



مقایسه کارایی نشانگرهای RAPD و SCoT در تعیین تنوع ژنتیکی ارقام آنتوریوم (*Anthurium andreanum*) و تعیین روابط ژنتیکی بین آنها

زهرا دانشور^۱، عباس سعیدی^۲ و ابراهیم بیرامی زاده^۳

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- استاد، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، (ابباس.سایدی@gmail.com) (نویسنده مسئول)
۳- گروه ژنتیک و به نژادی، پژوهشگاه گل و گیاهان زینتی، موسسه علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، محلات، ایران
تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۱

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی برای انجام برنامه‌های اصلاحی ضروری می‌باشد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰ رقم آنتوریوم A. andreanum از هفت نشانگر SCoT و ۴۰ نشانگر RAPD استفاده شد که در این مجموعه ۲۲ نشانگر RAPD و تمامی نشانگرهای SCoT چند شکلی نشان دادند. ماتریس فاصله ژنتیکی در محدوده‌ای بین ۰/۰۱ تا ۰/۳۷ برای نشانگر RAPD و بین ۰/۰۲ تا ۰/۵۲ برای نشانگر SCoT محاسبه گردید. درصد چند شکلی نشانگرهای RAPD و نشانگر SCoT، ۱۰۰ درصد برآورد گردید که تقریباً مشابه بودند. به منظور بررسی روابط ژنتیکی از تجزیه خوشه‌ای با روش Neighbor-Joining و با استفاده از نرم‌افزار Splits tree انجام شد. نشانگرهای RAPD و SCoT ارقام را به سه گروه تقسیم‌بندی نمودند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نشانگر SCoT نسبت به نشانگر RAPD با وضوح و تفکیک‌پذیری بالایی در شناسایی اطلاعات ژنومی دارد. این اولین گزارش آنالیز تنوع ژنتیکی آنتوریوم با استفاده از نشانگر SCoT بود. در مجموع، نتایج نشان داد که این نشانگرها اطلاعات سودمندی را برای محافظت منابع ژرم پلاسما آنتوریوم فراهم می‌کنند و همچنین برای برنامه‌های اصلاح نباتات مفید می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آنتوریوم، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی

مقدمه

آنتوریوم با نام علمی *Anthurium andreanum* متعلق به خانواده آراسه می‌باشد (۹). این گونه از مهم‌ترین گونه‌های جنس آنتوریوم است که به جهت دارا بودن گل‌های بسیار زیبا و جذاب با طول عمر مفید زیاد و دم گل طویل برای تولید گل شاخه بریده مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد (۲۳، ۲۵). گل‌های شاخه بریده نقش مهمی را در بازارهای جهانی به عنوان یک فرآیند تولید اقتصادی و درآمدزا ایفا می‌کنند. برای برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان روش‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته‌است. که از جمله این روش‌ها، می‌توان به استفاده از نشانگرهای فنوتیپی، روش‌های مبتنی بر اطلاعات شجره‌ای و نشانگرهای مولکولی اشاره کرد (۱۸). نشانگرهای مولکولی در زمره پرکاربردترین نشانگرهای ژنتیکی هستند که به تعداد زیادی در ژنوم وجود دارند و از کلاس‌های مختلفی از جهش‌های حادث شده در DNA نظیر جایگزینی (جهشی، نقطه‌ای)، نوآرایی (حذف و اضافه شدن بازها) یا بروز اشتباهاتی در تعداد موتیف‌های DNA تکراری به وجود آمده‌اند. این نشانگرها بر خلاف نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی از نظر نوع و تعداد نامحدود بوده و تحت تاثیر عوامل محیطی و یا مراحل نمو گیاه قرار نمی‌گیرند (۶). چند شکلی DNA ناشی از تکثیر تصادفی یا RAPD اولین نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR بودند که از این نشانگر در نقشه‌یابی ژنتیکی انگشت نگاری ژنومی و بررسی تنوع ژنتیکی استفاده‌های زیادی بعمل آمده زیرا کار کردن با آنها نسبتاً ساده بوده و نیازی به دانستن توالی برای طراحی آغازگرها نمی‌باشد (۲۶). در روش RAPD توالی نوکلئوتیدی آغازگرها طوری انتخاب می‌شود که طول آن ۹ یا ۱۰ نوکلئوتید بوده، محتوی ۸۰-۵۰ درصد C+G و فاقد توالی‌های پالندرومی می‌باشد (۲۶). مزیت نشانگر RAPD

نسبت به سایر نشانگرها این است که نیاز به داشتن اطلاعاتی در مورد ژنوم موجود نبوده و اطلاعات قبلی درباره توالی‌ها نیاز نداشته و مقدار DNA کمی نیاز دارند (۱۵۶). در این راستا، در آزمایشی روابط ژنتیکی بین نه رقم آنتوریوم گلدانی نشان داد که نشانگر RAPD می‌تواند به عنوان ابزاری مناسب برای شناسایی روابط خویشاوندی استفاده شود (۲۰). با توجه به نتایج بسیاری از محققان مبتنی بر استفاده از نشانگر RAPD به دلیل سهولت کار و مقرون به صرفه بودن آن نشانگر مذکور دارای معایب تکرار پذیری پایین و نیز بهینه‌سازی غلظت DNA می‌باشد که استفاده از این نشانگر را محدود می‌سازد. همچنین با توجه به افزایش فوق‌العاده پایگاه داده‌های عمومی زیستی و توسعه نشانگرهایی که در مجاورت و یا درون ژن‌های منتخب قرار دارند استفاده بیشتر از این نشانگرها را اجتناب ناپذیر می‌سازد (۲). اخیراً از نشانگرهای اختصاصی متصل شونده به ژن‌های خاص بوده که این سیستم نشانگری جدید موسوم به کدون آغاز هدف، SCoT^۱ (۳) توسعه یافتند که مبتنی بر مناطق حفاظت شده ژن‌ها می‌باشند. سیستم نشانگر جدید به نام کدون‌های آغاز هدف، بر اساس توالی‌های دو طرف نواحی آغازین ژن‌های گیاهی، طراحی شده و با موفقیت در چندین تحقیق به کار برده شده‌اند (۳). نشانگر SCoT، نشانگر مبتنی بر PCR می‌باشد و از مزایای این روش آسان و کم هزینه بودن نسبت به سایر نشانگرهای دیگر می‌باشد و همچنین تفکیک باندها در این روش بر روی ژل آگارز صورت می‌گیرد. از این تکنیک در بررسی تنوع ژنتیکی برنج *Oryza sativa* و مدل‌بندی گونه‌های آن استفاده شده است (۸). در مقایسه با روش RAPD، در این روش از پرایمرهایی با طول بیشتر و با دمای اتصال بالاتر استفاده می‌شود که در نتیجه باعث بهبود قابلیت تکثیر می‌گردد. نشانگر SCoT در مطالعاتی برای بررسی تنوع

ژنتیکی برنج، سیب زمینی، مانگو، سویا و بادام زمینی نیز مورد استفاده قرار گرفته که در مقایسه با نشانگرهای ISSR و RAPD قادر به بررسی تنوع ژنتیکی به نحو مطلوبتری بوده است (۱۳، ۲۸). هدف از این تحقیق مقایسه کارایی نشانگر RAPD و SCoT برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی آنتوریوم و همچنین تعیین روابط ژنتیکی میان ارقام بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۱۰ رقم تجاری آنتوریوم از پژوهشکده گل و گیاه زینتی محلات تهیه گردید (جدول ۱). مطالعات مولکولی به منظور استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تازه روییده و جوان آنتوریوم انجام شد (۲۲). این تحقیق در دانشگاه شهید بهشتی تهران و دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین صورت گرفت. پس از استخراج DNA و قبل از انجام واکنش PCR جهت بررسی کیفیت DNA از ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید. پس از تعیین غلظت نمونه‌های DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از هفت نشانگر SCoT و ۴۰ نشانگر RAPD صورت گرفت. علت استفاده از این نشانگر این است که براساس تنوع در ناحیه حفاظت شده کدون آغاز هدف عمل می‌کند. این مناطق

عموما شامل زمین‌هایی در ارتباط با توالی حفاظت شده DNA درون ژن هستند. مناطق حفاظت شده DNA اغلب در گونه‌های مختلف گیاهی حفظ شده‌اند مشخصات نشانگرها در (جدول ۲ و ۳) آورده شده است. اجزای واکنش PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X)، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۴۰ نانوگرم)، ۰/۹ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر آغازگر (۱ میکرومولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۱ واحد در میکرولیتر) و ۱۷/۳۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر شده بود. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف) که برای ۴۲ سیکل برنامه‌ریزی شده بود به شرح زیر انجام شد: ۳ دقیقه در دمای ۹۲°C جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۴۲ سیکل هر کدام شامل ۱ دقیقه در دمای ۹۲°C، ۲ دقیقه در ۴۸°C و ۲ دقیقه در ۷۲°C جهت بسط نهایی انجام پذیرفت. به منظور آشکارسازی چندشکلی بین نمونه‌ها از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید ۱ میکروگرم در میکرولیتر و عکس‌برداری ژل با استفاده از دستگاه ژل داک صورت گرفت.

جدول ۱- اسامی ارقام مورد بررسی در این تحقیق

نام رقم	ردیف	نام رقم	ردیف
Pistach	6	Fire	1
Previa	7	Carnaval	2
Presence	8	Tropic Night	3
Sunglow	9	Baron	4
Xavia	10	Essencia	5

جدول ۲- آغازگرهای SCoT مورد استفاده در این تحقیق

%GC	دمای اتصال بهینه	توالی ۵' - ۳'	نام آغازگر	انواع
۵۰	۵۰	CAACAATGGCTACCACCA	SCoT1	SCoT
۵۵	۵۰	CAACAATGGCTACCACCC	SCoT2	
۶۱	۵۰	ACGACATGGCGACCATCG	SCoT13	
۵۵	۵۰	AACCATGGCTACCACCAC	SCoT22	
۶۶	۵۰	CCATGGCTACCACCGCCA	SCoT28	
۷۲	۵۰	CATGGCTACCACCGGCC	SCoT35	
۵۵	۵۰	GCAACAATGGCTACCACC	SCoT36	

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی براساس وجود و یا عدم وجود نوار به ترتیب با اعداد ۱ و صفر برای ارقام مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد. برای بدست آوردن ماتریس فاصله ژنتیکی از نرم‌افزار NTSYS pc (ver 2.02) استفاده شد. آزمون مانتل برای مقایسه ماتریس‌های عدم تشابه با دندروگرام‌های بدست آمده توسط نشانگرهای RAPD و SCoT توسط نرم‌افزار NTSYS محاسبه گردید. به‌منظور گروه‌بندی و تفسیر روابط ژنتیکی از روش تجزیه خوشه‌ای NJ با استفاده از نرم‌افزار Splits Tree (version 4.14.2)

انجام شد. پارامترهای تنوع ژنتیکی شامل محتوای اطلاعات چند شکل و شاخص نشانگر محاسبه گردیدند. مقادیر PIC^1 برای هر جفت آغازگر بر پایه رابطه $PIC = \sum [2P_i(1-P_i)]$ (۲۱) محاسبه گردید. به‌طوری که P_i برابر با فراوانی آلل تکثیر شده و $(1-P_i)$ فراوانی آلل غایب در نظر گرفته شد. شاخص نشانگر $(MI)^2$ بر اساس تعداد باند‌های چند شکل در هر واحد سنجش و با استفاده از معادله $MI = DI \times EMR$ محاسبه گردید و تنوع ژنی (h) ، شاخص شانون (I) ، تعداد آلل موثر (Na) و تعداد آلل‌ها (Ne) با استفاده از نرم‌افزار (1.32) (Popgene) انجام شد.

جدول ۳- آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این تحقیق

Table 3. RAPD markers used in this research

انواع Type	نام آغازگر Marker Name	توالی ۵' - ۳' Sequence (5' to 3')	انواع Type	نام آغازگر Marker Name	توالی ۵' - ۳' Sequence (5' to 3')
	OPQ- 11	TCTCCGCAAC		OPAD -06	AAGTGCACGG
	OPAC- 07	GTGGCCGATG		OPAA -18	TGGTCCAGCC
	OPR- 10	CCATTCCCCA		OPH-12	ACGCGCATGT
	OPT -07	GGCAGGCTGT		OPA -02	TGCCGAGCTG
RAPD	OPK -07	AGCGAGCAAG	RAPD	OPAAB- 12	CCTGTACCGA
	OS -09	TCCTGGTCCC		OPJ- 14	CACCCGGATG
	OPZ- 17	CCTTCCCACT		OPAD -06	AAGTGCACGG
	OPAH -16	CAAGGTGGGT		OPI - 16	TCTCCGCCCT
	OPAG -13	GGCTTGCGCA		OPAA- 04	AGGACTGCTC
	OPC -20	ACTTCGCCAC		OPE -10	CACCAGGTGA
	OPAF- 10	GGTTGGAGAC		OPP -13	GGAGTGCCTC

نتایج و بحث

در این تحقیق ۴۰ نشانگر RAPD و هفت نشانگر SCoT برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۰ رقم آنتوریوم مورد استفاده قرار گرفت که ۲۲ نشانگر RAPD و تمامی نشانگرهای SCoT چندشکلی بالایی نشان دادند. نوار چندشکلی ایجاد شده توسط نشانگرهای RAPD و SCoT به ترتیب ۱۴۴ و ۶۱ و با میانگین ۸/۷۱۶/۵۴ در ارقام مورد ارزیابی به ازای هر نشانگر تکثیر شدند. بیشترین شاخص محتوای چند شکلی مربوط به نشانگرهای OPZ-17 و OPP-13 به میزان ۰/۴۵ و کمترین مقدار چند شکلی مربوط به نشانگر OPH-12 و OPA-02 به میزان ۰/۳۳ بود. بیشترین شاخص محتوای چند شکلی مربوط به نشانگر SCoT 22 به میزان ۰/۴۴ بود و کمترین میزان شاخص محتوای چندشکلی مربوط به نشانگر SCoT 1 به میزان ۰/۴ بود.

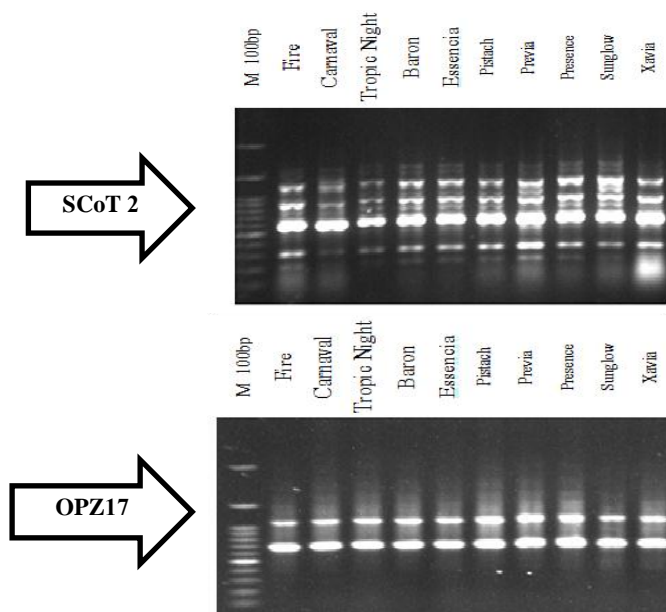
مقادیر محاسبه شده شاخص نشانگر در آغازگرهای مورد مطالعه در محدوده ی بین ۲/۸۱ تا ۴/۹۱ برآورد گردید. بیشترین مقدار شاخص نشانگر (MI) متعلق به نشانگر SCoT 22 (۴/۹۱) بود که نشان دهنده قدرت تفکیک بالای این نشانگر نسبت به سایر نشانگرها می باشد. مقادیر محاسبه شده شاخص نشانگر در آغازگرهای RAPD در محدوده ی بین ۱/۳۱ تا ۵/۳۷ برآورد گردید. بیشترین مقدار شاخص

نشانگر (MI) متعلق به نشانگر OPZ-17 با مقدار (۵/۳۷) بود. بر اساس داده های RAPD تشابه ژنتیکی بین نمونه ها از ۰/۱ تا ۰/۳۷ متغیر بود و میانگین آنها بین تمامی جفت نمونه ها ۰/۱۹ و برای داده های RAPD تشابه ژنتیکی بین ۰/۰۲ تا ۰/۵۲ و میانگین آنها ۰/۲۷ بین جفت نمونه ها تعیین شد. تعداد آل موثر در بین نشانگرهای RAPD در محدوده ی بین ۱/۲۴ تا ۱/۹۸ متغیر بود. میزان محتوای چندشکلی نشانگرهای مورد استفاده بین ۰/۳ تا ۰/۴۵ متغیر بود و میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی ۰/۳۹ بود که در جدول ۵ آورده شده است.

شاخص شانون (I) که معیاری از تنوع ژنی می باشد در محدوده ی بین ۰/۳۲ تا ۰/۶۹ در بین نشانگرها متغیر بود که بالاترین مقدار تنوع ژنی مربوط به نشانگر OPT-07 با مقدار ۰/۶۹ و پایین ترین مقدار شاخص شانون مربوط به نشانگر OPH-12 با مقدار ۰/۳۲ در نظر گرفته شد. تنوع ژنی (h) در بین این نشانگرها در محدوده ی بین ۰/۱۸ تا ۰/۴۹ متغیر بود و بالاترین مقدار تنوع ژنی بین نشانگرها، مربوط به نشانگر OPT-07 به میزان ۰/۴۹ می باشد که نشان دهنده این است که نشانگر مناسبی برای بررسی تنوع ژنی می باشد. پایین ترین مقدار تنوع ژنی مربوط به نشانگر OPH-12 با مقدار ۰/۱۸ بود (جدول ۴). الگوی نواری نشانگرهای RAPD و SCoT ارقام آنتوریوم در شکل (۱) آورده شده است.

جدول ۴- تنوع ژنی (h)، شاخص شانون (I)، تعداد آلل موثر (Na) و تعداد آلل‌ها (Ne) با استفاده از نشانگر RAPD
Table 4. Gene diversity (h), Shannon index(I), Effective number of alleles (Na) and Number of allele (Ne) using RAPD marker

Type	Marker	Na	Ne	H	I
RAPD	OPT-07	۲	۱/۹۰	۰/۴۹	۰/۶۹
	OPK-07	۲	۱/۲۹	۰/۲۱	۰/۳۵
	OS-09	۲	۱/۲۸	۰/۲۱	۰/۳۶
	OPR-10	۲	۱/۳۱	۰/۲۲	۰/۳۶
	OPQ-11	۲	۱/۴۷	۰/۲۹	۰/۴۴
	OPZ-17	۲	۱/۲۹	۰/۲۱	۰/۴۰
	OPAH-16	۲	۱/۳۷	۰/۲۵	۰/۴۱
	OPH-12	۲	۱/۲۵	۰/۱۸	۰/۳۳
	OPA-02	۲	۱/۴۶	۰/۲۹	۰/۴۵
	OPAAB-12	۲	۱/۲۷	۰/۲۰	۰/۳۴
	OPJ-14	۲	۱/۲۹	۰/۲۱	۰/۳۶
	OPC-20	۲	۱/۲۶	۰/۲۱	۰/۳۵
	OPAF-10	۲	۱/۳۳	۰/۲۳	۰/۳۸
	OPAD-06	۲	۱/۴۷	۰/۳۲	۰/۵۰
	OPAA-18	۲	۱/۳۰	۰/۲۱	۰/۳۵
	OPAG-13	۲	۱/۳۹	۰/۲۷	۰/۴۴
	OPAC-07	۲	۱/۲۴	۰/۱۹	۰/۳۳
	OPP-13	۲	۱/۲۹	۰/۲۲	۰/۳۷
	OPE-10	۲	۱/۳۸	۰/۲۷	۰/۴۴
	OPD-06	۲	۱/۳۰	۰/۲۲	۰/۳۷
	OPI-16	۲	۱/۴۳	۰/۲۸	۰/۴۵
	OPAA-04	۲	۱/۴۸	۰/۳۱	۰/۴۸
	average	۲	۱/۳۷	۰/۲۵	۰/۴۰
SCoT	SCoT 2	۲	۱/۶۰	۰/۳۶	۰/۵۳
	SCoT 36	۲	۱/۶۴	۰/۳۶	۰/۵۳
	SCoT 1	۲	۱/۳۵	۰/۲۴	۰/۳۹
	SCoT35	۲	۱/۵۵	۰/۳۳	۰/۵۰
	SCoT13	۲	۱/۳۷	۰/۲۶	۰/۴۲
	SCoT22	۲	18/18	۰/۱۵	۰/۲۷
	SCoT28	۲	۱/۵۵	۰/۳۳	۰/۵۰
	average	۲	۱/۴	۰/۲۹	۰/۴۵



شکل ۱- الگوی نواری نشانگرهای در تعدادی از ارقام آنتروریوم مورد مطالعه SCoT و RAPD
Figure 1. Banding pattern of SCoT and RAPD markers in some of the studied Anthurium cultivars

قرار گرفته‌اند. نتایج بدست آمده در این آزمایش با سایر یافته‌های محققان در تجزیه جمعیت‌هایی با قرابت ژنتیکی زیاد که بر روی آنتوریوم، بالنگو، سیاه دانه، ارکید استفاده شده‌اند مطابقت دارد و قابلیت نشانگر SCoT را در شناسایی و تفکیک افراد خویشاوند مورد تایید قرار می‌دهد (۱۳). براساس میانگین درصد پلی مورفیسم و شاخص محتوی چندشکلی، کارایی نشانگرهای SCoT و RAPD برای انگشت نگاری ارقام آنتوریوم نسبتاً یکسان بود. در مطالعه‌ای براساس ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۴ رقم \pm خرما تنوع ژنی (۰/۰۳) و شاخص شانون (۰/۰۴) بدست آمد که این نشانگر به خوبی تخمین تنوع ژنتیکی بین و داخل ارقام را نشان داد (۱). در مطالعه‌ای از ۲۴ نشانگر SCoT برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۵۵ ژنوتیپ گیاه رامیه (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.) استفاده گردید که ۱۳۶ باند چند شکل تولید کرده و ۸۷ درصد چندشکل بودند (۲۴). با توجه به محدودیت‌هایی که در مورد نشانگر RAPD وجود دارد. در نتیجه در مطالعه حاضر از نشانگر جدیدی که مبتنی بر کدون آغاز هدف بوده، برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی آنتوریوم استفاده شد. این روش بر روی بستر آگارز اعمال شده و روشی ساده و نسبتاً ارزان است و می‌تواند معایب نشانگر RAPD را پوشش دهد. نشانگر SCoT نسبت به روش‌هایی نظیر RAPD و ISSR در نقشه‌یابی QTL و آنالیز تفرق بالک، گزینه‌ای برتر محسوب می‌گردد و همچنین در تجزیه و تحلیل ژنتیکی گیاه کاربردهای فراوانی دارد (۲۷). نشانگر SCoT استفاده شده در این تحقیق ابزار سودمندی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، تشخیص و شناسایی سریع و قابل اعتماد ارقام آنتوریوم می‌باشند. لذا می‌توان از این داده‌های مولکولی بعنوان ابزاری کارآمد در برنامه‌های اصلاحی این گیاه، بخصوص برنامه‌های گزینش و هیبریداسیون جهت تهیه ارقام هیبرید استفاده کرد (۱۹).

تنوع ژنی نشانگر SCoT در محدوده‌ای بین ۰/۱۵ تا ۰/۳۶ متغیر بود. بیشترین میزان تنوع ژنی مربوط به نشانگرهای SCoT36 و SCoT2 بالاترین میزان تنوع مربوط به نشانگر (۰/۳۶) و کمترین میزان تنوع ژنی مربوط به نشانگر SCoT22 (۰/۱۵) بود. تعداد آل موثر نشانگرهای SCoT در محدوده‌ی بین ۱/۱۸ تا ۱/۶۴ متغیر بود. شاخص شانون (I) در محدوده‌ی بین ۰/۲۷ تا ۰/۵۳ در بین نشانگرها بود. تجزیه کلاستر با استفاده از داده‌های SCoT و RAPD ارقام را به سه گروه تقسیم‌بندی نمود (شکل ۲ و ۳). الگوی گروه‌بندی در نشانگر SCoT و RAPD نسبتاً مشابه است. عموماً تشابه بین گروه‌بندی ارقام در هر دو نشانگر SCoT و RAPD بسیار بالا بود. اولین و احتمالاً پرکاربردترین روش برای یافتن رابطه بین داده‌ها و فواصل ژنتیکی آزمون متل می‌باشد. این آزمون برای محاسبه همبستگی بین دو ماتریس فاصله به کار می‌رود (۴). آزمون مانتل جهت مطالعه تحلیل تنوع ژنتیکی محصولات زراعی به‌ویژه معلوم نمودن تطابق، ماتریس‌های حاصل از سیستم نشانگری مختلف بر روی یک مجموعه ژنوتیپ مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴). همبستگی بین نشانگرها با استفاده از آزمون متل نشان داد که همبستگی بسیار بالایی بین نشانگرهای RAPD و SCoT وجود دارد. این نتایج بیان‌کننده‌ی آن است که هر دو نشانگر نقاط مشترکی از ژنوم را تکثیر کرده‌اند.

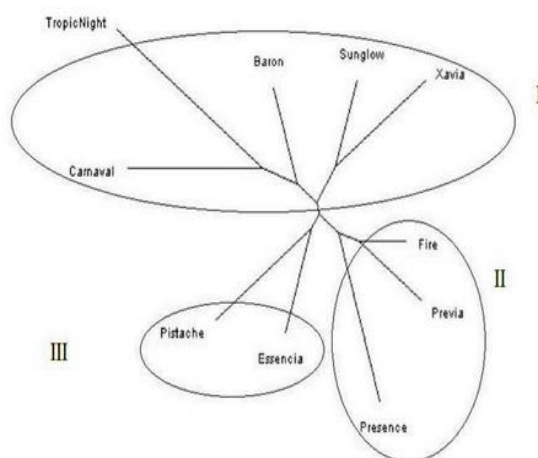
نتایج سایر محققان نشان می‌دهد که نشانگرهای SCOT می‌تواند برای مطالعه گونه‌های جنس *Cicer* و برای بررسی و برآورد تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ما بین واحدهای تاکسونومیک در این جنس مورد استفاده قرار بگیرد. نتایج ما با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (۱۰، ۱۱، ۷). میانگین شاخص محتوای چند شکلی نشانگرهای RAPD و SCoT به ترتیب به‌میزان ۲/۶۶ و ۳/۷۲ بود. نشانگر SCoT نشانگر چندشکل هستند که برای انگشت نگاری تشخیصی در بررسی تنوع ژنتیکی آنتوریوم در این پژوهش مورد استفاده

جدول ۵- مشخصات نشانگرهای RAPD و SCoT مورد استفاده

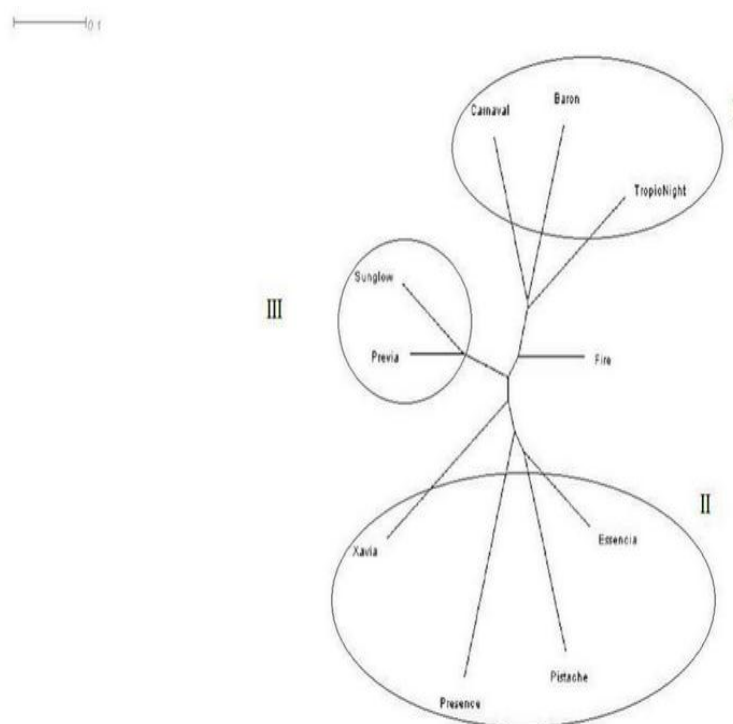
Table 5. Characteristics of the RAPD and SCoT markers used

انواع	آغازگر	تعداد باند پلی مورف	تعداد باند مونومورف	کل باند	درصد چندشکلی %	میزان شاخص محتوای چند (شکلی PIC)	شاخص نشانگر (MI)
RAPD	OPQ- 11	۷	.	۷	۱۰۰	۰/۳۹	۲/۷۷
	OPAC- 07	۱۱	.	۱۱	۱۰۰	۰/۴۴	۴/۹۱
	OPR- 10	۹	.	۹	۱۰۰	۰/۴۲	۳/۸۳
	OPT -07	۶	.	۶	۱۰۰	۰/۴۱	۲/۵۰
	OPK -07	۶	.	۶	۱۰۰	۰/۳۹	۲/۳۲
	OS -09	۷	.	۷	۱۰۰	۰/۴۲	۲/۹۲
	OPZ- 17	۱۲	.	۱۲	۱۰۰	۰/۴۵	۵/۳۷
	OPAH -16	۸	.	۸	۱۰۰	۰/۴۲	۳/۳۹
	OPAG -13	۶	.	۶	۱۰۰	۰/۴۱	۲/۴۶
	OPC -20	۶	.	۶	۱۰۰	۰/۴۱	۲/۴۵
	OPAF- 10	۵	.	۵	۱۰۰	۰/۳۷	۱/۸۶
	OPAD -06	۵	.	۵	۱۰۰	۰/۴۰	۱/۹۹
	OPAA -18	۸	.	۸	۱۰۰	۰/۴۱	۳/۲۸
	OPH-12	۴	.	۴	۱۰۰	۰/۳۳	۱/۳۱
	OPA -02	۴	.	۴	۱۰۰	۰/۳۳	۱/۳۲
	OPAAB- 12	۵	.	۵	۱۰۰	۰/۳۷	۱/۸۶
	OPJ- 14	۳	.	۳	۱۰۰	۰/۳۰	۰/۹۲
	OPD -06	۵	.	۵	۱۰۰	۰/۴۰	۱/۹۴
	OPI - 16	۴	.	۴	۱۰۰	۰/۳۵	۱/۳۹
	OPAA- 04	۶	.	۶	۱۰۰	۰/۴۰	۲/۴۰
	OPP -13	۱۱	.	۱۱	۱۰۰	۰/۴۵	۲/۹۶
	OPE-10	۶	.	۶	۱۰۰	۰/۴۱	۲/۴۸
	average	۶/۵۵	.	۶/۵۵	۱۰۰	۰/۴۰	۲/۷۰
SCoT	SCoT 1	۷	.	۷	۱۰۰	۰/۴۰	۲/۸۱
	SCoT 2	۷	.	۷	۱۰۰	۰/۴۱	۲/۸۸
	SCoT 13	۹	.	۹	۱۰۰	۰/۴۳	۳/۹۳
	SCoT 22	۱۱	.	۱۱	۱۰۰	۰/۴۴	۴/۹۱
	SCoT 28	۹	.	۹	۱۰۰	۰/۴۳	۳/۸۵
	SCoT 35	۱۰	.	۱۰	۱۰۰	۰/۴۳	۴/۳۶
	SCoT 36	۸	.	۸	۱۰۰	۰/۴۲	۳/۳۵
	average	۸/۷	.	۸/۷	۱۰۰	۰/۴۲	۳/۷

0.2



شکل ۲- تجزیه کلاستر ۱۰ رقم آنتوریوم با استفاده از نشانگرهای SCoT به روش NJ
Figure 2. Dendrogram of 10 cultivars of *Anthurium* using SCoT markers based on NJ



شکل ۳- تجزیه کلاستر ۱۰ رقم آنتوریوم با استفاده از نشانگرهای RAPD به روش Neighbor-Joining
Figure 3. Dendrogram of 10 cultivars of *Anthurium* using RAPD markers based on NJ

منابع

1. Al-Ourainy, F., S. Khan, M. Nadeem and M. Tarroum. 2015. SCoT marker for the assessment of genetic diversity in saudi arabian date palm cultivars, *Pakistan Journal of Botany*, 47(2): 637-643.
2. Andersen, J.R. and T. Lubberstedt. 2003. Functional markers in plants. *Trends in Plant Science*, 8: 554-560.
3. Collard, B.Y. and D. Mackill. 2009. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27(1): 86-93.
4. Escudero, A., J.M. Iriondo and M.E. Torres. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, 113: 351-365.
5. Fegghi, S.M.A., P. Norouzi, A. Saidi, K. Zamani and R. Amiri. 2012. Identification of SCAR and RAPD markers linked to Rz1 gene in Holly sugar beet using BSA and two genetic distance estimation methods. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 3: 598-605.
6. Ghareyazi, B. 1996. Application of DNA markers in plant breeding. *Proceedings of the 4th Iranian Congress on Crop Production and Plant Breeding*, Isfahan, Iran, 26-31 (In Persian).
7. Ghorbani Jamalabadi, J., A. Saidi, E. Karami, M. Kharkesh and R. Talebi. 2013. Molecular Mapping and Characterization of Genes Governing Time to Flowering, Seed Weight and Plant Height in an Intraspecific Genetic Linkage Map of Chickpea (*Cicer arietinum*). *Biochemical Genetic*, 387-397.
8. Gorji, A.M., P. Pocza, Z. Polgar and J. Taller. 2011. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*, 88: 226-237.
9. Govaerts, R., G. Frodin, J. Bogner, P. Boyce, B. Cosgriff, T.B. Croat, E.G. Gonçalves, M. Gayum, A. Hay, W. Hetterscheid, E. Landolt, S.J. Mayo, J. Murata, V.D. Nguyen, C.M. Sakuragui, Y. Singh, S. Thompson and G. Zhu. 2002. *World checklist and bibliography of Araceae (and Acoraceae)*. Kew: Royal Botanic Garden, 560 pp.
10. Hajibarat, Z., A. Saidi and R. Talebi. 2016. Evaluation of Genetic Diversity of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes Based on Morphological Traits and CDDP and SCoT Markers. *Seed and plant improvement journal*, 32(2): 201-214 (In Persian).
11. Iruela, M., J.I. Rubio, J. Cubero, T. Gil and Milla'n. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 643-651.

12. Karami E., R. Talebi, M. Kharkesh and A. Saidi. 2015. A Linkage map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) based on population from ILC3279×ILC588 cross: location of genes for time to flowering of, seed size and plant height. *Genetika*, 47(1): 253-263.
13. Luo, C. 2012. Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L.: revealed through SCoT analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(7): 1505-1515.
14. Mohammadi, S. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plant-salient statistical tools and consideration. *Crop Science*, 43: 1235-1248.
15. Naghavi, M., B. Ghareyazi and B.C. Hosseini Salak Deh. 2008. The start of molecular markers, 1045, Tehran University Press (In Persian).
16. Nebaure, S.G., L. Castillo-Agudo and J. Segura. 1999. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved faxglove (*Digitalis obscura* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 985-994.
17. Noormohammadi, Z., A. Fasihee, S. Homae-Rashidpoor, M. Sheidai, S. Ghasemzadeh Baraki, A. Mazooji and S.Z. Tabatabaee-Ardakani. 2012. Genetic variation among Iranian pomegranates (*Punica granatum* L.) using RAPD, ISSR and SSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 6: 268-275.
18. Pandey, S., S. Kumar, U. Mishra, A. Rai, M. Singh and M. Rai. 2008. Genetic diversity in Indian ash gourd (*Benincasa hispida*) accessions as revealed by quantitative traits and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 118: 80-86.
19. Rabiei, V., M. Saadati, J. Azimkhani and R.S. Mohammadi. 2012. An Investigation of the Genetic Diversity of Pomegranate Genotypes Prevalent in Tarume-Zanjan Using RAPD Markers. *Iranian Journal of Horticulture sciences*, 44(10): 109-118.
20. Ranamukhaarachchi, D.G., R.J. Henny, C.L. Guy and Q.B. Li. 2001. DNA fingerprinting to identify nine *Anthurium* pot plant cultivars and examine their genetic relationship. *HortScience*, 36(4): 758-760.
21. Roldan-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker and M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6: 125-134.
22. Saghai-Marooif, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 8014-8018.
23. Sedaghati, B., N. Babaeian, N. Bagheri and H. Salehian Aghblaq. 2015. Effect of Leaf Explants Types and Various Levels of 2, 4 -D on Callus Induction and Plant Regeneration in *Anthurium andraeanum*. *Journal of Crop Breeding*, 16: 1-15 (In Persian).
24. Satya, P., M. Karan, S. Jana, S. Mitra, A. Sharma, P.G. Karmakar and D.P. Ray. 2015. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species. *Meta gene*, 3: 62-70.
25. Stancato, G.C. and M.L.S. Tucci. 2010. Monitoring the end of the in vitro phase of *Anthurium andraeanum* Lindl. plantlets. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22: 61-68.
26. Upadhyaya, A., K. Jayadev, R. Manimekalai and V.A. Parthasarathy. 2004. Genetic relationship and diversity in Indian account accessions based on RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 99: 353-362.
27. Wang, Q., B. Zhang and G. Lu. 2009. Conserved region amplification polymorphism (CoRAP), a novel marker technique for plant genotyping in *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27: 139-143.
28. Zali, H., O. Sofalian, T. Hasanloo, A. Asgharii and M. Zeinalabedini. 2016. Drought stress effect physiological parameter and amino acids accumulations in canola. *Journal of Crop Breeding*, 8: 191-203 (In Persian).

Comparison of the Performance of SCoT and RAPD Markers for Study of Genetic Diversity and Relationships of *Anthurium (Anthurium andreanum)* Cultivars

Zahra Daneshvar¹, Abbas Saeedi² and Ebrahim Beyrami Zadeh³

1- M.Sc. Department of Science and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Science and Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran (Corresponding author: abbas.saidi@gmail.com)

3- Department of Genetics and Rape, Department of Flowers and Ornamental Plants, Institute of Horticulture, Research, Education and Promotion Center of Mahallat, Iran

Received: June 11, 2017

Accepted: December 2, 2017

Abstract

Survey of genetic diversity is essential for breeding program. The genetic diversity of *A. andreanum*, 10 cultivars were analyzed using seven Start Codon Targeted (SCoT) and 40 RAPD markers in which 22 RAPD markers and all of SCoT marker produced polymorphic bands. Matrix genetic distance ranged from 0.01 to 0.37 for RAPD and from 0.02 to 0.52 for SCoT marker analysis. Polymorphism percentage generated by SCoT markers (100%) was similar to RAPD markers. In order to determine genetic relationships, cluster analysis was performed using Neighbor-joining with Splits tree software. Cluster analysis for RAPD and SCoT markers revealed that cultivars were grouped in three clusters. Results from the present study revealed the superiority of SCoT over RAPD markers due to their high resolution and high variability in detection of genomic information. This is the first report of using SCoT marker for genetic diversity analysis in anthurium. Overall, results showed that these markers provide useful information to protect *A. andreanum* germplasm resources and also useful for breeding programs.

Keywords: *Anthurium*, Cluster analysis, Genetic diversity, Molecular markers