ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره٤، زمستان ۱۳۹۰
صفحه ٤٢-۳۵

گزینش والدین و پیش‌بینی نمود نتاج بر اساس نشانگرهای EST-SSR و مقایسه آن با انتخاب فنوتیپی در فسکیوی بلند (*Festuca arundinacea*)

محمد مهدی مجیدی[۱]، آقافخر میرلوحی[۲*]

۱ و ۲- به‌ترتیب استادیار و دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Mirlohi@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۵)

چکیده

علیرغم اینکه گزارشاتی در زمینه استفاده موفق از نشانگرهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی گراس‌های علوفه‌ای وجود دارد، مطالعات کاربردی در این زمینه از جمله تاثیر تنوع ژنتیکی بر نمود واریته‌های مصنوعی حاصله و کارایی نشانگرهای مولکولی در گزینش والدین در گراس‌های علوفه‌ای بسیار محدود است. در این پژوهش تعداد ۲۵ ژنوتیپ فسکیوی بلند از یک جامعه اولیه انتخاب و پس از ارزیابی مورفولوژیک آن‌ها (از طریق ۱۲ صفت)، تنوع مولکولی آن‌ها (با استفاده از ۵۰ آغازگر EST-SSR) مورد بررسی قرار گرفت. سپس تعداد ٦ ژنوتیپ از دورترین و ٦ ژنوتیپ از نزدیک‌ترین والدین بر اساس فاصله ژنتیکی مورفولوژیک و نیز فاصله ژنتیکی مولکولی انتخاب و پس از یک نسل پلی کراس جمعیت نتاج حاصله مورد بررسی قرار گرفت. متوسط فاصله ژنتیکی بین والدین انتخاب شده برای تنوع محدود در ارزیابی مورفولوژیک و مولکولی به‌ترتیب ۵۵ و ١٤ درصد کمتر از والدین انتخاب شده برای تنوع وسیع بود. تنوع مولکولی بیش‌تر بین والدین بر اساس نشانگر EST-SSR منجر به افزایش ۲۵ درصد عملکرد علوفه، ۱۲ درصد تعداد ساقه و۱۰ درصد قطر یقه بیشتر در نتاج گردید در حالی‌که مقایسه میانگین نتاج دو گروه متنوع و متشابه بر اساس ارزیابی مورفولوژیک با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. از طرف دیگر تنوع مورفولوژیک بالاتر میزان هتروزیس در صفات روز تا گرده‌افشانی و ارتفاع بوته (دارای وراثت پذیری بالا) را به‌ترتیب ٤/۵ و ۷ درصد افزایش داد در حالی‌که تنوع مولکولی روی نمود این صفات در رقم مصنوعی تاثیری نداشت. نتایج نشان داد که نمود نتاج در فسکیوی بلند می‌تواند از طریق ثبت اطلاعات حاصل از والدین کلونی پیش‌بینی گردد. این نتایج بر ضرورت گزینش والدین متنوع و اصلاح پلی‌کراس‌ها به کمک نشانگر به ویژه در مورد صفات کمی تاکید می‌کند.

واژه‌های کلیدی

پلی کراس،
تنوع ژنتیکی،
عملکرد،
EST-SSR،
Festuca arundinacea.

مقدمه

طی قرن گذشته روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات بیش‌ترین نقش را در بهبود ژنتیکی گراس-های علوفه‌ای و چمنی به‌منظور افزایش تولید و کاربرد آن‌ها داشته است (۲۸). با این حال وجود مسایلی از قبیل پیچیدگی ژنتیکی، چند ساله بودن و دگرگشنی (عموماً ناشی ازخود ناسازگاری و نرعقیمی) موجب شده که سرعت روش‌های کلاسیک در گراس‌ها و حتی سایر گیاهان علوفه‌ای در مقایسه با سایر گیاهان زراعی کمتر باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.4.8]

این امر لزوم انجام تلاش‌های مشترک متخصصان بیولوژی مولکولی و اصلاح‌گران گیاهی به‌منظور بهره‌گیری از روش‌های اصلاح مولکولی، به عنوان ابزارهای مکمل در توسعه ارقام علوفه‌ای و چمنی را آشکارتر می‌سازد (۱۲).

فسکیوی بلند (*Festuca arundinacea* Schreb.) از گراس‌های چند ساله علوفه‌ای است که در ایران پراکنش بالایی دارد و در اکثر مراتع، چراگاه‌ها و نواحی کوهستانی به ویژه مناطق مرکزی، غربی و شمالی کشور رویش داشته و از پتانسیل بالایی برای تولید علوفه به‌صورت زراعی و مرتعی برخوردار می‌باشد (۱۶). در فسکیوی بلند مانند بسیاری از گراس‌های علوفه‌ای به دلایلی از جمله وجود سیستم خودناسازگاری، طبیعت دگرگشن بودن و وجود گلهای کامل و ریز، امکان ایجاد هیبرید به نحوی که در ذرت مشاهده می‌شود، وجود ندارد و ایجاد رقم مصنوعی مرسوم‌ترین روش اصلاحی است (۷). روش تلاقی‌های نیمه خواهری (اعم از تاپ کراس، پلی کراس و آزادگرده افشانی) نه تنها به منظور تخمین قابلیت ترکیب‌پذیری عمومی ژنوتیپ‌ها (کلون‌ها)ی اولیه برای انتخاب والدین مناسب در ایجاد رقم ترکیبی استفاده می‌گردد, بلکه برای ایجاد نوترکیبی مجدد در مواد انتخاب شده (در برنامه‌های انتخاب دوره‌ای) و برآورد پارامترهای ژنتیکی نظیر وراثت‌پذیری و پیشرفت ژنتیکی در مطالعات ژنتیک کمی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۲). علاوه بر آزمون نتاج، ژنوتیپ‌های والدی برای ایجاد رقم ترکیبی در گراس‌های دگرگشن نظیر لولیوم و فستوکا می‌توانند بر مبنای نمود فنوتیپی و فاصله یا شباهت ژنتیکی آن‌ها نیز انتخاب شوند (۱۸) بطوری‌که اغلب شناسایی ترکیبات والدی دور برای ایجاد نتاج متفرق با تنوع ژنتیکی مناسب که بتواند بازده ناشی از انتخاب را افزایش دهد مفید خواهد بود (۱۱). هرچند در گزینش والدین تلاقی‌ها، قدرت ترکیب پذیری عمومی و هتروزیس معیار مناسبی است ولی هنگامی‌که تعداد زیادی از والدین در یک برنامه اصلاحی قرار داشته باشند، تعیین توانایی ترکیب پذیری وقت‌گیر و پرهزینه است و از طرفی این معیارها اغلب به‌وسیله اشتباهات آزمایشی کنترل نشده متاثر می‌گردند (۱۸). در این زمینه نشانگرهای مولکولی بدلیل فراوانی، خنثی بودن و پوشش بیش‌تر ژنوم می‌توانند نقش موثری ایفا کنند (۱۸) بنابراین محققان درصدد پیش‌بینی هتروزیس در سطح مولکولی برای تشخیص والدین مناسب هستند که در برخی گیاهان مطالعاتی نیز انجام شده است (۱، ۵، ۱۵، ۲۰ و ۲۹). نشانگرهای مولکولی می‌توانند در برنامه‌های تولید هیبرید از طریق تعیین گروه‌های هتروتیک، شناسایی ترکیبات والدی مناسب و مطالعه مکان‌های ژنی دخیل در هتروزیس ایفای نقش کنند. گزارش‌ها در زمینه این جنبه کاربردی نشانگرهای مولکولی در نباتات علوفه‌ای دگرگشن بسیار محدود و در سایر گیاهان نیز کارایی این روش متفاوت گزارش شده است. مطالعات در یونجه (۱۷) و چچم چند ساله (۱۳) نشان داده که نشانگرهای مولکولی در زمینه تمایز گروه‌های هتروتیک از توان بالایی برخور دارند. برناردو (٦) نشان داد که محاسبه تنوع ژنتیکی براساس RFLP می‌تواند انتخاب تلاقی‌های برتر بین اینبرد لاین‌های ذرت را تسهیل کند. چرس و همکاران (۹) بیان کردند که پیش‌بینی تظاهر F1 از طریق نشانگرهای مولکولی در آفتابگردان امکان پذیر است. تحقیقات در کلزا نشان داده که تنوع ژنتیکی والدین برای نشانگرهایRFLP به طور معنی‌داری با تظاهر (عملکرد) هیبریدها پیوسته بوده و هتروزیس می تواند به وسیله نشانگرهای مولکولی پیش‌بینی شود ولی استفاده از RFLPها به عنوان نشانگرهای مولکولی مشکل بوده است (۱۰). مطالعات در برخی دیگر از گیاهان نظیرجو (۱) و سویا (۸) نشان داده که بین فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگر مولکولی و هتروزیس عملکرد ارتباط منطقی پیدا نشده است. ریزماهواره‌ها یا توالی‌های تکراری ساده واحدهای نوکلوتیدی کوتاه (عموماً بین۲ تا ٦ نوکلوتید) هستند که به‌طور مکرر به دنبال هم تکرار می‌شوند. تنوع در تعداد واحدهای تکرار شونده ریزماهواره‌ها منجر به ایجاد تنوع در اندازه مکان‌های ژنی گشته که به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و الکتروفورز قابل آشکارسازی می‌باشد. از این نشانگرها می‌توان به‌عنوان ابزارهای مولکولی با پتانسیل بسیار بالا برای مطالعات ژنتیکی مختلف استفاده کرد (۲۳ و ۲۵). ریف و همکاران (۲۳) کارایی نشانگر SSR در تعیین فاصله ژنتیکی و پیش‌بینی هتروزیس در ذرت را بررسی نمودند. برای اولین بار در فسکیوی بلند حدود بیست هزار EST توسط ساها و همکاران (۲۵) شناسایی گردید که فراوانی SSRها در این بانک اطلاعاتی اولیه حدود ۱/۳ درصد بود که از بین آن‌ها ۱۵۳ آغازگر ریزماهواره طراحی و انتقال پذیری آن

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.4.8]

در برخی گونه‌های گندمیان مورد بررسی قرار گرفته است. پیتر اسکیم و همکاران (۲۰۰۸) انتقال پذیری و کارایی نشانگرهای معرفی شده را در بررسی تاثیر مدیریت مراتع بر روی دو گونه *Festuca pratensis* و *Lolium multiflorum* بررسی کردند. از آنجایی که نشانگرهای EST-SSR با نواحی کدشونده ژنوم پیوستگی دارد، به نظر می‌رسد بهتر از سایر نشانگرهای متداول بتوانند امکان ارزیابی مستقیم تفاوت‌های ژنتیکی را بین والدین فراهم کرده و اصلاح‌گر را در تصمیم‌گیری برای انتخاب والدین تلاقی برای توسعه یک رقم جدید کمک کند. داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی روی ژنوتیپ‌های فسکیوی بلند همچنین به عنوان مکملی برای داده های فنوتیپی به منظور شناسایی والدین برای تشکیل جوامع نقشه‌یابی مفید خواهد بود. در فسکیوی بلند کارایی استفاده از نشانگرها برای تعیین عملکرد رقم مصنوعی و همبستگی فاصله ژنتیکی والدین با نمود نتاج و قدرت ترکیب-پذیری عمومی مشخص نیست (۳). بر این اساس مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر فاصله ژنتیکی بین والدین بر اساس ارزیابی فنوتیپی و نشانگر مولکولی EST-SSR بر عملکرد و برخی خصوصیات جمعیت نتاج نسل بعد (رقم ترکیبی) طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

شناسایی دو گروه‌های ژنوتیپی (دارای تنوع محدود و تنوع وسیع) بر اساس ارزیابی فنوتیپی

بر اساس مطالعات قبلی تعداد ۲۵ ژنوتیپ فسکیوی بلند از درون یک ژرم پلاسم متنوع انتخاب شده بودند (۳) که به شکل غیر جنسی تکثیر و به‌صورت تکرارهای کلونی کشت گردیده و به مدت ۲ سال (۱۳۸٤ و ۱۳۸۵) در مزرعه دانشگاه صنعتی اصفهان تحت ارزیابی‌های کلونی قرار گرفتند بطوری که مجموعه‌ای از صفات زراعی، فنولوژیک و مرفولوژیک شامل امتیاز رشد بهاره، روز تا ظهور خوشه، روز تا گرده افشانی، تعداد ساقه بارور، ارتفاع بوته، عملکرد علوفه تر، عملکرد علوفه خشک، درصد ماده خشک، قطر یقه، طول خوشه، طول برگ و عرض برگ مورد بررسی قرار گرفتند (٤). بر اساس داده‌های فنوتیپی روی این ۲۵ ژنوتیپ و با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای دندروگرام ژنوتیپ-ها ترسیم و به کمک ماتریس فاصله اقلیدسی، تعداد ٦ ژنوتیپ دارای حداقل فاصله فنوتیپی (گروه دارای تنوع محدود) و ٦ ژنوتیپ دیگر دارای حداکثر فاصله فنوتیپی (گروه دارای تنوع وسیع) شناسایی شدند و در خزانه پلی کراس کشت شدند. شناسایی دو گروه‌های ژنوتیپی (دارای تنوع محدود و تنوع وسیع) بر اساس ارزیابی مولکولی با نشانگرهای EST-SSR به منظور استخراج DNAی ۲۵ ژنوتیپ اولیه، از پهنک برگ‌های جوان هر ژنوتیپ نمونه‌گیری گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA گیاهی DNeasy 96 (Qiagen, Hilden, Germany) انجام گردید. کمیت و کیفیت DNA توسط فلوری متر و نیز مشاهده روی ژل یک درصد آگارز تعیین گردید. از ۵۰ آغازگر EST-SSR بکار رفته در این پژوهش، ٤۰ آغازگر توسط ساها وهمکاران (۲۵) شناسایی و بکار گرفته شده بودند. این آغازگرها از بین هزاران EST در فسکیوی بلند، طراحی و انتقال پذیری آن‌ها بین چند گونه از گراس‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین ۱۰ آغازگر دیگر شامل ٤ آغازگر از چچم چند ساله (*Lolium perenne*) و ٦ آغازگر از چچم ایتالیایی(*Lolium multiflorum*) که در برخی گونه‌های جنس فستوکا نیز پلی مورفیسم نشان دادند (١٤)، مورد استفاده قرار گرفتند. اجزای واکنش و شرایط PCR مطابق پیتراسکم و همکاران (۲۳) انجام گردید. به‌منظور جداسازی فراوردهای تکثیر شده دستگاه ABI RISM 3100 Genetic Analyser با استفاده از پلی‌مر POP-4 و نشانگر استاندارد 400 HD مورد استفاده قرار گرفت (Applied Biosystems, Foster, Calif.). فایل‌های حاصل از دستگاه ABI توسط نرم افزارGene Marker, 1.51 تجزیه و امتیازدهی شدند. نشانگرهای حاصل بر حسب حضور یا عدم حضور باندها به صورت صفر و یک امتیازبندی شده و ماتریس دوتایی از داده‌ها را تشکیل دادند. این ماتریس به عنوان ورودی برای تجزیه‌های آماری مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA و بر اساس ماتریس تشابه Jacard با استفاده از نرم افزار NTSYS انجام شد. به کمک ماتریس تشابه و دندروگرام حاصله و بر اساس روش پیشنهادی کولیکر و همکاران (۱۸)، تعداد ٦ ژنوتیپ دارای حداقل فاصله (گروه دارای تنوع محدود از نظر مولکولی) و ٦ ژنوتیپ دارای حداکثر فاصله (گروه دارای تنوع وسیع از نظر مولکولی) شناسایی شدند و در خزانه پلی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.4.8]

کراس کشت گردیدند. برآورد قدرت ترکیب‌پذیری عمومی در آزمون نتاج پلی‌کراس جهت برآورد قدرت ترکیب‌پذیری عمومی ژنوتیپ‌ها به منظور تعیین والدین مناسب برای ایجاد رقم مصنوعی و مقایسه میزان انطباق آن با نتایج ارزیابی‌های مورفولوژیک (فنوتیپی) و مولکولی، از بذور حاصل از پلی کراس ٤ گروه (گروه دارای تنوع محدود به همراه گروه دارای تنوع وسیع بر اساس صفات مورفولوژیک و نیز گروه دارای تنوع محدود به همراه گروه دارای تنوع وسیع حاصل از آزمون مولکولی) به‌عنوان بذور خانواده‌های نیمه خواهری (فامیل‌های ناتنی) استفاده گردید. مجموعه‌ای از صفات زراعی، فنولوژیک و مرفولوژیک شامل، امتیاز رشد بهاره، روز تا ظهور خوشه، روز تا گرده افشانی، تعداد ساقه بارور، ارتفاع بوته، عملکرد تر و خشک علوفه، درصد ماده خشک و قطر یقه به مدت ۲ سال ثبت گردید و میانگین نتاج هر گروه ژنوتیپی برای مقایسه روش یش‌بینی فنوتیپی و مولکولی استفاده شدند. تجزیه و تحلیل های آماری به کمک نرم افزار SAS و SPSS انجام گردید. تجزیه تابع تشخیص با استفاده از نرم افزار SAS به منظور تمایز بین نتاج گروه‌های هتروتیک انجام گردید.

نتایج و بحث

با توجه به اینکه در روش گروه‌بندی، ژنوتیپ‌های داخل یک کلاستر حداقل فاصله ژنتیکی را داشته و میزان تنوع بین آن‌ها محدود می‌باشد (متشابه‌ترین) و از طرف دیگر ژنوتیپ‌های کلاسترهای مختلف حداکثر فاصله ژنتیکی را از یکدیگر داشته و دامنه تنوع بین آن‌ها وسیع‌تر است (متنوع‌ترین)، بر این اساس و نیز بر اساس متوسط فاصله ژنتیکی هر والد (جدول۱) تعداد ٦ ژنوتیپ از دورترین و ٦ ژنوتیپ دیگر از نزدیک‌ترین والدین بر اساس فاصله ژنتیکی مورفولوژیک (ارزیابی کلونی والدین) و نیز فاصله ژنتیکی مولکولی (EST-SSR) انتخاب و نمود آن‌ها در نسل بعد مورد بررسی قرار گرفت. جدول۱ شماره والدین انتخابی برای گروه‌های متنوع و متشابه به همراه متوسط فاصله ژنتیکی هر گروه و تفاوت آن با میانگین فواصل ژنتیکی کلیه ترکیبات (جامعه) را بر اساس ارزیابی‌های مورفولوژیک و مولکولی نشان داده است.

جدول ۱- متوسط فاصله ژنتیکی برای گروه‌های متنوع و متشابه والدین بر اساس ارزیابی مورفولوژیک و مولکولی

نحوه ارزیابی	گروه بر اساس دامنه تنوع	شماره والدین	متوسط فاصله اقلیدسی گروه	متوسط فاصله جاکارد گروه	درصد تفاوت با میانگین جامع*
فنوتیپی	وسیع (متنوع)	۲۴،۲۳،۱۹،۱۷،۱۳،۴	۱۲/۶۸	-	۳۶/۴۹
	محدود (متشابه)	۱۴،۱۲،۱۱،۷،۳،۲	۵/۶۸	-	-۳۸/۲۱
مولکولی	وسیع (متنوع)	۲۴،۲۰،۱۸،۱۳،۵،۲	-	۰/۴۴	۱۰
	محدود (متشابه)	۱۴،۱۳،۱۲،۱۱،۵،۴	-	۰/۳۸	-۵
میانگین		همه ۲۵ والد	۹/۲۹	۰/۴۰	-

* تفاوت متوسط فاصله ژنتیکی گروه مربوطه با میانگین کلیه فواصل ژنتیکی ژنوتیپ‌ها (ماتریس فاصله کلیه تلاقی های بین ژنوتیپ‌های جامعه

جدول۲- تجزیه واریانس بین گروه‌های نتاج دارای والدین متنوع و متشابه و میزان تنوع درون نتاج گروه‌ها بر اساس ارزیابی‌های فنوتیپی (کلونی) و مولکولی (EST-SSR)

	میانگین مربعات		تنوع درون نتاج انتخابی بر اساس ارزیابی مورفولوژیک والدین			تنوع درون نتاج انتخابی بر اساس ارزیابی مولکولی والدین		
صفت	مورفولوژیک	مولکولی	گروه متنوع	گروه متشابه	F*	گروه متنوع	گروه متشابه	F*
درجه رشد بهاره	۰/۲۵ns	۰/۷۸ns	۰/۱۵۳	۰/۶۶	۴/۳۴ns	۰/۲۳	۰/۱۵	۱/۵۱ns
روز تا گرده افشانی	۴۴/۰۵*	۱/۶۲ns	۷/۶۸	۹/۷۱	۱/۲۶ns	۱۰/۹۷	۱۲/۹۷	۱/۱۸ns
عملکرد علوفه خشک	۱۱۶۷۹ns	۱۳۹۰۴**	۳۱۳۰	۱۸۰۲	۱/۷۴ns	۳۸۲۰	۱۰۷۲	۳/۵۶ns
درصد ماده خشک	۰/۰۶ns	۰/۰۹ns	۰/۳۳	۰/۵۱	۱/۵۷ns	۰/۵۸	۰/۳۲	۱/۸۵ns
ارتفاع بوته	۶۶/۶۴*	۳۹/۴۶ns	۱۸/۴۴	۴/۷۲	۳/۹۱ns	۳۰/۳۲	۷/۵۴	۴/۰۲ns
تعداد ساقه	۰/۷۲ns	۲۴/۷۰*	۲/۸۱	۹/۷۸	۳/۴۸ns	۷/۸۳	۲/۵۸	۳/۰۳ns
قطر یقه	۰/۵۸ns	۲/۴۱*	۰/۳۸	۰/۴۴	۱/۱۶ns	۰/۵۱	۰/۲۴	۲/۱۳ns

* ns، *و ** به ترتیب عدم معنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

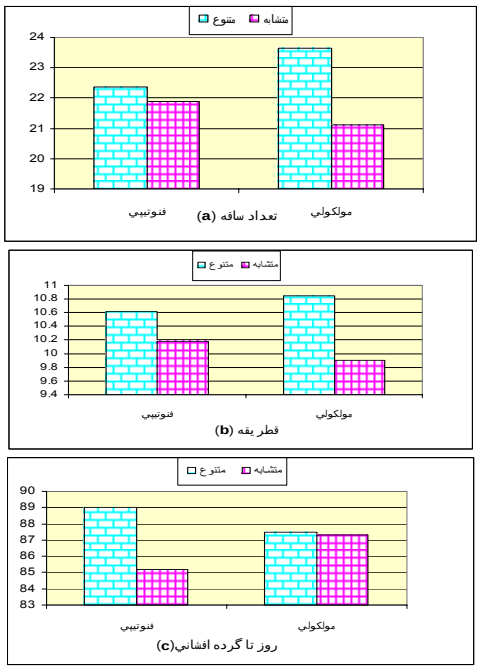
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.4.8]

متوسط فاصله ژنتیکی بین والدین انتخاب شده برای تنوع محدود در ارزیابی مورفولوژیک و مولکولی به ترتیب ۵۵ و ۱٤ درصد کمتر از والدین انتخاب شده برای تنوع وسیع بود. جدول ۲ نتایج تجزیه واریانس بین دو گروه فامیل‌های دارای والدین متنوع و فامیل‌های دارای والدین متشابه را بر اساس ارزیابی‌های مورفولوژیک (فنوتیپی) و مولکولی (EST-SSR) نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که وجود تنوع فنوتیپی بیش‌تر در بین والدها منجر به تاثیر معنی‌دار در نتاج برای صفات روز تا گرده‌افشانی و ارتفاع بوته گردید در حالی‌که میزان بیش‌تر تنوع مولکولی (EST-SSR) صفات عملکرد علوفه خشک، تعداد ساقه و قطر یقه را به طور معنی‌داری متاثر ساخت. معنی‌دار نبودن نسبت تنوع درون بین دو گروه متنوع و متشابه (F) برای هر دو نوع ارزیابی مرفولوژیک و مولکولی نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی بالا در والدین هرچند بر نمود برخی صفات تاثیر معنی‌دار دارد (که در ادامه ارایه می‌گردد)، اما تنوع درون نتاج نسل بعد را متاثر نمی‌سازد. به‌عبارت دیگر اگرچه از هر دو دیدگاه فنوتیپی و مولکولی، دو گروه والدین انتخابی (گروه دارای تنوع محدود و گروه دارای تنوع وسیع) از نظر تنوع کاملاً با همدیگر متفاوتند اما پس از یک نسل آمیزش تصادفی، تنوع فنوتیپی موجود در نتاج دو گروه به یکدیگر نزدیک می‌گردد. با این حال اینکه آیا تنوع مولکولی موجود در نتاج دو گروه تا چه حد به یکدیگر نزدیک می‌باشد به بررسی بیش‌تر نیاز دارد. مقایسه میانگین‌ها برای صفاتی که تنوع ژنتیکی بر نمود آن‌ها در نسل بعد تاثیر معنی‌دار داشته است در اشکال ۱ و ۲ نشان داده شده است. مقایسه میانگین برای عملکرد علوفه خشک (شکل۱–a) نشان می‌دهد که عملکرد علوفه نتاج پلی‌کراس‌های حاصل از والدین متنوع به لحاظ فنوتیپی (مرفولوژیک) با نتاج پلی‌کراس‌های حاصل از والدین متشابه فنوتیپی تفاوت معنی‌دار ندارد که می‌تواند بدلیل این باشد که خصوصیات ظاهری (مارکرهای مرفولوژیک) بدلیل محدودیت‌هایی نظیر تعداد کم و عدم پوشش کامل سطح ژنوم نمی‌توانند بطور کامل تفاوت‌های بین ژنوتیپ‌ها را مشخص نمایند. این در حالی است که این تفاوت برای تنوع مولکولی معنی‌دار بود به طوری‌که میزان افزایش عملکرد ناشی از تنوع بیش‌تر به لحاظ

شکل۱– مقایسه میانگین عملکرد علوفه خشک (a) و ارتفاع بوته (b) برای گروه‌های نتاج دارای والدین متنوع و متشابه بر اساس ارزیابی‌های مورفولوژیک و مولکولی (EST-SSR)

مولکولی برابر ٦۷/۷۵ گرم در مترمربع (معادل ۲٤/٦۲ درصد) برآورد گردید که بر ضرورت بهره‌گیری از ابزارهای مولکولی در مطالعه والدین و انتخاب دقیق آن‌ها برای حصول حداکثر عملکرد در نسل‌های بعدی ارقام مصنوعی تاکید دارد. مقایسه میانگین برای ارتفاع بوته (شکل۱–b) نشان می‌دهد که این صفت در اثر افزایش تنوع فنوتیپی حدود ٦ سانتی‌متر (معادل ۷ درصد) روند صعودی در نتاج داشته است ولی تفاوت معنی‌داری بین پلی‌کراس‌های حاصل از والدین دارای دامنه تنوع وسیع و تنوع محدود به لحاظ مولکولی مشاهده نگردید. کولیکر و همکاران (۱۸) در چچم چند ساله بر اساس نشانگر AFLP نشان دادند که پلی کراس‌های حاصل از والدین متنوع در مقایسه با پلی‌کراس‌های غیر متنوع حدود ۱٦ درصد عملکرد علوفه بیشتری داشته و از قامت بلندتری نیز برخوردار بودند. مقایسه میانگین برای تعداد ساقه و قطر یقه (شکل۲– a و b) نشان می‌دهد که تنوع فنوتیپی بیش‌تر تاثیرمعنی‌داری بر میزان هتروزیس این صفات ندارد ولی روز تا گرده افشانی را حدود ٤/۵۰ درصد افزایش داده است (شکل ۲–c). تنوع مولکولی بیشتر والدها بر اساس نشانگر EST-SSR، تعداد ساقه را به میزان ۱۲ درصد و قطر یقه را به میزان ۱۰ درصد در نتاج افزایش داد. نتایج نشان می‌دهد که میزان برتری انتخاب والدین به کمک مارکر در مقایسه کنترل آن بستگی دارد. نتایج جدول تجزیه واریانس و نمودارهای مقایسه میانگین حاکی از آن است که تنوع مورفولوژیک بالا بین واریته‌ها برای صفات

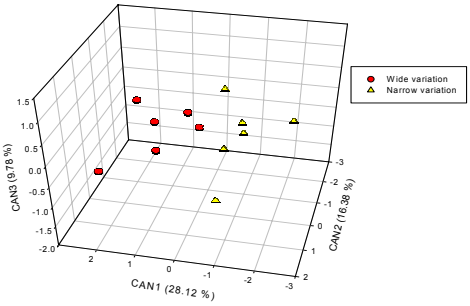
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.4.8]



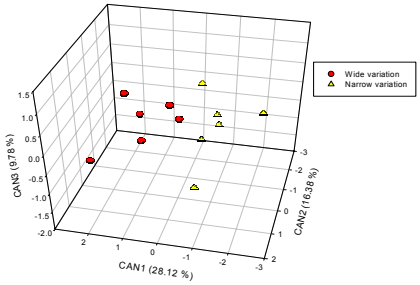
شکل ۲- مقایسه میانگین تعداد ساقه (a)، قطر یقه(b) و روز تا گرده افشانی(c) برای گروه‌های نتاج دارای والدین متنوع و متشابه بر اساس ارزیابی‌های مورفولوژیک و مولکولی (EST-SSR)

روز تا گرده‌افشانی و ارتفاع بوته که از معمولا وراثت پذیری بالایی برخوردار می‌باشند می‌تواند موجب افزایش این صفات و حدوث هتروزیس بیشتر در نسل‌های بعدی گردد، در حالی‌که نشانگر EST-SSR برای پیش‌بینی نمود صفات عملکرد، تعداد ساقه و قطر یقه که وراثت‌پذیری و پاسخ به گزینش کم‌تری دارند، بسیار موثر خواهد بود. صفاتی که وراثت‌پذیری پایینی دارند با تعداد بیشتری ژن کنترل شده و تاثیرپذیری بیش‌تری از محیط دارند (۲) از این رو استفاده از نشانگرهای مولکولی که سطح بیش‌تری از ژنوم را پوشش داده و تحت تاثیر محیط قرار نمی‌گیرند، در گزینش والدین برای این صفات موثرتر خواهد بود. ارتباط ضعیف بین تنوع نشانگرهای مولکولی و تنوع صفات مورفولوژیک دارای وراثت‌پذیری بالا در فسکیوی مرتعی و چچم چند ساله نیز گزارش شده است (۱۹). نتایج تجزیه تابع تشخیص کانونی برای نتاج پلی‌کراس حاصل از والدین متنوع و متشابه براساس ارزیابی‌های فنوتیپی و مولکولی در شکل ۳ (الف و ب) نشان داده شده است. برای داده‌های حاصل از نشانگر EST-SSR سه تابع کانونی اول که به‌ترتیب ۳۲/۳، ۲۲/۳ و ۱۲/٦ درصد از کل تنوع را توجیه نمودند، توانستند به خوبی شش پلی‌کراس حاصل از والدین متنوع را از شش پلی‌کراس دیگر متمایز کنند (شکل۳-الف). همچنین توابع تشخیص کانونی برای ارزیابی‌های فنوتیپی نیز که به ترتیب ۲۸/۱، ۱٦/٤ و ۹/۸ درصد از کل تنوع را توجیه نمودند، توانستند بین دو گروه تمایز ایجاد نمایند. این نتایج نشان می‌دهد که بر مبنای کلیه صفات مورد بررسی تفاوت در تنوع ژنتیکی والدین می‌تواند منجر به ایجاد تفاوت در نتاج نسل بعد آن‌ها و در نتیجه نمود واریته‌های حاصله گردد. نتایج پژوهش به وضوح سودمندی نشانگرهای مولکولی را برای انتخاب والدین پلی‌کراس نشان می‌دهد هرچند حصول نتایج دقیق‌تر نیاز به تحقیقات تکمیلی دارد. والدین متنوع بر اساس ارزیابی فنوتیپی ۳٦/۵ درصد و بر اساس ارزیابی مولکولی ۱۰ درصد تنوع بیش‌تری در مقایسه با متوسط فاصله کلکسیون ژرم پلاسم والدی دارا بودند و این مقادیر برای والدین دارای تنوع محدود (والدین متشابه) به‌ترتیب ۳۸/۲ و ۵ درصد بود (جدول ۱). این نتایج حاکی از آن است که علیرغم اینکه میزان تفاوت فاصله ژنتیکی والدین با متوسط جامعه بین دو گروه متنوع و متشابه در ارزیابی‌های فنوتیپی بسیار بیشتر از ارزیابی‌های مولکولی است (۳٦/۵ در مقایسه با ۱۰درصد)، ولی نمود نتاج پلی‌کراس نشان می‌دهد که عملکرد علوفه نسل بعد بر اساس انتخاب مولکولی بیشتر و معنی‌دار می‌باشد (شکل۱). اگر چه هتروزیس عموماً در اصلاح به روش هیبرید از طریق اینبرد لاین‌ها معروفیت دارد، ولی می‌تواند نقش مهمی نیز در اصلاح گیاهان علوفه‌ای دگرگشن ایفا کند (۷). ارتباط معنی‌دار بین تنوع موجود در والدین و عملکرد نتاج در این پژوهش حاکی از وجود اثرات هتروتیک در جوامع ساختگی است. پیش‌بینی این هتروزیس درسطح مولکولی نه تنها امکان تشخیص والدین قبل از آزمون‌های پرهزینه برای تعیین قابلیت ترکیب‌پذیری را فراهم می‌آورد، بلکه می‌تواند سرعت فراین‌های اصلاحی را تسریع کند. از آنجایی‌که برآوردهای تنوع ژنتیکی به شدت به نوع گیاه، نوع تکنیک نشانگر، تعداد نشانگر و شاخص تنوع بکار رفته بستگی دارد، مقایسه نتایج حاصل با سایر گزارشات مشکل به نظر می‌رسد. هر چند نشانگرهای مولکولی به طور موفقیت‌آمیزی برای پیش‌بینی هتروزیس در گونه‌هایی نظیر ذرت (٦ و ٢٤)، برنج و گندم (۲۱)، یونجه (۱۷)، آفتابگردان (۹) و کلزا (۱۰) استفاده شده است، ولی گزارشات در زمینه این جنبه کاربردی نشانگرهای مولکولی در تولید هیبرید یا شبه هیبریدها

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.4.8]



(الف)



(ب)

شکل۳- تجزیه تابع تشخیص برای تمایز نتاج ناتنی حاصل از والدین متنوع (Wide) و متشابه (Narrow) براساس ارزیابی‌های مولکولی (الف) فنوتیپی (ب)

(Semi-hybrids) از طریق تعیین گروه‌های هتروتیک، شناسایی ترکیبات والدی مناسب و مطالعه مکان‌های ژنی دخیل در هتروزیس به ویژه در گراس‌های علوفه‌ای بسیار محدود است به‌طوری که پژوهش حاضر به عنوان اولین کاربرد از نشانگر EST-SSR و دومین گزارش از کاربرد نشانگرهای مولکولی در بهبود نتاج گراس‌های علوفه‌ای است. کولیکر و همکاران (۱۸) برای اولین بار در گراس‌های علوفه‌ای با استفاده از ۱۸٤ نشانگر AFLP، نقش تنوع مولکولی را در پیش‌بینی هتروزیس در چچم چند ساله مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که این نشانگر کارایی بالایی در پیش‌بینی نمود نتاج از نظر عملکرد علوفه خشک دارد ولی برای روز تا گرده افشانی بین گروه‌های متنوع و متشابه تفاوت معنی‌داری در نتاج مشاهده نکردند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. به نظر می‌رسد امکان بهره‌گیری از نشانگرها در پیش‌بینی نمود نتاج به نوع گیاه، نوع نشانگر و صفات مورد بررسی بستگی داشته باشد زیرا که در برخی گزارش‌ها بین تنوع ژنتیکی والدین با نمود هیبریدها ارتباط معنی‌دار دیده نشده است به عنوان مثال در جو (۱) و سویا (۸) بین فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگر مولکولی و هتروزیس عملکرد ارتباط منطقی یافت نگردیده است. استفاده از نشانگرهایی که به ژن‌ها یا مکان‌های مشخصی پیوسته هستند در مقایسه با نشانگرهای تصادفی، می‌تواند در انتخاب والدین دارای هتروزیس بیش‌تر، سودمندتر باشد (۷). از آنجایی که نشانگرهای EST-SSR با نواحی کدشونده ژنوم پیوستگی دارد, به نظر می‌رسد بهتر از سایر نشانگرهای متداول بتوانند امکان ارزیابی مستقیم تفاوت‌های ژنتیکی را بین جفت والدین فراهم کرده و اصلاح‌گر را در تصمیم‌گیری برای انتخاب والدین تلاقی برای توسعه یک واریته جدید کمک کند. بر طبق قوانین ثبت واریته‌ها (UPOV) (۲۷) میزان خاصی یکنواختی به‌ویژه از نظر صفات کلیدی باید درون رقم مصنوعی تولید شده وجود داشته باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که اگر چه تنوع بالاتر منجر به سازگاری و نمود بهتر نتاج گردید، اما تنوع بیشتر در والدین منجر به ایجاد تنوع بیشتر در نتاج پلی‌کراس آن‌ها نمی‌گردد که این امر به‌عنوان یک مزیت در ایجاد واریته مصنوعی با یکنواختی مناسب مطرح می‌باشد. این نتیجه به همراه نمود بسیار برتر نتاج حاصل از انتخاب مولکولی (به‌عنوان مثال ۲۵ درصد افزایش عملکرد) بر ضرورت اصلاح پلی‌کراس‌ها به کمک نشانگرهای مولکولی تاکید می‌کند. در مجموع نتایج این پژوهش حاکی از شواهدی برکارآمدی نشانگر EST-SSR در گزینش والدین متنوع ژنتیکی است که منجر به افزایش عملکرد واریته مصنوعی گشته و تغییری در یکنواختی نمود فنوتیپی نتاج ایجاد نمی‌کند. با این حال تایید نهایی این نتایج و استفاده عملی از آن‌ها نیازمند انجام مطالعات بیشتر می‌باشد.

منابع

۱. ترابی س، امیدی م، شاه نجات بوشهری ع ا و قنادها م ر (۱۳۸٤) مقایسه فاصله ژنتیکی و مورفولوژیکی با هتروزیس بر اساس نشانگر RAPD در هیبریدهای جو، علوم کشاورزی ایران، ۳٦: ٤۹۳-۵۰۱ .

۲. فرشادفر ع (۱۳۷٦) روش‌شناسی اصلاح نباتات، انتشارات دانشگاه رازی کرمانشاه.

۳. مجیدی م م، میرلوحی ا و محمدی ر. ۱۳۸۸. ارزیابی تنوع، ارتباط صفات و تعیین فاصله ژنتیکی در جمعیت‌های فسکیوی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.4.8]

بلند (*Festuca arundinacea* Schreb.). مجله علوم کشاورزی ایران. ٤٠ : ٨٩-٩٨٤

٤. مجیدی م م، و میرلوحی ا (١٣٨٩). ارزیابی کلونی و تعیین قرابت ژنتیکی ژنوتیپ های فسکیوی بلند (*Festuca arundinacea* Schreb. پژوهش کشاورزی. تحت چاپ.

5. Baril CP, Verhaegn D, Vigneron P, Bouret JM and Kremer A. (1997) I : Structure of the specific combining ability between two species of Eucalyptus. I. RAPD data. *Theor. Appl. Genet*. 94: 769-803.

6. Bernardo R, (1993) Estimation of coefficient of coancestry using molecular markers in maize. *Theor. Appl. Genet*. 85 :1055-1062.

7. Brummer EC (1999) Capturing heterosis in forage crop cultivar development. Crop Sci. 39:943-954.

8. Cerna FJ, Cianzio SR, Rafalshi A, Tingey S, and Dyer D, (1997) Relationship between seed yield heterosis and molecular marker heterozygosity in soybean. *Theor. Appl. Genet*. 95: 460-467.

9. Cheres MT, Miller J F, Grane JM, and Kapp SJ (2000) Genetic distance as a predictor of heterosis and hybrid performance within and between heterotic groups in sunflower. *Theor. Appl. Genet*. 100: 889-894.

10. Diers, BW, Mcretty PBE and Osbom TC (1996) Relationship between heterosis and genetic distance based on RFLP markers in oilseed rape (*Brassica napus* l.). *Crop Sci*. 36: 79-83.

11. Guthridge KM, Dupal MP, Jones ES, Kolliker R, Smith KF, and Forster JW (2001) AFLP analysis of genetic diversity within and between populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). P. 141 *In*: *Plant and Animal Genome*. *The 9th International Conference on the Status of Plant and Animal Genome Research*, San Diego. Scherago Int., New York.

12. Hopkins A, Wang ZY, Mian R, Sledge M and Barker RE (2003). Preface. *Proceedings of the 3th International Symposium of Molecular Breeding of Forage and Turf*. Dallas, Texas and Ardomore, Oklahama, May, 18-22 (2003), U.S.A. P. 12.

13. Huff, DR (1997). RAPD characterization of heterogeneouse perennial ryegrass cultivars. *Crop Sci*. 37: 557-564.

14. Jones, ES, Dupal MP, Kolliker R, Drayton MC and Forster JW (2001) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor. Appl. Genet*. 102: 405-415.

15. Joshi SP, Bhave SG, Chowdari KV, Apte GS, Dhonukshe BL, Latitha K, Ranjekar PK, and Gupta VS (2001) Use of DNA markers in prediction of hybrid performance and heterosis for a three-line hybride system in rice. *Bioch. Genet*. 39: 179-199.

16. Khayam-Nekouei. M., A. F. Mirlohi, M. Naderi-Shahab, S. Meon, A. M. Ali and S. Napis. 2000. Genetic diversity of tall fescue in Iran. Proceeding of the 4th National Congress on Genetics, Genting Highlands, Malaysia.

17. Kidwell KK, Hartweck LM, Yandell BS, Crump PM, Brummer JE, Moutray J and Osborn TC (1999) Forage yields of Alfalfa populations derived from parents selected on the basis of molecular marker diversity. *Crop Sci*. 39: 223-227.

18. Kolliker R, Boller B and Widmer F (2005) Marker assisted polycross breeding to increase diversity and yield in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Euphytica* 146: 55-65.

19. Kolliker R, Stadelmann FJ, Reidy B and Nosberger J (1999) Genetic variation of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds, *Lolium perrene* L. and *Dactylis glomerata* L. *Euphytica* 106: 261-270.

20. Liu Z Q, Pei Y, and Pu ZJ (1999) Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Breed*. 118: 119-123.

21. Melchinger, AE (1999) Genetic diversity and heterosis. In: Coors JG and Pandey S (Eds.), *Genetic and Exploitation of heterosis in Crops*. ASA-CSA and SSSA. Madison, Wisconsin, USA.

22. Nguyen HT, and Sleper DA (1983) A: Theory and application of half-sib mating in forage grass breeding. *Theor. Appl. Genet*. 64: 187-196

23. Peter-Schimid MKI, Boller B, and Kolliker R (2008) Habitat and management affect genetic structure of *Festuca pratensis* but not *Lolium multiflorum* ecotype populations. Plant Breed. 127: 510-517 .

24. Reif JC, Melchinger AE, Xia XC, Warburton M, Hoisington DA, Vasal SK, Srinivasan G, Bohn M and Frisch M (2003). Genetic distance on SSR and heterosis in tropical maize population. *Crop Sci*. 43: 1275-1282.

25. Saha MC, Mian MAR, Eujayl I, Zwonitzer JC, Wang L and May GD (2004). Tall fescue EST-SSR markers with transferability across cereal grass species. *Theor. Appl. Genet*. 109: 783-791.

26. Ubi BE, Kolliker R, Fujimori M and Komatsu T (2003) Genetic diversity in diploid cultivars of Rhodesgrass determined on the basis of amplified fragment length polymorphism markers. *Crop Sci*. 43: 1516-1522.

27. UPOV (2002) General introduction to the examination of distinctness, uniformity and stability and the development of harmonized descriptions new varieties of plants. *International union of the protection of new varieties of plants*. Geneva. Switzerland.

28. Wang Z, Hopkins A and Main R (2001) Forage and turfgrass biotechnology. *Crit Rev. Plant Sc*i. 20: 573-619.

29. Xu WJ, Virmani SS, Hernandez JE, Sebastian LS, Redona ED and Li Z K (2002) Genetic diversity in the parental lines and heterosis of the tropical rice hybrids. *Euphytica* 127: 139-148

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.4.8]