ژنتیک نوین
دوره چهارم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۸
صفحه ۶۲-۵۵

شناسایی باندهای هترودوپلکس ریزماهواره در هیبریدهای برنج

سیدحمیدرضا هاشمی[۱]، سیدعلی میرمحمدی‌میبدی[۱]، احمد ارزانی[۱]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲]
۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
۲- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: irahamidreza@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۹ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۶/۱۴)

چکیده

ژنوتیپ‌های هیبرید برنج به همراه لاین‌های والدی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و در برخی از موارد باندهای غیروالدینی در افراد هیبرید (هتروزیگوت) مشاهده گردید. با توجه به این که ممکن است قطعات DNA هترودوپلکس از ترکیب توالی‌های آللی تشکیل یافته باشند، ازآزمون‌های ترکیب مقادیر برابر DNA لاین‌های والدینی قبل از PCR، و آزمون ترکیب مقادیر برابر از محصول PCR لاین‌های والدینی برای تایید موضوع استفاده گردید. نتایج حاصل نشان داد که همان باندهای غیروالدینی مشاهده شده در افراد هتروزیگوت، در این آزمون‌ها قابل رویت می‌باشند. این آزمایشات موید این مطلب بوده که این باندهای غیروالدینی ناشی از تشکیل قطعه DNAی هترودوپلکس با ترکیب رشته‌های DNA مربوط به دو آلل یک جایگاه ریزماهواره‌ای می‌باشند که در اثر پیوند اشتباهی (mismatch) بوجود آمده و از آنجایی که از سرعت حرکت متفاوتی نسبت به همودوپلکس‌ها برخوردارند بر روی ژل جایگاه متمایزی را به خود اختصاص می‌دهند. می‌توان وجود باندهای غیروالدینی را بعنوان مشخصه‌ای کلیدی برای شناسایی افراد هتروزیگوت از هموزیگوت در نظر گرفت. در این تحقیق از باندهای هترودوپلکس حاصل از بکارگیری ریزماهواره‌های RM1 و RM171 در شناسایی و آزمون خلوص ژنوتیپ‌های هیبرید نیز استفاده گردید. نتیجه حاصل نشان داد که باندهای هترودوپلکس ریزماهواره نه تنها برای شناسایی و انگشت‌نگاری هیبریدهای برنج مفید بوده، بلکه می‌توان از آنها در تشخیص بذور خارج از تیپ در هیبریدها سود جست.

واژه‌های کلیدی

**برنج هیبرید،
ریزماهواره،
باندهای غیروالدینی،
هترودوپلکس**

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.6.0]

مقدمه

پس از معرفی و تولید برنج هیبرید در چین، تولید ارقام هیبرید بعنوان یک گزینه تکنولوژیکی قابل اجرا برای استفاده از پدیده هتروزیس و شکستن سقف عملکرد ژنتیکی مورد توجه قرار گرفت. گذشته از این اهمیت اقتصادی برنج و همچنین داشتن ژنوم نسبتاً کوچک (440Mbp) آن را تبدیل به یک گیاه مدل برای مطالعه ژنوم گیاهی نموده است (۷) به طوری که مقدار نسبتاً پایین DNA تکراری و همچنین ماهیت دیپلوئیدی آن منجر به پیشرفت و تسریع کاربرد نشانگرهای مولکولی در برنج در دهه گذشته گردیده است (۲).

ریزماهواره‌ها (Microsatellite) یا توالی تکراری ساده (Simple Sequence Repeat, SSR) توالی‌های نوکلئوتیدی تکرارشونده‌ای بوده که به لحاظ فراوانی در ژنوم، ماهیّت هم‌بارزی، چندشکلی بالا، مکان اختصاصی بودن و توزیع یکنواخت در سراسر ژنوم (۱۸،۱۹و۱٤) امروزه بسیار مورد توجه اصلاحگران قرار گرفته است. خصوصا سطح بالای تنوع آللی، قدرت جداسازی بالا، کار آسان و قیمت پایین این نشانگرها آنرا بیشتر برای شناسایی، انگشت‌نگاري ارقام و آزمون خلوص ژنتیکی بذور هیبرید ایده‌آل ساخته است (۲۲،۲٦و۱۷). در برنج برآوردها حاکی از این است که بیش از ٦۰۰۰ نشانگر ریزماهواره، ژنوم را با تراکمی در حدود یک نشانگر در هر 0.25 cM یا در هر 75-100 Kb پوشش داده‌اند (۱۷). چنین فرض می‌شود ریزماهواره‌ها نسبت به دیگر توالی DNA از سرعت تکاملی بالاتری برخوردار باشند بطوریکه برآورد می‌شود نسبت جهش در توالی ریزماهواره از $۲/۵ \times ۱۰^{-۵}$ الی $۱۰^{-۲}$ در هر نسل متغیر باشد (۲۱) که احتمالا مقادیر بالای چندشکلی مشاهده شده در این نشانگر به نرخ بالای جهش در این توالی برمی‌گردد.

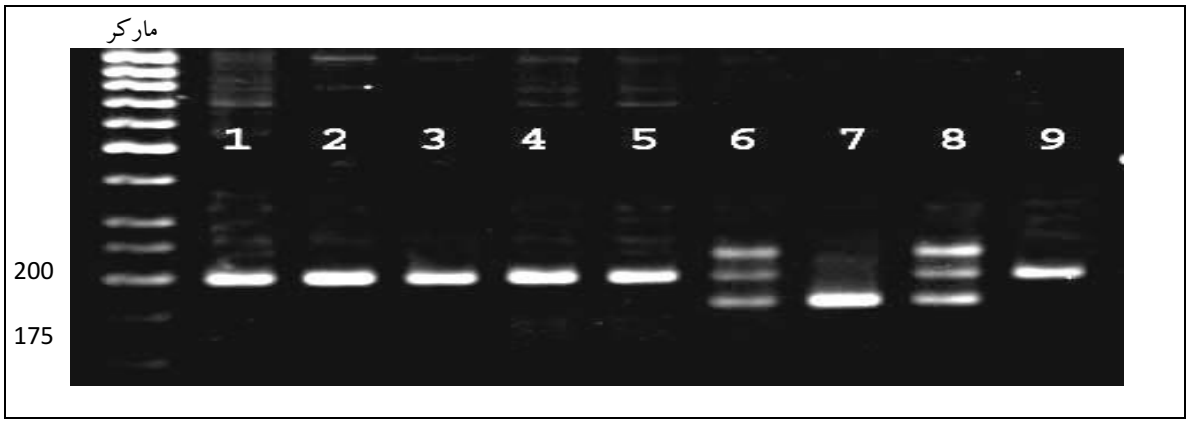
توالی‌های ریزماهواره را بطور متداول با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شده و سپس آلل‌ها بر حسب اندازه قطعات تکثیری بر روی ژل الکتروفورز شناسایی می‌شوند. ماهیت همبارزی این نشانگرها سبب می‌شود که برای یک مکان نشانگری خاص در افراد هیبرید (نتاج F_1) به شرط اینکه والدین‌شان از چندشکلی آللی برخوردارند، الگوی آللی هر دو والد مشاهده شود. با این وجود در آزمایش انگشت‌نگاری و آزمون خلوص ژنتیکی بذور هیبرید، گاهی علاوه بر باندهای والدینی، باندهای غیروالدینی نیز در ژنوتیپ‌های هیبرید، زمانی که ژنوتیپ‌های هیبرید با استفاده از الکتروفورز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند مشاهده گردیده است (شکل ۱). در آزمایشاتی که توسط یه‌یان (۲۹) بر روی هیبریدهای برنج صورت گرفته بود وجود این باندها گزارش گردیده بود هر چند که دلیلی برای آن بیان نگردید.

نظریاتی که در رابطه با ایجاد این باندهای اضافه ارایه شده است شامل ۱) ناشی از ترکیب توالی آللی والدین (باند هترودوپلکس) ۲) ناشی از ترکیب توالی غیرآللی (اثر متقابل غیرآللی) والدین و یا ۳) خطای بیولوژیکی نشانگرهای ریزماهواره نظیر باندهای Stutter، افزودن غیرالگویی و میکروواریانت‌ها اشاره نمود.

تشکیل هترودوپلکس بین توالی‌های آللی اولین بار توسط علیف و همکاران (۳) گزارش شد. به این صورت که آنها تشکیل باندهای غیروالدینی RAPD را به تشکیل مولکول‌های هترودوپلکس بین توالی‌های آللی نسبت دادند. هترودوپلکس‌ها در واقع مولکول‌های DNA دو رشته‌ای تشکیل یافته از دو آلل مختلف می‌باشند که در اثر پیوند اشتباهی (mismatch) بوجود آمده و از آنجایی که از سرعت حرکت متفاوتی نسبت به همودوپلکس‌ها برخوردارند بر روی ژل جایگاه متمایزی را به خود اختصاص می‌دهند (۲۱و ۱۶و ۱۵). مشابه این باندها در نشانگر RAPD در تحقیقات هانت و همکاران بر روی زنبور عسل (۱۳)، هوآنگ و همکاران در هیبریدهای Chrysanthemum (۱۲)، وو و همکاران در برنج (۲۷) و زنگ و همکاران در سویا (۳۰) نیز مشاهده گردید. هدف از اجرای این تحقیق بررسی و تعیین ماهیت باندهای اضافه غیروالدینی و امکان استفاده از آنها در شناسایی و انگشت‌نگاری هیبریدهای برنج و تشخیص بذور خارج از تیپ در بذور هیبریدهای برنج می‌باشد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.6.0]



شکل ۱ پروفایل ژل قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از آغازگر RM337 بر روی ژل آگارز. باندهای غیروالدینی در افراد هیبرید مشاهده می‌شود. شماره‌های ۹-۱ در شکل به ترتیب عبارتند از: ۱- نعمت-A، ۲- IR28/نعمت-A، ۳- IR28، ۴- IR28/ندا-A، ۵- ندا-A، ۶- IR69726-54-3-IR/ندا-A، ۷- IR69726-54-3-IR، ۸- IR69726-54-3-IR/نعمت-A، ۹- نعمت-A می‌باشند.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ١٦ ژنوتیپ برنج شامل ۳ لاین نرعقیمی سیتوپلاسمی به نام‌های ندا-A، نعمت-A و IR58025A؛ ۵ لاین اعاده کننده باروری به نام‌های IR42686R، IR62037-93-1-3-1-1-IR، IR69726-54-3-IR، IR28 و SA4 ؛ و ۸ لاین هیبرید F_1 شامل IR58025A/IR42686R، IR62037-93-1-3-1-IR/ندا-A، IR69726-54-3-IR/ندا-A، IR28/ندا-A، SA4/ندا-A، IR62037-93-1-3-1-IR/نعمت-A، IR69726-54-3-IR/نعمت-A، IR28/نعمت-A استفاده گردید. استخراج DNA ژنومی به روش دلاپورتا و همکاران (۶) با اندکی تغییر در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه صنعتی اصفهان اجرا گردید. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA نیز با روش الکتروفورز ژل آگارز تعیین گردید.

از میان ١٤ آغازگر ریزماهواره (RM154، RM164، RM337، RM206، RM216، RM258، RM263، RM9، RM1108، RM6344، RM443، RM1، RM171، RM264) که در آزمایشات انگشت‌نگاری هیبرید و لاین‌های برنج مورد استفاده قرار گرفته بود (۱) تعداد ۵ آغازگر که در آنها باندهای اضافه غیروالدینی مشاهده شده بود برای مطالعات بیشتر استفاده گردید که مشخصات این توالی در جدول (۱) نشان داده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر برای هر نمونه اجرا گردید که عبارت بود از ٤/٤ میکرولیتر آب مقطراستریل، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱/۵ میکرولیتر کلریدمنیزیم ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۱۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۲۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت ۱۰ میکرومولار، یک واحد تک‌پلی‌مراز و ٤ میکرولیتر DNA با غلظت ۴۰ نانوگرم. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز در دستگاه ترموسایکر (Techne LTD, UK, Mode FTGENE5D) در ۳ چرخه اجرا گردید که چرخه اول از یک سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه، و چرخه دوم از ۳۶ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه، و نهایتا چرخه سوم شامل بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. بمنظور مشاهده الگوی نواری محصولات تکثیری از ژل آگارز ۲ درصد و ژل پلی‌اکریل‌آمید شش درصد استفاده شد. پس از الکتروفورز رنگ‌آمیزی ژل به روش اتیدیوم بروماید انجام گرفت و از الگوی نواری بدست آمده عکس‌برداری گردید.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.6.0]

جدول۱ اسامی و مشخّصات توالی آغازگرهای ریزماهواره در بررسی هیبریدهای برنج

نام آغازگر	توالی رفت و برگشتی	ناحیه کروموزومی	موتیف
RM 1108	GCTCGCGAATCAATCCAC CTGGATCCTGGACAGACGAG	۱۰	(AG)12
RM1	GCGAAAACACAATGCAAAAA GCGTTGGTTGGACCTGAC	۱۰	(AG)26
RM171	ACGAGATACGTACGCCTTTG AACGCGAGGACACGTACTTAC	۱۰	(GATG)5
RM6344	ACACGCCATGGATGATGAC TGGCATCATCACTTCCTCAC	۷	(GAA)8
RM337	GTAGGAAAGGAAGGGCAGAG CGATAGATAGCTAGATGTGGCC	۸	(CTT)4-19-(CTT)8

نتایج و بحث

زمانی که ژنوتیپ‌های هیبرید با استفاده از الکتروفورز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند باندهای اضافه غیروالدینی در افراد هتروزیگوت مشاهده گردید. شکل ۱و۲ پروفایل ژل قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از آغازگر RM337 را نشان داده است که باندهای غیروالدینی به وضوح در ژنوتیپ‌ها قابل رویت است و اعداد ۵-۱ در شکل نیز به ترتیب ۱-ندا-A، ۲--IR69726-54-3-IR/ندا-A-۳،IR69726-54-3-IR-۴،IR69726-54-3--IR/نعمت-A و ۵-نعمت-A می‌باشند. جهت اثبات ماهیت هترودوپلکس این باندهای مشاهده شده در افراد هیبرید، از آزمون‌های DNA template mixing ، PCR template mixing و Snap chilling استفاده گردید.

آزمون DNA template mixing

در این آزمون ابتدا مقادیر برابر از DNA والدی هر هیبرید (F_1) که از غلظت مشابهی برابر بودند (غلظت مناسب بهینه گردید) ترکیب و در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. در ادامه DNA mix به آرامی در طی ۳۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر برنامه‌ریزی شده سرد گردید که در برنامه مورد استفاده کاهش دما در هر ۳۰ ثانیه، ۲ درجه سانتی‌گراد بود. از ترکیب حاصل بعنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید. الکتروفورز محصولات PCR بر روی آگارز ۲ درصد همان طور که انتظار بر این بود باندهای هترودوپلکس در افراد هیبرید مشاهده گردید.

آزمون PCR template mixing

ریزماهواره‌ها نشانگرهای مکان اختصاصی و هم‌بارز با چندشکلی بالا می‌باشند به طوری که اگر نتوان گفت که نشانگرهای SSR اختصاص به یک مکان ژنی خاص دارند ولی لااقل می‌توان گفت که برای نواحی مجاور آن اختصاصی می‌باشند که یک جفت از آغازگرهای خاص نواحی مجاور این SSR ها را تکثیر خواهد نمود (۸). جهت بررسی اینکه آیا باند اضافه مشاهده شده ناشی از اثر متقابل چندین مکان نشانگری بوده یا نه این آزمون اجرا گردید به این صورت که محصول PCR والدین هر هیبرید F_1 با غلظت برابر با هم ترکیب و از آن بعنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید. در الکتروفورز محصولات PCR بر روی آگارز ۲ درصد وجود باند اضافه در افراد هیبرید F_1 مشاهده گردید. با توجه به اینکه فراورده‌های PCR والدین تنها حاصل تکثیر یک ناحیه خاص از ژنوم می‌باشند مشاهده باند اضافه در واقع مبین آللی بودن این اثرات متقابل می‌باشد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.6.0]

آزمون Snap-chilling

ابتدا محصول PCR والدین هر هیبرید F_1 با غلظت برابر با هم ترکیب و از آن بعنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید. در ادامه فراورده‌های PCR در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفته و بلافاصله بر روی رک فلزی صفر درجه قرار داده شدند. در مشاهده محصولات الکتروفورزی بر روی آگار ۲ درصد هیچ باند غیروالدینی رویت نگردید. با توجه به اینکه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد دو رشته DNA کاملا از هم باز می‌گردند در صورت کاهش آنی دما به صفر درجه فرصت اتصال مجدد رشته‌ها امکان‌پذیر نبوده، و رشته‌ها بصورت تک رشته‌ای باقی می‌مانند (۱۱). با این فرض عدم تشکیل قطعات هترودوپلکس توجیه می‌گردد.

روی‌هم‌رفته آزمایشات DNA template mixing، PCR product mixing وSnap-chilling آللی بودن این باندها را تایید نمود. به این صورت که این باندهای غیروالدینی در واقع مولکول‌های هترودوپلکس ناشی از ترکیب توالی آللی می‌باشند. لازم بذکر است احتمال Stutter (در طی PCR ممکن است سر خوردن DNA پلی‌مراز روی دهد که منجر به کاهش یا افزایش واحد تکرار شود که خطاهای تکثیری با داشتن یک واحد تکرار کمتر یا بیشتر در بالا و پایین قطعات تکثیری اصلی قرار گیرند (۲٤)) بودن این باندها به این دلیل که، باندهای Stutter در صورت مشاهده در یک والد در نتاج هم همان الگوی باندی مشاهده می‌گردد رد گردید. همانطوری‌که در شکل ۳ نشان داده شده باندهای استاتر بصورت دو باند نزدیک هم در لاین‌های اعاده‌کننده باروری و هیبریدهای حاصل از آنها مشاهده می‌شود. در حالیکه باند غیر والدینی تنها در افراد هیبرید مشاهده می‌گردد.

وو و همکاران (۲۷) در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که باندهای غیروالدینی که در افراد هتروزیگوس F_1 و F_2 مشاهده می‌شود باندهای هترودوپلکس بوده که در اثر واسرشت‌سازی و اتصال مجدد توالی‌های هم‌بارز بین دو قطعه آللی ایجاد می‌گردند. این باندهای (هترو) دوپلکس از ساختار فضایی متفاوتی (ناشی از جهش‌های خوشه‌ای، حذف‌ها و اضافه‌ها) نسبت به همودوپلکس‌ها برخوردار بوده که سبب تغییر سرعت حرکت و موقعیت این باندها بر روی ژل می‌گردد (۲۳). داویز و همکاران (۵) وجود باندهای غیروالدینی را یک مشخصه کلیدی برای شناسایی نشانگرهای هم‌بارز RAPD در افراد هتروزیگوت دانستند و به همین ترتیب ناوی و همکاران (۲۰) وجود باندهای غیروالدینی را شاهدی برای اثبات هم‌بارز بودن بیان نمودند. مشاهده الگوی آللی هترودوپلکس در این جایگاه‌های نشانگری در واقع بیانگر وجود هموپلاسی یا تنوع آللی پنهان در ردیف بازی آلل‌های ریزماهواره می‌باشند به این مفهوم که آلل‌های مونومورف دارای اندازه مشابه ولی ترکیب خطی نامشابه می‌باشند (۲۵). این وضعیت در واقع ناشی از وقایع جهشی مستقل در یک کلاس آللی با اندازه یکسان می‌باشند (۲۱) که می‌توان از آن در شناسایی SNP استفاده نمود (۱۱). هر چند در مطالعاتی که در آنها فاصله ژنتیکی برآورد می‌گردد احتساب این باندها منجر به برآورد اریب می‌گردد.

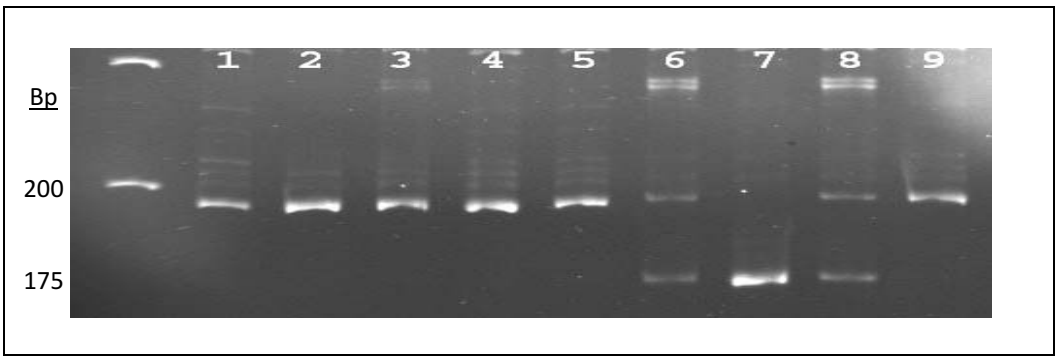
از آنجایی که موفقیت تجاری برنج هیبرید به کیفیت بذور ارائه شده خصوصا خلوص ژنتیکی بستگی دارد (۱۹) ارزیابی آنها بسیار حایز اهمیت می‌باشد. ارزیابی خلوص بذور هیبرید به طور معمول با استفاده از آزمون Grow Out Test (GOT) صورت می‌گیرد که بر اساس ارزیابی خصوصیات مورفولوژیک و گلدهی در مرحله بلوغ می‌باشد (۱۰و۹). با توجه به اینکه بسیاری از این صفات چندژنی یا کمّی بوده، در نتیجه بروز آنها تحت تاثیر عوامل محیطی تغییر می‌یابد. ضمن اینکه تعداد صفات مورفولوژیک موجود برای تمایز همه ارقام جدید کافی نمی‌باشند که نیاز به استفاده از روشی سریع‌تر با کارایی بالاتر و در عین حال هزینه و زمان کمتر از جمله نشانگرهای مولکولی ضروری می‌نماید (۲۸و۱۰). از آن جائیکه در این تحقیق باندهای هترودوپلکس اثر انگشت منحصر بفردی را برای ژنوتیپ‌های هیبرید ایجاد نمودند از باندهای هترودوپلکس RM1 و RM337 در شناسایی و آزمون خلوص ژنتیکی ژنوتیپ‌های هیبرید استفاده گردید (شکل ۴و۵). برای بررسی بذور هیبرید IR69726-54-3-A–ندا/IR از نشانگر RM337 که دارای چندشکلی بین والدین این هیبرید بود (۱) استفاده گردید. همان طوری که در شکل ۴ نشان داده شده، از هشت ژنوتیپ مورد بررسی تنها یک بذر

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.6.0]

(ژنوتیپ شماره ٦) آلوده تشخیص داده شد که شبیه والد مادری بود در حالی که بقیه بذور دارای باندهای هر دو والد بوده و باندهای هترودوپلکس نیز در تمام آنها مشاهده گردید. یک خصوصیت مهم باندهای هترودوپلکس، در شناسایی افراد هتروزیگوت از هموزیگوت خصوصاً در آغازگرهایی که در آنها چندشکلی بین والدین هیبرید وجود ندارد می‌باشد. همان طوری که از شکل ۵ پیداست در بررسی خلوص ژنتیکی بذور هیبرید بهار یک که والدین آن در مکان نشانگری RM1 بر روی ژل آگارز مونومورف بودند (۱) استفاده شد. در شکل ۵ در بذور هیبرید باند هترودوپلکس بصورت جفت باند مشاهده می‌شود (شماره‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰). در حالیکه بقیه بذور به عنوان تیپ خارج از محدوده (Off type) تشخیص داده شدند. استفاده از باندهای غیروالدینی در آزمون خلوص ژنتیکی بذور هیبرید برنج در واقع اولین گزارش در بکارگیری این توالی در این زمینه می‌باشد که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی نشان داد که باندهای هترودوپلکس ریزماهواره نه تنها برای شناسایی و انگشت‌نگاری هیبریدهای برنج مفید بوده، بلکه می‌توان از آنها در تشخیص بذور خارج از تیپ در هیبریدهای برنج سود جست. در این تحقیق اکثر باندهای هترودوپلکس ناشی از آغازگرهای ریزماهواره بر روی ژل آگارز بصورت تک باند (شکل ۱) و بر روی ژل اکریل‌آمید به جهت قدرت تفکیک بیشتر بصورت دو باندی دیده می‌شوند (شکل ۲). البته باندهای هترودوپلکس ناشی از آغازگرهای ریزماهواره RM1 به صورت جفت باند مشاهده گردید. می و همکاران (۴) دلیل حرکت تک باندی و جفت باندی بر روی ژل آگارز این هترودوپلکس‌ها را به دمای اتصال و ساختار ثانویه متفاوت هترودوپلکس‌ها نسبت دادند.

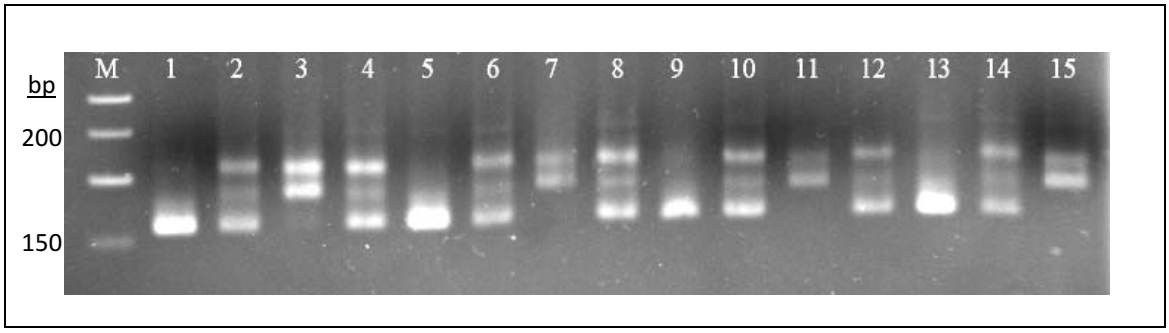
با توجه به نتاج بدست آمده می‌توان برای هر هیبرید یک نشانگر هترودوپلکسی ریزماهواره معرفی نمود که بتوان بر اساس آن هیبرید مورد نظر را به سرعت شناسایی نمود بطوریکه اصلاحگر بتواند بر اساس آن آزمون خلوص ژنتیکی را اجرا نماید. البته تایید نشانگرهای معرفی شده نیازمند آزمایش‌های تکمیلی نظیر توالی‌یابی ردیف بازی هترودوپلکس می‌باشد. باندهای هترودوپلکس می‌تواند گواه مستدلی برای شناسایی افراد هیبرید و آزمون تعیین خلوص ژنتیکی بذور هیبرید برنج باشد.



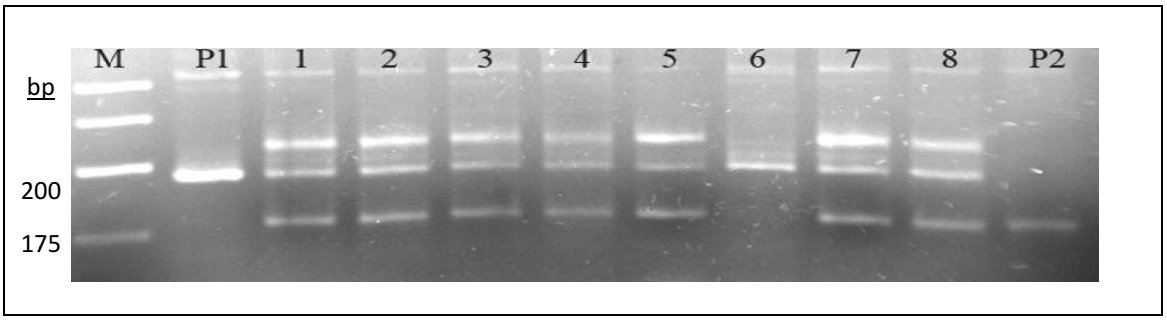
شکل۲- پروفایل ژل قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از آغازگر RM337 بر روی ژل اکریل‌آمید. باندهای غیروالدینی در افراد هیبرید بصورت جفت باند مشاهده می‌شود. شماره‌های ۹-۱ در شکل به ترتیب عبارتند از: ۱-نعمت-A، ۲-IR28/نعمت-A، ۳-IR28، ۴-IR28/ندا-A، ۵-ندا-A، ۶-IR69726-54-3-IR/ندا-A، ۷-IR69726-54-3-IR، ۸- IR69726-54-3-IR/نعمت-A، ۹-نعمت-A می‌باشند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

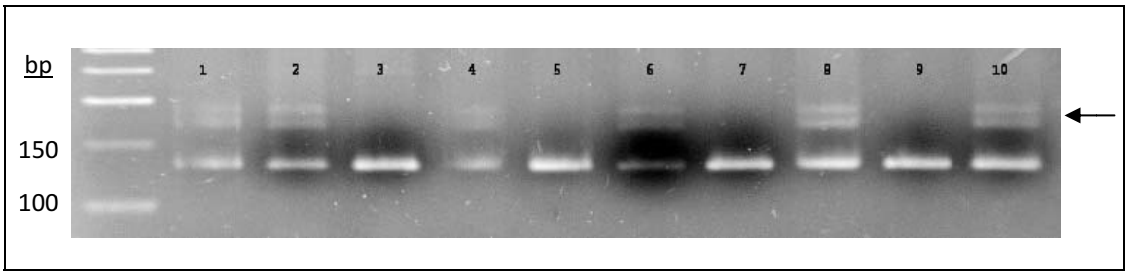
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.6.0]



شکل۳- پروفایل ژل نشاندهنده قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از آغازگر RM263. باندهای استاتر هم در افراد هیبرید و هم در لاین‌های اعاده‌کننده باروری مشاهده می‌شود. که شماره‌های ۱۵-۱ نشاندهنده ارقام هیبرید و لاین‌های مورد استفاده بوده که به ترتیب عبارتند از: ۱-نعمت-A ، ۲-IR28/نعمت-A، ۳-IR28، ۴-IR28/ندا-A، ۵-ندا-A، ۶-IR69726-54-3-IR/ندا-A، ۷-IR69726-54-3-IR، ۸- IR69726-54-3-IR/نعمت-A، ۹-نعمت-A، ۱۰-IR62037-93-1-3-1-IR/نعمت-A، ۱۱- IR62037-93-1-3-1-IR، ۱۲-IR62037-93-1-3-1-IR /ندا-A ، ۱۳-ندا-A، ۱۴-SA4/ندا-A، ۱۵-SA4 می‌باشند.(M= 50bp Ladder)



شکل۴- بررسی خلوص ژنتیکی بذور هیبرید با استفاده از آغازگر RM337 بر روی ژل آگارز. P_1 و P_2 به ترتیب لاین نرعقیم ندا-A و نربارور IR69726-54-3-IR والدینی بوده، در حالی که هشت بذر هیبریدتصادفی بین آنها قرار دارد. باندهای هترودوپلکس در همه بذور هیبرید بجز بذر شماره ۶ مشاهده می‌شود.



شکل۵- آزمون خلوص ژنتیکی بذور هیبرید بهار یک با استفاده از آغازگر RM1. در بذور هیبرید باندهای هترودوپلکس بصورت دوبانده مشاهده می‌شود (شماره‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.6.0]

منابع

۱. هاشمی‌پطرودی، س ح، (۱۳۸۶)انگشت‌نگاری مولکولی هیبریدها و تشخیص خلوص ژنتیکی بذور هیبرید برنج با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.

2. Ahmadikhah A, Karlov G, Nematzadeh G and K Ghasemi-Bezdi (2007) Inheritance of the fertility restoration and genotyping of rice lines at the restoring fertility loci using molecular markers, *Int. J. Plant Prod*. 1: 13-21.

3. Ayliffe M, Lawwrence GJ, Ellis JG and Pryor AJ (1994) Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands, *Nucleic Acids Res*. 22: 1632-1636.

4. May B, Krueger CC and Kincaid HL (1997) Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*, *Can. J. Fish. Aquat. Sci*. 54: 1542–1547.

5. Davis TM, Yu H, Haigis KM and McGowan PG (1995) Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers, *Theor. Appl. Genet.* 91: 582- 588.

6. Dellaporta SL, Wood J and Tickes JB (1993) A plant molecular DNA miniperation Version II, *Plant Mol. Bio. Rep*. 1: 19–21.

7. Delseny M, Salses J, Cooke R, Sallaud C, Regad f, Lagoda P, Guiderdoni E, Ventelon M, Brugidou C and Ghesquiere A (2001) Rice genomics: Present and future. *Plant Physiol. Biochem*. 39: 323-334.

8. Devienne D (2003) Molecular markers on plant genetics and biotechnology, Enfield, NH, Science Publishers.

9. Fuji S, and Toriyama K. (2005) Molecular mapping of fertility restorer gene for MS-CW-type cytoplasmic male sterility of rice, *Theor. Appl. Genet*., 111: 696-701.

10. Fukuoka S, Tran SD, Ebana K, Luu TN, Nagamine T and Okuno K (2006) Genetics organization of aromatic rice as revealed by RAPD markers: a case in conserving crop genetics resources on farm, *Euphytica*, 149: 61-71.

11. Gray L, Campbell DA and Spurr NK (2000) Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics, *Human Mol Genet* 9: 2403-2408.

12. Huang SC, Tsai CC and Sheu CS (2000) Genetic analysis of Chrysanthemum hybrids based on RAPD molecular markers, *Bot. Bull. Acad. Sin*. 41: 257-262.

13. Hunt GJ and Page J (1992) Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in honeybee, *Theor. Appl. Genet*. 85: 15-20.

14. Korzun V (2002) Use of molecular markers in cereal breeding, *Cell Mol. Biol. Lett*. 7: 811-820.

15. Kozlowski P and Krzyzosiak WJ (2001) Combined SSCP/duplex analysis by capillary electrophoresis for more efficient mutation detection, *Nucleic Acids Res* 29:E71.

16. Liu Z (2007) Aquaculture genome Technologies, Ames, Blackwell Publishing, XV+551 pp.

17. McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Fu M, Walton B, Li R, Maghirang Z, Xing X, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D and Stein L (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.), *DNA Res*. 9: 199–207.

18. McCouch SR, Chen X, Panaud O, Temnykh L, Xu Y, Cho YG, Huang N, Ishii T and Blair M (1997) Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding, *Plant Mol. Biol*., 35: 89–99.

19. Nandakumr N, Singh A, Sharma K, Mohapara RK, Prabhu TKV and FU (2004) Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers, *Euphytica* 136: 257-264.

20. Novy RG and Vorsa N (1996) Evidence for RAPD heteroduplex formation in cranberry: implication for pedigree and genetic-relatedness studies and source of co-dominant RAPD markers, *Theor. Appl. Genet*. 92: 840-849.

21. Pérez JA, Maca N and Larruga JM (1999) Expanding informativeness of microsatellite motifs through the analysis of heteroduplexes: a case applied to *Solanum tuberosum*, *Theor. Appl. Genet*. 99: 481–486.

22. Ranjekar PK, Davierwala AP and Gupta VS (2002) DNA markers and heterosis. PP: 161-201. *In*: Jain, S. M., D. S. Brar and B. S. Ahloowalia (eds), Molecular Techniques In Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers, The Nertherlands.

23. Resch W, Parkin N, Stuelke EL and Swanstrom R (2000) A multiple site-specific heteroduplex tracking assay as a new tool for the study of viral population dynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 98:176-181.

24. Schumm JW (1996) New approaches to DNA fingerprint analysis, Promega, Notes Magazine 58:12.

25. Selkoe KA and Toonen RJ (2006) Microsatellite for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers, *Ecology Lett*. 9: 615-629.

26. Singh RK, Sharma RK, Singh AK, Singh VP, Tiwari SP and Mohapatra T (2004) Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice, *Euphytica* 135: 135–143.

27. Wu JY, Wu HK and Chung MC (2002) Co-dominant RAPD markers closely linked with two morphological genes in rice (*Oryza sativa* L.), *Bot. Bull. Acad. Sin*. 43: 171-180.

28. Yashitola J, Thirumurgan T, Sundaram RM, Naseerullah MK, Ramesha MS, Sarma NP and Sonti RV (2002) Assessment of purity of rice hybrid using microsatellite and STS markers, *Crop Sci*. 42: 1369- 1373.

29. Ye-yun X, Zhan Z, Yi-ping X and Long-piY NG (2005) Identification and purity test of super hybrid rice with SSR molecular markers, *Rice Sci.* 12: 7-12.

Zheng C, Chang R, Qiu L, Chen P, Wu X and Chen S (2003) Identification and characterization of a RAPD/SCAR marker linked to a resistance gene for soybean mosaic virus in soybean, *Euphytica* 132: 199–210.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.1.6.0]