مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان (*Triticum aestivum* L.) از طریق صفات مورفوفیزیولوژیک و نشانگرهای مولکولی SSR

مریم نظری[1]، روح الله عبدالشاهی*[2]

[1] **دانشجوی کارشناسی ارشد سابق، گروه زراعت و اصلاح نبات، دانشگاه شهید باهنر کرمان.**

[2] **استادیار، گروه زراعت و اصلاح نبات، دانشگاه شهید باهنر کرمان.**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۰۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۳/۳۰

چکیده

وجود تنوع ژنتیکی شرط ضروری برای موفقیت در برنامه‌های به‌نژادی است. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی از طریق برخی از صفات مورفوفیزیولوژیکی و نشانگرهای SSR، ٤٠ رقم گندم نان در یک طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار در مزرعه پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال ۱۳۹۰-۱۳۸۹ مطالعه شدند. ژنوتیپ‌های گندم نان برای تمامی صفات مورد بررسی تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای نشان دادند. تعداد پنجه‌های بارور بیشترین همبستگی را با عملکرد دانه نشان داد. در آزمایش SSR از مجموع ۱۰ آغازگر انتخابی، ۹ آغازگر چند شکلی قابل توجهی نشان دادند. برای مجموع ژنوتیپ ها ۳۱ نوار چند شکل با میانگین ۳/٤ نوار به ازای هر آغازگر مشاهده شد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار کل جمعیت در تمام جایگاه های ژنی به طور متوسط ۰/۳٦ ارزیابی شد و جایگاه ژنی wmc 420 دارای بیشترین تنوع بر روی جمعیت مورد مطالعه بود. تجزیه کلاستر با استفاده از روش وارد انجام شد و ارقام بر اساس میزان شباهت‌ها گروه‌بندی شدند. اطلاعات این گروه بندی می‌تواند در پروژه‌های به‌نژادی برای افزایش عملکرد در شرایط تنش مورد استفاده قرارگیرد.

واژه های کلیدی *: تنوع ژنتیکی، گندم نان، نشانگر SSR، صفات مورفو-فیزیولوژیک، تجزیه کلاستر.*

* نویسنده مسئول: روح الله عبدالشاهی تلفن: ۰۹۱۷۷۳٦۷۱۱۹ Email:abdoshahi@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه های اصلاحی و حفاظت از منابع ژنتیکی دارد. افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات زراعی و استفاده بهینه از ذخایر ژنی مستلزم جمع آوری، نگهداری، توصیف و ارزیابی مواد ژنتیکی است (Pearce *et al*., 2000). نخستین ارزیابی‌های تنوع، بر اساس نتایج مورفولوژی و ارزیابی صفات زراعی بوده است که هنوز هم عمدتا بدلیل سادگی آن ها و البته بسته به هدف محقق و میزان دقت، مورد استفاده قرار می گیرند. گندم به عنوان مهمترین گیاه زراعی در جهان و ایران دارای ژنوتیپ های زیادی است که در برنامه های اصلاحی مورد استفاده قرار می گیرد. بنابراین، لازمه استفاده کارا و صحیح از آن ها، شناسایی روابط ژنتیکی ژنوتیپ ها و تعیین سطح تنوع موجود می باشد. امروزه از نشانگرهای مولکولی DNA به عنوان ابزاری مفید برای ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ژرم پلاسم و تعیین مکان ژن های مقاومت به بیماری و تنش های محیطی و همچنین رابطه بین اجداد وحشی و رقم های اصلاح شده در گیاهان استفاده می شود. در این میان، نشانگر های ریز ماهواره یا SSRها به دلیل چند شکلی بالا، توارث پذیری، همبارز بودن و فراوانی در گیاهان، نشانگرهای ایده آلی برای دامنه وسیعی از کاربردها از جمله تهیه نقشه ژنتیکی، گزینش به کمک نشانگر، مطالعات ژنتیکی و تکاملی، انگشت نگاری ژنتیکی، تجزیه و تحلیل شجره نامه ها و مشخص کردن میزان تغییرات تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم هستند (Kolliker *et al*., 2001; Condon *et al*., 2008). نشانگرهای ریز ماهواره عموما سطوح بالاتری از چند شکلی را نشان می دهند و با توجه به فراوانی تعداد آلل در هر لوکوس حتی قادر به تمایز بین رگه های بسیار مشابه نیز هستند (Nachit *et al*., 2001; Mohan *et al*., 1997). در گندم نشانگرهای متعددی از قبیل RAPD، RFLP، STS، ISSR و SSR استفاده شده اند. از بین این نشانگرها، ریزماهواره ها کاربرد بیشتری را در مقایسه با سایر نشانگرها پیدا کرده‌اند (Khlestkina *et al*., 2002). در آزمایشی تنوع ژنتیکی ٥٤ رقم قدیمی و جدید گندم بهاره با ۲۳ جایگاه ریزماهواره ارزیابی و در مجموع ۱۵۱ آلل با تعداد آلل بین ۱۱-۳ آلل و میانگین ٦/۹ آلل برای هر جایگاه گزارش شد (Khlestkina *et al*., 2004). در بررسی الگوی تغییرات ژنتیکی درون و بین دو مجموعه ارقام بومی گندم نگهداری شده در مرکز بین المللی اصلاح گندم و ذرت (CIMMYT) با استفاده از ٧٦ نشانگر ریزماهواره، تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای درون توده های مکزیکی و ترکیه مشاهده شد(Dresigacker *et al*., 2004).

افزایش عملکرد دانه و بهبود صفات زراعی وابسته به آن از مهمترین ویژگی های مورد نظر اصلاح گران به منظور دستیابی به ژنوتیپ های برتر می باشد. انتخاب بر اساس اغلب صفات

Archive of SID

www.SID.ir

مورفولوژیک همانند عملکرد و اجزای آن به دلیل سهولت اندازه گیری، ممکن است روشی سریع و مطمئن جهت غربال جوامع گیاهی برای بهبود عملکرد دانه باشد (Yildrim *et al*., 1993). روش های غربال ژنوتیپ ها که اساس فیزیولوژیک داشته باشند را می‌توان برای گزینش مواد والدین یا غربال سریع جمعیت های در حال تفرق استفاده نمود (Winter *et al*., 1988).

اهداف این مطالعه، بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم از طریق برخی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و نشانگرهای مولکولی SSR و تعیین روابط ژنتیکی آن‌ها جهت شناسایی والدین مناسب برای برنامه های اصلاحی و ژنتیکی بود.

مواد و روش ها

جهت بررسی تنوع ژنتیکی در ٤٠ رقم گندم نان (جدول ١) آزمایشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ٣ تکرار در مزرعه پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال ١٣٨٩ اجرا شد. اندازه هر کرت آزمایشی ١٢٥ در١٢٠ سانتی متر شامل ٦ ردیف ١٢٠ سانتی متری با فاصله ٢٥ سانتی متر بین ردیف های کاشت بود، همچنین بر روی هر خط ٤٠ عدد بذر با فاصله ٣ سانتیمتر از هم کاشت شد.

جدول ١- ارقام گندم نان مورد مطالعه.

Table 1-Bread wheat cultivars used in this study.

Cultivar	رقم	cultivar	رقم	cultivar	رقم	Cultivar	رقم
Rasool	رسول	Bzostaya	بزوستایا	mv-17	mv-17	Roshan	روشن
Omid	امید	Sabalan	سبلان	Chamran	چمران	Alamout	الموت
Moghan 2	مغان ٢	Sholeh	شعله	Hirmand	هیرمند	Gaspard	گاسپارد
Karaj 3	کرج ٣	Star	استار	Ws-82-9	Ws-82-9	Shiraz	شیراز
Dez	دز	Hamoon	هامون	Akbari	اکبری	Tous	طوس
Sardari	سرداری	Azadi	آزادی	Zarin	زرین	Bahar	بهار
Darab 2	داراب ٢	Mahdavi	مهدوی	Zagros	زاگرس	Bam	بم
Niknejd	نیک نژاد	Shahpasand	شاه پسند	Ghods	قدس	Alvand	الوند
Karaj 2	کرج ٢	Marvdasht	مرودشت	Tajan	تجن	Vee Nac	وی ناک
Excalibur	اکسکلیبر	Azar 2	آذر٢	Kavir	کویر	Pishtaz	پیشتاز

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک

در این تحقیق صفات زراعی و مورفولوژیک عملکرد دانه، وزن هزار دانه، تعداد پنجه بارور، قوه نامیه، تعداد روز تا گلدهی، تعداد روز تا رسیدگی، تعداد روز تا پر شدن دانه، سطح برگ و سطح ویژه برگ و صفت فیزیولوژیکی محتوای کلروفیل برگ پرچم اندازه گیری شد. تاریخ گلدهی زمانی در نظر گرفته شد که بیش از ۵۰ درصد بوته های هر کرت به گل رفته باشند و تاریخ رسیدگی زمانی در نظر گرفته شد که بیش از ۵۰ درصد بوته های هر کرت در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک باشند و ساقه ها حالت شکنندگی داشته باشند. شمارش تعداد پنجه بارور بر روی خط دوم هر کرت آزمایشی انجام گرفت. برای ارزیابی وزن هزاردانه تعداد ۲۰۰ دانه از خوشه های تصادفی شمرده و بعد از توزین در عدد ۵ ضرب شد. برای اندازه گیری سطح برگ، در انتهای مرحله گلدهی یک بوته به صورت تصادفی انتخاب، برگ های بوته جدا، نمونه های برگی روی کاغذ چسبانده و از آن ها کپی کاغذی تهیه شد. تصویر برگ ها با قیچی جدا و وزن آن ها یادداشت شد. سپس از جنس کاغذ کپی مربعاتی با ابعاد مختلف تهیه، وزن آن ها یادداشت شد و با استفاده از رابطه خطی بین داده های مربوط به وزن و مساحت مربعات کاغذی، مساحت کل برگ ها محاسبه شد (Hassibi, 2012) و سطح ویژه برگ از نسبت سطح برگ به وزن خشک برگ بدست آمد. مقدار کلروفیل a و b در نمونه های برگ با روش هضمی و بر مبنای روش طیف سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های ٦٦٣/٢ و ٦٤٦/٨ نانومتر به ترتیب برای کلروفیل a و b محاسبه شد (Dere *et al*., 1998). تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک شامل تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و تعیین همبستگی بین صفات با استفاده از نرم افزار SAS ver. 9.1 انجام شد. برای گروه بندی ارقام از تجزیه خوشه ای با روش وارد از نرم افزار Minitab استفاده شد(Amini *et al*., 2008). در انتها با روش تابع تشخیص نیز گروه بندی انجام شد و گروه بندی‌های کلاستر توجیه شد.

ارزیابی مولکولی

استخراج DNA از برگ های جوان به روش CTAB انجام شد (Doyle & Doyle, 1987). کیفیت و کمیت DNA استخراجی از طریق اسپکتروفتومتری و مطالعه طیف جذبی DNA در طول موج های ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر و نیز الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از ۱۰ آغازگر SSR اختصاصی که در مطالعات سایر محققان کیفیت آللی مناسب و میزان پلی مورفیسم بالایی را بین ارقام گندم نشان داده بودند انجام شد (جدول ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٢- اسامی آغازگرهای ریز ماهواره مورد استفاده در آزمایش.

Table 2- The names of the SSR primer pairs used in the experiment.

اسم آغازگر Name of primer	توالی رفت Forward 3´→5´	توالی برگشت Reverse 5´→3´	دمای اتصال Annealing temp. (°C)
gwm304	AGGAAACAGAAATATCGCGG	AGGACTGTGGGGAATGAATG	58
barc328	GCGTTGGGACACTTCGTATATCTTCT	TTGCATTATTGGTATTGGGGAGAT	68
wmc48	GAGGGTTCTGAAATGTTTTGCC	ACGTGCTAGGGAGGTATCTTGC	63
barc121	ACTGATCAGCAATGTCAACTGAA	CCGGTGTCTTTCCTAACGCTATG	64
gwm413	TGCTTGTCTAGATTGCTTGGG	GATCGTCTCGTCCTTGGCA	60
gwm617	GATCTTGGCGCTGAGAGAGA	CTCCGATGGATTACTCGCAC	62
xgwm601	ATCGAGGACGACATGAAGGT	TTAAGTTGCTGCCAATGTTCC	62
xwmc420	ATCGTCAACAAAATCTGAAGTG	TTACTTTTGCTGAGAAAACCCT	60
xwmc89	ATGTCCACGTGCTAGGGAGGTA	TTGCCTCCCAAGACGAAATAAC	66
gdm132	ACCGCTCGGAGAAAATCC	AGGGGGGCAGAGGTAGG	56

واکنش PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن و در حجم ١٠ میکرولیتر شامل ١ میکرولیتر بافر PCR ١٠x، ٠/٢٥ میکرولیتر کلرید منیزیم ٥٠ میلی مولار، ٠/٢٥ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase، ٠/٧٥ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ١٠ میکرومولار، ٠/٢٥ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) ١٠ میلی مولار و ٢٠ نانوگرم DNA ژنومی در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. الگوی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به این شرح بود: الف) یک چرخه واسرشت اولیه به مدت ٣ دقیقه در دمای ٩٤ درجه ب) ٣٥ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ٩٤ درجه به مدت یک دقیقه ج) اتصال آغازگر به الگو در دمای ٦٨-٥٦ درجه به مدت یک دقیقه د) بسط در دمای ٧٢ درجه به مدت یک دقیقه و ه) یک چرخه بسط نهایی به مدت ١٠ دقیقه در دمای ٧٢ درجه. محصولات PCR با استفاده از ژل اکریل آمید ٨ درصد با ولتاژ ١٣٠ ولت طی یک ساعت الکتروفورز تفکیک شدند. رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت ١٥ دقیقه انجام شد. در انتها ژل با آب مقطر شسته و توسط دستگاه ژل داک عکس‌برداری انجام شد. پس از حذف آغازگرهای با تکثیر نامناسب، آغازگرهای چندشکل بدست آمده روی ٤٠ ژنوتیپ بر اساس دستور العمل نرم افزار Alpha Ease FC 4 و NTSYS ver 2.02 و Pop Gene 32، به روش صفر ویک و حروف لاتین رتبه بندی شدند و داده‌ها با استفاده از این ٣ نرم افزار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت بدست آوردن تعداد آلل مشاهده شده (N_O)، تعداد آلل موثر (N_E)، شاخص شانن (I)، شاخص تنوع ژنی نی (h)، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) از نرم افزار Pop Gene 32 استفاده شد. همچنین ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار NTSYS ver 2.02 انجام شد. جهت مشخص شدن رابطه میزان همبستگی بین دندروگرام های حاصل از داده های مورفو-فیزیولوژیک و

Archive of SID

www.SID.ir

مولکولی با همدیگر از آزمون مانتل استفاده شد (Powel *et al*., 1996).

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات مورفو-فیزیولوژیک (جدول ۳) نشان داد که ارقام گندم در همه صفات مورد ارزیابی تنوع داشتند. این اختلاف برای صفات میزان کلروفیل a و سطح ویژه برگ در سطح ۵ درصد و برای بقیه صفات در سطح یک درصد معنی دار شد. مقایسه میانگین ها برای تمامی صفات با استفاده از آزمون دانکن در جدول ۵ آورده شده است. دامنه اختلاف زیاد بین بیشترین و کمترین میزان صفات در ارقام مورد بررسی نشان دهنده تنوع زیاد بین ارقام است به عنوان مثال در مورد صفت میزان عملکرد دانه، ارقام کرج ۲ و رسول به ترتیب با میانگین عملکرد ٤/٥٢٥ و ۱/۹۵۰ تن در هکتار، بیشترین و کمترین مقدار را داشتند. ارزیابی همبستگی بین صفات (جدول ٤) نشان داد که عملکرد دانه بیشترین همبستگی را با صفت تعداد پنجه بارور (**۰/٥٦) داشت. این همبستگی نشانگر تاثیر زیاد صفت تعداد پنجه بارور بر روی عملکرد دانه می‌باشد. با توجه به جدول ٤ در این مطالعه بین برخی صفات مورفو-فیزیولوژیک همبستگی‌های معنی‌داری مشاهده شد. جهت گروه بندی ارقام از نظر صفات مورفو-فیزیولوژیک از تجزیه کلاستر به روش وارد استفاده شد (شکل ۱). برش دندروگرام در نقطه ای که بیشترین فاصله را بین گروه ها ایجاد نمود صورت گرفت. با روش تابع تشخیص نیز گروه بندی انجام شد و ۱۰۰٪ گروه بندی‌های کلاستر توجیه شد. بر اساس تصویر دندروگرام حاصل، ارقام مورد بررسی به ۳ دسته تقسیم شدند. در دسته اول ارقام شاه پسند، امید، کرج۳ وگاسپارد، در دسته دوم ارقام نیک نژاد، مغان۲، مهدوی، قدس، زاگرس، تجن، استار، کرج۲، داراب۲، روشن، هامون، زرین، بزوستایا، بهار، سرداری، شعله، آذر۲، الوند، طوس، mv-17، سبلان، مرودشت، شیراز، الموت و در دسته سوم ارقام بم، رسول، ws-82-9، اکسکلیبر، وی ناک، دز، چمران، آزادی، پیشتاز، کویر، هیرمند و اکبری قرار گرفتند. شاخص ترین ویژگی ارقام گروه ۱ نسبت به گروه ۲ و ۳ دیررسی، دیر گلدهی و طول دوره پر شدن کوتاهتر بود. در تجزیه مولکولی از مجموع ۱۰ آغازگر مورد استفاده ۹ آغازگر چند شکلی قابل توجهی نشان دادند. باندهای ایجاد شده توسط این آغازگرها در محدوده ٥۰ تا ۳۱۸ جفت باز قرار داشتند. برای مجموع ژنوتیپ ها ۳۱ نوار چند شکل با میانگین ۳/٤ نوار به ازای هر آغازگر تشکیل گردید. در مورد اهمیت تعداد آلل‌های تکثیر شده باید به این نکته اشاره کرد که تعداد آلل های تکثیر شده از مکان‌های ژنی، تأثیر مستقیمی بر میزان هتروزیگوسیتی و میزان اطلاع رسانی آن مکان برای تعیین تنوع ژنوتیپی دارد. نتایج تجزیه مولکولی در جدول ٦ آورده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٣- تجزیه واریانس صفات مورفو- فیزیولوژیکی در ارقام گندم نان.

Table 3- Analysis of variance for morpho-physiological traits in bread wheat cultivars.

			میانگین مربعات (MS)					
S.O.V.	منابع تغییر	درجه آزادی df	عملکرد دانه GY: Grain yield	وزن ۱۰۰۰ دانه 1000-GW: 1000-grain weight	تعداد پنجه بارور NT: Number of tillers	روز تا گلدهی DF: Days to flowering	روز تا رسیدگی DM: Days to maturity	روز تا پر شدن دانه DFG: Days to filling grain
Replication	تکرار	2	3.32 **	0.21	763.28 **	3.45 **	7.96 **	101.19 **
Cultivar	رقم	39	1.20 **	1.76 **	1570.76 **	90.93 **	21.65 **	44.35 **
Error	خطا	78	0.26	0.14	150.97	0.56	1.86	5.74
٪ CV	ضریب تغییرات		14.85	6.14	11.52	0.51	0.72	5.58

			میانگین مربعات (MS)				
S.O.V.	منابع تغییر	درجه آزادی df	قوه نامیه V: Viability	سطح برگ LA: Leaf area	سطح ویژه برگ SLA: Specific leaf area	کلروفیل a Chl. a: Chlorophyll a	کلروفیل b Chl. b: Chlorophyll b
Replication	تکرار	2	0.02 **	2656.76	62.84	51.48 **	24.30
Cultivar	رقم	39	0.02 **	** 7379.67	612.66 *	20.00 *	20.29 **
Error	خطا	78	0.002	1024.10	340.88	10.24	8.61
٪ CV	ضریب تغییرات		6.02	29.59	13.25	19.82	25.73

*** و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ٥ و ١ درصد**

*** and **: significant at 0.05 and 0.01 probability level, respectively.**

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٤- ضرایب همبستگی بین صفات مورفو- فیزیولوژیکی در ارقام گندم نان.

Table 4- correlation coefficients for morpho-physiological traits in bread wheat cultivars.

صفات Traits	عملکرد GY	وزن ۲۰۰ دانه 200GW	تعداد پنجه NT	بارور FT	روز تا گلدهی DF	روز تا رسیدگی DM	روز تا پر شدن دانه DFG
GY	1	0.03	0.56**	-0.05	0.16	0.06	
200GW		1	0.04	-0.21	-0.04	0.29	
NT			1	-0.009	0.021	-0.03	
DF				1	0.75**	-0.90**	
DTM					1	-0.59**	
DFG						1	

صفات Traits	قوه نامیه V	سطح برگ LA	سطح ویژه برگ SLA	کلروفیل a Chl. a	کلروفیل b Chl. b
GY	0.21	-0.10	0.29	-0.001	-0.16
200GW	-0.003	-0.03	0.16	-0.18	-0.01
NT	0.38*	0.11	0.16	-0.03	-0.11
DF	0.08	0.55**	0.34*	0.07	0.33*
DTM	0.06	0.38*	0.45**	0.008	0.23
DFG	-0.03	-0.48**	-0.25	-0.14	-0.45**
F	1	-0.16	0.33*	-0.01	-0.10
LA		1	0.14	0.02	0.08
SLA			1	0.14	0.10
Chl. a				1	0.55**
Chl. b					1

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

*** and ** : significant at 0.05 and 0.01 probability level, respectively.**

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۵- مقایسه میانگین صفات مورفو-فیزیولوژیک در ارقام گندم نان.

Table 4- Mean comparsion for morpho-physiological traits in bread wheat cultivars.

Cultivar	رقم	عملکرد دانه GY (Ton ha^{-1})	وزن ۲۰۰ دانه 200GW (gr)	تعداد پنجه بارور NT	قوه نامیه V	روز تا گلدهی DF	روز تا رسیدگی DM	روز تا پر شدن دانه DFG	سطح برگ LA (cm)^2	سطح ویژه برگ SLA (cm^2/gr)	کلروفیل a Chl. a (µgr)	کلروفیل b Chl. b (µgr)
Mahdavi	مهدوی	3.633 a-i	5.536 j-n	117 d-h	96 a	145 g	190 b	45 cd	80.9 g-m	153.6 a-d	14.4 b-h	8.8 d-g
Pishtaz	پیشتاز	4.065 a-d	6.676 c-f	114 d-i	93 a-e	145 g	190b	45 cd	58.9 klm	126.2 c-g	10.6 gh	7.4 efg
Excalibur	اکسکلیبر	2.735 f-l	6.113 e-l	114 d-i	81 efg	138 h	181.6 d	43.6 cd	47.7 klm	108.9 fg	19.5 abc	16.2 abc
Bahar	بهار	3.900 a-f	6.395 d-i	155 ab	87 a-f	145.6 g	190 b	44.5 cd	120.5 d-k	145.6 a-f	19.4 a-d	12.9 b-f
Rasool	رسول	1.950 l	6.826 b-f	74.5 lmn	91 a-e	145 g	189 b	43 cd	79 g-m	130.3 c-g	14.8 b-h	19.6 a
Chamran	چمران	2.725 f-l	6.243 d-j	102.6 f-k	77 fg	145 g	189.3 b	45 cd	99.5 e-m	142.6 b-g	19.3 a-d	15.3 a-d
Akbari	اکبری	3.815 a-h	6.550 d-g	101 g-l	82 c-g	139 h	190 b	51 ab	71.1 i-m	137.1 b-g	16.2 a-g	12 b-g
Zarin	زرین	3.453 a-j	6.355 d-i	84.5 j-n	77 fg	145.5 g	189.3 b	42.3 cde	149.2 c-h	124.9 c-g	16.2 a-g	9 d-g
Roshan	روشن	4.380 ab	8.740 a	117.6 d-h	89 a-e	145.5 g	190.6 b	43.6 cd	145.3 c-i	165.6a bc	15.9 a-g	13.3 a-f
Moghan 2	مغان۲	3.765 a-h	5.306 lmn	130.3 b-e	94 a-d	145 g	190 b	45 cd	79.5 g-m	119.7 d-g	15.7 a-h	8.1 efg
Karaj2	کرج۲	4.525 a	6.180 e-j	80.5 k-n	93 a-e	145.3 g	189.3 b	44 cd	83.5 f-m	136.8 b-g	16.9 a-g	13.2 a-f
Karaj3	کرج۳	4.090 abc	4.190 o	120.6 c-h	85 a-g	160 c	194.5 a	31.6 g	114.3 d-l	137.6 b-g	16.7 a-g	16.4 abc
Azar2	آذر۲	4.263 abc	7.430 bc	123 c-g	85 a-g	145 g	190 b	45 cd	67.8 j-m	138.3 b-g	14.7 b-h	7.5 efg
Darab2	داراب۲	3.240 b-k	5.675 h-n	85.6 j-n	94 a-d	145 g	190 b	45 cd	87.1 f-m	127.8 c-g	22.4 a	11.9 b-g
Niknejad	نیک نژاد	3.800 a-h	6.495 d-h	120.5 c-h	93 a-e	145 g	189.3 b	43.6 cd	50.8 klm	156.4 a-d	16.5 a-g	12 b-g
Kavir	کویر	2.716 g-l	6.506 d-g	99.3 g-l	90 a-e	145 g	189.3 b	44 cd	71.5 i-m	135.8 b-g	8.2 h	5.4 g
Dez	دز	2.263 k-l	5.785 g-n	61 no	74 g	145 g	189 b	47.5 abc	116.4 d-l	128.4 c-g	12.2 c-h	6.5 fg
Hirmand	هیرمند	3.445 a-j	7.055 bcd	86.6 j-n	91 a-e	145 g	190 b	45 cd	92.5 e-m	153.3 a-e	15.1 a-h	13 a-f
mv-17	mv-17	2.415 kl	5.210 n	82.3 k-n	93 a-e	150 e	190.6 b	37 f	75.4 h-m	159.4 a-d	18.5 a-f	12.8 b-f
Marvdasht	مرودشت	4.226 abc	5.796 g-n	106 e-k	90 a-e	145 g	190 b	45 cd	154.4 c-g	186 a	16.8 a-g	8.4 efg
Sabalan	سبلان	3.925 a-d	5.240 mn	134.5 bcd	82 c-g	147.3 f	190 b	42.6 cde	202.2 bc	145.3 a-g	13.9 b-h	8.3 efg
Star	استار	3.170 c-k	6.780 b-f	111.5 d-j	84 b-g	145 g	189.3 b	44.3 cd	160.5 c-f	136.8 b-g	19.4 abc	10.1 c-g
Hamun	هامون	4.226 abc	6.625 def	111.3 d-j	85 a-g	145 g	189.3 b	44.3 cd	43.2 lm	127.9 c-g	12 d-h	10.2 c-g
Alvand	الوند	3.445 a-j	5.680 h-n	123 c-g	90 a-e	150 e	190 b	41.6 de	96.8 e-m	143.5 a-g	18.3 a-f	12.2 b-g
Ghods	قدس	4.385 ab	5.510 j-n	134.6 bcd	96 ab	145.3 g	190 b	44.6 cd	141.5 c-j	119.3 d-g	19.8 ab	11.4 b-g
Bam	بم	2.465 i-l	6.405 d-i	46 o	35 h	145.3 g	189.3 b	44 cd	176.8 cd	110 fg	16.7 a-g	13.8 a-e
Azadi	آزادی	3.585 a-j	4.445 o	71.5 mn	87 a-f	145.6 g	189.3 b	43.6 cd	69 j-m	155.6 a-d	18.8 a-e	11.6 b-g

Archive of SID

www.SID.ir

Omid	امید	3.133 c-k	6.936 b-e	95.5 h-m	94 abc	163 b	197 a	34 fg	121.3 d-k	174.7 ab	21.5 ab	17.1 ab
Shiraz	شیراز	4.310 abc	5.313 lmn	110.5 d-j	85 a-g	146 fg	190 b	42.6 cde	54.4 klm	149.6 a-f	20.6 ab	11.7 b-g
Alamut	الموت	3.510 a-j	6.170 e-j	128.5 c-f	82 d-g	145.5 g	189.3 b	42.3 cde	64.8 klm	130.1 c-g	16.8 a-g	13.6 a-e
Zagros	زاگرس	2.675 h-l	6.135 e-k	82.6 k-n	89 a-e	145 g	189 b	44 cd	59.1 klm	126.5 c-g	13.8 b-h	7.1 efg
Vee Nac	وی ناک	2.730 f-l	5.313 lmn	104.6 e-k	93 a-e	138 h	179 e	46 bcd	104.5 d-m	102 g	16.5 a-g	8.6 d-g
Tajan	تجن	2.820 e-l	6.110 e-l	100.6	95 ab	138 h	189.3 b	52 a	55.2 klm	124.3 c-g	16.1 a-g	9.6 c-g
Sardari	سرداری	3.766 a-h	6.876 d-i	170 a	96 a	145 g	190 b	45 cd	174.7 cd	149 a-f	11.9 e-h	8.5 d-g
Sholeh	شعله	4.360 ab	6.056 f-m	116.5 d-h	83 c-g	145 g	189.3 b	44.3 cd	35.7 m	132.2 b-g	11.2 fgh	8.4 d-g
ws-82-9	ws-82-9	2.903 d-l	7.506 b	86 j-n	96 a	145 g	185.6 c	47.5 abc	75 h-m	150.6 a-f	16 a-g	8.7 d-g
Gaspard	گاسپارد	3.130 c-k	5.333 k-n	101.5 f-k	89 a-f	160.5 c	191 b	38 ef	165.4 cde	142.2 b-g	14.9 b-h	11.9 b-g
Shahpasand	شاه پسند	2.505 i-l	5.600 i-n	89.3 i-m	91 a-e	165.6 a	197 a	31.3 g	316.8 a	131.4 c-g	14.2 b-h	13.4 a-f
Bezustaya	بزوستایا	3.693 a-h	6.400 d-i	144.3 bc	89 a-f	153 d	190 b	38 ef	250.7 b	158.2 a-d	17 a-g	12.3 b-f
Tous	توس	3.873 a-g	5.273 mn	119 c-h	91 a-e	145.5 g	190 b	43 cd	100 e-m	145.6 a-f	15.4 a-h	13.7 a-e

میانگین ها با حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ ندارند.

Means followed by similar letters in each column are not significantly different at 5% probability level.

جدول ٦- نتایج تجزیه مولکولی برای هر جفت آغازگر در ارقام گندم.

Table 6- Molocular analysis for each primer in bread wheat cultivars.

آغازگر Primer	تعداد آلل مشاهده شده Number of observed allele (N_O)	تعداد آلل مؤثر Number of effective allele (N_E)	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity (H_O)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity (H_E)	شاخص شانون Shannon index (I)	شاخص نی Nei index (h)
barc 328	2	1.43	0.71	0.46	0.48	0.30
gdm 132	4	1.51	0.56	0.48	0.42	0.28
gwm 304	3	1.34	0.35	0.30	0.43	0.28
wmc 48	4	1.33	0.58	0.42	0.35	0.21
barc 121	4	1.39	0.41	0.34	0.37	0.23
gwm 617	5	1.33	0.69	0.5	0.37	0.22
gwm 601	2	1.17	0.1	0.09	0.42	0.25
wmc 89	5	1.46	0.64	0.46	0.40	0.25
wmc 420	2	1.63	0.28	0.24	0.53	0.35
Mean±SE	3.44±1.16	1.40±0.35	0.48±0.20	0.36±0.13	0.38±0.22	0.24±0.17

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس نتایج حاصل، بیشترین تعداد آلل، مربوط به جایگاه های gwm 617 و wmc 89 با ۵ آلل و کمترین تعداد آلل، مربوط به جایگاه‌های barc 328 و gwm 601 با ۲ آلل بود. میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریز ماهواره، مناسب بودن هر جایگاه را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می دهد(Roder *et al*., 1998). تعداد آلل با فراوانی برابر در هر جایگاه ریزماهواره، تعداد آلل مؤثر (N_E) برای آن جایگاه نامیده می‌شود که شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنی (H_E) می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی تعداد آلل مؤثر (N_E) برای تمام جایگاه های ژنی مورد مطالعه نشان داد که میانگین تعداد آلل‌های مؤثر در تمامی جایگاه‌های ریزماهواره مورد مطالعه، برابر١/٤ است و بیشترین تعداد آلل مؤثر در جایگاه ژنی wmc 420 و کمترین تعداد آلل مؤثر در جایگاه ژنی gwm 601 وجود دارد.

هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) معیاری برای ارزیابی تنوع ژنی بوده و با تعداد آلل مؤثر ارتباط مستقیم دارد. هتروزیگوسیتی شاخصی است که احتمال متفاوت بودن افرادی که به طور تصادفی از یک جمعیت انتخاب شده‌اند را بیان می کند. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار با مقدار ۰/۵ در جایگاه ژنی gwm 617 و کمترین هتروزیگوسیتی با مقدار ۰/۰۹ در جایگاه ژنی gwm 601 مشاهده شد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای کل جمعیت در تمام جایگاه ها به طور متوسط ۰/٣٦ بدست آمد که با سیستم گرده‌افشانی گندم تطابق دارد. هتروزیگوسیتی با سیستم گرده‌افشانی گیاه ارتباط مستقیم دارد به این صورت که اگر گیاهی خودناسازگار و دگر-گشن باشد، میانگین این شاخص به یک نزدیک می‌شود (Safarpoor, 2008).

شاخص اطلاعات شانون یا (I) و تنوع ژنتیکی نی(Nei) یا (h) نیز برای هر ۹ جایگاه ریز ماهواره محاسبه گردید. شاخص شانون معیاری برای اندازه‌گیری میزان آلل‌های چندشکل در یک جایگاه است. این شاخص برای جایگاه ژنی wmc 420 بیشتر از سایر جایگاه‌ها (۰/۵۳) و برای جایگاه ژنی wmc 48 کمتر از سایر جایگاه-ها (۰/۳۵) بود. تنوع ژنتیکی نی در جایگاه ژنی wmc 420 به میزان ۰/۳۵ (بیشترین میزان) و در جایگاه ژنی wmc 48 به میزان ۰/۲۱ (کمترین میزان) ارزیابی شد. با توجه به نتایج حاصل می توان بیان داشت که جایگاه ژنی wmc 420 به دلیل داشتن بیشترین میزان شاخص شانون، تنوع ژنتیکی نی و تعداد آلل مؤثر، بیشترین تنوع را بر روی جمعیت مورد مطالعه داشته است.

تجزیه خوشه ای بر اساس نوارهای چندشکل، ارقام مورد بررسی را در ۵ دسته قرار داد (شکل ۲). در دسته اول ارقام روشن، چمران، زرین، قدس، ws-82-9، اکبری، تجن، بزوستایا، کویر، سبلان، استار، هامون، مهدوی، آزادی، شاه پسند، مرودشت و کرج۳ ، در دسته دوم ارقام الموت، هیرمند، شعله، سرداری و اکسکلیبر، در دسته سوم ارقام پیشتاز، mv-17، زاگرس،

Archive of SID

www.SID.ir

داراب۲، نیک نژاد و کرج۲، در دسته چهارم ارقام گاسپارد، بهار، بم، وی ناک، شیراز، طوس و الوند و در دسته پنجم ارقام آذر۲، رسول، امید، دز و مغان۲ قرار گرفتند.

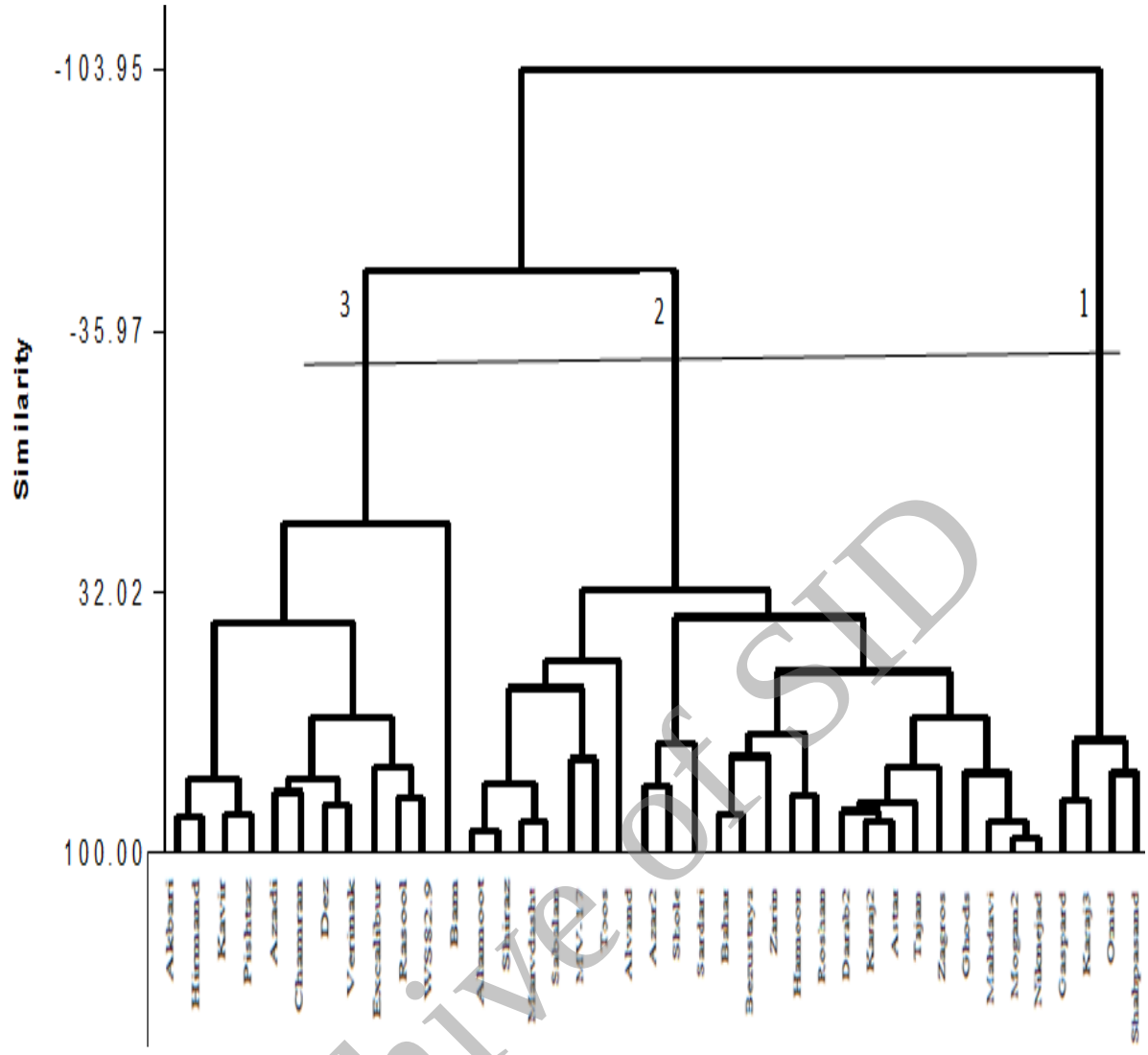
با مقایسه گروه بندی صفات مورفوفیزیولوژیکی و مولکولی مشاهده شد که بعضی ارقام در هر دو نوع گروه بندی، در گروه های همسانی قرار داشتند. برای کلاسترهای حاصل، ماتریس های کوفنتیکی توسط نرم افزار NTSYS محاسبه شد سپس به منظور مقایسه دوکلاستر، دو ماتریس کوفنتیک با آزمون مانتل مقایسه شدند. نتایج مقایسه تشابه دو کلاستر بر اساس ماتریس های کوفنتیک دو روش مورفوفیزیولوژیک و مارکر مولکولی همبستگی معنی داری نشان نداد. عدم تشابه بین نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی در مطالعات مختلف گزارش و دلایل مختلفی برای آن بیان شده است (Amini *et al*., 2008; Khan *et al*.,2008; Mahasi *et al*., 2008). علت عدم مطابقت دندروگرام های حاصل از صفات مختلف را شاید بتوان در تعداد کم نشانگر ریزماهواره مورد استفاده در تحقیق دانست (Haj Mansour *et al*., 2011). از آنجا که منابع ژنی می توانند فنوتیپ های مشابهی را برای ژن های متفاوت آشکار کنند این نتایج دور از انتظار نیست (Rolda´n-Ruiz *et al*., 2001; Archak *et al*., 2003).

نتایج این مطالعه بیانگر کارآمدی نشانگرهای SSR در بررسی تنوع ژنتیکی میان رقم های گندم مورد مطالعه می باشد که وجود این تنوع ژنتیکی می تواند در برنامه های به نژادی گندم در جهت بهبود کمیت و کیفیت پیشنهاد شود.

به منظور ارزیابی دقیق و جامع تنوع ژنتیکی در رقم های مورد بررسی، مطالعات مقایسه ای در سطح سایر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و نشانگرهای مولکولی بسته به اهداف اصلاحی محقق پیشنهاد می شود. انتخاب و استفاده از تعداد بیشتری آغازگر SSR با پراکنش کروموزومی بالا که بتوانند مکان های ژنی مختلف با تعداد آلل های بیشتر را تکثیر کنند، برای بررسی تنوع ژنتیکی می تواند مؤثر باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

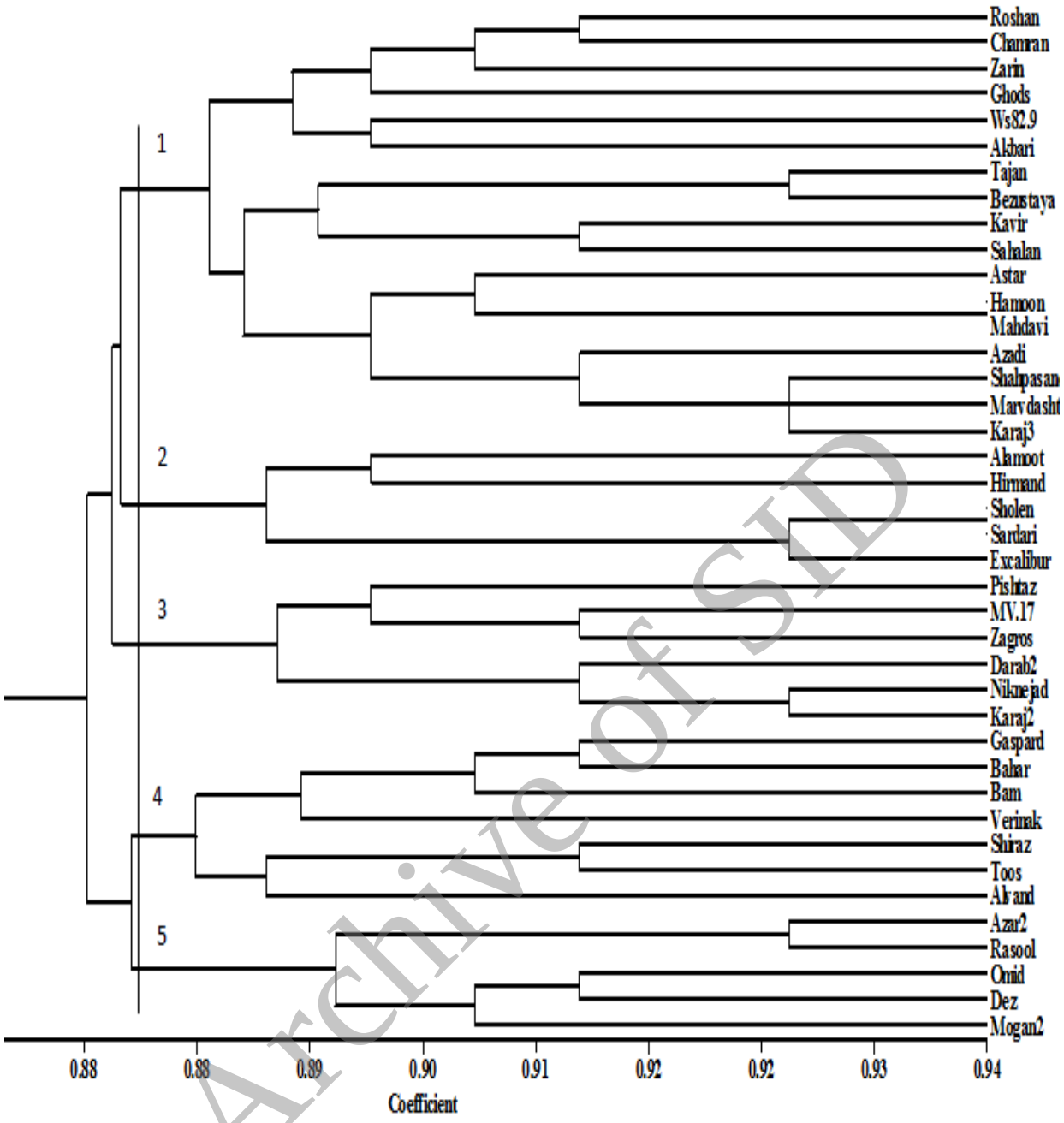


شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای برای صفات مورفوفیزیولوژیک در ارقام گندم نان.

Figure 1- Dendrogram resulted from cluster analysis for morpho-physiological traits in bread wheat cultivars.

Archive of SID

www.SID.ir



Archive of SID

شکل۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای بر اساس داده های ریزماهواره در ارقام گندم نان.

Figure 2- Dendrogram resulted from cluster analysis based on microsatellite data in bread wheat cultivars.

منابع

Amini F, Saeidi G, Arzani A (2008). Study of genetic diversity in safflower genotypes using agromorphological traits and RAPD markers. Euphytica 163: 21-30.

Archak S, Gaikwad B, Gautam D, Rao E, Swamy K, Karihaloo J (2003). DNA fingerprinting of Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using RAPD and ISSR techniques. Euphytica 230: 397–404.

www.SID.ir

Condon F, Charles Gustus D, Rasmusson C, Kevin PS (2008). Effect of advanced cycle breeding on genetic diversity in barley breeding germplasm.Crop Science 48: 1027-036.

Dere S, Gunes T, Sivci R (1998). Spectrophotometric determination of hlorophyll-a,b and total cartenoid contents of some Algae Species using different solvents. Turkish Journal of Botany 22: 13-7.

Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantines of fresh leaf tissue. Phyto chemical Bullten 19: 11-15.

Dresigacker S, Zhang P, Warburton ML, Ginkelt ML, Hoisington DA, Bohn M, Enferad A, Poustini K, Majnoun Hosseini N, Taleei A, Khajeh-Ahmad-Attari A (2004). Physiological responses of Rapseed (*Brassica napus* L.) varieties to salinity stress in Vegetative Growth Phase. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 4: 103-114 (In Farsi).

Haj Mansour SH, Bihamta MR, Nabipoor AR, Mohamadi A, Pirseyedi M, Nik Khah HR (2011). Genetic diversity in barley genotypes: microsatellite markers and morphological traits. Seed and Plant Improvement Journal 26-1: 150-171.

Hassibi P (2012). Measurement of leaf area index by weighty method. Retrieved Apr, 11, 2012, from http:// paymanhassibi. Blogfa.com/ post- 5. aspx

Khan MA, Von Witzke-Ehbrecht S, Maass BL, Becker HC (2009). Relationships among different geographical groups, agro-morphology, fatty acid composition and RAPD marker diversity in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Genet Resource Crop Evol 56: 19-30.

Khlestkina EK, Pestsova EG, Salina E, Röder MS, Arbuzova VS, Koval SF, Börner A (2002). Genetic mapping and tagging of wheat genes using RAPD, STS, and SSR markers.Cellular and Molecular Biology Letters 7: 795-802.

Khlestkina EK, Röder MS, Börner A, Shumny VK (2004). The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellite markers. Plant Breeding 123: 122-127.

Kölliker R, Jones E S, Drayton MC, Dupal MP, Forster JW (2001). Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) marker for white clover (*Trifolium repens* L.). Theoretical and Applied Genetics 102: 416-424.

Mahasi MJL, Wachira FN2, Pathak RS2, Riungu TC (2009). Genetic polymorphism in exotic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using RAPD markers. Journal of Plant Breeding and Crop Science 1: 008-012.

Melchinger AE (2004). SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted of different megaenviroments. Crop Science 44: 381-388.

Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Yano M (1997). Genome mapping, molecular markers and marker assistaed selection in crop plants. Molecular Breeding 3: 87-103.

Nachit MM, Elouafi I, Pagnotta A, Saleh EL, Iacono E, Labhilili M, Asabati A, Azarak M, Hazzam H, Benscher D, Khairallah M, Ribault JM, Tanzarella OA, Porceddu E, Sorrells ME (2001). Molecular linkage maps for an intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). Theoretical and Applied Genetics 102: 177-186.

Pearce SR, Knox M, Ellis TNH, Flavell AJ, Kumar A (2000). Pea Ty1-copia group retrotransposons: transitional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*. Molecular Genetics Genet 263: 898-907.

Powel W, Morgant M, Andre C, hanfey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996). The comparison of RFLP , RAPD ,AFLP and SSR (micro satelite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: 225-238.

Archive of SID

www.SID.ir

Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leory P, Ganal MW (1998). A microsatellite map of wheat. Genet 149: 2007-2023.

Rolda´n-Ruiz I, Van Eeuwijk FA, Gilliland TJ, Dubreuil P, Dillmann C, Lallemand J, De Loose M, Baril CP (2001). A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass *(Lolium perenne* L.) varieties. Theoretical and Applied. Genetics 103: 1138-1150.

Safarpoor M (2008). Identification of genetic diversity in almond cultivars using ISSR and SSR molecular markers. M.Sc. Thesis. University of Esfahan. Iran

Winter SR, Musick JT, Porter KB (1988). Evaluation of screening techniques for breeding drought resistant winter wheat. Crop Science 28: 512-516.

Yildrim M, Budak N, Arshas Y (1993). Factor analysis of yield and related traits in bread wheat. Turkish Journal of Field Crops 1: 11-15.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of genetic diversity in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using morpho-physiological traits and SSR markers

Nazari M.[1], Abdolshahi R.*[2]

[1] Former M.Sc. Student of Agronomy and plant breeding, Kerman Shahid Bahonar University
[2] Asisstant Prof., Dep. of Agronomy and Plant Breeding, Kerman Shahid Bahonar University

Abstract

Genetic diversity is a requirement for success in the breeding programs. In order to evaluate genetic diversity of 40 bread wheat genotypes through morpho-physiological traits and SSR markers, wheat genotypes were cultivated in Shahid Bahonar university research field in a randomized complete block design with 3 replications during 2011-2012. Wheat genotypes showed a considerable genetic diversity for all traits. Fertile tillers had the highest correlation with grain yield. In SSR experiment, 9 primers showed remarkable polymorphism. Considering all genotypes, 31 polymorphic bands with the mean of 3.4 per each primer were detected. The average expected heterozygosis was 0.36 for all loci. Wmc 420 had the highest diversity in evaluated population. Cluster analysis was performed based on Ward's method and cultivars were classified based on the similarity. The cluster Information can be used in the breeding programs for yield improvement in drought prone environments.

Keywords: *Genetic diversity, bread wheat, SSR marker, morpho-physiologic traits, cluster analysis.*

Archive of SID

* Corresponding Author: Abdoshahi R. Tel: 09177367119 Email: abdoshahi@gmail.com

www.SID.ir