

مقایسه فاصله ژنتیکی و مرفولوژیکی با هتروزیس بر اساس نشانگر RAPD در هیبریدهای جو

سپیده ترابی^۱، منصور امیدی^۲، علی اکبر شاه نجات بوشهری^۳ و محمدرضا قنادها^۴
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیاران و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۴/۱۷

خلاصه

در سالهای اخیر برای تسریع و افزایش کارایی اصلاح بر استفاده از نشانگرهای مولکولی تاکید زیادی شده است. در مطالعه حاضر، تنوع ژنتیکی ۱۲ ژنوتیپ جو با استفاده از نشانگرهای DNA بررسی شد. قطعات چند شکلی بوسیله ۷ پرایمر اختیاری ۱۰ نوکلئوتیدی ازمیان ۴۰ پرایمر تولید شدند و با استفاده از نرم افزارهای NTSYS و SPSS و با استفاده از ضریب تشابه Dice مبتنی بر UPGMA آنالیز شد و برای مطالعه و بررسی قدرت بالقوه تظاهر هیبرید تولید شده از مواد والدی استفاده گردید. صفاتی مانند محور زیر سنبله، طول سنبله، طول پدانکل، طول ریشک، تعداد پنجه عقیم، تعداد پنجه بارور، بیوماس (وزن زی توده)، عملکرد سنبله اصلی، دانه در سنبله، عملکرد کل و وزن ۱۰۰ دانه در مزرعه اندازه گیری و هتروزیس آنها محاسبه شد. نتایج آزمایشات نشان داد که ۱۲ ژنوتیپ جو در چند گروه تقسیم شدند علاوه بر این بین هتروزیس و فاصله ژنتیکی تنها در صفات ارتفاع و طول پدانکل همبستگی مشاهده شد و در سایر صفات ارتباطی وجود نداشت. از آنجائیکه فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای RAPD به طور معنی داری با تظاهر هیبرید و هتروزیس در کلیه صفات همبستگی نداشت، به نظر می رسد، این امکان وجود ندارد که با فاصله ژنتیکی بتوان تظاهر هیبرید آنها را پیش بینی کرد. در مقایسه بین متدهای مرفولوژیکی و مولکولی نیز مشاهده شد که الگوی نواری RAPD هیچ همسویی با صفات مرفولوژیکی و زراعی نداشته است.

واژه های کلیدی: جو، نشانگر RAPD، هتروزیس، فاصله ژنتیکی

مقدمه

آگاهی در مورد تنوع ژرم پلاسما و ارتباط ژنتیکی در میان ژنوتیپها کمک بزرگی در استراتژیهای توسعه محصولات به شمار می رود علاوه بر این تعیین و تشخیص ژنوتیپهایی که هیبرید آنها هتروزیس بالایی دارد برای اصلاحگر از اهمیت بسزایی برخوردار است. روشهای مرسوم اصلاحی که بر اساس فرایندهای تلاقی، تلاقی برگشتی و گزینش هستند با وجود کارایی وقت گیر بوده بنابراین باید به دنبال روشهایی بود که به

نحوی مکمل کارهای اصلاحی و روشهای کلاسیک شده و راندمان کار را افزایش دهد. برای این مطالعه از جو استفاده شد. جو یکی از ۵ گیاه زراعی مهم در دنیا است در ایران بعد از گندم بالاترین سطح زیر کشت را دارا است (۳،۴). جو گیاهی از تیره گرامینه^۱، زیر خانواده پوئیده^۲، طایفه تری تیسه^۳ و جنس هوردنوم^۴ می باشد. جو گیاهی زودرس با عملکرد بالقوه بالا است و بر روی حاشیه زمینهای کشاورزی، در محیطهای متنوع و

1. Graminea
2. Pooideae
3. Triticeae
4. Hordeum

هیبرید با فاصله ژنتیکی، (۳) مقایسه روش های مرفولوژیکی و مولکولی بر اساس مارکر RAPD.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

در این تحقیق ۶ ژنوتیپ جو ایرانی و ۶ ژنوتیپ جو ژاپنی از کلکسیون دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه شد. در پاییز ۱۳۸۰ بذور فوق در کرت هایی شامل ۴ خط ۲ متری با فاصله ۲۵ سانتیمتری بر روی دو پشته به هدف تلاقی کشت گردیدند. با بررسی های انجام شده جو ایرانی به عنوان والد مادری و جو ژاپنی به عنوان والد پدری دو به دو با هم تلاقی داده شدند به طوری که جمعاً ۶ تلاقی در بهار ۱۳۸۱ انجام شد جدول ۱ اسامی ژنوتیپ ها و ترتیب تلاقی آنها را نشان می دهد.

جدول ۱- ژنوتیپ های استفاده شده در این تحقیق که از ژنوتیپ های موجود در تحقیقات قبلی انتخاب شده اند

والد مادری	والد پدری
ژنوتیپ ۷ کلکسیون	ژنوتیپ ۵۰ ژاپنی
ژنوتیپ ۴ کلکسیون	ژنوتیپ ۵ ژاپنی
ژنوتیپ ۳ کلکسیون	ژنوتیپ جو ژاپنی
ژنوتیپ ۱۵ کلکسیون	ژنوتیپ ۱۰ ژاپنی
ژنوتیپ ۱۷ کلکسیون	ژنوتیپ ۱۱ ژاپنی
ژنوتیپ ۵ کلکسیون	ژنوتیپ ۱ ژاپنی

بذور حاصل از تلاقی یا F1 در اواخر اردیبهشت ۱۳۸۱ برداشت شد و بذور والدین و F1 در گلخانه گروه زراعت و اصلاح نباتات کشت شدند تا جهت استخراج DNA در آزمایشگاه از آن استفاده گردد.

آزمایشات مزرعه ای

در سال ۱۳۸۱ بذور والدین و F1 ها در کرت هایی با شرایط قبلی کشت شدند و ۱۳ صفت بر روی والدین و هیبریدها در مزرعه اندازه گیری شد شامل بیوماس (وزن زی توده)، ارتفاع گیاه، طول پدانکل، طول ریشک، بیرون آمدگی پدانکل، طول سنبله، تعداد پنجه بارور، تعداد پنجه عقیم، تعداد دانه در هر

وسعی پیدا شده است (۳، ۴).

تشخیص ترکیب پذیری با هتروزیس عملکرد بالا مهمترین مرحله در پیشرفت محصولات هیبرید است. به طور کلی، والدین با یک توانایی ترکیب پذیری عمومی بالاتر و یک فاصله ژنتیکی دورتر می توانند یک هیبرید با تظاهر عملکرد بهتر را تولید کنند. برای انجام تلاقیها، هتروزیس معیار مناسبی است ولی هنگامیکه تعداد زیادی از والدین در یک برنامه اصلاحی قرار داشته باشند اندازه گیری هتروزیس آسان نمی باشد و اغلب بوسیله اشتباهات آزمایشی کنترل نشده مانند نوسانات بارندگی و غیر یکنواختی خاک از واقعیت دور می شود و همچنین تشخیص توانایی ترکیب پذیری گران و زمان بر است لذا بسیاری از دانشمندان سعی می کنند که هتروزیس را در سطح مولکولی پیش بینی کنند که در این تحقیقات نتایج مختلفی مشاهده شد. از آن جمله ژوا و همکاران (۱۹۹۹)، لیو و همکاران (۱۹۹۹) و کرنا و همکاران (۱۹۹۷) بیان کردند بین فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای DNA با تظاهر هیبرید و هتروزیس همبستگی وجود ندارد در صورتیکه تاکاتسو و همکاران (۲۰۰۱) اسمیت و همکاران (۱۹۹۰)، کرس و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند که پیش بینی تظاهر F1 در نشانگرهای مولکولی امکان پذیر است. بعضی تحقیقات در ذرت و کلزا نشان داده که تنوع ژنتیکی والدین برای نشانگرهای RFLP به طور معنی داری با تظاهر (عملکرد) هیبریدها پیوسته بوده و هتروزیس می تواند بوسیله نشانگرهای مولکولی پیش بینی شود. ولی استفاده RFLP ها به عنوان نشانگرهای مولکولی مشکل بوده است (۱۰، ۱۸). با توجه به اینکه PCR وسیله ای برای کاهش زمان است یکی از تکنیک هایی که از مزیت PCR بهره مند می شود نشانگر RAPD است (۲۱). به طور کلی میان نتایج بدست آمده از RAPD و دیگر تکنولوژیها برای آنالیز انحراف ژنتیکی و ارتباط ژنتیکی مطابقت وجود دارد (۱). مزیت اصلی تکنیک RAPD سادگی آن، صرفه جویی در زمان الکتروفورز و ارزانی آن است البته معایبی هم دارد چون نشانگر RAPD غالب است تعیین تنوع ژنتیکی باید بر حضور و عدم حضور باندها طراحی شود.

اهداف اصلی این تحقیق عبارتند از: (۱) تعیین چند شکلی و فاصله ژنتیکی در بین ۱۲ والد، (۲) بررسی ارتباط تظاهر

ژل‌ها به مدت نیم ساعت در محلول اتیدیوم بروماید، به غلظت ۱ - ۰/۵ میلی‌گرم انجام شد و در زیر نور UV بوسیله دستگاه ترانس لومیناتور قابل رویت شد، و آنگاه عکس برداری مربوطه انجام شد.

جدول ۲ - لیست آغازگرهای چند شکل، توالی، درصد چندشکلی، تعداد باندهای چند شکل - کل باندها

آغازگر	توالی (۳ ۵)	کل باندها	تعداد باندهای چند شکلی	درصد چند شکلی
UBC96	GGCGGCATGG	۵۸	۱۴	۲۴/۱۳
UBC66	GAGGGCGTGA	۳۵	۶	۱۷/۱۴
UBC64	GAGGGCGGGA	۵۹	۹	۱۵/۲۵
UBC95	GGGGGGTTGG	۸۰	۱۲	۱۵
UBC1	CCTGGGCTTC	۵۶	۱۰	۱۱/۸۵
UBC100	ATCGGGTCCG	۶۸	۸	۱۱/۷۶
UBC77	GAGCACCAGG	۲۳	۴	۱۷/۳۹
جمع		۳۷۹	۶۴	۱۶/۶۲

رتبه‌بندی و تجزیه آماری داده‌ها

داده‌های حاصل از الکتروفورز به صورت کیفی بوده و برای تجزیه آماری باید آنها را به صورت کمی درآورد. مناسب‌ترین روش برای این تبدیل وجود یا عدم وجود باندها است که به صورت کد ۰ و ۱ نشان داده می‌شود از آنجا که تمام نمونه‌ها روی یک ژل نمونه‌گذاری شده‌اند نیاز به تصحیح ندارد. لازم به ذکر است باندهای وارد شده در آنالیز در محدوده ۱۵۰۰-۳۰۰ جفت باز^۱ بوده و باندهای خارج از این محدوده بازی به علت ضعیف بودن تکرارپذیری از محاسبات حذف شدند. به این ترتیب ماتریس دو طرفه ارقام و متغیرها بر اساس ۰ و ۱ تشکیل شده و سپس آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS انجام گرفت در این آنالیز تجزیه کلاستر داده‌ها بر اساس ضرایب تشابه Dice صورت گرفته و در نهایت دندروگرام بر اساس روش UPGMA (میانگین حسابی غیر وزنی)^۲ رسم شد.

تخمین تظاهر و هتروزیس هیبرید برای صفات مختلف

میانگین بیوماس، ارتفاع، طول پدانکل، برآمدگی پدانکل، طول ریشک، طول سنبله، عملکرد خوشه اصلی، تعداد دانه در

سنبله، عملکرد سنبله اصلی، عملکرد کل، وزن ۱۰۰ دانه و شاخص برداشت.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از گیاه ابتدا ۳-۵ بذر را در گلدان کاشته بعد از ۱۵-۱۰ روز در مرحله حدود ۳ برگ ۱۰۰ میلی گرم برگ تازه برداشت و در آلومینیم پیچیده و بر روی یخ گذاشته شدند سپس استخراج طبق روش مینی پرب که توسط دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) تصحیح شده بود صورت پذیرفت. کمیت و کیفیت نمونه های DNA استخراج شده از طریق اسپکتوفوتومتری در طول موج جذب نور در طول‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت و غلظت ۵ نانوگرم از DNA مورد بررسی تهیه شد سپس نمونه‌های مذکور در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

تکثیر RAPD

تعداد ۴۰ آغازگر منفرد تصادفی از مجموعه آغازگرهای شرکت سیناژن برای تکثیر DNAی ژنومی گیاهان فوق‌الذکر مورد استفاده واقع شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر اساس روش ویلیامز و همکاران (۱۹۹۰) انجام شد به این صورت که هر مخلوط واکنش، به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل 1x PCR (Tris-Cl, 1% gelatin), 1.9 (500mM KCL, 100 mM MgCl₂, 1.9 mM dNTPs, 0.8 μM primer واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۲۵ نانوگرم DNA ژنومی تهیه گردید. مخلوط‌های واکنش آماده شده برای تکثیر به دستگاه ترموسایکلر برای ۴۵ دور طبق برنامه زیر منتقل شد. قسمت اول: واسرشت شدن در ۹۳ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه، قسمت دوم: ۴۵ سیکل شامل واسرشت سازی در ۹۳ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه، اتصال در ۳۵ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و قسمت سوم: تکمیل بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه.

الکتروفورز فرآورده‌های تکثیری

جهت الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده از الکتروفورز ژل آگارز به غلظت ۱/۵ درصد استفاده شد. و نشانگر لدر 1kb (1kb-ladder marker) و CG بکار برده شد. مدت زمان الکتروفورز ۲ ساعت در ولتاژ ثابت، ۸۰ ولت، بود. رنگ آمیزی

1. bp=base pair

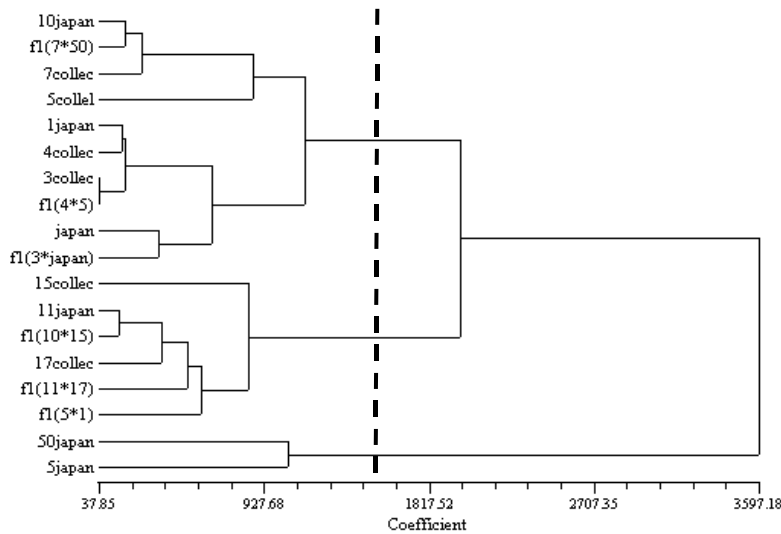
2. unweighted pair-group method for the Arithmetic Average

در محدوده ۱۵۰۰-۳۰۰ جفت باز که دارای تکرارپذیری بالایی بودند در نظر گرفته شد.



شکل ۱- الگوی نواری، قطعات دی.ان.ای تکثیر شده بر اساس آغازگر UBC66، ۱۸ ژنوتیپ جو به ترتیب از راست به چپ ژنوتیپ های ۷ کلکسیون، ۵۰ ژاپنی، F1(7x50)، ۴ کلکسیون، ۵ ژاپنی، F1(4x5)، ۳ کلکسیون، جو ژاپنی، F1(3x Japanese)، ۱۵ کلکسیون، ۱۰ ژاپنی، F1(10x15)، ۱۷ کلکسیون، ۱۱ ژاپنی، F1(11x17)، ۵ کلکسیون، ۱ ژاپنی، F1(5x1)، نشانگر CG

مشاهدات این تحقیق نشان داد که نشانگر RAPD روشی سریع و ارزان قیمت برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی تعداد زیادی نمونه می باشد. همچنین با توجه به میانگین ضرایب تشابه ژنوتیپها در این تحقیق وجود چنین تنوعی در ژنوتیپها از جذابیت مطلوبی برخوردار نبوده و باید نسبت به گسترش ژرم پلاسما، جمع آوری نمونه و احیای ژرم پلاسما ژنوتیپهای موجود در کلکسیون اقدام شود.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از ژنوتیپ های والدین وهیبریدهای حاصل از آنها در داده های مورفولوژیکی با استفاده از فاصله اقلیدسی مبتنی بر روش UPGMA

خوشه اصلی، عملکرد کل، وزن ۱۰۰ دانه، تعداد پنجه عقیم و بارور و شاخص برداشت هیبریدها محاسبه شد سپس به دو روش هتروزیس برای همه صفات محاسبه شد.

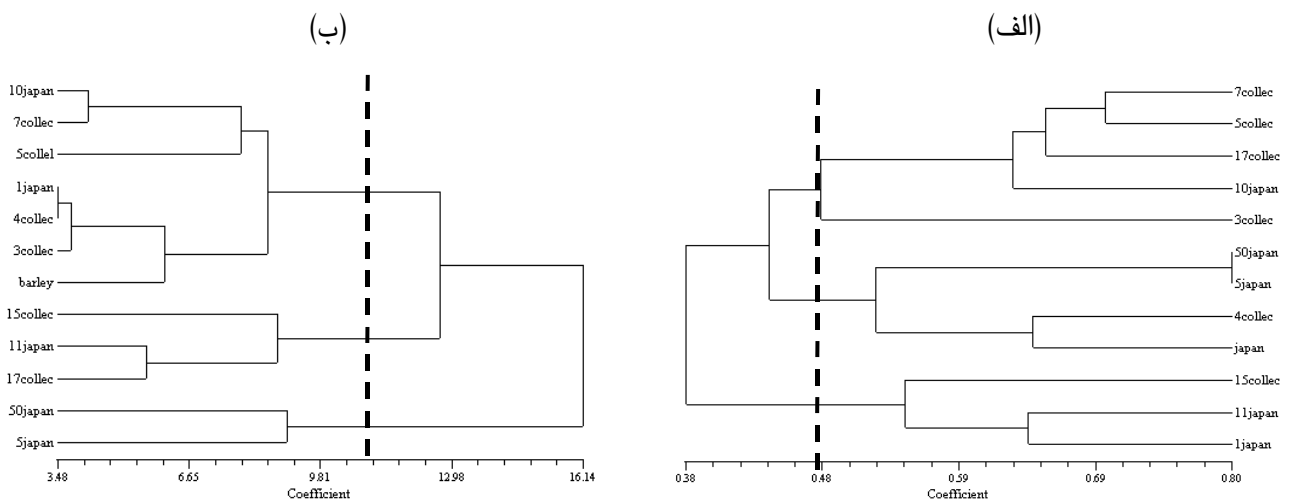
$$H = \frac{F_1 - MP}{MP} \quad (۱)$$

$$H = \frac{F_1 - P_1}{P_1} \quad \text{اگر } P_1 > P_2 \quad (۲)$$

در معادله (۱) میانگین صفت مورد نظر در نتاج F₁ و MP میانگین صفت مورد نظر در میانگین والدین است در معادله (۲) میانگین صفت مورد نظر در والد برتر است.

نتایج و بحث

از ۴۰ آغازگر تصادفی (UBC1-UBC100) استفاده شده ۷ آغازگر چند شکلی قابل توجهی را نشان دادند که قادر به دسته بندی بودند. از آغازگرهایی که وضوح کافی نداشتند یا بصورت منومورف بودند صرف نظر شد. از مجموع آغازگر آزمایش شده بر روی ۱۲ ژنوتیپ ۳۷۹ باند تولید گردید (جدول ۲). ۶۴ تا از این قطعات (۱۶/۶۲ درصد) در بین ژنوتیپها چند شکل بودند (جدول ۲). محدوده درصد چند شکلی در بین ژنوتیپها از ۱۱/۷۶٪ با آغازگر UBC100 تا ۲۴/۱۳٪ با آغازگر UBC96 بود. بیشترین تعداد باند چند شکل مربوط به آغازگر UBC96 و کمترین تعداد باند چند شکل مربوط به آغازگر UBC100 بود (جدول ۲). با توجه به ضرایب تشابه بیشترین تشابه میان ژنوتیپهای ۵۰ ژاپنی و ۵ ژاپنی و بیشترین تمایز میان ۱ ژاپنی و ۳ کلکسیون بود. برای تجزیه آماری نوارهایی



شکل ۳- دندروگرام ۱۲ ژنوتیپ جو بر مبنای UPGMA و بر اساس ضریب تشابه Dice در داده‌های RAPD (الف) و ضریب تشابه جاکارد در داده‌های مرفولوژیکی (ب)

گروه بندی می‌توان فرضیاتی در مورد نحوه توارث و عمل ژن داد.

در این آزمایش پس از تجزیه کلاستر و رسم دندروگرام، داده‌های حاصل از متد مولکولی و مرفولوژیکی بررسی شدند (شکل ۳). در هر دو دندروگرام ژنوتیپ‌های شماره ۳ کلکسیون، ۱۰ ژاپنی، ۷ کلکسیون، ۵ کلکسیون در یک گروه و ژنوتیپ‌های شماره ۵ ژاپنی و ۵۰ ژاپنی نیز با هم در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۳) و در کارهای مولکولی و مرفولوژیکی این گروه‌بندی تغییر نکرده است. البته در ژنوتیپ‌های دیگر گروه‌بندی تغییر کرده است که این امر بیانگر تفاوت این ژنوتیپ‌ها در سطح مولکولی و DNA می‌باشد. نکته قابل توجه در مورد ژنوتیپ‌های شماره ۵ ژاپنی و ۵۰ ژاپنی است که از نظر مرفولوژیکی کاملاً شباهت قابل توجهی دارند و در کارهای مولکولی که ژنوتیپ‌ها در سطح DNA بررسی می‌شوند نیز کاملاً به هم نزدیک هستند. در مقایسه ضرایب تشابه این دو ژنوتیپ دیده شد که تشابه این دو ژنوتیپ در بررسی مولکولی بسیار بیشتر از بررسی‌های مرفولوژیکی است و این مسئله احتمالاً به علت اثر محیط روی فنوتیپ می‌باشد که سبب دورتر شدن ژنوتیپ‌های مشابه می‌شود. پس از مقایسه این دو کلاستر به

در تجزیه کلاستر داده‌های مرفولوژیکی و رسم دندروگرام (شکل ۲) و مقایسه گروه بندی والدین و F_1 های حاصل از آنها نیز ژنوتیپ‌های شماره ۳ کلکسیون، $F_1(4 \times 5)$ ، ۱ ژاپنی، ۴ کلکسیون، جو ژاپنی، (جو ژاپنی $F_1(3 \times 3)$ ، ۱۰ ژاپنی، $F_1(7 \times 50)$ ، ۷ کلکسیون، ۵ کلکسیون در گروه اول و ژنوتیپ‌های شماره ۱۱ ژاپنی، $F_1(10 \times 15)$ ، ۱۷ کلکسیون، $F_1(11 \times 11)$ ، ۱۵ کلکسیون در گروه دوم و ژنوتیپ‌های شماره ۵ ژاپنی و ۵۰ ژاپنی در گروه سوم قرار گرفت. مشاهده گردید در ۸۳/۳ درصد از موارد، هیبریدهای حاصل از والدین حداقل با یکی از والدین در یک گروه قرار گرفت. که نشان دهنده نزدیک بودن آن هیبرید به یکی از والدین می‌باشد مثلاً $F_1(7 \times 50)$ با ۷ کلکسیون در یک گروه قرار گرفته‌اند که بیانگر این مسئله می‌باشد که گیاه هیبرید حاصل در مقایسه دو والد به والد ۷ کلکسیون شباهت بیشتری پیدا کرده است مشاهده شد که ۳ هیبرید حاصل با والد مادری خود در یک گروه قرار گرفته‌اند (۵۰) و ۲ هیبرید دیگر نیز با هردو والد در یک گروه قرار گرفته‌اند بنابراین با این بررسی تا حدودی می‌توان در مورد اثرات مادری نیز تصمیماتی اتخاذ نمود. بنابراین این گروه بندی تا حدودی نحوه توارث و عمل ژن‌ها را روشن می‌سازد. و با استفاده از این

متفاوت باشند این موضوع نشان دهنده این است که تجزیه کلاستر و گروه‌بندی افراد بر اساس نشانگر RAPD ممکن است هیچ ارتباطی با گروه‌بندی افراد بر اساس صفات بوتانیکی و مرفولوژیکی نداشته باشد. علاوه بر این رادیوی و همکاران نیز عدم تطابق الگوی نواری براساس نشانگر RAPD و تجزیه کلاستر صفات مرفولوژیکی را مشاهده کردند.

هتروزیس کلیه صفات بررسی شد (جدول ۳) سپس همبستگی بین هتروزیس صفات و فاصله ژنتیکی آنها محاسبه شد در این بررسی مشاهده شد که بین تظاهر هیبرید و فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگر RAPD در جو تنها ارتفاع با فاصله ژنتیکی همبستگی معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان داد علاوه بر این، صفت طول پدانکل نیز همبستگی معنی‌داری در سطح ۱۰ درصد از خود نشان داد و در بقیه صفات همبستگی معنی‌دار مشاهده نشد. به این صورت که در مقدار هتروزیس مشاهده شده با نزدیکی ژنوتیپ‌ها روند خاصی مشاهده نگردید یعنی ژنوتیپ‌های دور و نزدیک برای داده‌های مولکولی از نظر میزان بروز هتروزیس بطور مشابه عمل کردند.

کمک نرم افزار NTSYS و آزمون مانتل همبستگی آنها $r = 0/136$ به دست آمد ($p[\text{random } z \geq \text{observed } z] = 0/2368$) که بیانگر این است که این دو تجزیه کلاستر از نظر آماری باهم همبستگی معنی‌داری ندارند. این مسئله را رولدن - رویز و همکاران (۲۰۰۱) بر روی ارقام دائمی اثبات کردند (۱۷). همچنین کاسیو و همکاران (۲۰۰۲) مطالعه‌ای روی گیاه باقلا با استفاده از روشهای مرفولوژیکی، آیزوایم و RAPD انجام دادند و آنها نیز همبستگی بالایی بین روش مرفولوژی و RAPD پیدا نکردند (۶). همچنین سزپانلاک و همکاران نیز در سال ۲۰۰۲ در مقایسه آغازگر RFLP و روش مرفولوژیکی این عدم تطابق را مشاهده کردند (۱۹) همچنین آنها در نتایج خود تنوع حاصل از روش مرفولوژیکی را بطور قابل توجهی بیشتر از تنوع ژنتیکی دیدند که این مسئله در نتایج مطالعات قبلی نیز ثابت شده است. کیانی و همکاران (۱۳۸۱) نیز مشاهده کردند که تجزیه کلاستر و گروه‌بندی افراد بر اساس الگوی بانندی RAPD هیچ همسویی با صفات مرفولوژیک و زراعی افراد نداشته است (۲). یعنی افراد دارای الگوی بانندی یکسان که در یک گروه قرار گرفته‌اند ممکن است از نظر صفات مرفولوژیکی و زارعی کاملا

جدول ۳- تخمین هتروزیس صفات مختلف با میانگین والدین

ژنوتیپ	ارتفاع	طول سنبله	طول ریشک	طول پدانکل	بیرون آمدگی پدانکل	تعداد پنجه بارور	تعداد پنجه عقیم	بیوماس
F1(7×50)	۰/۴۱	۰/۴۳	۰/۵۱	۰/۴۸	۰/۸۹	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۳۳
F1(4×5)	۰/۳۲	۰/۳۰۰۸	۰/۴۲	۰/۱۳	۰/۴۳	۰/۴۷	۰/۴۷	۱/۱۴
F1(3× ژاپنی)	-۰/۰۳۲	۰/۱۱	-۰/۰۸۹	۰/۱۷	۰/۲۶	-۰/۴۸	-۰/۴۸	-۰/۳۷
F1(10×15)	-۰/۰۵۴	۰/۰۶۴	۰/۰۵	۰/۱۴	۱/۱۵	-۰/۲۶	-۰/۲۶	-۰/۴۲
F1(11×17)	۰/۰۹۹	۰/۰۳۲	.	۰/۲	۱/۵	۰/۴۷	۰/۴۷	۰/۳۶
F1(5×1)	۰/۲۹	۰/۱۴	۰/۱۸	۰/۲۳	۰/۳۴	۰/۰۵۹	۰/۰۵۹	-۰/۰۶

ادامه جدول ۳

شاخص برداشت	وزن ۱۰۰ دانه	عملکرد کل	تعداد دانه در سنبله	عملکرد سنبله اصلی
F1(7×50)	۰/۰۸	۰/۴۱	۰/۳۳	۰/۶۵
F1(4×5)	۰/۱۴	۰/۹۶	۰/۱۱	-۰/۸۴
F1(3× ژاپنی)	۰/۰۵	-۰/۵۸	-۰/۱۴	-۰/۲
F1(10×15)	۰/۳۱	-۰/۴۳	-۰/۳۹	-۰/۳۲
F1(11×17)	-۰/۶۹	۰/۵۴	-۰/۱۳	-۰/۰۱۳
F1(5×1)	۰/۱۱	-۰/۳۴	-۰/۴۲	-۰/۳۶

مرفولوژی بر اساس ۱۷ صفت زراعی به طور معنی‌داری با هتروزیس همبستگی دارد.

مسئله اطلاع از قدرت ترکیب پذیری و هتروزیس مثبت در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت به سزایی برخوردار است و برای دست یافتن به این اطلاعات هزینه و زمان زیادی باید صرف کرد بنابراین یافتن راهکارهایی برای سرعت بخشیدن به این مهم از اهمیت زیادی برخوردار است لذا تلاش بر این بود که رابطه‌ای بین نشانگرهای مولکولی و تظاهر هیبریدها پیدا شود که سالها بر روی این موضوع کار شد و نتایج ضد و نقیض بسیاری بدست آمد در این آزمایش نیز ارتباط معنی‌داری بین نشانگر RAPD و تظاهر هیبرید پیدا نگردید. البته به نظر می‌رسد هنگامیکه تعداد نمونه کم است، بین فاصله ژنتیکی و هتروزیس همبستگی معنی‌داری وجود نداشته باشد اما اگر تعداد نمونه افزایش یابد بین فاصله ژنتیکی و هتروزیس همبستگی وجود دارد. بنابراین هنگامیکه ساختار داده‌های نمونه مناسب نیست و اندازه نمونه بزرگ است به عنوان یک غربال اولیه تخمین ارتباط بین فاصله ژنتیکی و هتروزیس ضروری است.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از طرح بررسی نحوه توارث صفات مختلف و کاربرد نشانگرهای RAPD در هیبرید های جو، به شماره ۷۱۵/۳/۶۵۹ می باشد که با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده است بدینوسیله مراتب تشکر و سپاسگزاری اعلام می گردد.

REFERENCES

۱. امیدی. م. ۱۳۷۹. بررسی کشت بافت، تنوع سیتوژنتیکی و پروتئینی جو. رساله دکتری تخصصی اصلاحات نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
۲. پورمحمد کیانی. س. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی کلزا (*Brassica napus L.*) با استفاده از مارکر RAPD-PCR. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی ایران
۳. مظاهری، د. ۱۳۸۰. مبانی زراعت عمومی. انتشارات دانشگاه تهران
- ۴- کریمی، ه. ۱۳۵۷. گیاهان زراعی. انتشارات دانشگاه تهران
5. Barker J. H. A., M. Matthes, G. M. Arnold, K. J. Edwards, I. Ahman, S. Larsson, & A. Karp. 1999. Characterisation of genetic diversity in potential biomass willows (*Salix spp.*) by RAPD and AFLP analyses. *Genome* 42:173-183.

در این مورد ژا و همکاران (۱۹۹۹) متوجه شدند که به علت پیچیدگی های ژنتیکی هتروزیس، پیش‌بینی آن از طریق فاصله ژنتیکی مشکل است (۲۲). علاوه بر این لیو و همکاران (۱۹۹۹) ارتباط بین تظاهر هیبریدها و فاصله ژنتیکی را بر اساس نشانگر RAPD در جو بررسی کردند و مشاهده کردند که فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای RAPD به طور معنی‌داری با تظاهر هیبرید و هتروزیس همبستگی نداشت (۱۴) بنابراین بیان کردند که این امکان وجود ندارد که بتوان تظاهر هیبریدها را با استفاده از فاصله ژنتیکی پیش‌بینی کرد. همچنین کرنا و همکاران (۱۹۹۷) با بررسی ارتباط بین هتروزیس عملکرد و هتروزیگوسیتی نشانگرهای مولکولی در سویا مشاهده کردند که بین فاصله ژنتیکی تخمین زده بوسیله نشانگر RFLP و هتروزیس عملکرد ارتباطی وجود ندارد ولی بین مکان ژنی آیزوایزیم و هتروزیس برای عملکرد ارتباط وجود دارد (۷). البته در اختصاص نشانگر آیزوایزیم برای انتخاب والدین محدودیت وجود دارد و آن به علت کم بودن تعداد مکانی ژنی آیزوایزیم در سویا است. ملچینگر و همکاران (۱۹۹۹) مشاهده کردند در ذرت توانایی پیش‌بینی تظاهر F₁ در نشانگرهای مولکولی خیلی قوی است البته این مسئله زمانی صادق است که مطالعات شامل تلاقیهای درون و برون گروهی باشد (۱۵). ریدی و همکاران (۲۰۰۳) فاصله ژنتیکی و مرفولوژیکی را با هتروزیس در یونجه مقایسه کردند و مشاهده کردند که بین فاصله ژنتیکی با هتروزیس رابطه‌ای وجود ندارد علی‌رغم اینکه ماتریس فاصله‌ای

6. Casiva P. V., B. O. Saidman, J. C. Vilards, & A. M. Cialdella. 2002. First comparative phenetic studies of Argentinean species of *Acacia* (Fabaceae), Using morphometric, isozymal, and RAPD approaches. *American Journal of Botany* 89: 843-853.
7. Cerna F. J., S. R. cianzio, A. Rafalski, S. tingey, & D. Dyer. 1997. Relationship between seed yield heterosis and molecular marker heterozygosity in soybean. *Theor Appl. Genet* 95: 460-467.
8. Chao S., P. J. Sharp, A. J. Worland, E. J. Warham, R. M. D. Koebner, & M. D. Gale. 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group7 chromosomes. *Theor. A ppl. Genet.* 78:495-504.
9. Cheres M. T., J. F. Miller, J. M. Grane, & S. J. Kapp. 2000. Genetic distance as a predictor of heterosis and hybrid performance within and between heterotic group in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 100:889-894.
10. Diers B. W., P. B. E. Mcvetty, & T. C. Osborn. 1996. Relationship between heterosis and genetic distance based on RFLP markers in oilseed rape (*Brassica napus* l.) *crop Sci.* 36:79-83.
12. Joyce A. T., M. T. Abberton, T. P. T. Michadson-Yeates & J. W. Forster. 1999. Relationship between genetic distance measured by RAPD-PCR and heterosis in inbred lines of White clover (*Trifolium repens* L.1.). *Euphytica* 107:159 -165.
13. Kam-Mogan L. N. W. & B. S. Gill, & S. Muthukrishnan. 1989. DNA restriction fragment length polymorphism: a strategy for genetic mapping the D genome of wheat. *Genome* 32:724-732.
14. Liu Z. Q., Y. Pei, & Z. T. PU. 1999. Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheats *triticum aestivum* L. *Plant Breeding* 118: 119-123.
15. Melchinger A. E., M. Lee, K. R. Lamkey, & W. L. Woodman. 1990. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms relation to genetic effects in maize inbreds. *Crop Sci.*30:1033-1040.
16. Riday H., E. Charles Brummer, T. Austin. Campbell, d. luth, & P.M. Cazarro. 2003. Comparisons of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago setiva* subsp . *setiva* and subsp. *Falcata* *Euphytica.* 131:37-45.
17. Roldan- Ruiz I., F. A. Van Eeuwijk. T. J. Gilliland, P.Pubreuil, C. Dillmann, J. tallemand, M. Deloose, & C. P. Baril. 2001. A Comparative study of molekular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) Varieties. *Theor Appl Genet* 103: 1138-1150.
18. Smith O. S., J. S. C. Smith, S. L. Bowen, R. A. Tenborg, & S. J. Wall. 1990. similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree ,F1 grain yield, grain yield. *Heterosis and RFLP. Theor. Appl. Genet.* 80:833-840.
19. Szczepaniak M., E. Cieslak, & P. Tomasz Bednarek. 2002. Morphological and AFLP variation of *ELYMUS REPERUS* (L.) gould (POAceeae). *Cellular & Molecolar biology letters* 7: 547-558.
20. Takatsu Y., M. Miyamoto, E Inove, T. Yamada, t. Manabe, M. Kasumi, M. Hayashi, F. Sakuma, W. Marubashi & M. Niwa. 2001. Interspecific hybridization among wilel *cladiolus* species southern Africa based oon randomly amplified polymorphic DNA markers, *scientia Horticulturae* 91: 339-348.
21. Williams J. C. K., M. K. Hanafey, J. A Rafalski, & S. V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA marker *Methods Enzymol* 218: 705-740.
22. Zhao M. F., X. H. Li, J. B. Yang, C.G. Xe, R. Y. He, D. J. Liu, & Q. Zhang. 1999. Relationship between molecular marker heterozygosity and hybrid performance in intra-and inter subspecific crosses of rice plant *Breeding* 118: 139-144.
23. Zhao R. Ch. Zhao, & Y . Ming. 1994. Studies on the effects of sample on the Relationship Between cenetic Distance and Heterosis in wheat . *J. Biomath.* 9(1), pp. 48-53

A Comparison of Genetic and Morphological Distance with Heterosis by Using RAPD Markers in Barley Hybrids

**S. TORABI¹, M. OMIDI², A. A. SHAHNEJAT-BUSHEHRI³
AND M. R. GHANNADHA⁴**

**1, 2, 3, 4, Former Graduate Student, Assistant Professors, and Professor
University College of Agriculture & Natural Resources (UCAN),
University of Tehran, Karaj, Iran
Accepted July. 21, 2004**

SUMMARY

In recent years biotechnology has become complementary to traditional breeding. In the present study, genetic divergence among 12 genotypes of barley was surveyed using DNA markers. Some fragments generated by seven primers of a 10-mer arbitrary sequence were used to study the potential power in different parents with different characteristics and to predict yield performance in the hybrid produced from parental materials. Traits such as biomass weight, plant height, peduncle as well as spike length, peduncle extrusion, yield per plant along with its components of number of seeds per spike and 100-seeds weight, as well as other morphological characters were evaluated. Experimental results, demonstrated that the 12 barley genotypes were divided into groups. Although genetic distance based on RAPD markers has not been significantly correlated with either hybrid performance or heterosis in traits, it has been used to predict hybrid performance with mixed results. It appears to be impossible to predict the hybrid performance from the genetic distance itself. Comparisons of genetic and morphological distance were made through RAPD and morphometric approaches. Experimental results indicated that there were no significant correlations between them.

Key words: Barley, RAPD markers, Heterosis, Genetic distance