Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره سوم،شماره۱،بهار ۱۳۸۷
صفحه ۸۹-۷۹

بررسی روابط ژنتیکی ارقام گندم نان براساس تنوع اللی نشانگرهای ریزماهوار

شیما جمالی راد[۱]، سید ابوالقاسم محمدی[۱]*، منوچهر خدارحیمی[۲]، محمود تورچی[۱]

۱- کارشناسی ارشد،دانشیار،دانشیار،گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی،
۲- استادیار دانشگاه تبریز، [۲] بخش غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر،
*نویسنده مسئول،آدرس الکترونیکی:sa-mohammadi@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی ۷۰ لاین و رقم مورد استفاده در برنامه‌های اصلاح مقاومت به زنگ گندم در کشور با استفاده از۴۰ نشانگر ریزماهواره بررسی شد. در مجموع ۳۹۰ الل چند شکل با میانگین ۹/۲۶ الل به ازای هر جایگاه ریزماهواره در ژنوتیپ ها تکثیر شد. نشانگر Xbarc87 و جایگاه دوم نشانگر Xbarc165 با ۳ الل کمترین تعداد و نشانگر Xgwm46 با ۱۸ الل بیشترین تعداد الل را دارا بودند. میزان اطلاعات چند شکلی برای نشانگرهای مورد بررسی از ۰/۳٦ تا ۰/۹۰ با میانگین ۰/۷۳±۰/۰۱۹ متغیر بود. گروه بندی ژنوتیپ ها با استفاده از الگوریتم eighbor Joining براساس ضریب فاصله راجر بیشترین مطابقت را با اطلاعات شجره‌ای در دسترس ژنوتیپ ها داشت. تجزیه واریانس مولکولی برای تعیین تعداد مطلوب گروه نشان داد که بیشترین تمایز بین گروه‌ها در نقطه برش دندروگرام با شش گروه ایجاد می‌شود. با شش گروه، واریانس بین گروه‌ها حدود ۵۷٪ واریانس مولکولی بین ژنوتیپ‌ها را تبیین کرد. در این گروه بندی، اغلب ژنوتیپ ها با شجره مشترک با هم گروه بندی شدند. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی، بیشترین ناهمگنی مربوط به گروه سوم با تبیین ۱۶/۶٪ واریانس کل و بیشترین همگنی مربوط به گروه دوم با حدود ۱/۰۰٪ واریانس کل مولکولی بود. برای گروه‌های شش‌گانه ۱۲۳ الل اختصاصی شناسایی شد که بیشترین آن به گروه سوم و کمترین آن به گروه دوم تعلق داشت.

واژه های کلیدی

تجزیه خوشه ای،
گندم،
نشانگرهای اختصاصی،
نشانگرهای ریزماهواره،

مقدمه

آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد میزان آن در ژرم پلاسم‌های گیاهی و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات می‌باشد(۶). گندم بعنوان مهمترین گیاه زراعی در جهان و ایران دارای ژنوتیپ های زیادی است که در برنامه های اصلاحی مورد استفاده قرار می گیرند. بنابراین، لازمه استفاده کارآ و صحیح از آنها، شناسایی روابط ژنتیکی ژنوتیپ ها و تعیین سطح تنوع موجود می باشد. علاوه بر این، در سالهای اخیر

www.SID.ir

Archive of SID

اخیر تاکید روی تولید ارقام هیبرید در گندم جهت بهره برداری از پدیده هتروزیس و در نتیجه شناسایی والدین مناسب، اهمیت این مسئله بیشتر کرده است (۲۵).

در گیاهان مختلف نشانگرهای مورفولوژیکی،آیزوزایم‌هاو پروتئین‌های ذخیره‌ای و نیز نشانگرهای DNA برای بررسی تنوع و تعیین روابط شناسایی والدین مناسب، اهمیت این مسئله بیشتر کرده است (۲۵). در گیاهان مختلف نشانگرهای مورفولوژیکی، آیزوزایم‌ها و پروتئین‌های ذخیره‌ای و نیز نشانگرهای DNA برای بررسی تنوع و تعیین روابط ژنتیکی افراد استفاده شده اند. ولی به‌علت محدودیت تعداد نشانگرها و تأثیر عوامل محیطی و مراحل رشدی گیاه بر نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی، امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNAبعنوان ابزارهای کارآ و مکمل برای تعیین سطح تنوع و تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی استفاده می شوند(۱۵، ۲۶). در گندم نشانگرهای متعدی ازقبیل RAPD[1](۱۲)، (۹)، RFLP[2] (۲۲)، STS[3] (۲٤)، ISSR[4] (۱۷) و SSR[5] (۲، ۸، ۲۶) استفاده شده اند. ازبین این نشانگرها، SSRها یا ریزماهواره ها بعلت امـتیازدهی همبارز، جایگاه ژنومی مشخص و چندشکلی و تکرارپذیری بالا، کاربرد بیشتری را در مقایسه با سایر نشانگرها پیدا کرده اند(۱۲).

خلستکنیا و همکاران (۱۳) تنوع ژنتیکی ۵۴ رقم قدیمی و جدید گندم بهاره را با ۲۳ جایگاه ریزماهواره ارزیابی و در مجموع ۱۵۱ آلل با تعداد آلل بین ۱۱-۳ الل و میانگین ۶/۹ الل برای هرجایگاه گزارش کردند. ریف و همکاران (۱۸) روند تغییر تنوع ژنتیکی ارقام گندم را در طول اهلی شدن و اصلاح (تولید ارقام اصلاح شده از ارقام بومی در طول پنجاه سال برنامه اصلاح گندم در مرکز سیمیت) آنها بررسی کردند. در این مطالعه ۲۵۳ ژنوتیپ شامل ارقام از مجموعه سیمیت، ارقام جدید خویشاوند ارقام سیمیت، ارقام بومی و ژنوتیپ هایی از Triticum tauschii توسط ۹۰ جفت آغازگر ریزماهواره با پوشش ژنومی بالا مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج کاهش سطح تنوع از T. tauschii تا ارقام بومی و از ارقام بومی تا ژرم پلاسم اصلاحی الیت را نشان دادند. کریستینسن و همکاران (٤) سطح تنوع ۷۵ رقم گندم بهاره اروپایی را با ۷۹ جفت آغازگر SSR و گزارش کردند که تنوع ژنتیکی ارقام از سال ۱۹۱۰ تا ۱۹٤۰ کاهش ولی از سال ۱۹٦۰ به بعد افزایش داشته است. درسی جیکر و همکاران (۷) با بررسی الگوی تغییرات ژنتیکی درون و بین دو مجموعه ارقام بومی گندم نگهداری شده در مرکز بین المللی اصلاح گندم وذرت (CIMMYT) با استفاده از ۷٦ نشانگرهای ریز ماهواره، تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای را درون توده های مکزیکی و ترکیه مشاهده کردند.

اهداف این مطالعه، بررسی سطح تنوع ژنتیکی لاین و ارقام گندم مورد استفاده در برنا مه‌های اصلاح مقاومت به زنگ کشور و تعیین روابط ژنتیکی آنها جهت شناسایی والدین مناسب برای برنامه‌های اصلاحی و ژنتیکی بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی

مواد گیاهی ارزیابی شده شامل ۷۰ ژنوتیپ گندم مورد استفاده در برنامه‌های اصلاحی کشور بود که نام و شجره آنها در جدول ۱ آورده شده است.

استخراج DNA، انجام PCR و تفکیک قطعات تکثیری

استخراج DNA ژنومی طبق روش سقایی معروف و همکاران (۲۱) انجام و کمیت و کیفیت نمونه ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ در صد تعیین شد. برای تکثیر جایگاههای ریزماهواره از ۴۰ جفت آغازگر استفاده گردید (جدول ۲).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۰ میکرولیتر با اجزای ۵۰ نانو گرم DNA الگو، ۰/۲۵ میلی مولار از هر آغازگر، ۰/۲۵ میلی مولار مخلوط dNTP، ۲/۰۰ میلی مولار کلرید منیزیم و ۰/۵۰ واحد آنزیم Taq DNA polymerase انجام شد.

1-Random Amplified Polymorphic DNA
2-Restriction Fragment Length Polymorphism
3-Sequence Tagged Site
4-Inter Simple Sequence Repeat
5-Simple Sequence Repeat

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- اسامی و شجره لاین ها و ارقام گندم مورد مطالعه

نام	شجره
الموت	KVZ/Ti71/3/Maya"s"//Bb/Inia/4/Kj2/5/Anza/3/Pi/Ndr//Hys
الوند	1-27-6275/CF1770
امید	شماره توده بومی به1-29-11085
بزوستا یا	Bezostaya
بولانی	بولانی
پیشتاز	Alvand//Aldan/Ias58
تجن	Bow"s"/Nkt"s"(CM67428-GM-LR-5M-3R-LB-Y)
چمران	Attila,(CM85836-50Y-OM-OY-3M-OY)
چناب	چناب
داراب ۲	Maya"s"
روشن	انتخابی از توده های بومی اصفهان
زرین	PK15841
شیراز	Gv/D630//Ald"s"/3/Azd
شیرودی	Attila,(CM85836-4Y-OM-OY-8M-OY-OPZ)
فلات	Kvz/Buho"s"//Kal/Bb=Seri82
قدس	Rsn/5/Wt/4Nor10/K54*2//Fn/3/Ptr/6/Omid//KalBb
کا سکوژن	Gascogne
کراسینگ بلوک ۸٤	opata*2/wulp
کراسینگ بلوک ۸۷	catbird
کراسینگ بلوک ۸۹	yaco/parus//parus
کراسینگ بلوک ۹۷	Milan/sha7
کویر	Stm/3Kal//V534/Jit716
نیک نژاد	F13471/Crow"s"
هیرمند	Byt/4/Jar//Cfn/Sr70/3/Jup"s"
Chinese 166	Chinese 166
Vilmorin 23	Vilmorin 23
CIMMYT1	WBLL1/FRET//PASTOR
CIMMYT3	FRET2*2/4/SNI/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ
CIMMYT5	FRET2*2/KUKUN
CIMMYT7	FRET2/KURUKU//FRET2
CIMMYT9	FRET2/KUKUN//FRET2
CIMMYT11	FRET2/KUKUN//FRET2
CIMMYT12	FRET2/TUKURU//FRET2
CIMMYT13	FRET2/TUKURU//FRET2
CIMMYT16	WBLL1*2/KUKUN
CIMMYT17	WBLL1*2/KUKUN
CIMMYT18	WBLL1*2/TUKURU
CIMMYT19	WBLL1/4/HD2281/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ/5/KAMB1
CIMMYT21	WBLL1*2/KURUKU
CIMMYT22	WBLL1*2/KURUKU

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول ۱

نام	شجره
Hybrid 46	Hybrid 46
Jupateco ' 73R'	Jupateco ' 73R'
Lee	Lee
M-78-16	MP151//Arvand/3/Brochis/Arvand
M-79-6	Bow"s"/Vee"s"//1-60-3
M-79-7	Bloyka ICW84-0008-013AP-300L-3AP-300L-0AP
M-81-4	T.Aest/5/Ti/4/La/3/Fr/Kad//Gb/6/;F13471/Crow"
M-81-13	Hahn"S"//Mjl/Lira//2*Rsh
M-82-6	Karawan 1//Sun640/M2512
M-82-12	Ald"s"/Snb"s"//Tjn
M-82-14	Ww33G/Vee"S"//Mrn/3/Attila/Tjn
M-82-18	KASYON/GENARO.81//TEVEE-1 ICW92-0281-1AP-OL-2AP-…
Mkh3	KAUZ//KAUZ/PVN
Mkh4	SERI/KAUZ
Mkh5	LIRA/SHA5
Mkh6	BOW/FKG15
Mkh7	BOW/SERI
Mv-17	Mv-17
N-75-16	Shanghai7//Hahn's' *2/pvl 's'
PRWYT-DT-2	SERI.1B//KAUZ/HEVO/3/AMAD
PRWYT-DT-3	SERI.1B//KAUZ/HEVO/3/AMAD
PRWYT-DT-7	SERI.1B*2/3/KAUZ*2/BOW//KAUZ
PRWYT-DT-14	HUW234+LR34/PRINIA
PRWYT-DT-15	ATTILA*2/PASTOR
PRWYT-DT-17	ATTILLA*2/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ
PRWYT-DT-20	ATTILA*2/STAR
S-78-11	Bow"s"/Cm34798/3/snb
WS-82-9	Ww33G/Vee"S"//Mrn/4/HD2172/Bloudan//Azd/3/San/Ald"s"//Avd
Ws-82-13	Ww33G/Vee"S"//Mrn/3/Attila/Tjn

www.SID.ir

جدول ۲- مکان کروموزومی، نوع واحد تکراری، تعداد الل ، فراوانی الل رایج، تنوع ژنی و میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) برای نشانگر ریزماهواره در ژنوتیپ های گندم مورد مطالعه

نشانگر	نوع واحد تکراری	مکان کروموزمی	فراوانی الل رایج	تنوع ژنی	تعداد الل	PIC	نشانگر	نوع واحد تکراری	مکان کروموزمی	فراوانی الل رایج	تنوع ژنی	تعداد الل	PIC
Xbarc3	CCT	6A	۰/۳۸	۰/۷۸	۱۲	۰/۷۵	**Xgwm124**	CT-GT	1B	۰/۳۵	۰/۸۰	۱۰	۰/۷۷
Xbarc37	TTA	6A	۰/۱۷	۰/۸٤	۸	۰/۸۲	**Xgwm129**	GT-N-GT	5A/ 5B	۰/۳۳	۰/۷۸	۸	۰/۷۵
Xbarc54	TAGA	3A	۰/۲۱	۰/۸۷	۱۰	۰/۸۵	**Xgwm160**	GA	5A	۰/۲۰	۰/۸۸	۱۲	۰/۸۷
Xbarc87	TAG	3D/ 7D	۰/۷۵	۰/٤۰	۳	۰/۳٦	**Xgwm161**	CT	3D	۰/۵۱	۰/٦۹	۹	۰/٦٦
Xbarc130	GA	5D	۰/۳۱	۰/۸۲	۸	۰/۸۰	**Xgwm169**	GA	6A	۰/۲۷	۰/۸٤	۱۱	۰/۸۲
Xbarc141	GA	5A	۰/۱۹	۰/۸۸	۱۳	۰/۸۷	**Xgwm190**	CT	5D	۰/۲۷	۰/۸۳	۹	۰/۸۱
Xbarc165-1	ATT	5A/6A	۰/٤۵	۰/٦۷	۸	۰/٦۱	**Xgwm212**	CT	5D	۰/۳۱	۰/۷۹	۸	۰/۷۷
Xbarc165-2	ATT	5A/6A	۰/۷٤	۰/٤۱	۳	۰/۳٦	**Xgwm213**	GA	5B	۰/۱۳	۰/۹۱	۱۵	۰/۹۰
Xbarc206	CT	4A/ 2B/ 7D	۰/۳۱	۰/۷۵	۵	۰/۷۰	**Xgwm291**	CA	5A	۰/۳۳	۰/۸۰	۹	۰/۷۸
Xbarc255	ATT	7B	۰/٤۱	۰/۷	۸	۰/٦۵	**Xgwm299**	(GA) (TAG)	3B	۰/۴۵	۰/۶۹	۷	۰/۶۵
Xbarc303	ATT	5A	۰/۵۳	۰/٦۸	۹	۰/۶۵	**Xgwm312**	CT	2A	۰/٦۱	۰/۵۹	۸	۰/۵۷
Xcfa 2028	CA	7A	۰/٤٦	۰/٦۹	۵	۰/٦٤	**Xgwm325**	CT	6D	۰/۱۷	۰/۹۰	۱۵	۰/۹۰
Xcfa 2141	GA	5A&5D	۰/۲۲	۰/۸۵	۱۰	۰/۸٤	**Xgwm327**	GT	5A	۰/۲٤	۰/۸۷	۱۳	۰/۸٦
Xcf a2155	TG	5A	۰/٤۰	۰/۷٤	٦	۰/۷۱	**Xgwm332**	GA	7A	۰/۲٦	۰/۸۳	۱۰	۰/۸۱
Xcfa2234	CA	3A	۰/۳٤	۰/۷۲	۵	۰/٦۷	**Xgwm357**	GA	1A	۰/٦٤	۰/۵٦	۷	۰/۵٤
Xgwm6	GA	4B	۰/۳۳	۰/۷۷	۱٤	۰/۷٤	**Xgwm408**	(TA) (CA) (TA) (CA)	5B	۰/۲۵	۰/۸۴	۱۱	۰/۸۲
Xgwm45	TAA	3A	۰/۲۱	۰/۸٦	۱۱	۰/۸٤	**Xgwm448**	GA	2A	۰/۴۲	۰/۶۸	۵	۰/۶۳
Xgwm46	$(GA)_2GC(GA)_3$	7B	۰/۲۲	۰/۸۹	۱۸	۰/۸۸	**Xgwm499**	GA	5B	۰/۳۳	۰/۷۵	۷	۰/۷۱
Xgwm58	$(GT)_{18}TT(GA)_4$	6B	۰/۳۵	۰/۸۰	۹	۰/۷۸	**Xgxm570**	(CT) (GT)	6A	۰/۳۳	۰/۸۲	۱٤	۰/۸۰
Xgwm118-1	-	4A/ 5B	۰/٦۳	۰/۵۳	٤	۰/٤۷	**Xgwm639**	GA	5A/ 5B/ 5D	۰/۳۳	۰/۸۵	۱۷	۰/۸۴
Xgwm118-2	-	4A/5B	۰/٤٦	۰/٦۷	۵	۰/٦۱	**Psp2999**	(CAG) (CAA)	1A	۰/۵۳	۰/۶۹	۱۱	۰/۶۸
							میانگین			**۰/۳٦**	**۰/۷٦**	**۹/۲۸**	**۰/۷۳**
							خطای معیآر			**۰/۰۲۳**	**۰/۰۱۸**		**۰/۰۱۹**

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دماهای ۶۵°C- ۵۰ به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت دو دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهائی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. جداسازی محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید واسرشته‌ساز ۶ درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی ساخت شرکت Bio-Rad انجام و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره صورت گرفت (۵).

تجزیه های آماری

امتیازدهی الگوهای نواری

الگوهای نواری حاصل بصورت وجود و عدم وجود نوار امتیازدهی شدند. همچنین برای هر نشانگر، الل‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بصورت A، B، C و ... نامگذاری و برای برآورد فراوانی های اللی و پارامترهای ژنتیکی هر جایگاه ریز ماهواره و نیز فاصله ژنتیکی ژنوتیپ ها استفاده شدند (۱۴).

درصد هتروزیگوتی مورد انتظار و میزان اطلاعات چند شکل (PIC): هتروزیگوتی مورد انتظار و میزان اطلاعات چند شکل به ترتیب از فرمول های $H = 1 - \sum pi^2$ و $PIC = 1 - \sum pi^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2pipj^2$ محاسبه شدند که در این فرمول ها، pi و pj به ترتیب فراوانی الل‌های i و j در جایگاه ریزماهواره می‌باشند (۲۳). این پارامترها بر مبنای ۱۰۰۰ نمونه bootstrap با استفاده از برنامه PowerMarker V325 (۱٤) برآورد شدند.

گروه بندی ژنوتیپ ها

تجزیه خوشه ای

تجزیه خوشه ای براساس ضرایب فاصله مبتنی بر وجود و عدم وجود الل ها و همچنین فراوانی های اللی با استفاده از الگوریتم های UPGMA [1] و Neighbor Joining انجام شد (۱۴، ۲۰).

جزیه واریانس مولکولی(AMOVA)

برای تعیین تعداد مطلوب گروه ها در تجزیه خوشه ای و نیز تعیین تنوع بین و درون گروه ها ازتجزیه واریانس مولکولی استفاده شد. بدین ترتیب که در هر نقطه برش دندروگرام، گروه ها بعنوان تیمار و ژنوتیپ های هر گروه بعنوان تکرار در نظر گرفته شدند. در نقطه ای که واریانس بین گروهی بیش از واریانس درون گروهی باشد، بیشترین تمایز بین گروه ها حاصل خواهد شد (۱۶).

نتایج وبحث

پارامترهای ژنتیکی جایگاه های ریزماهواره

از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای Xbarc165 و Xgwm118 دو جایگاه ژنومی را تکثیر کردند. این امر می تواند ناشی از خاصیت آمفی پلوئیدی گندم و یا از چند مکانه بودن جایگاه تکثیر این نشانگرها باشد. چهل جفت آغازگر مورد بررسی با تکثیر ۴۲ جایگاه ریزماهواره در مجموع ۳۹۰ الل چند شکل با میانگین ۹/۲۸ الل به ازای هر جایگاه ریزماهواره در ۷۰ ژنوتیپ گندم تولید کردند. جایگاه دوم نشانگر Xbarc165 و Xbarc87 با ۳ الل کمترین تعداد و نشانگر Xgwm46 با ۱۸ الل بیشترین تعداد الل را دارا بودند. میزان اطلاعات چند شکلی برای نشانگرهای مورد بررسی در این مطالعه از ۰/۳٦ تا ۰/۹۰

[1]- Unweighted paired group method using arithmetic averages

www.SID.ir

Archive of SID

با میانگین ۰/۰۱۹±۰/۷۳ متغیر بود که جایگاه دوم نشانگر Xbarc165 و Xbarc87 کمترین و نشانگرهای Xgwm213 و Xgwm325 بیشترین میزان PIC را داشتند. هتروزیگوتی مورد انتظار یا تنوع ژنی از ۰/٤۰ (Xbarc87) تا ۰/۹۱ (Xgwm213) با میانگین ۰/۰۱۸±۰/۷٦ متغیر بود (جدول ۲).

آگایا و بویوکونال ـ بال با استفاده از ۱۹ نشانگر ریز ماهواره در ۱۱ رقم گندم نان تعداد ۹-۲ الل با میانگین ٥/٤۲ الل را به ازای هر جایگاه گزارش کردند. (۳) ریبریو و همکاران محدودهٔ اللی را در ارزیابی ٥۹ لاین گندم با نشانگرهای ریزماهواره ۱۱-۲ الل با میانگین ٤/۷۷ بدست آوردند(۱۹). زانگ و همکاران ٤۷٤ الل چندشکل را برای ۹۰ نشانگر ریزماهواره در بررسی ۱۳٦ لاین گندم با تعداد الل ۱۳-۲ گزارش کردند (۲٥). تفاوت در تعداد الل شناسایی شده در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل منشأ و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نیز ماهیت نشانگرهای ریزماهواره از نظر تعداد نوکلئوتید واحدهای تکراری باشد.

میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چند شکلی زیاد و وجود الل یا الل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. بنابراین، نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌هایی با خویشاوندی نزدیک بسیار مفید خواهند بود. وی و همکاران میانگین میزان اطلاعات چند شکلی را برای نشانگرهای ریزماهواره ۰/٦۷٤ و ریبیرو و همکاران ۰/٥۲ گزارش کردند (۲۳و۱۹).

هتروزیگوتی مورد انتظار یا تنوع ژنتیکی یکی دیگر از معیارهای ارزیابی تنوع اللی نشانگرها و میزان اطلاعات نشانگری در مطالعات بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها است. تنوع ژنی احتمال متفاوت بودن دو الل تصادفی در دو فرد را نشان می‌دهد. (۱) دریسی جیکر و همکاران ، میانگین تنوع ژنی را ۰/٤۷ و هوانگ و همکاران ۰/۷۷ گزارش کردند (۷و۱۱). اگر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کاملاً هموزیگوت باشند، میزان دو پارامتر PIC و تنوع ژنی یکسان خواهد بود (۱).

فراوانی الل رایج (اللی که بیشترین فراوانی را بین الل‌های یک جایگاه دارد) در این مطالعه از ۰/۱۷ (Xgwm213) تا ۰/۷٥ (Xbarc87) متغیر بود. مقایسه تعداد الل و فراوانی الل رایج درجایگاه‌های ریز ماهواره نشان داد که نشانگرهایی با تعداد الل کمتر، حداکثر فراوانی الل رایج را داشتند. با بررسی سه پارامتر میزان اطلاعات چند شکلی، تنوع ژنی و نیز فراوانی الل رایج مشخص شد که نشانگرهایی با PIC و تنوع ژنی بالا، فراوانی الل رایج کمتری داشتند. بنابراین، جایگاه‌هایی با فراوانی الل رایج کمتر قدرت تمایز بیشتری را خواهند داشت. مقایسه نشانگرهایی با توالی تکراری متفاوت نشان داد که نشانگرهای با توالی‌های تکراری دو نوکلئوتیدی دارای بیشترین تعداد الل، میزان اطلاعات چندشکلی و تنوع ژنی و کمترین میزان فراوانی الل رایج بودند.

گروه بندی ژنوتیپ ها

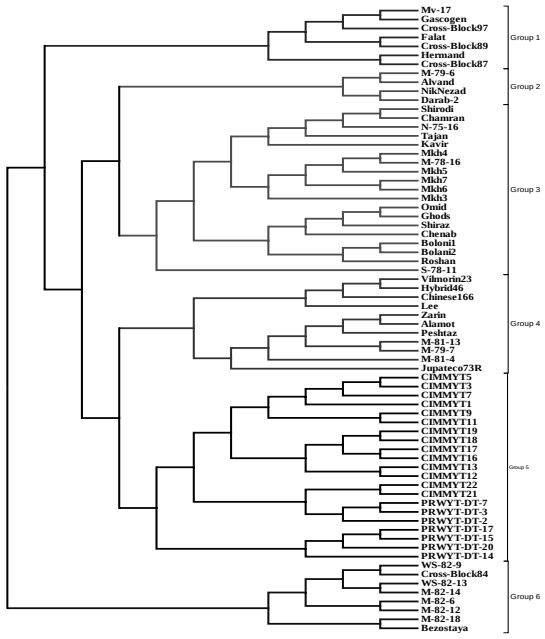
تجزیه خوشه ای

در کلیه دندروگرام های حاصل از روشهای مختلف، یکسری روابط ثابت بین ژنوتیپ ها مشاهده شد که از جمله آنها می توان به روابط بسیار نزدیک لاین‌های خواهری بولانی۱ و ۲، M82-14 و WS82-13، CIMMYT9 و CIMMYT11 و شیرودی و چمران و نیز گروه‌بندی لاین‌های CIMMYT و PRWYT-DT (مشتق شده از مواد CIMMYT) در کنار هم اشاره کرد. در این گروه‌بندی ها همچنین لاین‌های Mkh، مشتق شده از ژرم پلاسم مناطق معتدل مدیترانه‌ای و تمامی لاین‌های کراسینگ بلوک به استثنای کراسینگ بلوک ۸۴ با هم و در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند. با این وجود، با درنظر گرفتن گروه‌بندی‌های مختلف و اطلاعات شجره‌ای موجود برای لاین‌ها، دندروگرام حاصل از ضریب فاصله راجر و الگوریتم Neighbor Joining برای تفسیر نهایی انتخاب شد (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

شکل۱- گروه بندی ژنوتیپ های مورد مطالعه براساس داده های ریز ماهواره با استفاده از الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب راجر



برای تعیین تعداد مطلوب خوشه که در آن بیشترین تمایز بین گروه ها حاصل شود از تجزیه واریانس مولکولی در نقاط مختلف برش دندروگرام استفاده شد. مقایسه نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که بیشترین تمایز بین گروه‌ها در نقطه برش با ٦ گروه حاصل شد که در این حالت واریانس بین گروه‌ها ۵۷٪ تنوع کل بین ژنوتیپ‌ها را تبیین کرد (جدول ۳).

منبع تغییر	مجموع مربعات	درصد تبیین واریانس
بین گروهها	**۸۴۶/۰۵**	**۵۷**
درون گروهها	**۶۶۱/۰۲**	**۴۳**
درون گروه اول	۵۲/۰۵	۳/۳۰
درون گروه دوم	۱۲/۷۷	۱/۰۰
درون گروه سوم	۲۴۶/۵۶	۱۶/۲۰
درون گروه چهارم	۱۴۴/۲۷	۹/۲۰
درون گروه پنجم	۱۲۰/۰۶	۸/۰۰
درون گروه ششم	۸۵/۳۱	۵/۳۰

جدول۳- تجزیه واریانس مولکولی با شش گروه در دندروگرام حاصل از روش Neighbor Joining براساس ضریب راجر برای تعیین تعداد مطلوب گروه

در این گروه‌بندی، گروه اول شامل ۷ لاین Mv-17، Gascogne، فلات، هیرمند و کراسینگ بلوکهای ۹۷، ۸۹ و ۸۷ بود. تنوع درون این گروه حدود ۳/۳۰ درصد تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را تبیین کرد که نشان‌دهنده یکنواختی ژنتیکی ژنوتیپ‌های این گروه بود. اکثر این ژنوتیپ ها بجز فلات و هیرمند جزو لاین‌های مقاوم به زنگ محسوب می‌شوند. در گروه دوم چهار ژنوتیپ M-79-6، الوند، نیک نژاد و داراب قرار داشتند که همگی بجز M-79-6 جزء ژنوتیپ‌های سازگار شده به شرایط ایران بودند. این گروه واریانس درون گروهی حدود یک درصد واریانس کل همگن‌ترین گروه از نظر نشانگرهای مورد بررسی بود. بیشتر ارقام ایرانی شامل شیرودی، تجن، چمران، کویر، امید، قدس، شیراز، چناب، بولانی۱، بولانی۲ و روشن بهمراه لاین‌های Mkh و لاین‌های N-75-16، M-78-16، S-78-11 در گروه سوم قرار گرفتند. اکثر ژنوتیپ‌های این گروه حساس به زنگ زرد می باشند. این گروه با تبیین ۱۶/۲۰ درصد تنوع ژنتیکی کل ژنوتیپ‌ها، ناهمگن‌ترین گروه در بین گروه‌های شش‌گانه بود. گروه چهارم از ۳ لاین ایرانی (زرین، الموت و پیشتاز) و ۵ لاین خارجی (Vilmorin23, Hybrid46, Chinese166, Lee and Jupateco73R)، و ۳ لاین M-79-7, M-81-13 و M-81-4 تشکیل شده بود. بررسی شجره ارقام ایرانی نشان داد که در تولید آنها از ارقام خارجی بعنوان والد استفاده شده است. این گروه با تبیین ۹/۲۰ درصد واریانس مولکولی ژنوتیپ های مورد بررسی، یک گروه نسبتاً همگن محسوب می‌شد بیشتر ژنوتیپ‌های این گروه باستثنای ژنوتیپ‌های Lee، Jupateco73R، زرین و الموت جزو ژنوتیپ‌های مقاوم به زنگ محسوب می شوند. کلیه ژنوتیپ‌های CIMMYT و PRWYT-DT که اغلب براساس شجره خویشاوند هستند به گروه ۵ منتسب شدند. تغییرات ژنوتیپ‌های گروه ۵ براساس ۴۰ نشانگر ریزماهواره مورد استفاده، حدود ۸/۰۰ درصد تنوع ژنتیکی کل ژنوتیپ‌ها را توجیه کرد. از نظر پاسخ به زنگ زرد، ژنوتیپ‌های این گروه حساس تا مقاوم می باشند. گروه ۶ شامل ۸ لاین WS-82-9، کراسینگ بلوک ۸۴، WS-82-13، M-82-14، M-82-6، M-82-12، M-82-18 و بزوستایا بود که همگی

www.SID.ir

Archive of SID

بجز کراسینگ بلوک۸۴ و بزوستایا دارای یک والد مشترک در شجره خود بوده و از ژرم پلاسم مناطق معتدله منشأ گرفته اند. به استثنای دو رقم بزوستایا و کراسینگ بلوک۸۴ بقیه ارقام این گره مقاوم به زنگ زرد هستند. مطابقت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با اطلاعات شجره‌ای آنها و نیز میزان واریانس بین گروهی بالا (۵/۷٪) نشان‌دهنده کارآیی نشانگرهای مورد استفاده در تعیین روابط بین ژنوتیپ ها بود.

برای تعیین نشانگرهای متمایز کننده گروه ها، الل های اختصاصی برای ژنوتیپ های هر گروه شناسایی شد. الل اختصاصی به اللی گفته می‌شود که فقط در یک یا تعدادی از افراد یک گروه بوده و در گروه‌های دیگر وجود نداشته باشد. ۱۲۳ الل اختصاصی برای گروه‌های شش‌گانه شناسایی شد. گروه ۳ (شامل ارقام ایرانی، ارقام تولید شده در CIMMYT و ژنوتیپ‌های امیدبخش) با ۴۸ الل، بیشترین و گروه ۲ (به جزء لاین M-76-6 بقیه لاین‌های این گروه ارقام ایرانی بودند) با ۵ الل کمترین تعداد الل اختصاصی را داشتند. در بین نشانگرهای مورد مطالعه نیز بیشترین تعداد الل اختصاصی برای نشانگر Xgwm46 با ۹ الل و کمترین آن برای نشانگرهای CFA2234، CFA2141، Xgwm312، Xgwm190، Xgwm448، Xbarc206 با یک الل شناسایی شد. با ترکیب نشانگرهایی با الل‌های اختصاصی برای گروه‌های مختلف می‌توان با تعداد کمتر نشانگر بطور موثر ژنوتیپ‌های مختلف را از هم تفکیک کرد و یا اینکه ژنوتیپ‌های جدید را به گروه‌های از قبل تعیین شده منتسب کرد.

نتیجه گیری

مقایسه نشانگرهایی با توالی تکراری متفاوت نشان داد که نشانگرهای با توالی‌های تکراری دو نوکلئوتیدی دارای بیشترین تعداد الل، میزان اطلاعات چند شکلی، تنوع ژنی و کمترین میزان فراوانی الل غالب بودند. تعداد زیاد الل به ازای هر جایگاه ریزماهواره، همچنین وجود الل‌های اختصاصی نشان داد که این نشانگرهای ریزماهواره توانستند ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در بیشتر موارد براساس شجره آنها تفکیک کنند، هر چند استثناهایی نیز در برخی موارد مشاهده شد. با توجه به بالا بودن میزان اطلاعات چندشکل (PIC) تعدادی از نشانگرها، می‌توان از ترکیب آنها برای تمایز بین ژنوتیپ‌هایی با خویشاوندی نزدیک استفاده کرد. قرارگرفتن ژنوتیپ‌های MV_{17} و بولانی بعنوان والدین مقاوم و حساس در اکثر پروژه‌های مقاومت به زنگ در کشور در گروه‌های مجزا و با فاصلهٔ ژنتیکی بیشتر، نشان دهنده اعتبار گروه‌بندی‌های حاصله در این مطالعه می باشد.

سپاسگزاری

از قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز برای فراهم کردن هزینه و امکانات لازم و از بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر جهت فراهم کردن مواد ژنتیکی این تحقیق سپاسگزاری می شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱-محمدی س ا (۱۳۸۵) تجزیه و تحلیل داده های مولکولی از دیدگاه بررسی تنوع ژنتیکی. مجموعه مقالات کلیدی نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، ۷-۵ شهریور ماه ۱۳۸۵، ص ۱۱۹-۹۶.

2. Ahmad M (2002) Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats. Genome, 45: 646–651.

3. Akkaya MS and Buykunal-Bal EB (2004) Assessment of genetic variation of bread wheat varieties using microsatellite. Euphytica, 135: 179-185.

4. Christiansen MJ, Andersen SB, and Ortiz R (2002) Diversity changes in an intensively bread wheat germplasm during the 20th century. Mol. Breed., 9: 1-11.

5. CIMMYT (2005) Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.

6. Donini P, Stephenson P, Bryan GJ and Kobner RMD (1998) The potential of microsatellites for high throughput genetic diversity assessement in wheat and barley. Gen. Res. Crop Evol., 45: 415-421.

7. Dresigacker S, Zhang P, Warburton ML, Ginkelt ML, Hoisington DA, Bohn M and Melchinger AE (2004) SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted of different megaenviroments. Crop Sci., 44: 381-388.

8. Gethi JG, Labate JA, Lamkey KR, Smith ME and Kresovich S (2002) SSR variation in important U.S. maize inbred lines. Crop Sci, 42: 951-957.

9. Grunberg AM, Costa JM, and Kratochvil RJ (2001) Amplified fragment length polymorphism in a selected sample of soft red winter wheat. Cereal Res. Commun., 29: 251–258.

10. Heckenberger M, Bohn M, Ziegle JS, Joe LK, Hauser JD, Hutten M, and Melchinger AE (2002) Variation of DNA fingerprints amons accessions within maize inbred lines and implication for identification of essentially derived varieties. Mol. Breed., 10: 181-191.

11. Huang XQ, Börner A, Röder, MS and Ganal M W (2002) Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet., 105: 699–707.

12. Khlestkina EK, Pestsova EG, Salina E, Röder MS, Arbuzova VS, Koval SF and Börner A (2002) Genetic mapping and tagging of wheat genes using RAPD, STS, and SSR markers. Cell. And Mol. Bio. Let., 7: 795-802.

13. 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 Breed., 123: 122-127.

14. Liu K and Muse V (2004) PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics, 21: 2128-2129.

15. Manifesto MM, Schlatter AR, Hopp HE, Suarez EY, and Dubcivsky J (2001) Quantitative evaluation of diversity in wheat germplasm using molecular markers. Crop Sci., 41: 682-690.

16. Mohammadi SA and Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. Crop Sci., 43: 123-1248.

17. Nagaoka T and Oghihara Y (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor. Appl. Genet., 94: 597–602.

18. Reif JC, Zhang P, Dresigacker S, Warburton ML, Ginkelt ML, Hoisington DA, Bohn M, and Melchinger AE (2005) Wheat genetic diversity trend during domestication and breeding. Theor. Appl. Genet., 5: 859-864.

19. Ribeiro-Carvaiho C, Guedes-Pinto H and Igregas G (2004) High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace Barbela. Ann. Bot., 94: 699-705.

20. Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate system (v.2.1). User guide. Exeter Software, Setauket, New York.

21. Saghai-Maroof MA, Soliman K, Jorgensen RA and Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 8014–8018.

22. Ward RW, Yang ZL, Kim HS and Yen C (1998) Comparative analyses of RFLP diversity in landraces of *Triticum aestivum* and collections of *T. tauschii* from China and Southwest Asia. Theor. Appl. Genet., 96: 312-318.

23. Wei YM, Hou YC, Yan ZH, Wu W, Zhang ZQ, Liu DC and Zhang YL (2005) Microsatellite DNA

www.SID.ir

Archive of SID

polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to fusarium head blight. Theor. Appl. Genet., 46: 3-9.

24. Wie YM, Zhang Y, Yan Z, Wu W, Zhang Z and Lan X (2003). Genetic diversity in Chinese endemic wheats based on STS and SSR markers. Wheat Information Service, 97: 9-15.

25. Zhang XY, Li CW, Wang LF, Wang HM, You GX and Dong YS (2002) An estimation of the minimum number of SSR alleles needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement and production. Theor. Appl. Genet., 106: 67-73.

26. Zhang P, Dreisigacker S, Melchinger AE, Reif JC, Mujeeb Kazi A, Van Ginkel M, Hoisington D and Warburton ML (2005). Quantifying novel sequence variation and selective advantage in synthetic hexaploid wheats and their backcross-derived lines using SSR markers. Mol. Breed., 15: 1-10.

www.SID.ir