بسم الله الرحمن الرحیم

بسمه تعالی

دانشگاه لرستان

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان پایان نامه

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های سویا *Glycine max* با استفاده از نشانگر نیمه تصادفی ISJ و تصادفی RAPD

Assessment of Genetic Diversity Among Soybean Genotypes, Using Semi-random Intron-exon Splice Junction Marker (ISJ) And random RAPD

نگارش: مژگان پنجو

استاد راهنما:

فرهاد نظریان فیروزآبادی

استاد مشاور:

هادی احمدی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

مهر ۱۳۹۰

چکیده:

سویا (*Glycine max* (L.) Merr)، یکی از مهمترین گیاهان زراعی دنیاست که دارای میزان بالایی روغن و پرتئین است. به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ٤٥ ژنوتیپ سویا، از دو نوع نشانگر مولکولی RAPD (١٠ آغازگر تصادفی) و ISJ (١٥ آغازگر نیمه تصادفی) استفاده شد. اطلاعات حاصل از هر دو نشانگر به طور جداگانه و با هم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از مجموع ١٠٣ باند RAPD، ٦٠٪ باندها و از مجموع ١٢٩ باند تولیدی توسط نشانگر ISJ، ٨٧٪ باندها چندشکل بودند. تجزیه کلاستر بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده و به روش UPGMA صورت گرفت. میزان ضریب همبستگی برای نشانگرهای RAPD و ISJ به ترتیب ٠/٩٥ و ٠/٨١ بود. نتایج حاصل از دندروگرام ها نشان داد که RAPD در مقایسه با ISJ نمی تواند تنوع ژنتیکی را در بین ژنوتیپ های سویا به خوبی نشان دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که می توان از نشانگرهای ISJ برای تمایز ژنوتیپ های بسیار نزدیک به هم استفاده کرد. همچنین در صورت استفاده از نشانگر ISJ، استفاده از آغازگرهای ET پیشنهاد می شود.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

کلیات و اهداف

۱-۱تنوع ژنتیکی و اهمیت آن

فصل دوم: مرور منابع

۲-۱-خصوصیات گیاهی

۲-۲- طبقه بندی سویا

۲-۳- تاریخچه و منشا جغرافیایی.....

۲-٤- خصوصیات اکولوژیکی

۲-۵- ترکیب شیمیایی و ارزش غذایی یا موارد استفاده سویا

۲-٦- انتخاب به کمک نشانگر

۲-٦-۱ نشانگر مورفولوژیکی

۲-٦-۲ نشانگرهای بیوشیمیایی و یا پروتئینی

۲-٦-۳- نشانگرهای مولکولی در سطح DNA

۲-٦-۳-۱- نشانگرهای DNA غیر مبتی بر PCR

۲-٦-۳-۲- نشانگرهای DNA مبتی بر PCR

۲-۷-مروری بر مطالعات انجام شده در بررسی تنوع ژنتیکی سویا در جهان با استفاده از نشانگرهای مولکولی

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱-مواد گیاهی

۳-۲- استخراج DNA ژنومی

۳-۳-تعیین کیفیت و کمیت DNA

۳-۳-۱-الکتروفورز

۳-۳-۲-اسپکتوفتومتر

۳-٤- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در گیاه سویا

۳-٤-۱- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده ازآغازگرهای تصادفی (RAPD)

۳-٤-۱- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده ازآغازگرهای نیمه تصادفی (ISJ)

۳-٤-۱-۱- راه اندازی واکنشPCR در آغازگرهای نیمه تصادفی (ISJ)

عنوان | صفحه

۳-٤-۱-۲-الکتروفورز محصول PCR .....
۳-۵-تفسیر و تجزیه و تحلیل آماری داده ها

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤-۱- نتایج مربوط به استخراج DNA
٤-۲- نتایج مربوط به گرادیان دمایی واکنش‌های PCR
٤-۳- نتایج مربوط به آغازگرها و تجزیه و تحلیل حاصل از RAPD
٤-٤- نتایج مربوط به آغازگرها و تجزیه و تحلیل حاصل از ISJ
٤-٤-۱ تجزیه و تحلیل حاصل از آغازگرهای گروه IT و ET
٤-۵- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها
٤-۵-۱- تشکیل ماتریس تشابه برای نشانگر تصادفی RAPD
٤-۵-۲- تشکیل ماتریس تشابه و گروه بندی بر اساس آغازگرهای نیمه تصادفیISJ
٤-۵-۳- تشکیل ماتریس تشابه و گروه بندی بر اساس آغازگر های نیمه تصادفی گروهIT
٤-۵-۳-۱- تجزیه به مولفه های اصلی برای آغازگر های نیمه تصادفی گروهIT
٤-۵-٤- تشکیل ماتریس تشابه و گروه بندی برای آغازگرهای نیمه تصادفی ET
٤-۵-٤-۱- تجزیه به مولفه های اصلی برای آغازگرهای نیمه تصادفیET
٤-۵-۵- ماتریس تشابه حاصل از تلفیق اطلاعات نشانگر های تصادفی و نیمه تصادفی
٤-٦- نتیجه گیری های کلی و پیشنهادات

منابع

فهرست تصاویر

عنوان	صفحه
شکل۲-۱- تصویری از گیاه سویا	
شکل ۲-۲ تصویری از توالی اجماع در اتصالت اگزون-اینترون	
شکل ۲-۳ تصویری از واکنش نشانگرنیمه تصادفیISJ	
شکل۳- ۱تصویری از مراحل دمایی واکنش زنجیره ای پلیمراز در نشانگر RAPD	
شکل ۳-۲ تصویری از مراحل دمایی PCR توسط نشانگر نیمه تصادفی (ISJ)	
شکل ٤-۱ : استخراج DNA با روشCTAB موری و تامسون (Williams *et al*., 1990). در هر چاهک مقدار ۲ ماکرولیتر DNA ژنومی بارگذاری شده است. M : سایز مارکر ۱kb و شماره‌های ۱تا۸ بیانگر نمونه‌های استخراج شده هستند.	
شکل ٤-۲- گرادیان دمایی برای آغازگر ET15-32. حرفM: سایز مارکر ۱kb و ۱۰۰bp، حرف C نشان‌دهنده کنترل منفی (موادPCR به جز DNA)، اعداد ۱و۲ نشان دهنده ژنوتیپ می‌باشند. همانطور که در تصویر دیده می‌شود در دمای ۵۰ و٥٤ درجه سانتی‌گراد با Tm :٤٨، چندشکلی واضح‌تر و بیشتری دیده می‌شود.	
شکل٤-۳: تصویر دو واکنش PCR را برای سه ژنوتیپ در دو نوع شرایط برای آنزیم تک پلی مراز را نشان می دهد. اعداد ۲،۱و۳ نشان دهنده ژنوتیپ می‌باشند.	
شکل٤-٤- محصول آغازگرE20 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ، حجم محصولPCR بارگذاری شده در هر چاهک ۲۵ ماکرولیتر است و تعداد چرخه های PCR ٤۰بود. M: سایز مارکر ۱kb و ۱۰۰bp؛ C: کنترل منفی؛ اسامی بیانگر ژنوتیپ‌ها می‌باشد. این آغازگر نسبت به بقیه آغازگرها درصد چندشکلی بیشتری را نشان داده بود.	
شکل ٤-۵- محصول آغازگر B15 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ، حجم محصولPCR بارگذاری شده در هر چاهک ۲۵ ماکرولیتر است و تعداد چرخه های PCR ٤۰بود. M: سایز مارکر ۱kb و ۱۰۰bp؛ C: کنترل منفی؛ اسامی بیانگر ژنوتیپ‌ها می‌باشد. باند هایی با اندازه bp ۱۵۰ که در پایین ژل تشکیل شده است.	
شکل ٤-٦- محصول آغازگر D10 روی ژل آگارز ۱/۵٪ ، حجم محصولPCR بارگذاری شده در هر چاهک ۲۵ ماکرولیتر است و تعداد چرخه های PCR ٤۰ بود. M: سایز مارکر ۱kb و ۱۰۰bp؛ C: کنترل منفی؛ اسامی بیانگر ژنوتیپ‌ها می‌باشد.	
شکل ٤-۷- محصول آغازگر OPH16 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ، حجم محصولPCR بارگذاری شده در هر چاهک ۲۵ ماکرولیتر است و تعداد چرخه های PCR ٤۰ بود. M: سایز مارکر ۱kb و ۱۰۰bp؛ C: کنترل منفی؛ اسامی بیانگر ژنوتیپ‌ها می‌باشد. این آغازگر درصد تنوع ژنتیکی پایینی را نشان داد.	
شکل ٤-۸-باندهای چندشکل و یک شکل برای ۱۰ آغازگر تصادفی مورد استفاده در این تحقیق.	
شکل ٤-۹- محصول آغازگر IT15-32 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ، حجم محصولPCR بارگذاری شده در هر چاهک ۲۵ ماکرولیتر است و تعداد چرخه های PCR ٤۰بود. M: سایز مارکر ۱kb و ۱۰۰bp؛ C: کنترل منفی؛ اسامی بیانگر ژنوتیپ‌ها می‌باشد. این آغازگر در گروه آغازگرهای IT چندشکلی بالایی داشت.	
شکل ٤-۱۰- محصول آغازگر IT15-31 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ، حجم محصولPCR بارگذاری شده در هر چاهک ۲۵ ماکرولیتر است و تعداد چرخه های PCR ٤۰بودM : سایز مارکر ۱kb و ۱۰۰bp؛ C: کنترل منفی؛ اسامی بیانگر ژنوتیپ‌ها می‌باشد. این آغازگر در گروه آغازگرهای IT درصد چندشکلی پایینی داشت.	

شکل ٤-١١- محصول آغازگر ET15-31 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ، حجم محصولPCR بارگذاری شده در هر چاهک ۲۵ ماکرولیتر است و تعداد چرخه های PCR ٤٠بودM : سایز مارکر ۱kb و ۱۰۰bp؛ C: کنترل منفی؛ اسامی بیانگر ژنوتیپ‌ها می‌باشد. این آغازگر در گروه آغازگرهای ET درصد چندشکلی پایینی داشت.	
شکل ٤-١٢- محصول آغازگر ET15-33 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ، حجم محصولPCR بارگذاری شده در هر چاهک ۲۵ ماکرولیتر است و تعداد چرخه های PCR ٤٠بود. M: سایز مارکر ۱kb و ۱۰۰bp؛ C: کنترل منفی؛ اسامی بیانگر ژنوتیپ‌ها می‌باشد.	
شکل ٤-١٣- محصول آغازگر ISJ۱۰ بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ، حجم محصولPCR بارگذاری شده در هر چاهک ۲۵ ماکرولیتر است و تعداد چرخه های PCR، ٤٠بود. M: سایز مارکر ۱kb و ۱۰۰bp؛ C: کنترل منفی؛ اسامی بیانگر ژنوتیپ‌ها می‌باشد.	
شکل٤-١٥- تعداد باندهای چندشکل و یک شکل برای ۱۵ آغازگرها مورد استفاده در این تحقیق را نشان می دهد.	
شکل٤-١٧- دندروگرام ٤٥ ژنوتیپ سویا بر اساس الگوی باندی نشانگرRAPD با استفاده از ضریب تشابه تطابق ساده و روشUPGMA.	
شکل٤-١٨- دندروگرام مربوط به ٤٥ ژنوتیپ سویا بر اساس الگوی باندی آغازگرهای ISJ با استفاده از ضریب تشابه تطابق ساده و روشUPGMA.	
شکل٤-١٩- نمودار دو بعدی مربوط به تجزیه مولفه‌های اصلی براساس ماتریس تطابق ساده ٤٥ ژنوتیپ سویا مورد مطالعه در این تحقیق.	
شکل٤-٢٠- نمودار سه بعدی مربوط به تجزیه مولفه‌های اصلی براساس ماتریس تطابق ساده ٤٥ ژنوتیپ سویا مورد مطالعه در این تحقیق.	
شکل ٤-٢١- دندروگرام مربوط به ٤٥ ژنوتیپ سویا بر اساس الگوی باندی آغازگرهای ISJ گروه IT با استفاده از ضریب تشابه تطابق ساده و روشUPGMA.	
شکل٤-٢٢- نمودار دو بعدی مربوط به تجزیه مولفه‌های اصلی براساس ماتریس تطابق ساده ٤٥ ژنوتیپ ها سویا.	
شکل٤-٢٣- نمودار سه بعدی مربوط به تجزیه مولفه‌های اصلی براساس ماتریس تطابق ساده ٤٥ ژنوتیپ ها سویا.	
شکل ٤-٢٤- دندروگرام مربوط به ٤٥ ژنوتیپ سویا بر اساس الگوی باندی آغازگرهای ISJ گروه ET با استفاده از ضریب تشابه تطابق ساده و روشUPGMA.	
شکل٤-٢٥- نمودار سه بعدی مربوط به تجزیه مولفه‌های اصلی براساس ماتریس تطابق ساده ٤٥ ژنوتیپ ها سویا.	
شکل٤-٢٦- نمودار سه بعدی مربوط به تجزیه مولفه‌های اصلی براساس ماتریس تطابق ساده ٤٥ ژنوتیپ ها سویا.	
شکل ٤-٢٧- دندروگرام ٤٥ ژنوتیپ سویا بر اساس تلفیق الگوی باندی آغازگرهای ISJ وRAPD با استفاده از ضریب تشابه تطابق ساده و روشUPGMA.	
شکل٤-٢٨- نمودار سه بعدی مربوط به تجزیه مولفه‌های اصلی براساس ماتریس تطابق ساده ٤٥ ژنوتیپ ها سویا.	
شکل٤-٢٩- نمودار سه بعدی مربوط به تجزیه مولفه‌های اصلی براساس ماتریس تطابق ساده ٤٥ ژنوتیپ ها	

سویا.	

فهرست جداول	
عنوان	صفحه
جدول ۲-۱:رده بندی سویا	
جدول ۲-۲ طبقه بندی نشانگرها	
جدول ۳- ۱ ژنوتیپ های گیاه سویا	
جدول ۳-۱اجزای واکنش در روش RAPD	
جدول ۳-۲ آغازگر های مورد استفاده در واکنشRAPD	
جدول ۳-۳ آغازگر های نیمه تصادفی (ISJ) مورد استفاده در مطالعه سویا	
جدول۳-٤ مواد مورد استفاده برای واکنش PCR	
جدول ٤-۱- مشخصات و تعداد باند تولید شده توسط هر کدام از آغازگر های تصادفی RAPD	
جدول ٤-۲- مشخصات و تعداد باند تولید شده توسط هر کدام از آغازگر های تصادفیISJ	
جدول ٤-۳- تجزیه مولفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه و نسبت واریانس مورد انتظارنشانگر ISJ توسط سه مولفه اول.	
جدول ٤-٤- تجزیه مولفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه و نسبت واریانس مورد انتظار آغازگرهای ISJ گروه IT توسط سه مولفه اول.	
جدول ٤-٥- تجزیه مولفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه و نسبت واریانس مورد انتظار آغازگرهای ISJ گروه ET سه مولفه اول.	
جدول ٤-٦- تجزیه مولفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه و نسبت واریانس مورد انتظار **حاصل از تلفیق اطلاعات نشانگر های تصادفی و نیمه تصادفی** سه مولفه اول.	

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کلیات و اهداف

روند افزایش جمعیت جهانی، بهبود کلی سطح تغذیه، جایگزین شدن روغن‌های نباتی با روغن‌های حیوانی، و افزایش روزافزون مصرف پروتئین‌های گیاهی، تلاش ها را برای دستیابی به منابع جدید روغن نباتی افزایش داده است. ایران با کمبود شدید روغن خوراکی مواجه است بطوریکه بیش از ۹۰ درصد نیاز روغن خوراکی از کشورهای تولیدکننده روغن تامین می‌شود. بنابراین سالانه ارز قابل توجهی جهت واردات روغن از کشور خارج می‌شود (شهیدی و فروزان، ۱۳۷۵). برای مثال، سال ۱۳۸۷ یک میلیون و ۹۵۳ هزار و ۷۶۸ تن روغن خام و دانه روغنی به ارزش یک میلیارد و ۶۷۲ میلیون و ۲۳۹ هزار دلار جهت واردات روغن هزینه شده است (Anonymous, 2008). سویا گیاهی یکساله که جهت تولید روغن و پروتئین کشت شده (لطیفی، ۱۳۷۵). و اولین منبع تامین‌کنندهٔ روغن جهان به شمار می‌رود (Anonymous, 2007). روغن سویا یک روغن خوراکی است که پس از تصفیه، در تولید فرآورده‌های گوناگون برای تغذیه انسان مصرف می‌شود. دانه سویا حاوی ۱۸ درصد روغن بوده که مصارف اصلی آن در شکل روغن مایع برای آشپزی، سالاد، مارگارین و روغن جامد است. روغن سویا دارای لینولئات زیاد و اسیدهای اشباع کم است. همچنین سویا به عنوان یک منبع پروتئین، مورد توجه است. از آنجایی که پروتئین‌های حیوانی گران هستند و اغلب کمتر از مقدار مورد نیاز در دسترس قرار دارند، به تازگی پروتئین‌های گیاهی بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. در بین انواع منابع جدید پروتئین، پروتئین سویا در مقام اول قرار گرفته است و بالاترین میزان پروتئین را در گیاهان داراست (۴۰-۵۰درصد) به همین دلیل به آن طلای سبز می گویند سویا برای پیشگیری از بیماری‌های قلبی، پوکی استخوان، سرطان، کنترل بیماری های کبدی، مفید است (میرزایی،۱۳۸۷). همچنین کنجاله سویا به عنوان یک منبع پروتئینی مانند کنجاله پنبه‌دانه، آشغال گوشت، پودر ماهی و گلوتن حدود ۱۰ درصد نیاز حیوان به پروتیین را تأمین می‌کند.

سویا قادر است با باکتری‌های خاکزی تثبیت کننده ازت بنام ریزوبیوم ژاپونیکوم *Rhizobium japonicum* همزیستی برقرارنماید (Anonymous, 2006). بدین ترتیب مقداری ازت تثبیت شده که بخشی به مصرف گیاه می‌رسد ولی قسمت اعظم آن در خاک باقی مانده و منجر به افزایش ازت خاک و حاصلخیزی خاک می‌شود (رستگار، ۱۳۸۵).

۱-۲- تنوع ژنتیکی و اهمیت آن

تنوع ژنتیکی مهمترین عامل بقاء موجودات زنده از جمله گیاهان زراعی در برابر تغییرات شرایط محیطی و آفات است (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲).از اصلاح نباتات به عنوان انتخاب افراد برتر، از درون جوامع متنوع گیاهی یاد می‌شود، بنابراین موفقیت انتخاب گیاهان برتر به تنوع ژنتیکی در جمعیت گیاهی مورد نظر بستگی دارد (ارزانی، ۱۳۸۰). بررسی تنوع ژنتیکی، متخصصین اصلاح نباتات را در شناسایی ظرفیت ژنتیکی صفات

مرتبط با اهداف اصلاحی مهم، یاری می‌نماید. به نظر می رسد که تبعیت تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی و اقلیمی در ژنوتیپ‌ها، نشان دهندهٔ سازگاری‌های احتمالی آنها با محیط‌های متفاوت می‌باشد (Loarce *et al.*, 1996). ارزیابی تنوع ژنتیکی از میان جمعیت گیاهان اهلی و وحشی برای حفاظت، نگهداری و استفادهٔ مفید ژرم پلاسم، شناسایی والدین مناسب و همچنین محتوای ژنتیکی جهت برنامه های اصلاحی، ضروری می-باشد (Kresovich *et al.*, 1992; Diers and Osborm, 1994; Hallden *et al.*, 1994; Cruz *et al.*, 2007). تنوع ژنتیکی از نیازهای اساسی پیشرفت در اصلاح نباتات و پایه و اساس توسعه ژنتیکی است. (Hallauer and Miranda, 1988، Ramanujam *et al.*, 1974) و روش‌های متفاوتی برای ارزیابی تنوع ژنتیک وجود دارد. اطلاعات تنوع ژنتیکی را می‌توان از صفات مورفولوژیکی، پروتئین، آیزوزایم و نشانگر های مولکولی بدست آید (Pejic *et al.*,1998). استفاده از صفات ظاهری برای شناسایی ژنوتیپ و تمایز، در مرکز برنامه های اصلاحی قرار دارد. اما این گونه از خصوصیات به دلیل تداخل اثر ژنوتیپ با محیط خیلی قابل اعتماد نیستد. و از طرفی تعداد زیادی از واریته‌های موجود دارای مبدا ژنتیکی مشابه بوده و تولید واریته های جدید با این داده‌های مورفوژنتیکی به اندازه کافی بین این ژنوتیپ‌ها تبعیض قائل نمی‌شود (Ahmad *et al.*,2007). آیزوزایم ها و پروتئین های دیگر هم تحت تاثیر محیط، بافت و دوره رشد گیاهی می باشند و همچنین بین ژنوتیپ های خویشاوند نزدیک، تنوع کمی را نشان می دهند (معالی امیری و همکاران، ۱۳۸۰). پیشرفت های سریع در زمینه زیست شناسی مولکولی و فن آوری زیستی، ابزار قدرتمندی را برای مطالعات ژنتیکی گیاهان از جمله گیاهان زراعی در اختیار محققین قرار داده است (قره یاضی، ۱۳۷۵). نشانگرهای مبتنی برDNA، قوی‌ترین ابزار برای مطالعه تنوع ژنتیکی هستد، زیرا نسبت به روش‌های موفولوژیکی تحت تاثیر شرایط محیط قرار نگرفته و هر مرحله‌ای از نمو گیاه قابل شناسایی می باشد.(Lakshmikumaran, 2000). یکی دیگر از کاربردهای مطالعهٔ تنوع ژنتیکی، شناسایی ارقام و تجزیه و تحلیل های فیلوژنیک و اکولوژی است (Kumar, 1999).از این رو شناسایی ارقام به کمک نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR، در مدیریت نمونه‌های جمع‌آوری شده ژرم پلاسم، و شناسایی ارقام یکسان با اسامی متفاوت، مفید است (عبدمیشانی و بوشهری، ۱۳۷۸).

ارقام یک گونه در روش های مرسوم از طریق صفات مورفولوژیکی قابل تشخیص اند و از آنجاییکه در گیاهانی مثل سویا که ارقام از گروه های والدینی الیت مشابه ای بدست می آیند، در نتیجه یافتن تمایز مورفولوژیکی کار دشواری است (Rodrigues *et al.*, 2008). مطالعات زیادی در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی به کمک نشانگرهای مولکولی در سویا صورت گرفته است که در همه آنها مزیت استفاده از نشانگرهای مولکولی به اثبات رسیده است. RFLP اولین نشانگر مولکولی بود که از آن در گیاه سویا استفاده شد (Apuya *et al.*, 1988; Keim *et al.*, 1989). با وجود این به دلیل کمبود چند شکلی در این گیاه، نسبت به سایر گیاهان موفقیت چندانی را کسب نکرد (Tanksley *et al.*, 1989). مطالعات متعدد مبتنی

بر نشانگرRFLP نشان داده که میزان چند شکلی در سویا در حد پایینی است (Keim *et al*., 1992) که پایین بودن تنوع ژنتیکی در این گیاه را می توان به خودگشنی و همچنین محدود بودن تنوع در خزانهٔ ژنتیکی مواد اصلاحی ارتباط داد (Apuya *et al*., 1988; Morganta *et al*., 1994). علاوه برRFLP، از نشانگر های مولکولی دیگری نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی در این گیاه استفاده شده است. یکی از این نشانگر ها، نشانگر RAPD (چند شکلی طولی حاصل از تکثیر) است. کاربرد نشانگرهای RAPD سریع و آسان بوده همچنین توانایی این نشانگر برای مطالعات شناسایی و رده‌بندی و وابستگی‌های سیستمیک ساختار ژنتیک جمعیت، هیبریداسیون گونه‌ها و شناسایی اجداد به اثبات رسیده است (Fahima *et al*.,1999). در تحقیقی که بر روی ۲۱ توده سویای زراعی و ۲۷ توده وحشی سویا با کمک این نشانگر صورت گرفت. داده ها نشان داد که تنوع ژنتیکی سویای وحشی بالاتر از سویای زراعی بوده و همچنین اثبات شد که تمایز جغرافیایی نقش مهمی را در تمایز ژنتیکی گونه ها بر عهده دارد (Xu *et al*., 2003).

نشانگر RAPD برای محصولات زیادی استفاده شده است با این حال برای تجزیه ژنتیک ژنوم‌های بزرگ و پیچیده، چندان مناسب نیست (Devos and Gale.,1992). از طرف دیگر، حساسیت زیاد این نشانگر به آلودگی DNA و عدم تکرارپذیری، سبب شده است که محققان برای مطالعات دقیق‌تر و تهیه نقشه‌های ژنی چندان از آن استفاده نکنند.

برخلاف RAPD که از آغازگرهای کاملاً تصادفی استفاده می‌کند، نشانگر مبتنی برPCR دیگری در دسترس است که از آغازگرهای نیمه تصادفی استفاده می کند. آغازگرهای این نشانگر بر اساس ناحیه حد فاصل اتصال اینترون ها و اگزون ها (Intron-exon Splice Junction) یا ISJ طراحی می‌شوند و در مقایسه با روشRAPD ، دقیق تر بوده و از چند شکلی بالاتری برخوردار هستند. آغازگرهای نیمه تصادفی علاوه بر مزیت‌های فراوان نسبت به RAPD در بیان تنوع ژنتیکی بسیار مناسب تر هستند (Jaroslaw *et al*., 2002).

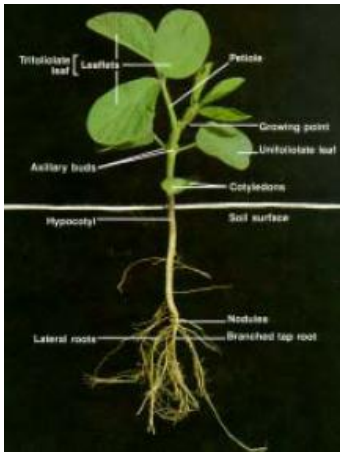
با توجه به توضیحات بالا، تنوع اساس و ماده خام اصلاح نباتات می‌باشد و لازمه اتخاذ روش‌های مناسب در جهت اصلاح و معرفی ارقام با کیفیت و عملکرد بالا، لازم است بهنژادگر شناخت و درک صحیحی از تنوع و ماهیت آن داشته باشد. با توجه به سازگاری و اهمیت گیاه سویا برای تولید روغن مورد نیاز کشور، ارزیابی و بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ های موجود ضروری است. هدف از اجرای این پژوهش آگاهی از میزان فاصله ژنتیکی بین ٤٥ ژنوتیپ سویا و میزان تنوع ژنتیکی بین آنها با استفاده از نشانگرISJ و RAPD است. در صورت آگاهی از تنوع ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های این گیاه، انتخاب والدین برای تولید ارقام هیبرید جهت بهره برداری از حداکثر هتروزیس میسر شده و در صورت تکراری بودن برخی ژنوتیپ ها می توان آنها را از ژرم پلاسم موجود حذف کرد.

فصل دوم

مرور منابع

۲-۱-خصوصیات گیاهی

سویا یکی از گیاهانی است که برای بذر یا دانه کشت می شود. این گیاه یکی از لگومینوزه های یکساله است که به صورت بوته های انبوه و نسبتا پربرگ رشد می کند. سویا گیاهی روز کوتاه است. طول دوره رشد و مقدار رشد رویشی این گیاه به رقم و طول روز بستگی زیادی دارد. سویا دارای چهار نوع برگ است. لپه ها یا برگ دانه و برگ های اولیه با دو برگ متقابل تک برگچه ای بلافاصله در بالای لپه ها تشکیل می شوند و سایر برگ ها که سه برگچه ای است در روی ساقه یا شاخه تشکیل می شود. هر برگ دارای دمبرگ بزرگی است. برگچه ها نسبتا پهن و بیضی شکل و کرکدار می باشند. از جوانه های واقع در زوایای انتهای برگ های تحتانی ساقه احتمال رشد شاخه وجود دارد. معمولا برگ های سویا همزمان با رسیدن دانه می ریزد. گل های سویا کوچک و به رنگ سفید یا بنفش کمرنگ می باشند ساقه اصلی سویا عمودی و از گره های پایین تر ساقه تعدادی شاخه کوچکتر منشعب می شود. تولید شاخه های فرعی در ارقام مختلف متفاوت است. و رشد ساقه و خواص گلدهی در دو فرم رشد محدود و رشد نا محدود بیان می شود. که گیاهان رشد نامحدود رشد رویشی و گل دادن خود را در یک زمان انجام می دهند و گیاهان رشد محدود ابتدا بیشتر رشد رویشی خود را کامل کرده و سپس گل داده و مرحله رشد زایشی را آغاز می کند. گل های سویا خود بارورند و گرده افشانی ممکن است در داخل غنچه یا قبل از بازشدن کامل گل صورت گیرد. درصد دگرگشنی در سویا کمتر از نیم درصد گزارش شده که به فعالیت حشرات بستگی دارد. گل ها پس از بارور شدن تبدیل به غلاف و دانه می گردنند. هر گل بارور شده تولید یک نیام یا غلاف می کند. در داخل غلاف معمولا دو، سه و گاهی پنج عدد دانه است. دانه ها کوچک، گرد و یا بیضوی هستند. رنگ دانه بسته به واریته ممکن است زرد، سبز، قرمز یا سیاه باشد. ریشه سویا از یک ریشه اصلی و ریشه های فرعی زیادی تشکیل یافته. روی ریشه سویا پس از تشکیل ریشه های نوین مانند سایر گیاهان لگومینوزه گرهک های به وسیله باکتری رایزوبیوم بوجود می آید که رابطه همزیستی با هم دارند. و بدین ترتیب که ریشه سویا موادی را ترشح می کند که رشد باکترهای خاک و باکتر های مذکور را تسریع کرده و در عوض باکتری نقش تثبیت ازت را برای گیاه بر عهده دارد (رستگار، ۱۳۸۵)(شکل ۲-۱).



شکل۲-۱- تصویری از گیاه سویا

۲-۲- طبقه بندی سویا

سویا، گیاهی متعلق به خانواده لگوم ها و با نام علمی *Glycine max* (L.) Merr. است. تعداد کروموزوم این گیاه 2n=2x=40 بوده و گیاهی یکساله و خود گشن است. جنس سویا دارای زیر گونه های زیادی است که یکی از آن ها، گونه زراعی سویا است. در جدول ۲-۱ رده بندی گیاهشناسی سویا ذکر شده است.

جدول ۲-۱:رده بندی سویا(Fuller rev, 2006)

سلسله	plantae
دسته	Tracheophyta
زیر دسته	Spermatophytana
رده	Angiospermopsida
زیر رده	Rosidae
راسته	Rosales
خانواده	Leguminoseae
زیر خانواده	Fabaceae
تیره	phaseoleae
جنس	Glycine
گونه	max

۲-۳- تاریخچه و منشا جغرافیایی

سویا گیاهی بومی آسیا، منطقه منچوری، چین و ژاپن است که حدود ٤٧٠٠ سال قبل در تاریخ چین به این گیاه اشاره شده است (ناصری، ١٣٦٩). گونه زراعی سویا در طبیعت یافت نشده است و به نظر می رسد که احتمالاً سویای زراعی از گیاه وحشی گلایسین بوجود آمده باشد که یک گیاه یکساله خزنده متعلق به شمال چین، کره، تایوان و ژاپن است واز لحاظ کروموزومی دیپلوئید با ٤٠ کروموزوم بوده است (Wilcox, 1985). سویا را اغلب یکی از قدیمیترین محصولات اهلی می دانند که در قرن یازدهم یعنی دیر زمانی پس از بومی شدن کنجد در خاورمیانه بومی شده است. بر اساس مدارک تاریخی، نیمه شرقی چین رابه عنوان منطقه اهلی کردن سویا می دانند. سویا از طریق چین و کشور های همسایه کره و ژاپن و جنوب شرقی آسیا و سرانجام در اطراف جهان پراکنده شده این دانه روغنی به عنوان یک محصول اهلی تا آغاز قرن بیستم که آمریکا آن را به محصول تجاری عمده تبدیل کند، اساساً در انحصار آسیا بوده است (رستگار، ١٣٨٥). در ایران از کاشت سویا در زمان های قدیم اطلاعاتی در دست نیست، فقط در گیلان و از سالیان نسبتاً دور یک رقم سویا که آن را پشم باقلا یا خرس باقلا می نامیدند، معمول بوده است (برومند، ١٣٧٧).

۲-٤- خصوصیات اکولوژیکی

چون سویا دارای نیازهای ویژۀ آب و هوایی، مدت تابش متوالی، نور و زمین است، لذا برای حصول موفقیت باید کشت و کار آن در مناطق خاصی انجام گیرد. سویا دارای تعداد زیادی ارقام مختلف است بطوریکه تنها در آمریکا بیش از ۳۰۰۰ رقم آن را از کشورهای مختلف جمع آوری و طبقه بندی کرده اند. وزارت کشاورزی آمریکا، سویا را به ده گروه : ۰۰، ۰، ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، ۷ و ۸ تقسیم بندی کرده است که گروه۰۰ در شمالی ترین نقاط دنیا از جمله کانادا کشت می شود و گروه ۸ در مناطق نزدیک استوا زراعت می شود. در ایران، بسته به نواحی و شرایط آب و هوایی گروه های ۳، ٤، ٥ و ٦ شانس موفقیت بیشتری دارند.

۲-٥- ترکیب شیمیایی و ارزش غذایی یا موارد استفاده سویا

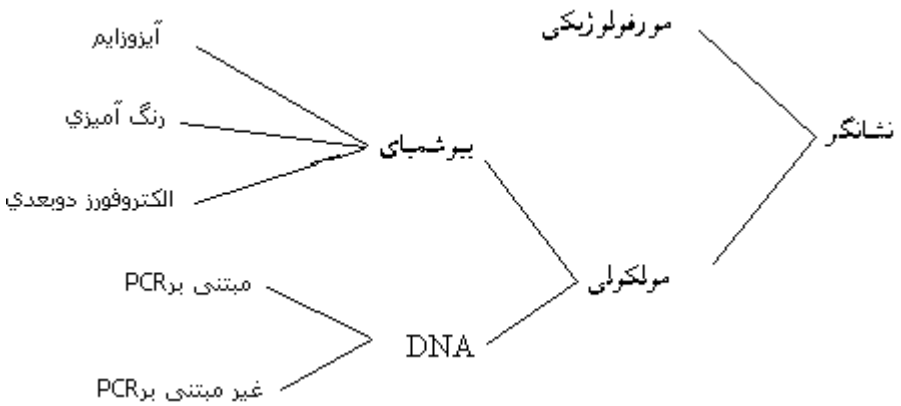
هدف اصلی از کشت سویا را در مرحله اول، تولید دانه و تهیه روغن است. با این حال میزان روغن در دانه سویا یک ویژگی مربوط به واریته و تا حدودی تحت تاثیر محیط و آب و هوا ی منطقه کاشت بوده و معمولا بین ١٦ تا ٢٤ درصد متغییر است. روغن سویا حاوی حدوداً ۱۰ درصد اسید لینولنیک، ٥٥ درصد اسید اولئیک و۳۰ درصد اسید لینولئیک است. بالا بودن نسبی اسید لینولنیک باعث ایجاد طعم بد و بی ثباتی طعم در روغن سویا می شود. همچنین این دانه قابل هضم و دارای کلسیم، آهن و ویتامین های بالایی می باشد. میزان پروتئین در سویا که از ارزش فوق العاده ای برخوردار است، بین ٤٠ تا ٥٠ درصد است . البته بین میزان پروتئین و روغن در سویا، یک رابطه معکوس وجود دارد. روغن های خوراکی و کنجاله های حاوی پروتئین که محصول فرایند روغن کشی است، بخش مهمی از غذای روزانه انسان و دام را تشکیل می دهد. و علاوه بر آن، این روغن ها حتی مصارف دارویی، صنعتی گوناگونی و مهمی دارند و یکی از صادرات با ارزش در اکثر کشور های جهان محسوب می شوند. از گیاه سویا همچنین به عنوان مراتع، علوفه خشک، سیلو، کود سبز و یا علوفه تازه استفاده می شود. به طور کلی جدا از از روغن و پروتئین که منبع عظیمی از مجموعه فراورده های غذایی-صنعتی است، بیش از ١٦٣ نوع فراورده اصلی را با تنوع بسیار می توان از دانه سویا استخراج نمود. در تغذیه انسان به صورت مارگارین، روغن طباخی، مایونز، سس سالاد، آرد سویا، کنستانتره سویا، شیرینی، شکلات، شیر گیاهی، انواع غذای صبحانه، لوبیای سرخ کرده، گوشت مصنوعی و در صنعت برای صابون سازی، تهیه سلونوئید، پلاستیک، جوهر چاپ، رنگ مشمع، شمع، گلیسیرین، انواع چسب ها، روغن جلا، لعاب پلاستیک، حشره کش ها، مواد نرم کننده و مرطوب کننده مورد استفاده قرار می گیرد (رستگار، ۱۳۸٥).

۲-٦- انتخاب به کمک نشانگر

اصلاح نباتات یعنی انتخاب افراد برتر، از درون یک جامعه متنوع گیاهی است. انتخاب بر مبنای نشانگر[1] فرایندی که به موجب آن از یک نشانگر (مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و یا تغییرات DNA/RNA) به عنوان عامل انتخاب برای انتخاب صفات مهم، از قبیل مقاومت به بیماری، کیفیت تولید، تحمل به استرس های زنده و... استفاده می شود. به عبارت دیگر انتخاب بر مبنای نشانگر فرایند انتخاب غیر مستقیم یک صفت است (Ribaut *et al*., 1998). به عبارت دیگر، چون انتخاب و یا تظاهر فنوتیپی برخی صفات کمی به گونه ای نیست که بتوان مبادرت به انتخاب آنها کرد (وراثت پذیری پائین)، لذا از نشانگرهایی استفاده می شود که با ژن های کنترل کننده آنها پیوستگی دارند (Anonymous, 2010).

فنوتیپ هر گیاه توسط ترکیبی از عوامل ژنتیکی و محیطی تعیین می گردد. چون انتخاب و اصلاح ارقام گیاهی برای صفات کمی، همواره با مشکلاتی رو به رو بوده است، متخصصین اصلاح نباتات از مدت های طولانی، در پی یافتن نشانگرهای ژنتیکی بوده اند که با صفات مورد نظر لینکاژ داشته باشند. بطوریکه آنها به عنوان معیار غیر مستقیمی در انتخاب ارقام استفاده نمایند. برای آنکه بتوان از یک صفت به عنوان نشانگر ژنتیکی استفاده کرد، نشانگر باید حداقل از دو خصوصیت چندشکلی و توارث برخوردار باشد. بطور کلی نشانگری در اصلاح نباتات مفید است که لینکاژ نزدیکی با ژن های کنترل کننده صفت مورد نظر داشته باشد، توارث پذیری آن بالا بوده و بکارگیری آن نیز آسان باشد (وجدانی، ۱۳۷۵؛ فصیحی هرندی و همکاران، ۱۳۷٦؛ Paterson *et al*., 1991).

جدول ۲-۲ طبقه بندی نشانگرها(نقوی وهمکاران، ۱۳۸٦)



۲-٦-۱ نشانگر مورفولوژیکی

اولین نشانگر های ژنتیکی همان صفات کیفی مندلی بودند که توسط مشاهده عینی رتبه بندی می شوند. این نشانگرها را نشانگرهای ظاهری یا مورفولوژیک می نامند. به عبارت دیگر به تغییرات ظاهری قابل رؤیت در موفولوژی موجودات زنده را که در نتیجه جهش به وجود می آید نشانگرهای مورفولوژیکی می گویند. که

[1]-Marker Assisted Selection (MAS)

یا در طبیعت یافت می شوند ویا در نتیجه آزمایشات جهش زایی بدست می آیند. این نشانگرها به صورت عینی قابل رتبه دهی هستند و معمولا دارای توارث غالب می باشند. اگرچه نشانگرهای مورفولوژیکی به طور سنتی در علوم زیستی مورد استفاده قرار گرفته اند، ولی دارای محدودیت هایی هستند. به دلیل اثرات اپیستازی و پلیوتروپی، و اینکه به شدت تحت تاثیر محیط و مرحله رشد موجود هستند برای برنامه های اصلاحی نامطلوب می باشند و همچنین فراوانی و تنوع کمی دارند و گاهی برای مشاهده و ثبت آن باید منتظر ظهور آن ها ماند و اساس ژنتیکی بسیاری از آنها هنوز روشن نشده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦؛ فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲).

۲-٦-۲ نشانگرهای بیوشیمیایی و یا پروتئینی

نشانگرهای بیوشیمیایی، پروتئین های هستند که در نتیجه بیان ژن می باشند این پروتئین ها از طریق الکتروفورز و رنگ آمیزی قابل جداسازی و تشخیص هستند. انواع مختلفی از این نشانگرها مانند پروتئین های ذخیره ای و آیزوزایم ها یا پروتئین های آنزیمی وجود دارد. معمول ترین نوع این نشانگرها آیزوزایم ها هستند که فرم های مختلف یک آنزیم را نشان می دهند. در دهه ۱۹۵۰، آیزوزایم ها به طور موفقیت آمیزی به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی در مطالعات ژنتیک و اصلاح گیاهان، به کار رفته اند و تا اواخر ۱۹۷۰ نقشه های ژنتیکی تلفیقی(آیزوزایم و نشانگرهای مورفولوژیکی) بسیاری از گونه های مهم تهیه شده (نقوی و همکاران ۱۳۸٦؛ فارسی و ذوالعلی ، ۱۳۸۲).

نشانگرهای بیوشیمیایی تغییرات را در سطح ردیف و عمل ژن به صورت نشانگری همبارز نشان می دهند. از معایب این نشانگرها محدود بودن آنها است. همچنین تحت تاثیر تغییرات پس از ترجمه قرار می گیرند و تظاهر کمی برخی از آنزیم ها و پروتئین ها تحت تاثیر مرحله رشد گیاه قرار می گیرد. از آنجاییکه روش های رنگ آمیزی پروتئین ها در مورد آیزوزایم ها چندان زیاد نیست، درنتیجه تعداد آیزوزایم های قابل ثبت و مشاهده به صد عدد هم نمی رسد از طرفی آیزوزایم ها نه تنها کم هستند بلکه چندشکلی آنها چندان زیاد نیست (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦)

۲-٦-۳- نشانگرهای مولکولی در سطح DNA

یک نشانگر مولکولی، توالی خاصی از DNA است که به راحتی آشکار می شود و توارث پذیری آن به سادگی قابل رؤیت است. استفاده از نشانگرهای مولکولی، مبتنی بر چندشکلی طبیعی می باشد (نقوی و هکاران، ۱۳۸٦). گسترش نشانگرهای DNA موجب به کارگیری روش های بسیاری برای غلبه بر مشکلات اصلاحی و ژنتیکی موجودات شده است. در واقع کشف انواع مختلف آنزیم های محدودگر توسط اسمیت ویلکوکس (۱۹۷۷) همچنین کشف واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) توسط مولیس و فالونا (۱۹۸۷)

فرصت مناسبی را برای بررسی تنوع موجودات مختلف در سطح DNA امکان پذیر کرده است. نشانگرهای ژنتیکی ارزش زیادی را در برنامه های اصلاح و تحقیقات ژنتیکی دارند. تاکنون تعداد زیادی از نشانگرهای DNA معرفی شده اند و در تجزیه های ژنتیک موجودات مورد استفاده قرار گرفته اند، این نشانگرها از نظر بسیاری از ویژگی ها مانند درجه چندشکلی، غالب یا همبارز، تعداد جایگاه های تجزیه شده در هر آزمایش، توزیع در سطح کروموزوم، تکرار پذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی یابی DNA الگو و هزینهٔ مورد نیاز با همدیگر متفاوت اند. انتخاب بهترین نشانگر به هدف مطالعه و سطح پلوئیدی موجود مورد مطالعه بستگی دارد (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦).

روش های مختلفی برای طبقه بندی نشانگرهای مولکولی DNA وجود دارد اما متداول ترین آن ها بر مبنای کاربرد یا عدم کاربرد روش PCR می باشد که بر این اساس نشانگرهای DNA را به دو گروه تقسیم بندی کرده اند

۱. نشانگرهای DNA غیر مبتی بر PCR
۲. نشانگرهای DNA مبتی بر PCR

۲-٦-۳-۱- نشانگرهای DNA غیر مبتی بر PCR

این دسته از نشانگرهای DNA نیازی به واکنش زنجیره ای پلیمراز ندارند. یکی از مهمترین این دسته از نشانگرها، RFLP[1] است. و انواع دیگر این نشانگرها RLGs[2] و ماهوارک ها می باشد(فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲).

نشانگر RFLP چند شکلی طولی حاصل از تقسیم، اولین تکنولوژی بود که چند شکلی را در سطح توالی های DNA مشخص نمود. ابتدا DNA را توسط یک آنزیم برشی (آنزیم های بسیار اختصاصی که ردیف های ویژه ای را روی مولکول DNA شناسایی کرده و آنها را از محل خاصی قطع می کند) برش می دهند (Botstein *et al*., 1980). این نوع نشانگر قطعاتی ایجاد می کند که تعداد و اندازه آنها می تواند میان جمعیت ها، دسته ها و گونه ها متفاوت باشد. در این روش قطعات حاصل از برش الکتروفورز و لکه گذاری بر روی یک غشا انجام می شود با استفاده از ژل آگارز از هم جدا شده و به غشای نایلونی یا نیتروسلولزی منتقل می شوند و با کاوشگرهای خاصی که نشاندار هستند، دورگ می گردد. سیستم آللی از تفاوت طول قطعات حاصل از هضم که کاوشگرهای مذکور به آن ها متصل می شوند شناخته می شود.. از RFLPبه طورگسترده ای برای تجزیه های ژنتیکی در اصلاح گیاهان استفاده شده است (Tanksly *et al*., 1989) که جهت ترسیم نقشه ای ژنتیکی و جستجو ژن ها در QTLs[3] به کار برده شده، و به دنبال کاربرد

[1] Restriction Fragment Lenghth Polymorphism (RFLP)
[2] Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGs)
[3] Quantitative Trait Locus (QTL)

این نشانگر در برنامه های اصلاحی منجر به ادغام و بهبود روش های ژنتیکی جدید یا روش های قبلی خود شده (landry *et al*., 1991).

RFLP یک نشانگر همبارز است و از آنجا که اندازه قطعات تولید شده توسط آن معمولا بزرگ است، رتبه دهی آن آسان می باشد. با وجود تکرارپذیری بالا، RFLP روشی دشوار و پیچیده با چند شکلی پایین است و تهیه کاوشگر، هزینه و زمان زیادی لازم دارد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲).

۲-٦-۳-۲- نشانگرهای DNA مبتی بر PCR

ابداع و معرفی واکنش زنجیره ای پلیمراز، بیشترین نقش را در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA داشته است. نشانگرهای مبتی بر PCR، نشانگر هایی هستند که با بهره گیری از واکنش زنجیره ای پلیمراز نیاز به کاوشگر و در نتیجه دورگ گیری ندارند. این گروه از نشانگرها از توالی های الیگونکلئوتیدی به عنوان آغازگر برای تکثیر قطعات خاصی از DNA استفاده می کند (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦). از جمله این نشانگرها می توان به RAPD[1] (Williams *et al*., 1990)، SSR[2] (Rafalski and Tingey, 1993)، AFLP[3](Vos *et al*., 1995) ، ISJ[4] (Weining and Langridge., 1991) و ... اشاره کرد.

AFLP (چند شکلی طولی حاصل از تکثیر) با استفاده از این روش تعداد زیادی از قطعه های حاصل از هضم، تکثیر و قابل رؤیت می شوند. اما بزرگترین محدودیت این روش طراحی و ساخت آغازگرها است که به اطلاعاتی اولیه ای در زمینه ردیف بازی قطعه موردنظر دارد. متاسفانه برای بیشتر گیاهان زراعی ردیف بازی بسیاری از ژنوم در دسترس نیست (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦).

RAPD (چند شکلی طولی حاصل از تکثیر) است. نشانگرهای RAPD متداول ترین و پرکاربردترین نشانگر مبتنی برPCR می باشد. و به عنوان یک نشانگر سریع و آسان بوده و از آن برای بررسی تنوع ژنتیکی سویا استفاده شده است (Ahmad *et al*., 2007). توانایی این نشانگر برای مطالعات شناسایی و رده‌بندی و وابستگی‌های سیستمیک ساختار ژنتیک جمعیت، هیبریداسیون گونه‌ها و شناسایی اجداد به اثبات رسیده است (Fahima *et al*.,1999). همچنین از این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان زیادی استفاده شده است، با این حال برای تجزیه ژنتیکی ژنوم‌های بزرگ و پیچیده، مانند غلات، چندان مناسب نیست (Devos and Gale.,1992; Gawel, 2002). بزرگترین عیب این نشانگر تکرارپذیری کم نتایج تکثیر از آن است که آن را بیشتر در معرض انتقاد قرار داده است (Vekemans and Jacquemart, 1997; Perez *et al*., 1998). از طرف دیگر، حساسیت زیاد این نشانگر به آلودگی DNA، سبب شده است که محققان برای مطالعات دقیق‌تر و تهیه نقشه‌های ژنی چندان از آن استفاده نکنند.

---

[1] Random Amplyfied Polymorphic DNA (RAPD)
[2] Simple Sequence Repeat (SSR)
[3] Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)
[4] Intron-exon Splice Junction (ISJ)