جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

استفاده از روش RAPD به عنوان مارکر دی.ان.اِ برای تشخیص چند شکلی در ارقام جو ایرانی

بابک بهنام، بهمن یزدی صمدی، سیروس عبدمیشانی، علیرضا طالعی و علی‌اکبر شاه‌نجات‌بوشهری

بترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادان، دانشیار و مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۸/۵

خلاصه

تنوع ژنتیکی در خلال ۲۰ رقم جوی ایرانی با استفاده از نشانگرهای RAPD بررسی شد و ۹۵۰ باند پلی‌مورفیک با استفاده از ۳۳ پرایمر تکی (۱۰ بازی) تولید شد. تکثیر حاصله باعث ایجاد باندهایی در محدوده اندازه‌های بین ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز شد و فقط باندهایی که دارای وضوح کامل و منطقی بودند برای تشکیل ماتریس جفتی بر اساس حضور یا عدم حضور باند رتبه بندی شدند. ماتریس حاصله. برای محاسبه و تشکیل ماتریس فاصله بر مبنای ضریب تشابه نی بکار رفت. فرآوردهای تکثیری به ازاء هر پرایمر بعنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شد. رسم دندوگرام، فواصل ژنتیکی ارقام، بوسیله تجزیه خوشه‌ای انجام شد. ارقام در شش گروه دسته‌بندی شدند. تجزیه مربع کای نیز نشان داد که ارقام و پرایمرها از لحاظ باندهی با هم متفاوتند. تولید باندهای پلی‌مورفیک در میان ارقام جو موفقیت‌آمیز بود و نشان داد که مارکرهای RAPD برای مطالعه پلی‌مورفیسم ژنتیکی در جو مناسبند.

واژه‌های کلیدی: جوایرانی،تنوع ژنتیکی،نشانگر RAPD،ماتریس فاصله،ضریب تشابه نی،باندهای پلی مورفیک

مقدمه

هوردئوم، یکی از جنس‌های بسیار گسترده و وسیع قبیلهٔ گندمیان است. ۴۵ گونه و زیرگونه، که اغلب آنها جزو علف‌های هرز یکساله یا چند ساله هستند، در مناطق گرم هر دو نیمکرهٔ شمالی و جنوبی پیدا شده است. جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.)، منشاء آن از ناحیهٔ هلالی شکل حاصلخیز جنوب غربی آسیا (Fertile cresent)، بین النهرین،است(۶). تمامی گونه‌ها دارای تعداد مساوی کروموزوم پایه (n=x=7) در سطوح مختلف پلوئیدی هستند. (۵). بررسی خویشاوندی ژنتیکی در میان گونه‌هاو زیرگونه‌های هوردئوم هنوز موضوع مورد بحث است (۴،۵ و ۱۴). از روش‌های مختلفی جهت طبقه بندی این زیرگونه‌ها استفاده شده است از آن جمله شامل:توزیع جغرافیایی مورفولوژیکی (۴)، استفاده از آیزوزایم (۱۰،۱۷ و ۱۸)، وبررسی‌های سیتولوژیکی (۲۷). اما نتایج این طبقه‌بندی‌ها همیشه در راستای هم نبوده و بعضی اوقات متضاد هم هستند. امروزه استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی به دلایل زیر متداول نیست: ۱ ـ محدودیت تعداد نشانگرها. ۲ ـ وجود اثر غالبیت واپیستازی، ۳ ـ نشان دادن اثر پلیوتروپی ۴ ـ تغییرات در نفوذ ژن و ۵ ـ نشانگرهای مورفولوژیکی ممکن است یک فنوتیپ تغییر یافته‌ای راکه با نیازهای زارع منطبق نیست ایجاد نماید.

نشانگرهای آیزوزایم و پروتئین نیز به دلایل متعدد برای تشخیص چند شکلی در داخل و بین ارقام اهلی کارایی لازم را نداشته

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

و تعداد محدودی باند تولید می‌نمایند. بعبارتی کمبود مکانهای ژنی آیزو زایمی و این واقعیت که آن‌ها تحت تغییرات پس از ترجمه قرار می‌گیرند، استفاده از آن ها را محدودتر کرده‌است . از طرفی نشانگرهای RFLP[1] که مبتنی بر چند شکلی طولی قطعات برش یافته حاصل از آنزیمهای برشی DNA است، به علت پرهزینه بودن، طولانی بودن تجزیه و تحلیل آنها از لحاظ زمانی و استفاده از مواد پرخطر رادیواکتیو و عدم تشخیص ارقام نزدیک به هم، کاربرد وسیع آنها را، برای این منظور، محدود کرده است (۳۰). نهایتاً نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA معرفی گردیدند که چند شکلی وسیعی را در سطح DNA نشان داد و یک روش مطلوب برای تشخیص گونه‌های خویشاوند نزدیک به هم نیز محسوب می شود(۲۵).

با پیدایش تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، (PCR)، تکنیک‌های مولکولی مطلوب و جدیدی مبتنی بر آن گسترش یافت که از جمله آنها: تکثیر قطعات تصادفی DNA یا RAPD می‌باشد (۳۳). این تکنیک جدید فرم تغییر یافته‌ای از PCR است، بطوریکه در آن توالی‌های DNAی ژنوم بوسیلهٔ آغازگرهای کوتاه و اختیاری (۱۱ - ۱۰ نوکلئوتیدی)، تکثیر می‌شود. نشانگرهای RAPD دارای مزایای زیر می باشند : ۱ ـ نامحدود بودن تعداد نشانگرها، ۲ ـ عدم استفاده از مواد رادیواکتیو، ۳ ـ عدم وجود اثر پلیوتروپی، ۴ ـ این نشانگرها قادر به تشخیص بین ارقام نزدیک به هم هستند، ۵ ـ آسان و سریع بودن تجزیه و تحلیل، ۶ ـ اقتصادی‌تر بودن نسبت به RFLP، ۷ ـ احتیاج به میزان کم DNA و ۸ ـ تولید بیش از یک باند نشانگر در هر واکنش است (۱۱).البته این نشانگرها دارای معایبی نظیر غالب بودن و اشکال در تکرارپذیری می‌باشند ولی به واسطه مزایای تکنیکی، نشانگرهای RAPD بطور وسیعی در ژنتیک جمعیت‌ها، تجزیهٔ تنوع زیستی و مطالعات و بررسی خویشاوندی درمیان گونه‌ها در سطوح مختلف بکار رفته است (۱۱،۱۵ و ۳۱). درجنس هوردئوم در یک بررسی از ۱۹ گونه وحشی و زیر گونه‌های آن با استفاده از نشانگرهای RAPD انجام شد که فنوگرامی را نتیجه داد که طبقه بندی‌های قبلی را تایید می‌کرد (۱۳).

روابط فیلوژنتیکی در میان ۳۹ گونه و ۶ زیر گونهٔ جوهای وحشی و جوهای زراعی با استفاده از نشانگرهای RAPD به عنوان کاراکترهای تشخیصی مورد بررسی قرار گرفت. ۷۶ قطعهٔ رپید با استفاده از ۱۲ آغازگر ده‌تایی با توالی نوکلئوتیدی اختیاری تولید شد، که در محدودهٔ اندازه ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت بازی بودند. باندهایی که به طور کامل مشخص و واضح بودند، برای حضور و عدم حضور، در یک ماتریس جفتی[2] رتبه بندی شدند. نتایج نشان می‌دهند که تکنولوژی RAPD یک وسیلهٔ مطمئن و مفید برای تعیین چند شکلی برای مطالعات ژنتیکی می‌باشد.

نشانگر RAPD در ۲۷ اینبردلاین جو بهاره با تفاوت داشتن در اجداد مشترک و در ۲۰لاین دابلد هاپلوئید[3] تلاقی دو والدی، بررسی شده است (۳۲). از ۳۳ آغازگر ۱۰ بازی مورد آزمایش، ۱۹ آغازگر با ۳۱ باند چند شکلی[4]، تشخیص داده شد. تمامی باندهای چند شکلی ، به عنوان نشانگر ژنتیکی غالب رتبه‌بندی شدند، بجز یکی که در آن تجزیه‌های ساترن بلاتینگ دلالت بر حضور ۲ باند تکثیر هم‌بارز داشت وبه این ترتیب از روی نشانگرهای RAPD، اطلاعات سودمندی را به دست آمد که در رابطه با تشابه ژنتیکی و یا فاصلهٔ ژنتیکی مورد استفاده واقع شد. در حالیکه از روی اطلاعات شجره‌ای (مورفولوژیکی) نمی‌توان بدان پی‌برد.تکنیک RAPD برای فراهم ساختن نشانگرهای ژنتیکی مطمئن در جو مورد استفاده قرار گرفته است. در یک مطالعهٔ لینکاژی با ۲۳ باند RAPD، ۲۸ باند RFLP و ۲۹ مکان ژنی برروی ۷۲ کروموزوم دوبل شده لاین‌های نتاج هاپلوئید حاصل از تلاقی جو،انجام شد. نقشهٔ لینکاژی حاصله، ۶۸۰ سانتی‌مورگان را تحت پوشش قرار داد که حدود نصف ژنوم بود (۲۹). نشانگرهای RAPD به نظر می‌رسند که قابلیت اطمینان بیشتری در طی تهیه نقشه‌های ژنتیکی نسبت به RFLP در جو داشته‌اند.

در جنس هوردئوم در طی یک بررسی از ۱۹ گونهٔ وحشی و زیر گونه‌های آن‌ها با استفاده از نشانگرهای RAPD انجام شد و یک فنوگرام را که تقسیم‌بندی‌های قبلی را تایید می‌کرد، نتیجه داد . همچنین مطالعه‌ای برای تعیین قابلیت نشانگر RAPD، برای ترسیم مجدد و بازسازی فیلوژنی هوردئوم بوسیله مقایسه نتایج دندوگرامی حاصل از RAPD و مطالعات قبلی انجام شده است (۲۳).

البته از نشانگرهای RAPD برای بررسی همبستگی آن‌ها با

1 - Restriction Fragment Length ploymorphism (RFLP)
2 - Binary Matrix
3 - Doubled Haploid (DH)
4- Polymorphic Band

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بیماریهایی نظیر زنگ سیاه، تحقیقاتی انجام شده است. سهولت تجزیه BSA[1] در تشخیص نشانگرهای مولکولی برای ژن‌های مقاومت‌به‌زنگ سیاه‌رادریولاف‌برای ژن Pc68، با استفاده از آغازگر های‌تصادفی‌بکمک تکنولوژی PCR مشخص شده‌است(۲۸).

در تحقیق حاضر علاوه بر اینکه سعی شد تکنیک PCR و نشانگر مولکولی RAPD که مبتنی بر PCR است در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، راه‌اندازی شود، هدف دیگری نیز دنبال شد که عبارتست از بررسی تنوع ژنتیکی و یا چند شکلی ژنتیکی در میان کولیتوارهای جو زراعی که کشت و کار آن‌ها در ایران رایج بوده می‌باشد و نهایتاً تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها جهت گروه بندی ارقام به روش آماری چند متغیر بوده است. این نتایج جزو اولین تحقیقات در رابطه کاربرد نشانگرهای مبتنی بر PCR در گیاهان و بویژه در غلات در دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران است.این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تهران، واقع در کرج از شهریور ۱۳۷۴ تا اسفند ۱۳۷۵ انجام شد که شامل راه‌اندازی تکنیک PCR وانجام تحقیق اصلی ونتیجهٔ آن بیش از ۸۰ ژل پلی آکریل آمیدبرروی‌ارقام‌جوبا ۴۰ آغازگر و الکتروفورز حدود ۱۰۰۰ نمونه که توسط PCR تکثیر شده بودند، می‌باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی :

جدول ۱ لیست اسامی ۲۰ رقم از کولیتوارهای جو زاعی مورد استفاده قرار گرفته است را نشان می‌دهد:

استخراج DNAی ژنومی

DNAی ژنومی با وزن مولکولی بالا از ۰/۵-۰/۳ گرم بافت تازه برگی که ۱۰ روز از تاریخ کاشت آن گذشته بود طبق دستورالعمل مینی‌پرپ[2] توسط Dellapaorta (1983) ، انجام گرفت(۹). کیفیت و کمیت DNAی ژنومی از طریق اسپکتروفتومتری (جذب نور)[3] با استفاده از دستگاه اسپکترو فتومتر انجام شد. به این ترتیب که سه طول موج جذب نور به ترتیب بر طول‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد، سپس از نسبت ۲۸۰/۲۶۰ برای بررسی کیفیت DNA استفاده شد، در صورتیکه این نسبت بین ۱/۸ و ۲ باشد از کیفیت خوبی برای PCR برخوردار بوده است و از اعداد مربوط به طول موج‌های ۲۶۰ و ۳۲۰ جهت محاسبه میزان کمی DNA استفاده شد. و به این ترتیب محلول‌های پایه‌ای[4] که نسبت در آنها بین ۲-۱/۸ بود، انتخاب شدند سپس محلول کاری[5] با DNAی به غلظت ۵ نانوگرم در میکرولیتر تهیه می‌شد و از این غلظت DNA در آزمایشات استفاده گردید.

آغازگر[6]

تعداد ۴۰ آغازگر از دسته اول[7] آغازگرهای دانشگاه بریتیش‌کلمبیا کانادا[8] مورد استفاده قرار گرفت که در این میان فقط از ۳۳ آغازگر، جهت بررسی چند شکلی مورد استفاده قرار گرفت. جدول ۲ لیست آغازگرها و توالی مربوطه و تعداد باندهای چندشکلی راکه تولید نموده‌اند نشان می‌دهد.

PCR و شرایط الکتروفورزی ژل پلی آکریل آمید

روشی که برای PCR بکار برده شد، روشی بود که توسط Hue et al, 1990 شرح داده شده و مبنای آن همان روش Williams et al است (۱۶ و ۳۳). تمامی مواد بکار برده شده در PCR به جز DNA و آب مورد استفاده، شرکتی بوده و به صورت تیوب‌های آماده تجاری و محلول بودند(از شرکت های Promega, Gibco, Operon, UBC). تمامی وسایل و تیوب‌های به‌کار رفته تازه و استریل بودند. مقدار DNAی بکار رفته ۵ نانوگرم در میکرولیتر بود که نهایتاً ۵ میکرولیتر از این محلول را به مخلوط واکنش اضافه کردیم(۲۵ نانوگرم). حجم نهایی هر محلول واکنش تکثیر ۲۵ میکرولیتر بوده که این مخلوط شامل (به ازای یک نمونه):

۱) بافر ۱۰x، ۲) منیزیوم کلراید با غلظت ۱/۹ میلی مول، ۳) dNTP به غلظت ۱/۲۵ میلی‌مول از هر کدام، ۴) آغازگر ۱۰نوکلئوتیدی به غلظت ۰/۲ میکرو مول، ۵) ۲۵ نانوگرم DNAی ژنومی ، ۶) ۱-۰/۸ واحد آنزیم تگ و۷) آب دوبار

1 - Bulk Segregant Analysis (BSA) 2 - Miniprep 3 - Absorbanse 4 - Stock Solution 5 - Working Solution

۷ - منظور از دسته اول این است که پرایمرهای شرکت UBC شامل ۴ دسته است بنامهای دسته اول تا چهارم و هر دسته شامل ۱۰۰ پرایمر است دسته اول از ۱ تا ۱۰۰ . دسته دوم از ۲۰۰ تا ۲۹۹ و الی آخر

6 - Primer 8 - University of British Colombia(UBC)

تقطیر به میزان ۱۲/۹ میکرولیتر بود. البته قبل از تکثیر به هر تیوب واکنش حدود ۴۰ میکرولیتر روغن معدنی برروی مخلوط جهت جلوگیری از تبخیر اضافه شد. مخلوط های واکنش آماده شده برای تکثیر به دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Phramacia، برای ۴۵ دور طبق برنامه زیر انجام شد:

قسمت اول: ۹۳°C به مدت ۲ دقیقه، جهت واسرشت شدن[1] ؛ قسمت دوم: ۴۵ مرتبه شامل (۹۲°C به مدت ۲ دقیقه، ۳۵°C به مدت ۱ دقیقه برای اتصال آغازگر[2] ؛ ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه برای بسط[3]) ؛ قسمت سوم: ۳۵°C به مدت ۱ دقیقه برای تکمیل اتصال و ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه برای تکمیل بسط.

نمونه‌ها پس از تکثیر بلافاصله به دمای ۴°C یخچال منتقل تا در طی چند ساعت آینده، الکتروفورز آن انجام شود، ولی اگر می‌خواستیم بعد از چند روز الکتروفورز را انجام دهیم بهتر بود در دمای ۲۰°C- نگهداری شوند. قبل از الکتروفورز به هر تیوب ۵ میکرولیتر لودینگ بافر[4] شامل Bromophenol blue، و Xylene cyanol 0.25 %2 و Sucrose 40% ، اضافه می‌شد.

برای انجام الکتروفورز، از الکتروفورز ژل عمودی، پلی‌آکریل آمید با غلظت ٦ درصد که شامل ۱۵ چاهک بود استفاده شد. علت استفاده از ژل پلی آکریل آمید این بود که وضوح باندها بسیار بالا بود و جهت امتیازدهی باندها مناسب و راحت‌تر بود. با توجه به اینکه تعداد ارقام مورد آزمایش ۲۰ عدد بود، هر بار ۱۴ رقم مربوط به یک آغازگر در یک ژل (همیشه چاهک پانزدهم را برای نشانگر استفاده می‌شد) و ٦ رقم باقیمانده همان آغازگر، به همراه همان نوع نشانگر در ژل ٦٪ دیگر بارگیری[5] و اجرا[6] می‌شد، که برای الکتروفورز از ولتاژ ثابت ۲۰۰ ولت به مدت ۲/۵ ساعت استفاده شد. نشانگر مورد استفاده Lambda Ladder بود.رنگ آمیزی با استفاده از اتیدیوم بروماید به غلظت ۱-۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت نیم ساعت انجام شد، ژل‌ها سپس با آب معمولی شستشو و زیر نور UV به کمک دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده و نهایتاً عکس برداری سیاه و سفید با دوربین Zenit مدل ۱۲۲، دیافراگم ۲/۸، سرعتB و مدت زمان ۱۲-۱۰ ثانیه، انجام شد (شکل ۱ و ۲).

تجزیه آماری داده‌ها

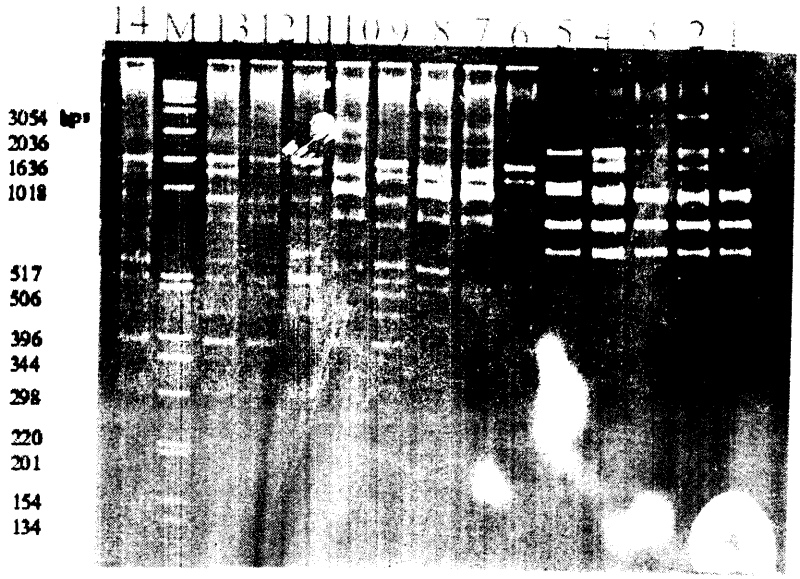
چون هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی در میان ارقام است و ما می‌خواهیم بدانیم که ارقام درچه دسته‌هایی قرار می‌گیرند و چقدر با هم متفاوتند و از طرفی داده‌های ما کیفی است و به نحوی باید آن‌ها را تبدیل به کمی نمائیم، که در مورد داده‌های بدست آمدهٔ ما همان باندهای چند شکل و یک شکل قطعات DNAی تکثیر شده ارقام بود. پس تبدیل مناسب همان تبدیل به حضور یا عدم حضور باندهای مختلف در ارقام است و در واقع دسته بندی می‌کنیم، بطوریکه حضور باند را یک و عدم حضور را صفر می‌دهیم (۲).

ماتریس حاصله دارای ۲۰ سطر و ۹۳۴ ستون بود. که سطور شامل ارقام و ستون ها، باندهای پلی‌مورفیک حاصل از هر آغازگر بود. حال قبل از اینکه گروه بندی را توسط تجزیهٔ خوشه‌ای انجام دهیم، نخست تجزیهٔ مربع کای بر روی جدول توافقی حاصل از آغازگر و رقم در سطح یک درصد و پنج درصد انجام دادیم. هدف از تجزیهٔ مربع کای این بود که می‌خواستیم بدانیم اولاً بین ارقام در سطح یک و پنج درصد از لحاظ باندهی تفاوت موجود است یا خیر، ثانیاً بین آغازگرها در سطح یک و پنج درصد از لحاظ باندهی تفاوت هست یا خیر، ثالثاً اثر متقابل آغازگر و رقم را در سطح یک و پنج درصد مقایسه کنیم. البته نمودار توزیع فراوانی باندی به ازای آغازگرهای مختلف در دستجات مختلف باندی بر اساس کلیه ارقام، تقریباً این تفاوت را نشان می‌داد ولی تجزیه‌مربع کای یک صحهٔ آماری بر این قضیه بود.برای تجزیهٔ خوشه‌ای در اینجا از ضریب تشابه نی(۲٦)، استفاده شد که عبارتست از $I=\frac{2N}{N_1+N_2}$ که در آن N تعداد باندهای مشترک و(N_1 + N_2) عبارت است از مجموع کلیه باندهای پلی‌مورفیک مربوط به ارقام. ماتریس فاصله با توجه به فرمول زیر تشکیل شد:(جدول ۳ و ۴).

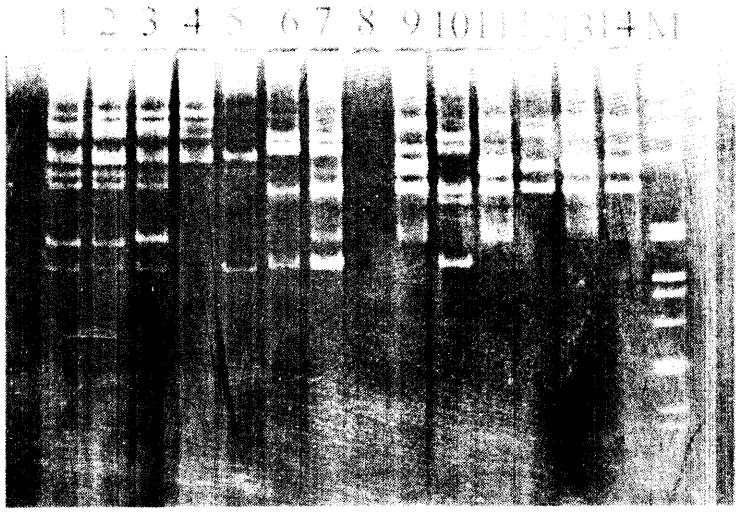
ضریب تشابه نی = I و فاصله ژنتیکی[7] $GD= GD= -Ln(I)$

علت استفاده از این فرمول‌ها به این دلیل است که فرمول مستقل از باندهایی است که در هر دو وجود ندارد و این خود یکی از مزایای این فرمول است. از طرفی تحت تاثیر کدبندی هم نیست (۲).ماتریس فاصلهٔ حاصل را که (۲۰×۲۰) بود به محیط SPSS برده و به روش Average تجزیهٔ مربوطه ترسیم شد. لازم به یادآوری است که

1 - Denaturation 2 - Annealing 3 - Extention 4 - Loading Buffers 5 - Loading
6 - Running 7 - Genetic Distance



شکل ۱ - پروفیل باندی ، قطعات DNAی تکثیر شده بر اساس پرایمر UB81 ، ۱۴ رقم جو زراعی بر روی ژل پلی آکریل آمید ۶٪، ۱:رقم ریحان ، ۲: ریحان ، ۳: B6 ، ۴: زرجو ، ۵:استار (ماکوئی)، ۶:والفجر، ۷:گرگان ، ۸: ظفر، ۹: سینا، ۱۰:ویکتوریا، ۱۱:کاپری ، ۱۲:گوهرجو، ۱۳: ارم،M:مارکر λ1kb Ladder و ۱۴:افغانستان.



شکل ۲ - پروفیل باندی ، قطعات DNAی تکثیر شده بر اساس پرایمر UB60 ، ۱۴ رقم جو زراعی بر روی ژل پلی آکریل آمید ۶٪، ۱:رقم ریحان ، ۲: ریحان ، ۳: B6 ، ۴: زرجو ، ۵:استار (ماکوئی)، ۶:والفجر، ۷:گرگان ، ۸: ظفر، ۹: سینا، ۱۰:ویکتوریا، ۱۱:کاپری ، ۱۲:گوهرجو، ۱۳: ارم، ۱۴: افغانستان، M:مارکر λ1kb Ladder(اندازه باندهای آن مطابق شکل قبل است).

| | | |

می‌باشد تا بتوان به نتایج تکرارپذیری دست یافت، که محققین دیگر نیز به این مسئله اشاره داشته‌اند(۱۵، ۳۱ و ۳۳). این داده‌ها دلالت بر ضرورت بررسی اولیه در رابطه با مناسب بودن و یا تناسب ترکیب آغازگر - ژنوتیپ برای تجزیهٔ RAPD دارد.

ب - در رابطه با تجزیه تحلیل آماری:

از آنجائیکه انجام هر نوع کارآماری مستلزم وجود تفاوت بین ارقام و آغازگرها می‌باشد، تجزیه مربع کای برای ارقام، آغازگرها و اثر متقابل آنها انجام گرفت. مربع‌کای محاسبه شده برای ارقام و آغازگرها واثر متقابل در سطح یک درصد معنی‌دار بود و نشان می‌داد که:

اولاً، ارقام با همدیگر از نظر باندهی با همدیگر متفاوتند.ثانیاً، آغازگرها از نظر تاثیر برروی ارقام متفاوتند.ثالثاً، به واسطه معنی‌دار شدن، اثر متقابل آغازگرها در ارقام متفاوت است. متوسط باندهی آغازگرهای مختلف در ۲۰ رقم، ۱۲۱ بود که آغازگرهایی که دارای میانگین بالای ۱۲۱ بوده و نیز آنهایی که دارای باندهای بسیار واضحی بودند، در نظر گرفته شد و بقیه حذف شدند. البته دلیل دیگر حذف آن‌ها همان ناواضح بودن و نامشخص بودن ماهیت باندهای تولید شده بود. هر چند که بعضی از آغازگرها، تعداد زیادی هم باند داده بودند ولی به دلیل عدم داشتن خصوصیات مذکور (آغازگرهای UB_{87}، UB_{86}، UB_{85}، UB_{82}، UB_{66}، UB_{63}، UB_4 و UB_{38} در یک مرحله از تجزیه حذف شدند). خوشه های به دست آمده از ماتریس‌های فاصله که بر مبنای ضریب تشابه نی، برای ۳۳ آغازگر یا کل آغازگرها در (شکل ۳) و ۲۵ آغازگر (پس از حذف آغازگرها) در(شکل ۴)، نشان داده شده است.

هر دو نوع خوشه ارقام را در شش گروه متمایز بر اساس فواصل نی نشان می‌دهند. که در این میان ارقام شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۷، ۸ و ۱۰ در هر دو خوشه بطور مشابه در گروههای ۱، ۲ و ۳ قرار گرفته‌اند: که این نشان دهندهٔ آن است که تشخیص این ارقام از طریق ۲۵ آغازگر امکان پذیر است. و بقیه آغازگرها قادر نخواهند بود، چند شکلی چندانی را بین آنها نشان دهد. در صورتیکه بقیهٔ ارقام در دو خوشه در وضعیت‌های مختلفی از نظر چند شکلی قرار گرفته‌اند، که این نشان دهندهٔ اینست که تعداد ۲۵ آغازگر برای تشخیص میزان چند شکلی در بین آنها کافی نبوده است، و شاید نیاز به تعداد آغازگرهای بیشتری نیز برای بررسی چند شکلی باشد.

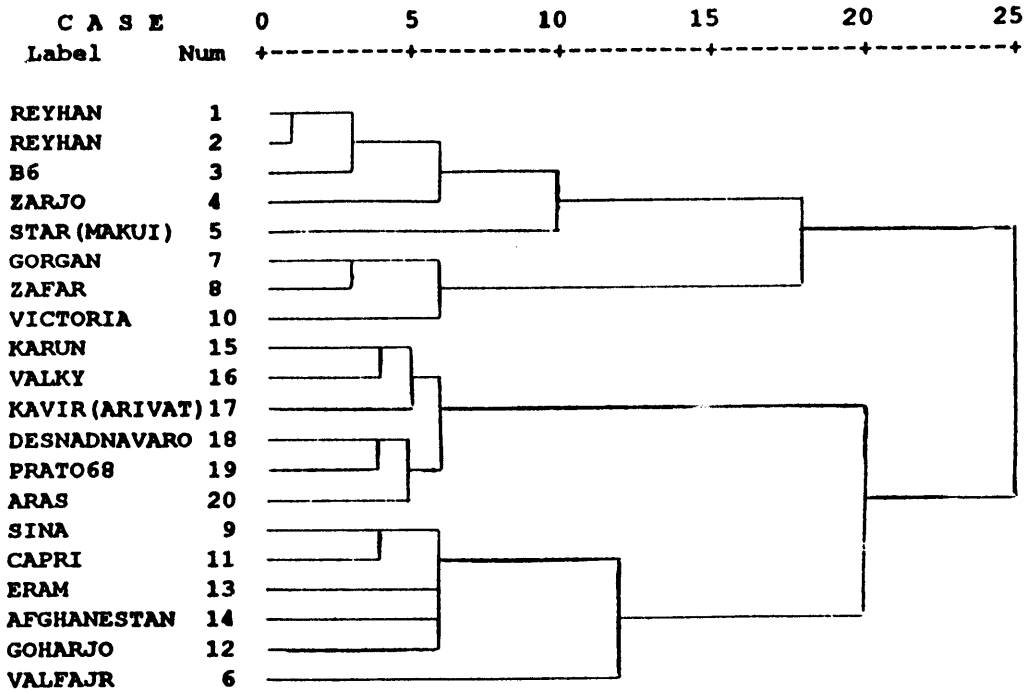
نکته دیگر آنکه تشابه ارقام ۱، ۲، ۳ با همدیگر در گروه ۱ در هر دو خوشه بسیار زیاد و از بقیه بیشتر است (بیش از ۰/۹). همینطور برای ارقام ۷ و ۸ درگروه سوم که بازاء هر دو خوشه وضع بدین منوال است. توجیه این مساله می‌تواند این باشد که اولا ۱ و ۲ هر دو مربوط به یک رقم بوده و این تشابه مورد انتظار است و تشابه آنها با رقم ۳ احتمالا مربوط به شجره‌نامه آنها باشد. نکته قابل توجه اینست که در وضعیت شکل ۷ ، رقم والفجر در گروه ٦ ولی در شکل ۸ ، رقم والفجر در گروه ۴ قرار گرفته است. که این نشان دهندهٔ اینست که هشت آغازگر حذف شده برای شکل ۴ باندهی قابل توجهی برای این رقم نشان داده‌اند. ولی رقم استار در هر دو خوشه، در گروه ۲ قرار گرفته‌است و همانطور که ذکر کردیم، تعداد ۲۵ آغازگر برای تشخیص چند شکلی برای آن کافی بوده‌است. از طرفی در هر دو شکل دو رقم مذکور هر کدام به تنهایی در گروه‌های جداگانه قرار دارند. با توجه به اینکه این ارقام به ترتیب مبدأشان کلکسیون بین‌المللی CI.۱۰۸۹۸۵ و فائو می‌باشد، در حالیکه ارقام دیگر، بومی مناطق مختلف‌اند که این گروه‌بندی احتمالاً با این قضیه در ارتباط باشد. مطلب آخر آنکه: ارقام ۱۵، ۱٦، ۱۷، ۱۸ و ۱۹ در هر دو شکل باهم در یک گروه واقع شده‌اند (در شکل ۳، در گروه ۵ و در شکل ۴، در گروه ٦). این نشان دهنده دو مطلب است: اول اینکه این امر تا حدودی طبیعی است چراکه منشاء آنها آمریکا است؛ دوم اینکه نشانگر اینست که ۲۵ آغازگر برای تشخیص و تمایز این ارقام از بقیه کافی است. پس بطور خلاصه گروهبندی ارقام بر اساس شکل های ۳ و ۴ به شرح زیر است:

الف - شکل شماره ۳: شامل ٦ گروه به شرح زیر است:

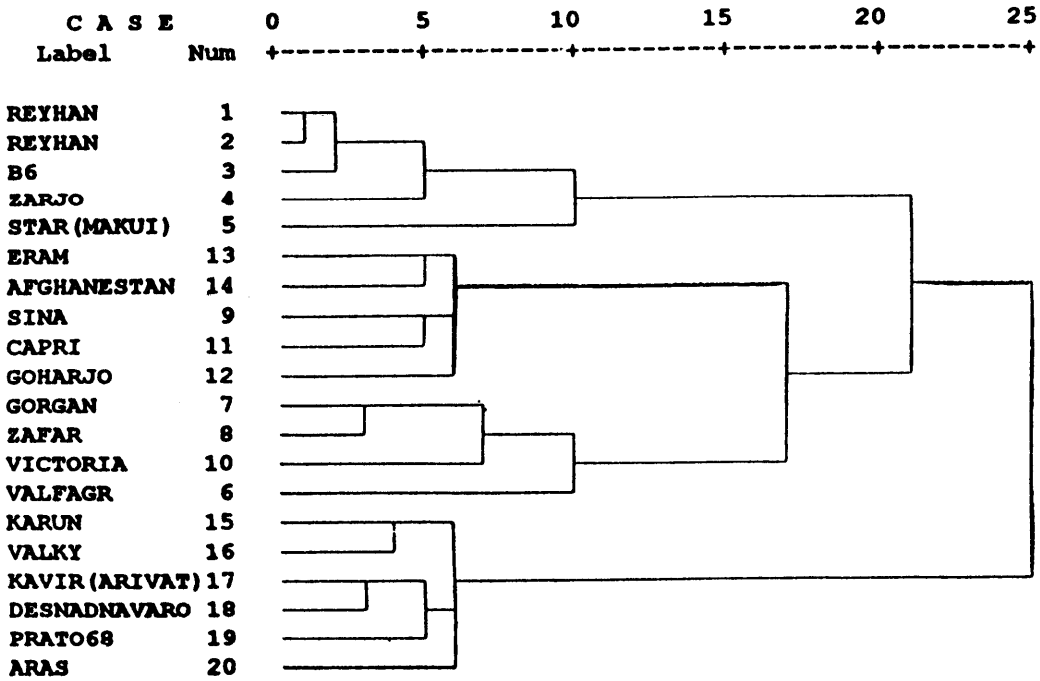
گروه اول شامل: ارقام ریحان، B6 و زرجو (۱، ۲، ۳ و ۴) که ۱ و ۲ همان ریحان هستند. گروه دوم شامل: رقم استار (۵). گروه سوم شامل: ارقام گرگان، ظفر و ویکتوریا (۷، ۸ و ۱۰). گروه چهارم شامل: ارقام کویر، ارس، کارون، والکی، دسنادناوارو و پراتو ٦۸ (۱۷، ۲۰، ۱۵، ۱٦، ۱۸، ۱۹).گروه پنجم شامل: ارقام سینا، کاپری، ارم، افغانستان و گوهر جو(۹، ۱۱، ۱۲، ۱۴ و ۱۳). گروه ششم شامل: رقم والفجر(٦).

ب - شکل شماره ۴: شامل ٦ گروه به شرح زیر است:

گروه اول شامل: ارقام ریحان، B6 و زرجو (۱، ۲، ۳ و ۴) که ۱ و ۲



شکل ۳ - دندوگرام فاصله ژنتیکی ۲۰ رقم جو، بر مبنای کلیه پرایمرها(۳۳ پرایمر) مقیاسی بالا نشانگر فاصله ژنتیکی بر مبنای ضریب تشابه نی است.



شکل ۴ - دندوگرام فاصله ژنتیکی ۲۰ رقم جو، بر مبنای ۲۵ پرایمرها(۸ پرایمر حذف) مقیاسی بالا نشانگر فاصله ژنتیکی بر مبنای ضریب تشابه نی است.

همان ریحان هستند. گروه دوم شامل: رقم استار(۵). گروه سوم شامل: ارقام گرگان، ظفر و ویکتوریا(۷، ۸ و ۱۰). گروه چهارم شامل: رقم والفجر(٦). گروه پنجم شامل: کاپری، افغانستان، گوهر، ارم و سینا(۱۱، ۱۴، ۱۲، ۱۳ و ۹). گروه ششم شامل: کارون، والکی، دسنادناوارو، پراتو ٦۸،کویر و ارس (۱۵،۱٦،۱۸،۱۹،۱۷و۲۰). در مورد دو شکل فوق می‌توان چنین گفت که:

از آنجائیکه بر اساس شکل های ۳ و ۴ ارقام بر اساس میزان تشابه یا تفاوت چند شکلی ی آنها به ترتیب قرار گرفته‌اند (از بالا به پایین تشابه کمتر می‌شود)، لذا ارقام دورتر با داشتن چند شکلی بیشتر تفاوت بیشتری را از نظر مولکولی خواهند داشت و از طرف دیگر از نظر دورگ‌گیری، ارقام با تفاوت ژنتیکی بیشتر، امکان ایجاد هتروزیس بیشتر و یا انتقال صفات نادر را در بر خواهند داشت،پس انجام تلاقی والدین دورتر، کارایی بیشتری در این زمینه خواهد داشت. بنابراین براساس خوشه ها، تلاقی بین گروههای ۱ و ٦ بر اساس شکل ۳ برای رسیدن به اهداف فوق مفید خواهد بود. و بر اساس شکل ۴ ، اگر این تلاقی بین ۱ و ۲۰ صورت گیرد، احتمالاً مفیدتر باشد. بهر حال بهتر است که در تلاقی‌ها، این دو نوع تلاقی بیشتر مدنظر قرار گیرند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی به خاطر تقبل بخشی از هزینه‌های این تحقیق همچنین از آقایان دکتر عباس گرامی و مهندس خلیل عالمی‌سعید کمال تشکر و امتنان را داریم.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱ - بهنام، ب. ۱۳۷٦. استفاده از تکنیک RAPD-PCR بعنوان نشانگر DNA برای تعیین چند شکلی در بین برخی از ارقام جو ایرانی و گندمهای دوروم ایتالیایی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۲ - مقدم، م.، س.ا. محمدی شوطی، م. آقایی سربرزه.، ۱۳۷۳. آشنایی با روش های آماری چند متغیره (ترجمه)، انتشارات پیشتاز علم، ۲۰۹ صفحه.

3. Abo-elwafa, A., K. Murai and, T. Shimada. 1995. Intra-and inter-specific variation in lens revealed by RAPD marker. Theor.Appl.Genet. 90.332-340.

4. Bailey, T.B, Jr. and R.E Comstock. 1976. Linkage and synthesis of better genotypes in self-fertilizing species, Crop. Sci. 16:363-370.

5. Bothmer, R., Von., N.Jacobsen., C.Baden, R.B.jorgensen, and I. Lindle - laursen. 1991. An ecogeographical study of Hordeum. International Board for plant Genetic Resourcer. Rome.

6. Briggs, D.E. 1978. The origin and classification of barleys. In Barley. Chapman & Hall, London, Halsted press. Book, John wiley & sons, New York. PP. 76-88.

7. Brown, T.A. 1996. Gene cloning an Introduction. Chapman & Hall. Third eddition

8. Cipriani, G.,R.D.Bella and R.Testolin. 1996. Screening RAPD primers for molecular taxonomy and cultivar fingerprinting in the genus Actinidia. Euphytica. 90:169-174.

9. Dellaporta, S. L. , J. Wood, J. B. Hicks. 1983. A plant molecular DNA minipreparation versionII. plant . Mol. Rep. 1:19-21.

10. Fernandez, J.A., J.Sanz., and N.Jouve. 1987. Biochemical variation to determine phylogenetic relationships between Hordeum chilense and other American species of the genus Horewn(Poaceae).

Plant Syst. Evol. 157:105-119.

11. Foolad M. R. , R. A. Jones and R. L. Rodriguez. 1993. RAPD markers for constructing interspecific tomato genetic maps. Plant Cell . Report. 3: 00-00
12. Gebhardt C., D. Muganeiri, E. Reitter, F. Salamini, and F. Bonnel. 1993. Identification of RFLP markers closely linked to the H1 gene to conferring resistance to *Gldadera restochiensis* in potato Theor. Appl. Genet . 85: 541-544
13. Gonzalez J.M., And E. Ferrer.1993. RAPD analysis in Hordeum spicies. Genome. 36: 1029-1031.
14. Harlan,J.R.and D.Zohary.1966. Distribution of wild wheat and barley.Science,(Washington D.C.). 153:1074-1080.
15. Heun.M., and T.helentjaris. 1993.Inheritance of RAPD in F1 hybrids of corn. Theor. Appl. Genet. 85:691-968.
16. Hu Jinguo, and C. F. Quiros . 1991. Identification, of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers Plant Cell Report. 10:505-511.
17. Jaaska, V., and V.Jaaska., 1986. Isoenzyme Variation in the barley genus Hordeum L.I. Alchol dehydrogenase and superoxide dismutase. Biochem. Physiol. pflanz. 181:301-320.
18. Jorgensen, R.B. 1986. Relationships in the barley genus (Hordeum) an electrophoretic examination of proteins. Hereditas, 104:273-291.
19. Joshi, c.p., H. T. Nguyen. 1993. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. Plant Science 93:95- 103
20. Kresowich. s., J.G.K. Williams., J.R. Mcferson., E.J.Routman, and B.A. Schaal. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of Brassica oleracea L.Via a random amplified polymurphic DNA assay. Theor. Appl. Genet. 85:190- 196.
21. Landkhorst-klein, R.M.,A.Vermunt, R. Weide, T.Liharska and P.Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato(*L.esculentum*)using random amplified polymorphic DNA(RAPD). Theor. Appl. Genet. 83: 108- 114
22. Mackill D. J. 1993. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. Crop. Sci. Vol. 35:889-894.
23. Marillia E.F. and G.J.Scoles. 1996. The use of RAPD markers in Hordeum phylogeny. Genome, 39:645-654.
24. Martin.J.M., TR. Black., EA. Hockett . 1991a- Diversity among north american spring barley cultivars based on coefficients of parentage. Crop . Sci. 31:1131- 1137
25. Molnar. S. j.,and G. Fedak. 1989. Polymorphism in ribosomal DNA repeat units of 12 hordeum species. Genome, 32:1124- 1127
26. Nei, M. 1978. Estimation of average heterogyosity and genetic distance from a small numbers of individuals. Genetics, 89:583-590.

27. Noda, K. & K.J. Kasha. (1978). A proposed barley karyotype revision based on C-Band chromosome identification. Crop. Sci. 18:925-930.

28. Pener G. A., J. Chong, M.Levsque-lemay, S.J. Molnar and G. Fedak. 1993. Theor.Appl.Genet. 91:270-273.

29. Petersen L. H.Ostergard, H.Giese.1994. Genetic diversity among wild and cultivated barleys as revealed by RFLP.Theor.Appl.Genet.89: 676-691.

30. Staub, J. E, and F.C. Serguen., M.Gupta. 1996. Genetic Markers, Map Construction, and their application in plant breeding. Hort Science, Vol. 31(5): 729-741.

31. Thormann, C.E., M.E. Ferreira, L.E Camargo, I.G.Tivang, and T.G. Osborn. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic reaction ships within and among cruciferous species. Theor. Appl. Genet. 88: 973-980.

32. Tinker, N.A., M.G.Fortin, and D.E.Mather. 1993. Random amplified polymorphic DNA and Pedigree relationships in spring barley. Theor.Appl.Genet. 85: 976-94.

33. Williams, J.G.K., A.R.Kubelik., K.J.Livak., J.A.Rafalski and S.V.Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, Vol. 18, No. 22: 6531-6535.

Application of RAPD(PCR) as DNA Markers for the Detection of Polymorphism Among Barley Cultivars.

B. BEHNAM, B. YAZDI-SAMADI, C. ABD-MISHANI, A. TALEI AND A. SH. BOOSHEHRI

Former Graduate Student , Professors, Associate Professor and Instructor, Respectively Faculty of Agriculture, University of Tehran Karaj, Iran.

Accepted Oct. 27, 1999

SUMMARY

Genetic diversity among 20 Iranian barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) was investigated using RAPD markers. 950 RAPD fragments were generated using 33 single decameric primers of arbitrary nucleotide sequence. Amplification reactions resulted in fragment ranging in length from 300 to 3000 bps. Clearly resolved bands were scored for the presence or absence in a binary matrix. This matrix was used to calculate a distance matrix based on Nei's similarity coefficient. Amplified products were treated as independent characters to generate a phenogram using cluster analysis. Cultivars were classified in 6 groups. χ^2 analysis showed that, there were differences between varieties and primers regarding band generation. The generation of polymorphic band in barley cultivars was succesful, and suggested that RAPD marker is suited to study DNA polymorphism in barley.

Key words: Polymorphism, *Hordeum vulgare*, Nei's similarity, Distance matrix, RAPD-PCR