	95	5	128	20	3.60	24.2	3169
12	Alice	France	193	216	23	250	158	6	139	24	3.25	26.3	3918
13	Turner	Denmark	196	220	24	251	159	6	162	20	3.41	23.5	3154
14	PAU C-61	France	197	220	23	250	153	5	119	20	2.99	23.5	2463
15	PF 7045, 91	Germany	179	205	26	246	143	6	149	22	3.38	20.7	2816
16	GWC	Germany	192	218	26	250	160	6	166	25	3.03	20.2	2991
17	SYNI	Iran	177	209	32	246	138	5	139	25	3.76	22.9	3786
18	Hyola-42	Canada	170	201	31	246	138	6	151	24	3.88	25.3	4368
19	Rafaela	Italy	151	166	16	236	154	5	148	25	2.07	21.3	4336
20	Licord	Germany	194	219	25	253	166	5	131	26	3.23	20.5	2871

B.F. = Beginning of flowering
E.F. = End of flowering
F.P. = Flowering period
M = Maturity
P. H. = Plant height
B. N. = Branch number
P/P = Pod per plant
S/P = Seeds per pod
S.W. = Seeds weight
H. I. = Harvest index
Y = Yield

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

الف- برش DNA ژنومی (Digestion)

DNA ژنومی با استفاده از دو آنزیم *Eco*RI و *Mse*I تیمار گردید. اجزا واکنش ٤٠ میکرولیتری برای هر نمونه عبارت بود از: ٤ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر One-Phor-all (تریس استات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷، استات منیزیم ۱۰۰ میلی‌مولار و استات پتاسیم ۵۰۰ میلی‌مولار)، ۵ واحد آنزیم *Eco*RI، ۵ واحد آنزیم *Mse*I، ۰/۵ میکروگرم DNA ژنومی و آب مقطر. این واکنش در ۳۷ °C و به مدت ۳ ساعت صورت گرفت.

ب- اتصال آداپتور (Ligation)

اجزاء حجمی واکنش ۱۰ میکرولیتری برای اتصال آداپتور برای هر نمونه عبارت بود از: ۱ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر مرحله هضم، ۱۰ میلی‌مولار ATP، ۵ میکرومولار آداپتور *Eco*RI، ۵۰ میکرومولار آداپتور *Mse*I، ۱ واحد آنزیم T_4 DNA لیگاز و آب دو بار تقطیر. این محلول پس از آماده شدن به محلول تهیه شده در مرحله هضم اضافه و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار داده شد.

ج- تکثیر مقدماتی (Pre Amplification)

اجزاء واکنش ۲۵ میکرولیتری تکثیر مقدماتی عبارت بود از: ۵۰ نانوگرم از هر کدام از آغازگرهای بدون باز اضافی *Eco*RI (E000) و *Mse*I (M000)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر (تریس ۱۰۰ میلی‌مولار، کلرید پتاسیم ۵۰۰ میلی‌مولار با pH برابر ۸/۳)، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط نوکلئوتیدی ($dNTP_S$)، ۱ واحد آنزیم تک DNA (*Taq*) پلیمراز، ٦ میکرولیتر DNA حاصل از مرحله برش و اتصال آداپتور و آب دوبار تقطیر. قابل ذکر است که DNA حاصل از مراحل برش و اتصال آداپتور به میزان ۵ برابر با آب مقطر رقیق شد و از این محلول، ٦ میکرولیتر به عنوان DNA الگو در تکثیر مقدماتی استفاده گردید. سی چرخه دمایی تکثیر مقدماتی شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ٦۰ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (٦۰ ثانیه) بود. واکنش‌ها در ترموسایکلر Perkin-Elmer مدل 480 تعیین گردید.

د- تکثیر انتخابی (Selective Amplification)

اجزاء واکنش ۲۰ میکرولیتری تکثیر انتخابی به شرح زیر بود:

۵۰ نانوگرم از هر کدام از آغازگرهای *Eco*RI و *MSe*I (به ترتیب با ۳ و ۲ باز انتخابی)، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر با همان اجزاء تکثیر مقدماتی، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط نوکلئوتیدی، ۱ واحد آنزیم تک DNA پلیمراز و ۲ میکرولیتر DNA حاصل از تکثیر مقدماتی (DNA حاصل از تکثیر مقدماتی به میزان ۵ برابر با آب مقطر رقیق شد) و آب دو بار تقطیر. در مجموع ۳٦ چرخه دمایی در چهار بخش استفاده گردید. بخش اول حاوی یک چرخه دمایی شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ٦۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (٦۰ ثانیه)، بخش دوم ۱۱ چرخه شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد (۳۰ثانیه)، ٦۵ درجه سانتی‌گراد

www.SID.ir

Archive of SID

(۳۰ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ثانیه) بود که در هر چرخه، دمای اتصال به میزان یک درجه کاهش یافت به طوری که دمای اتصال چرخه یازدهم به ۵۶ درجه رسید. بخش سوم ۲۳ چرخه، شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۵۶ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) و بخش چهارم (بسط نهایی)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. واکنش‌ها در ترموسایکلر Perkin-Elmer مدل 480 تعیین گردید.

الکتروفورز

فرآورده‌های حاصل از تکثیر انتخابی را با حجمی مساوی (۲۰ میکرولیتر) از بافر نمونه‌گذاری (فرمالدئید ۹۸٪، EDTA ۱۰ میلی‌مولار، زایلن سیانول و برموفنل) مخلوط و پس از ۵ دقیقه استقرار در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سریعاً روی یخ قرار داده شدند. و از هر نمونه به میزان ۱۰ میکرولیتر در ژل ۶٪ پلی اکریل آمید واسرشت قرار داده شد.

بافر الکتروفورز، TBE ۱ برابر، ولتاژ ثابت آزمایش ۲۰۰ ولت، زمان ۱۳۵ دقیقه و دمای ژل در طول الکتروفورز ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود، قبل از الکتروفورز اصلی، الکتروفورز مقدماتی (بدون نمونه‌گذاری) به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط فوق صورت گرفت.

رنگ‌آمیزی ژل

به منظور رؤیت باندها از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره به صورت زیر استفاده شد. ابتدا جهت تثبیت، هر ژل به مدت ۸ دقیقه در محلول حاوی اسید استیک ۰/۵ درصد و اتانول ۱۰٪ قرار گرفت. سپس برای رنگ‌آمیزی، هر ژل به مدت ۱۵ دقیقه در محلول حاوی ۰/۵ درصد اسید استیک، ۱۰٪ اتانول و ۰/۲ درصد نیترات نقره قرار گرفت. در ادامه به مدت ۳۰ ثانیه با آب دوبار تقطیر شستشو داده شدند. برای ظهور باندها از محلول ۶٪ سود و ۰/۱٪ فرمالدئید به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید. در پایان نیز با آب مقطر شستشو داده شدند (Sanguinetti *et al.*, 1994).

تجزیه داده‌ها

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc ver2.02 (Rolfh et al., 1990) انجام شد. ماتریس صفر و یک بر اساس داده‌های حاصل از امتیازبندی ژل‌ها تشکیل شد. برای تعیین تشابه بین ارقام از ضریب جاکارد (Jaccard *et al.*, 1908) استفاده گردید. گروه‌بندی ارقام با استفاده از روش Complete Linkage صورت گرفت. برای تعیین نیکویی برازش خوشه‌بندی با ماتریس تشابه، همبستگی بین ماتریس تشابه با دندروگرام مربوطه ضریب کوفنتیک (Cophenetic Coefficient) محاسبه گردید. تجزیه به مختصات اصلی (Principal Coordinate Analysis) نیز مکمل با روش تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت.

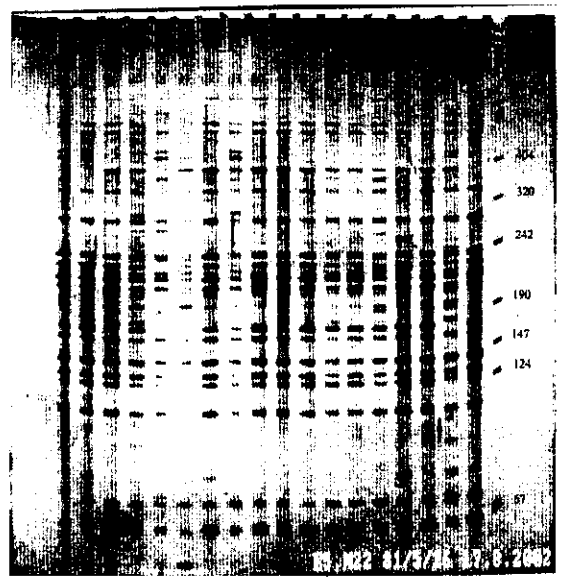
نتایج و بحث

در این تحقیق ۲۰ جفت آغازگر روی ۲۰ رقم کلزا آزمایش گردید، که از این تعداد،

www.SID.ir

Archive of SID

۵ جفت آغازگر انتخاب شدند. توالی آغازگرهای انتخاب شده E-ACA/M-GT، E-ACG/M-TC، E-CGA/M-GA، E-GGA/M-GC، E-AAG/M-GG بود (شکل ۱). دامنه انتخاب باند بین ۷۰ تا ۷۰۰ جفت باز بود. اغلب باندهای مورد مطالعه در محدوده ۲۵۰ تا ۵۰۰ جفت بازی قرار داشتند. در مجموع، ۲۱٤۵ باند تولید گردید که تنها باندهای چند شکل مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. از ۱۵۵ باند مورد مطالعه، ۱۰۵ باند چند شکل بود. جفت آغازگر E-AAG/M-GG بیشترین چند شکلی و E-ACG/M-TC کمترین چندشکلی را ایجاد کردند. بیشترین تشابه (۰/۸٤) بین دو رقم Sim-o46 و Modena و کمترین تشابه (۰/۳۸) بین دو رقم Rafaela و Syn-1 و میانگین ضریب تشابه ۰/٦۱ بود. تجزیه خوشه‌ای، ارقام را در چهار گروه متمایز قرار داد (شکل ۲). میزان همبستگی بین ماتریس تشابه و ماتریس کوفنتیک حاصل از آن (p = ۰/۰۰۱) r = ۰/۸۵ بود. این نتایج هیچ رابطه‌ای را بین داده‌های حاصل از آنالیز مولکولی و داده‌های حاصل از اطلاعات مرفولوژیکی نشان نداد. اگر چه هر دو نوع آنالیز ارقام را در چهار گروه متمایز قرار دادند، ولی ارقام را در این گروه‌ها در دو آنالیز با هم تفاوت داشتند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از داده‌های AFLP، اگرچه اندکی با یکدیگر تغییر داشتند، ولی در حالت کلی (داده‌های پنج آغازگر)، ارقام را با یک فاصله ژنتیکی قابل قبول از هم جدا می‌کرد. به خاطر دشواری امتیازبندی باندهای AFLP و همچنین اشتباهاتی که در اثر تغییر در کیفیت ژل به وجود می‌آید، حذف باندهای بسیار ضعیف و یا نادر می‌توانست تا حد زیادی از بروز خطا در

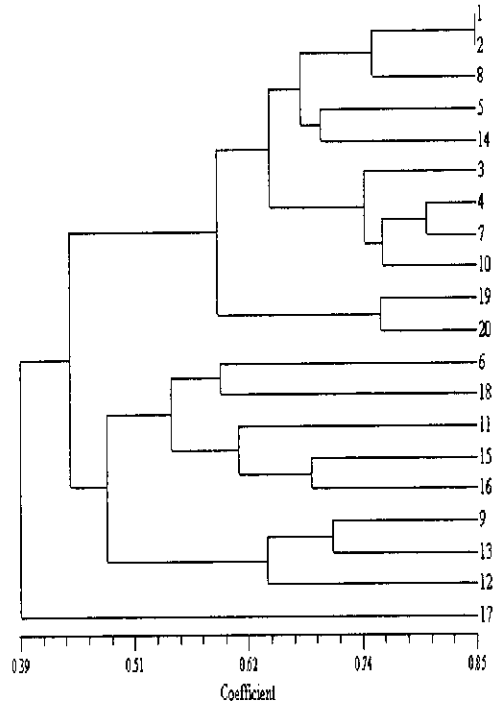


شکل ۱- تصویر یک انگشت‌نگار AFLP با استفاده از آغازگرهای E-ACA و M-GT

Fig. 1. AFLP fingerprint using E-ACA and M-GT primers

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه نشانگر AFLP در ارقام کلزا

(ارقام بر اساس جدول ۱ شماره‌گذاری شده‌اند)

Fig. 2. Dendrogram of AFLP marker

(1, 2, 3... cultivar numbers, see Table 1)

محاسبه تشابه بین افراد جلوگیری کند که این کار صورت گرفت (Powell et al., 1996). برای داشتن دیدگاه بهتر راجع به فواصل ژنتیکی بین ارقام و همچنین برای مشاهده فواصل ژنتیکی بین ارقام به صورت چند بعدی، تجزیه به مختصات اصلی نیز مکمل با روش تجزیه خوشه‌ای انجام شد. قسمت اعظمی از تغییرات با سه مؤلفه اصلی توجیه شد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان می‌دهد که آغازگرهای مورد آنالیز در این تحقیق، تنها بخشی از ژنوم کلزا را مورد پویش قرار داده‌اند چرا که درصد بیشتری از تنوع بین ارقام به وسیله مؤلفه اصلی اول توجیه گردیده است (محمدی، مذاکرات شخصی). میزان اطلاعاتی که از روش AFLP به دست می‌آید تا حدود زیادی به تعداد آغازگر و نوع نوکلئوتید انتخابی آن بستگی دارد، اما الیس و همکاران (Ellis *et al.*, 1997) ثابت کردند که با انتخاب ٦ جفت از بهترین آغازگرها، امکان توجیه ۸۰٪ از روابط مورد انتظار وجود دارد (Mace *et al.*, 1999a, b).

اگرچه ضرایب مختلفی برای تعیین تشابه بین افراد وجود دارد ولی در این آزمون از ضریب تشابه جاکارد استفاده گردید. یکی از دلایل عمده برای این انتخاب این است که در تکنیک AFLP نمی‌توان آلل‌های متفاوت را به صورت باندهای مجزا تشخیص داد، لذا برای تعیین تشابه

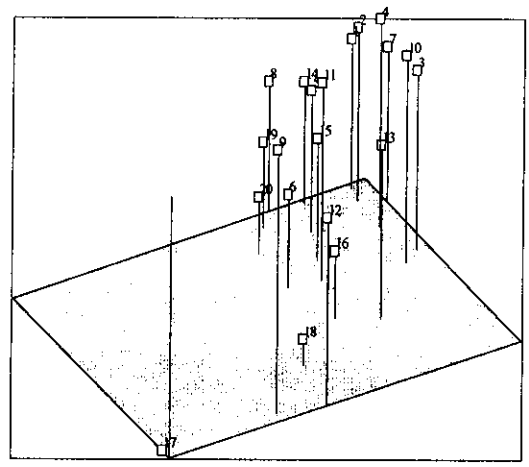
www.SID.ir

Archive of SID

بین ارقام، از ضریب تشابه جاکارد استفاده گردید. ضریب تطابق ساده از این لحاظ مناسب نبود که در این ضریب، وجود و عدم وجود باند، منظور می‌شود. عدم وجود یک نشانگر AFLP در دو گیاه می‌تواند به دلیل موتاسیون‌های کاملاً متفاوت (حذف، اضافه، جا به جایی) باشد که نباید به طور یکسان در نظر گرفته شوند. از طرف دیگر تا یک قطعه توالی‌یابی نشود نمی‌توان اطمینان یافت که دو باندی که در یک موقعیت یکسان در دو ژنوتیپ قرار گرفته‌اند، یکسان و یا به هم شبیه هستند (De Riek *et al.*, 1999). از آنجایی که باندهای یک شکل فاقد اطلاعات می‌باشند، لذا حذف شدند. حذف این باندها و همچنین باندهای نادر باعث کاهش میانگین تشابه در بین ارقام گردید (Powell *et al.*, 1996).

برای تفکیک صحیح ارقام و همچنین تخمین درست میزان تشابه موجود بین هر دو رقم، دقت کافی در امتیازبندی و حذف باندهای مصنوعی (باندهایی که در اثر رؤیت اشتباه، تغییر شرایط PCR، هضم ناقص، کدورت ژل و غیره به صورت باند دیده می‌شوند) در آنالیز منظور گردید. زیرا عدم دقت در امتیازبندی و وجود باندهای مصنوعی سبب می‌شود تا برآورد روابط ژنتیکی بین افراد نادرست باشد (Powell *et al.*, 1996).

در مجموع چندین عامل، تخمین روابط ژنتیکی بین افراد را تحت تأثیر قرار می‌دهند که عبارتند از ۱) تعداد نشانگر مورد استفاده ۲) توزیع نشانگرها در ژنوم (پوشش ژنومی) ۳) طبیعت مکانیزم‌های تکاملی که در واقع زیربنای تنوع محاسبه شده می‌باشند. تعداد نشانگر، واریانس تخمین تشابه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سطح ژنومی، تنها در حضور لینکاژ نامتعادل، واریانس تخمین تشابه را تغییر می‌دهد. اگر لینکاژ نامتعادل وجود داشته باشد در این



شکل ۳- پلات سه‌بعدی حاصل از داده‌های AFLP

Fig. 3. Three dimentional plots from AFLP data

(1, 2, 3 ... Cultivar numbers, see Table 1)

www.SID.ir

Archive of SID

صورت نشانگرهایی که به طور منظم در ژنوم پخش شده‌اند، تخمین بهتری نسبت به نشانگرهایی که به طور تصادفی در ژنوم پخش شده‌اند، به وجود می‌آورند. در صورتی که در حالت لینکاژ متعادل، توزیع نشانگرها، اهمیتی ندارد. تفاوت در مکانیزم‌های ایجاد تنوع در ژنوم (مانند انواع موتاسیون) تخمین تشابه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Powell *et al.*, 1996). مثلاً بیان شده است که نشانگرهای میکروساتلیت به دلیل سیر تکاملی سریع و داشتن خصوصیت تکرار- لغزش (مکانیسمی است که برای ایجاد پلی‌مرفیسم SSR، پیشنهاد شده است)، نشانگرهای مناسبی برای تخمین تشابه ژنتیکی افراد نمی‌باشند مگر در مورد خویشاوندان بسیار نزدیک (Bowcock, 1994).

تکنیک AFLP به دلیل تکرارپذیری بالا و تولید تعداد زیادی باند در یک آزمون، یک تکنیک مفید و قابل اعتماد می‌باشد زیرا تکرارپذیری، یک روش ساده برای ارزیابی کیفیت نشانگر محسوب می‌شود که در نتیجه می‌توان خوشه‌بندی صحیحی بر اساس داده‌های حاصل از آن برای ارقام متفاوت انجام داد (Powell *et al.*, 1996; Mace *et al.*, 1999a,b). در تحقیقی که توسط جونز و همکاران (Jones *et al.*, 1997) صورت گرفت، مشخص شد که تکنیک AFLP تکرارپذیری بالایی در آزمایش‌های مختلف داشته است، این آزمایش‌ها تنها در یک باند با هم تفاوت داشتند. با این وجود نشانگر AFLP به عنوان یک نشانگر غالب محسوب می‌شود و در نتیجه نمی‌توان هتروزیگوت‌ها را از هموزیگوت‌ها تشخیص داد. البته با ایجاد نرم‌افزارهای کامپیوتری (Breyne *et al.*, 1997) می‌توان بر این مشکل فائق آمد (Powell *et al.*, 1996). در این مطالعه مشخص شد که روش AFLP یک ابزار سریع و قدرتمند و مؤثر است که تنها نیاز به حداقل کار اولیه دارد، ولی نشانگرهای زیادی را شناسایی می‌کند که دستیابی به آن‌ها با روش‌های دیگر در همان مدت زمانی و با همان مقدار هزینه، مشکل و یا غیرممکن است (Mace *et al.*, 1999b). نشانگر AFLP دارای نسبت چندگانه (Multiplex Ratio) زیادی می‌باشد و همچنین کارایی بیشتری در تعیین هتروزیگوسیتی دارد (Mace *et al.*, 1999a,b)، اما مهم‌ترین معیار در انتخاب نشانگر، میزان اطلاعات حاصل، سادگی تعیین ژنوتیپ، سادگی عمل و هزینه کمتر می‌باشد (Caetano-Anolles and Gresshoff, 1998). با توجه با این که AFLP تنوع ژنتیکی را در سطح DNA، یعنی منشاء تمام خصوصیات گیاه مورد ارزیابی قرار می‌دهد، لذا گروه‌بندی ارقام بر اساس داده‌های حاصل از آن می‌تواند مفیدتر از تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مرفولوژیک باشد زیرا در اندازه‌گیری صفات مرفولوژیک خطاها بسیار بیشتر از روش آزمایشگاهی می‌باشد که در تکنیک AFLP

www.SID.ir

Archive of SID

مورد استفاده قرار می‌گیرد و ممکن است در برآورد تنوع ژنتیکی، اثرات محیطی نیز وارد شود. همچنین زمانی که برای انجام AFLP صرف می‌شود بسیار کمتر از مدت زمانی است که برای اندازه‌گیری خصوصیات مرفولوژیکی صرف می‌شود. با توجه به نتایج حاصله می‌توان از ارقامی که فاصله ژنتیکی زیادی با هم دارند در فرآیند تلاقی استفاده کرد. پیشنهاد می‌شود از تکنیک AFLP در ارزیابی و شناسایی گونه‌های وحشی جنس براسیکا (Brassica) در ایران استفاده شود. همچنین برای افزایش قابلیت این تکنیک، از آنزیم‌ها و آغازگرهای مختلف استفاده گردد. در این مطالعه مشخص شد که می‌توان از تکنیک AFLP بدون استفاده از کیت‌های گران قیمت وارداتی در تحقیقات مولکولی استفاده کرد.

References

Ahnert, D., Lee, M., Austin, D. F., Livin, C., Woodman, W. L., Openshaw, S. J., Smith, J. S. C., Porte, K., and Dalton, G. 1996. Genetic diversity among elite sorghum inbred line assessed with DNA markers and pedigree information. Crop Science 36: 1385-1392.

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

Breyne, P., Boerjan, W., Gerates, T., Van Monague, M., and Van Gysel, A. 1997. Applications of AFLP in plant breeding, molecular biology and genetics. Belgium Journal of Botany 129: 107-117.

Chavarriaga-Aguirre, P., Maya, M. M., Tohme, J., Duque, M. C., Iglesias, C., Bonierbale, M. W., Kresovich, S., and Kochert, G. 1999. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the *cassava core* collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. Mol Breeding 5: 263-273.

Caetano-Anolles, G., and Gresshoff, P. M. 1998. DNA Markers. John Wiley and Sons, INC. Publication, New York.

Dellaporta, S. C., Wood, F., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation. Version Π. Plant Molecular Biology Reporter 1(4): 19-21.

De Riek, J., Dendauw, J., Mertens, M., Deloose, M., Heurse, J., and Van Blockstaele, E. 1999. Validation of criteria for the selection of AFLP markers to

www.SID.ir

Archive of SID

assess the genetic variation of a breeders collection of ever green azaleas. Thoretical and Applied Genetics 99: 1155-1163.

Ellis zzz, R. P., Mcnicol, J. W., Baird, E., Booth, A., and Lawrence, P. 1997. The use of AFLPs to examine genetc relatedness in barley. Mol Breeding 3:359-369.

Hill, M., Witsenboer, H., Zabeau, M., Vos, P., Kesseli, R., and Michelmore, R. 1996. PCR fingerprinting using AFLPs as a tool for studing genetic relationships in Lactuca spp. Theoretical and Applied Genetics 93: 1202-1210.

Hongtrakul, V., Huestis, G. M., and Knapp, S. J. 1997. Amplified Fragment Length Polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplsm: genetic diversity among oilseed inbred lines. Theoretical and Applied Genetics 95:400-407.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sue la distribution florale. Bull. Soc. Vaud Sci. Nat. 44: 223-270.

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., and Keresters, M. 1996. Evaluation of AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology 142:1881-1893.

Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevschi, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., and Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by network of European laboratories. Molecular Breeding 3: 381-390.

Karp, A., Edwards, K., Bruford, M., Vosman, B., Morgante, M., Seberg, O., Kremer, A., Boursot, P., Arctander, P., Tautz, D., and Hewitt, G. 1997. New molecular techniques for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. Nature Bitechnol 15: 625-628.

Lima, M. L. A., Garcia, A. A. F., Oliveria, K. M., Matsuoka, S., Arizono, H., and de Souza, C. L. 2002. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parantage among genotypes of suger cane (*Saccharum* spp.). Theoretical and Applied Genetics 104: 30-38.

Lombard, V., Baril, C. P., Dubreuil, P., Blouet, F., and Zhang, D. 2000. Potential use of AFLP markers for distinction of rapeseed cultivars. Geves, La Miniere, F-78285 Guyancourt Cedex, France.

www.SID.ir

Archive of SID

Mace, E. S., Gebhardt, C. G. and Lester, R. N. 1999a. AFLP analysis of genetic relationships in the tribe Datureae (Solanaceae). Theoretical and Applied Genetics 99: 634-641.

Mace, E. S., Lester, R. N., and Gebhardt, C. G. 1999b. AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (Solanaceae). Theoretical and Applied Genetics 99: 626-633.

Maguire, T. L., Peakall, R., and Saenger, P. 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the managrove species *Avicennia marina* (Forsk) vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. Theoretical and Applied Genetics 104: 388-398.

Maughan, P. J., Saghai Maroof, M. A., Buss, G. R., and Huestis, G. M. 1996. Amplification Fragment Lenght Polymorphism (AFLP) in soybean: peacies diversity, inheritance and near-isogenic lines. Theoretical and Applied Genetics 93: 392-401.

Miyashita, N. T., Kawabe, A., and Innan, H. 1999. DNA variation in the wild *Arabidopsis thaliana* revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism analysis. Genetics 152: 1723-1731.

Odonougue, L. S., Souza, E., Tanksley, S. D., and Sorrell, M. E. 1999. Relationships mong North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphism. Crop Science 34: 1251-1258.

Paul, S., Wachira, F. N., Powell, W., and Waugh, R. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze) revealed by AFLP profiling. Theoretical and Applied Genetics 94: 255-263.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalsky, A. 1996. The comparison of RFLP,RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breeding 2: 225-238.

Rohlf, F. J. 1990. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Ver.2.02. Exeter software, Setauket, New York.

Russell, J. R., Fuller, J. D., Macaulay, M., Hatz, B. G., Jahoor, A., Powell, W., and Waugh, R. 1997. Direct comparison of Ehe levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theoretical and Applied Genetics 95: 714-722.

Sanguinetti, C. J., Neto, E. D., and Simpson, A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. Biotechniques 17(5): 915-921.

www.SID.ir

Archive of SID

Sharma, S. K., Knox, M. R., and Ellis, T. H. N. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparison with RAPD analysis. Theoretical and Applied Genetics 93: 751-758.

Solimani, V. D., Baum, B. R., and Johason, D. A. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat[*Triticum turgidum* L. (Desf.) Husn.]. Theoretical and Applied Genetics104: 350-357.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, Theo van de Lee, M., Hornes, M., Frijers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23 (21): 4407-4414.

Zabeau, M., and Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7 (Publ. no. 0534858 A1).

Zhu, J., Gale, M. D., Quarrie, S., Jackson, M. T., and Bryan, G. J. 1998. AFLP markers for study of rice biodiversity. Theoretical and Applied Genetics 96: 602-611.

آدرس نگارندگان:

مهدی رهایی- خیابان کارگر شمالی، کوچهٔ شهید اکبری، پلاک ۸، تهران.

بدرالدین ابراهیم سیدطباطبائی- گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری و سیروس عبدمیشانی- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

محمدعلی ملبوبی- مرکز ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران.

www.SID.ir