ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۴۳۸- ۴۲۹

بررسی تنوع ژنتیکی برخی لاین‌های جو زراعی با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP

Evaluation of genetic diversity of some cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.) lines by AFLP markers

افسانه شیری[۱]، سیده ساناز رمضانپور*[۱]، حسن سلطانلو[۱]، مهدی کلاته‌عربی[۲]، شعبان کیا[۲]

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشیاران، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیاران، مرکز تحقیقات کشاورزی گلستان

Shiri A[1], Ramezanpour SS[*1], Soltanloo H[1], Kalateh Arabi M[2], Kia Sh[2]

1.1. Graduated Student, Associate Professors, Gorgan Universirty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Assistant Professor, Faculty Staff of Golestan Agricultural Research Station, Gorgan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:ramezanpours@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۷- تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

چکیده

جو یکی از غلات مهم در جهان است که به عنوان غذا مورد استفاده بشر و حیوانات قرار می‌گیرد. کاهش تنوع ژنتیکی در این گیاه موجب آسیب‌پذیری شدید در برابر تنش‌های محیطی، آفات و بیماری‌ها و در نتیجه کاهش عملکرد شده است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۶۴ لاین زراعی جو در یک طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP بررسی شد. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی و تعیین تنوع ژنتیکی موجود در لاین‌های مورد بررسی جو از نظر مولکولی و استفاده از اطلاعات حاصل در انتخاب والدین برای انجام تلاقی و تولید جمعیت‌های مناسب در نسل‌های بعدی بود. با استفاده از ۸ ترکیب آغازگری AFLP تعداد ۷۴۹ باند حاصل شد که ۹۳ باند چندشکل بودند. بیشترین و کمترین باند چندشکل به ترتیب، با استفاده از ترکیبات آغازگری E-/M-CTA ACA (۱۶ باند) و E-ACA /M-CTC (۷ باند) حاصل شد. از آنجا که بیشترین میزان PIC مربوط به ترکیب آغازگری E-ACA/ M-CAA (۰/۴۱) بود، بنابراین می‌توان از آن برای تمایز بین ژنوتیپ‌های جو با خویشاوندی بسیار نزدیک استفاده کرد. تجزیه خوشه‌ای صفات مولکولی بر اساس ضریب تشابه جاکارد، لاین‌های مورد مطالعه را به ۷ گروه تقسیم کرد. تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) نیز نتایج تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد. لاین ۴۱ و رقم بومی صحرا کمترین تشابه ژنتیکی را نشان داده و دارای بیشترین فاصله یا اختلاف ژنتیکی بودند. بنابراین در برنامه-های اصلاحی می‌توان از این دو لاین برای انجام تلاقی و تولید نتاج دارای تنوع ژنتیکی بالا استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه به مختصات اصلی
تجزیه خوشه‌ای
جو زراعی
نشانگر مولکولی AFLP

Archive of SID

مقدمه

هر ساله میلیون‌ها هکتار از اراضی زراعی در جهان به کشت گیاهان خانواده گندمیان اختصاص داده می‌شود که در این بین جو با اختصاص حدود ۱۱ درصد از سطح زیر کشت غله دنیا و همچنین با ۱۲ درصد تولید پس از گندم، برنج، ذرت، چهارمین غله با اهمیت جهان محسوب می‌شود (Patpour 1998). جو به علت تنوع ژنتیکی بالا یکی از گیاهانی است که در شرایط کاملا متفاوت آب و هوایی رشد کرده و دارای ارقامی می‌باشد که نسبت به شرایط مختلف سازگاری دارند (Ebrahimi et al. 2011). یکی از پی‌آمدهای اجتناب‌ناپذیر کشاورزی مدرن که مبتنی بر استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت قابل قبول است، کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی بوده است. اگرچه تخمین این کاهش تنوع ژنتیکی مشکل و یا غیرممکن است، اما در این که تعداد بسیاری از ژن‌های مفید از دست رفته و ذخایر ژنتیکی با سرعت فزاینده‌ای کاهش یافته‌اند و محصولات زراعی عمده در معرض تهدید روز افزون شرایط محیطی نامناسب و تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار گرفته‌اند، تردیدی وجود ندارد. بنابراین امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان اجزای مهم پروژه‌های اصلاح نباتات تلقی می‌شوند (Arzani 1999). روش AFLP مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که توسط Vos et al. (1995)، ارایه شد. این روش براساس تکثیر دستجات خاصی از قطعات برش یافته ژنومی با استفاده از PCR می‌باشد. از مزایای این روش تکرارپذیری بالا، امکان بررسی هم‌زمان چندین مکان ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر، غیرحساس بودن الگو، ظرفیت بررسی کل ژنوم برای نمایان DNA به غلظت الگو، ظرفیت بررسی کل ژنوم برای نمایان کردن چندشکلی و تولید تعداد زیاد نوار تکرارپذیر در مدت زمان کوتاه می‌باشد (Vos et al. 1995; Pejic et al. 1998; Sasanuma et al. 2002). توزیع و فراوانی نشانگرهای AFLP در طول ژنوم یکنواخت نیست و همانند سایر غلات انتخاب ترکیب آغازگرها به طور مستقیم روی توزیع مکانی نشانگرهای AFLP تاثیر می‌گذارد. دلیل توزیع غیریکنواخت این نشانگر به مکانیسم‌های ایجاد چندشکلی در این نشانگر نسبت داده می‌شود، وقایعی مانند جهش، حذف و اضافه شدن قطعات در ایجاد چندشکلی در این نشانگر دخیل هستند (Greg 1998). اکثر این وقایع به طور تصادفی در طول ژنوم به وقوع می‌پیوندند و بنابراین به نظر می‌رسد که مکان‌های نشانگر AFLP نیز به صورت تصادفی در طول ژنوم قرار گرفته باشند (Franco et al. 2001). عموما نشانگرهای AFLP که با ترکیب‌های مختلف آنزیم‌های برشی حاصل شده‌اند توزیع مناسب‌تری در طول ژنوم داشته‌اند. همچنین تجمع نشانگرها به‌خصوص AFLP در نواحی سانترومری نیز گزارش شده‌است (Staub and Serguen 1996; Franco et al. 2001). تجمع نشانگرهای AFLP و RFLP در نواحی سانترومری شاید به دلیل کاهش یا ممانعت از نوترکیبی در این مناطق باشد (Franco et al. 2001; Langridge et al. 2001) و این عقیده در مورد سایر نقشه‌های ژنتیکی منتشر شده در سایر غلات نیز صادق است (Franco et al. 2001). AFLP به دلیل تکرارپذیری بالا، کمترین وابستگی به شرایط محیطی و تولید تعداد زیادی باند در یک آزمون، یک روش مفید و قابل اعتماد می‌باشد. زیرا تکرارپذیری یک روش ساده برای ارزیابی کیفیت نشانگر محسوب می‌شود که در نتیجه می‌توان خوشه‌بندی صحیحی بر اساس داده‌های حاصل از آن برای ارقام متفاوت انجام داد (Paul et al. 1997). در تحقیقی که توسط Jones et al. (1997) صورت گرفت، مشخص شد که روش AFLP تکرارپذیری بالایی در بین هفت آزمایشگاه اروپایی داشته است، این آزمایش‌ها تنها در یک باند با هم تفاوت داشتند.

Sayed-Tabatabaei and Shahnejat-Bushehri (2001) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام گندم با استفاده از نشانگر AFLP از ۱۶ جفت آغازگر انتخابی استفاده کردند. در مجموع ۱۹۹۸ نوار به دست آمد که در محدوده تقریبی ۳۷ الی ۱۱۴ جفت بازی واقع شدند. نتایج نشان داد که ارقام تحت بررسی از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار نبوده و گسترش پایه ژنتیکی واریته‌ها نیاز جدی است. در پژوهشی دیگر تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های فسکیوی بلند نیز با استفاده از نشانگر AFLP بررسی شد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد در نرم‌افزار NTSYS انجام شد و براین اساس ژنوتیپ‌ها به پنج گروه تقسیم‌بندی شدند (Khayam-Nekouei et al. 2001). Rahaii (2002) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط

Archive of SID
www.SID.ir

ژنتیکی بین ارقام کلزا از ۲۰ آغازگر انتخابی AFLP استفاده کرد که در کل ۲۱۴۵ باند مشاهده شد و از این تعداد ۱۰۵۸ باند چندشکل بود. در این تحقیق تشابه ژنتیکی بین ارقام کلزا، با استفاده از ضریب جاکارد تعیین شد. دامنه تغییر تشابه ژنتیکی بین ۰/۳۸ تا ۰/۸۴ و میانگین ۰/۶۱ بود. نتایج تجزیه خوشه‌ای آنها نشان داد که ارقام کلزا در چهار گروه قرار گرفتند. محققین نشان دادند که می‌توان از روش AFLP به عنوان ابزاری کارا و مؤثر در تعیین روابط ژنتیکی ارقام کلزا استفاده کرد. در پژوهشی دیگر تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری توسط نشانگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت. جهت محاسبه تشابه ژنتیکی میان اکوتیپ‌ها از ضریب همبستگی جاکارد و روش گروه‌بندی UPGMA استفاده شد. اکوتیپ‌ها در سطح تشابه ۶۲ درصد در ۸ گروه قرار گرفتند. نتایج، تنوع ژنتیکی بالایی را میان اکوتیپ‌ها نشان داد. همچنین تنوع ژنتیکی بالا نشان داد که گندم سرداری احتمالا یک رقم نیست بلکه توده‌ای از اکوتیپ‌ها می‌باشد و تجزیه و تحلیل AFLP روشی مفید برای ارزیابی تنوع ژنتیکی میان اکوتیپ‌های گندم می‌باشد (Osmani and siosemarde 2009). این تحقیق به منظور تعیین تنوع ژنتیکی بین ۶۴ لاین زراعی جو و شناسایی لاین‌های دارای فاصله ژنتیکی برای انجام تلاقی و تولید نتاج دارای تنوع ژنتیکی بالا در برنامه‌های اصلاحی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی و شرایط کشت

این تحقیق در سال ۱۳۸۹ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی عراقی محله گرگان اجرا شد. آزمایش با ۶۴ لاین شامل ۲۸ لاین از مناطق معتدله و ۳۵ لاین از مناطق ایکاردا به همراه رقم بومی صحرا در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد، مشخصات لاین‌ها و شجره آنها برای لاین‌های منطقه ایکاردا و معتدله به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ آمده است. در هر تکرار آزمایش، هریک از ژنوتیپ‌های مورد بررسی در دو خط یک متری و به فاصله ۳۰ سانتی‌متر از یکدیگر (روی یک پشته) و به میزان ۶ گرم بذر در شرایط مزرعه‌ای و زیر سیستم آبیاری جوی و پشته کشت شدند.

نمونه‌برداری، استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت آن

جهت استخراج DNA از برگ جوان استفاده شد. تعداد ۵ بذر از هر لاین داخل گلدان‌های پلاستیکی کشت شد. سپس گلدان‌ها در داخل سینی‌های لبریز از آب قرار داده شدند تا آب از پایین به بالا نشت پیدا کند و یک لامپ 100 w جهت تامین نور روی گلدان‌ها تعبیه شد. پس از دو هفته زمانی که گیاهچه‌ها به مرحله ۳-۲ برگی رسیدند، برگ‌ها جدا شده و در داخل فویل‌های آلومینیومی قرار گرفت. پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع، نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA براساس روش Saghai-Maroof et al. (1994) انجام شد. به منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد.

آزمایش چندشکلی طولی قطعات تکثیرشده (AFLP)

AFLP طبق روش Vos et al. (1995) انجام شد. در ابتدا DNA استخراجی به طور همزمان با دو آنزیم برشی *Eco*RI و *Mse*I که مکان برشی آن‌ها به‌ترتیب از شش و چهار باز تشکیل شده و انتهای چسبنده تولید می‌کنند، مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. سپس به دو انتهای چسبناک این قطعات بریده شده، سازگارسازهای[1] *Eco*RI و *Mse*I با توالی مشخص متصل شده و به این ترتیب به هر دو انتهای آزاد قطعات، بیست نوکلئوتید شناخته شده و همگانی اضافه شد. تکثیر پیش انتخابی (PCR اولیه)[2] توسط آغازگرهای *Eco*RI و *Mse*I با یک نوکلئوتید اضافی انجام شد. در این مرحله آغازگرهای مورد استفاده با یک نوکلئوتید اضافی در انتهای ´۳، الگوهای DNA مناسب برای مرحله تکثیر انتخابی فراهم می‌کنند. به منظور انجام PCR اولیه، ۴ میکرولیتر DNA رقیق شده از مرحله قبل (به نسبت ۱:۱۰) به عنوان الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X تکثیر[3]، دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات[4] با غلظت ۶۰۰ میکرومول، کلرید- منیزیم[5] با غلظت ۴ میلی‌مول، آغازگر *Mse*I دارای یک نوکلئوتید انتخابی C با غلظت ۱۰ میکرومول، آغازگر *Eco*RI دارای یک نوکلئوتید

[1] Adaptor
[2] Pre amplification
[3] 10X PCR buffer
[4] dNTPs
[5] $MgCl_2$

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- شماره و شجره لاین‌های منطقه ایکاردا در بررسی تنوع ژنتیکی استفاده از نشانگر AFLP

شماره	منطقه ایکاردا	شجره	شماره	منطقه ایکاردا	شجره
۱	*۱۰/۱۱۰	Rihane.03	۱۸	۵۳/۱۱۰	Carina/Moroc9-75
۲	۱۲/۱۱۰	CWB117-9-7/3/Roho//Alger/Ceres362-1-1	۱۹	۶۲/۱۱۰	Tipper//Wl2291/Wl2269
۳	۱۴/۱۱۰	(CWB117-77-9-7//Alpha/Durra(TH	۲۰	۶۴/۱۱۰	Mo.B1337/Wl2291//Moroc9-75
۴	۱۵/۱۱۰	(CWB117-77-9-7//Alpha/Durra(TH	۲۱	۶۶/۱۱۰	Zanbaka
۵	۲۰/۱۱۰	Tadmor	۲۲	۶۷/۱۱۰	Mtn-01
۶	۲۱/۱۱۰	Angora/4/Roho//Alger/Ceres362-1-1/3/Alpha/Durra	۲۳	۶۸/۱۱۰	ER.BL-1A-7
۷	۲۲/۱۱۰	Pamir-009/Sonata	۲۴	۶۹/۱۱۰	ER.BL-8-5
۸	۲۴/۱۱۰	A109-SA-706-79//4341N/Ot/3/Roho//Alger/Ceres362-1-1/4/Antares/ky63-1294//Lignee131	۲۵	۷۰/۱۱۰	Arta
۹	۲۷/۱۱۰	CWB117-77-9-7//Hml-02/ArabiAbiad*2/6/Cl07117-–9/DeirAlla106//Bda/3/Arar/5/11012	۲۶	۷۷/۱۱۰	ER.BL-42-9
۱۰	۲۸/۱۱۰	BKFMaguelone1604/Lignee640//Grivita/3/80-5014/F3BulkHip//Alger/Ceres362-1-1	۲۷	۸۰/۱۱۰	Tokak
۱۱	۳۰/۱۱۰	Cl6944	۲۸	۸۱/۱۱۰	Tadmor//ER/Apm
۱۲	۳۳/۱۱۰	Viringa'S//Wl2291/Wl2269/3/H.spont.38-3/Akrash-01	۲۹	۹۵/۱۱۰	Moroc9-75//Wl2291/Cl01387/3/H.spont.41-1
۱۳	۳۵/۱۱۰	Roho//Alger/Ceres362-1-1/3/Alpha/Durra/4/Alpha/Gumhuriyet//Sonate	۳۰	۹۸/۱۱۰	Schooner/Sara
۱۴	۳۶/۱۱۰	Mari/Aths*2	۳۱	۱۰۲/۱۱۰	ChiCm/An57//Albert/3/Alger/Ceres362-1-1/4/Arta
۱۵	۴۰/۱۱۰	Wl2291	۳۲	۱۰۳/۱۱۰	ChiCm/An57//Albert/3/Alger/Ceres362-1-1/4/Arta
۱۶	۴۲/۱۱۰	Sara/4/H.spont.96-3/3/Roho//Alger/Ceres362-1-1	۳۳	۱۰۴/۱۱۰	Soufara-02/3/RM1508/Por//Wl2269/4/Hml-02/ArabiAbiad//ER/Apm
۱۷	۴۶/۱۱۰	Lignee527//Lignee527/NK1272	۳۴	۱۰۵/۱۱۰	Soufara-02/3/RM1508/Por//Wl2269/4/Hml-02/ArabiAbiad//ER/Apm
			۳۵	۱۰۶/۱۱۰	ArabiAbiad//Arar//H.spont.41-5/Tadmor

*۳۵ لاین مورد بررسی در این تحقیق از بین ۱۱۰ لاین ایکاردا انتخاب شدند و بنابراین این اعداد بیانگر شماره لاین‌ها هستند. لاین ۱۰ از بین ۱۱۰ لاین ایکاردا

انتخابی A با غلظت ۸۰۰ نانومول، یک واحد آنزیم تگ DNA پلی‌مراز[1] (شرکت Fermentase) با یکدیگر مخلوط شد و حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید. در نهایت به منظور انجام PCR از برنامه حرارتی جدول ۳ استفاده شد.

پس از PCR اولیه تکثیر انتخابی (PCR ثانویه) توسط آغازگرها با سه نوکلئوتید انتخابی انجام شد. به منظور انجام PCR ثانویه دو میکرولیتر از فرآورده‌های PCR مرحله قبل (رقیق شده به نسبت ۱:۶) به عنوان الگو، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر ۱۰X تکثیر، دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات با غلظت ۶۰۰ میکرومول، کلرید منیزیم با غلظت ۴ میلی‌مول، هشت آغازگر *Mse*I دارای بازهای انتخابی با غلظت ۸۰۰ نانومول، یک آغازگر فلورسنت *Eco*RI (منتهی به رنگ‌های فلورسنت هگز[2] و تمرا[3] دارای بازهای انتخابی با غلظت ۴۰۰ نانومول، ۰/۵ واحد آنزیم تگ DNA پلی‌مراز (شرکت Fermentase) با یکدیگر مخلوط شد و حجم نهایی به ۱۲/۵ میکرولیتر رسید. برای انجام PCR از برنامه تاچ‌دان[4] استفاده شد که در هر چرخه مقدار دمای اتصال آغازگر کاهش می‌یابد. در طی ۱۰ چرخه اول، در هر چرخه یک درجه سانتی‌گراد از دمای اتصال کاهش یافت (جدول ۴).

محصولات تکثیر انتخابی بر روی ژل پلی‌اکریلامید واسرشت پنج درصد بارگذاری شد. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات DNA، امتیازدهی باندها به صورت (۱) و (صفر) به ترتیب برای حضور و

[1] Tag DNA polymerase

[2] HEX
[3] TAMRA
[4] Touch down

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- شماره و شجره لاین‌های مناطق معتدله در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر AFLP

شماره	منطقه معتدله	شجره	شماره	منطقه معتدله	شجره
۳۶	*۱۴/۳۵۲	YEA389.3/YEA475.4//Productive	۵۰	۱۹۰/۳۵۲	S:510/3/Arinar/Aths//DS 2982
۳۷	۱۸/۳۵۲	Kavir/Arinar//Ashar/3/Lignee 527/Chn-01//Gustoe/4/Rhn-/08/3/Deir Alla 106//Dl71	۵۱	۲۱۶/۳۵۲	Zabol
۳۸	۲۹/۳۵۲	Alanda-01/3/Arar/Lignee527//Arar/PI386540	۵۲	۲۵۸/۳۵۲	Rhn-03*2/M83-194 Ras*32
۳۹	۳۲/۳۵۲	Alanda-01/7/M126/CM67//As/Pro/3/Alanda/6/UC76252/Arig8/5/Hml/4/Lth/3/Nopal//Pro/11012-2	۵۳	۲۶۵/۳۵۲	Arbayan/NK1272/4/Arar/3/Mari/Aths*2//M-Att-73-337-1
۴۰	۳۳/۳۵۲	Bereke-54/Alanda	۵۴	۲۶۷/۳۵۲	
۴۱	۳۴/۳۵۲	Bereke-54/Alanda	۵۵	۲۶۹/۳۵۲	CHAMICO/TOCTE//CONGONA
۴۲	۳۷/۳۵۲	Zarjau/80-5151//DZ-40-66/3/Meteor	۵۶	۲۸۳/۳۵۲	PETUNIA 1
۴۳	۳۹/۳۵۲	PRATO/3/Roubur/WA2136-68//K-281/Skorokhod	۵۷	۲۸۹/۳۵۲	ATACO/BERMEJO//HIGO/3/CLN-B/80.5138//GLORIA-BAR/COPAL/4/CHEVRON-BAR/5/MNS3/6/PINON
۴۴	۷۴/۳۵۲	Express/Saida	۵۸	۲۹۱/۳۵۲	PENCO/CHEVRON-BAR/3/SLLO/ROBUST//QUINA/5/ATACO/BERMEJO//HIGO/3/CLN-B/80.5138//GLORIA-BAR/COPAL/4/CHEVRON-BAR
۴۵	۷۵/۳۵۲	Express/Saida	۵۹	۳۱۲/۳۵۲	CHAMICO/TOCTE//CONGONA
۴۶	۱۱۶/۳۵۲	Rhn//Bc/Coho/3/DeirAlla106//Api/EB89-8-2-15-4/4/Fassa-01	۶۰	۳۱۹/۳۵۲	HIGO/LINO//TOCTE/FALCON-../BAR/3/CHAMICO/TOCTE
۴۷	۱۴۴/۳۵۲	Kmk//Rbr/Wa2196-68/3/EBC(A)/4/Beecher	۶۱	۳۳۱/۳۵۲	Alanda//Lignee527/Arar/3/BF891M-616/4/BF891M-592
۴۸	۱۴۹/۳۵۲	Sawson /3/Zaphar*2//As46/Aths*2	۶۲	۳۳۶/۳۵۲	CHAMICO/TOCTE//CONGONA/3/CHENG DU …105/5/ATACO
۴۹	۱۶۶/۳۵۲	ICNB-105960/Torkman	۶۳	۳۳۸/۳۵۲	…HIGO/LINO//TOCTE/FALCON-BAR/3/CHAMI
			۶۴	صحرا	

*۲۸ لاین مورد بررسی در این تحقیق از بین ۳۵۲ لاین مناطق معتدله انتخاب شدند و بنابراین این اعداد بیانگر شماره لاین‌ها هستند، لاین ۱۴ از بین ۳۵۲ لاین ایکاردا

جدول ۳- برنامه حرارتی برای انجام PCR در مرحله تکثیر پیش انتخابی در روش AFLP

چرخه	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)
	۳۰	۹۴
۲۰ چرخه	۶۰	۶۰
	۱۲۰	۷۲
۱ چرخه	۳۰۰	۷۲
	نامحدود	۴

عدم حضور باند انجام شد. باندهای مبهم و از دست رفته نیز به صورت نقطه (.) مشخص شد. سپس داده‌ها به نرم‌افزار Excel جهت تجزیه و تحلیل منتقل شدند. پس از این مرحله ماتریس تشابه[1] و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc 2.02e محاسبه شد و دندروگرام بر اساس الگوریتم UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد ترسیم شد. برای تعیین همبستگی بین ماتریس خروجی (ماتریسی که بر اساس دندروگرام به دست می‌آید) و ماتریس فاصله یا تشابه (بر اساس آن خوشه‌بندی صورت می‌گیرد)، همبستگی کوفنتیک محاسبه شد. از نرم‌افزار GenALEX V.6.2 برای محاسبه تجزیه به مختصات اصلی استفاده شد.

[1] Similarity matrix

نتایج و بحث

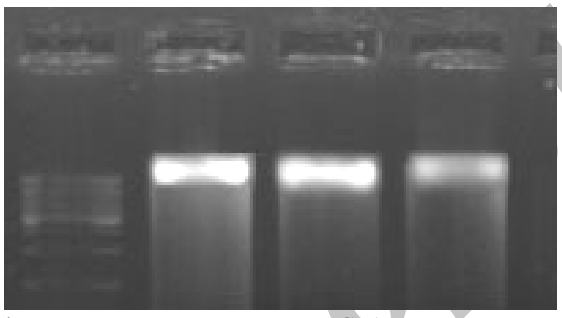
نتایج الگوی DNA بر روی ژل آگارز نشان داد که DNAهای استخراجی از کمیت و کیفیت خوبی برخوردار بودند و شکستگی نداشتند، غلظت نمونه‌ها نیز بین ۳۱/۵ تا ۷۶۴/۵ نانوگرم بر میکرولیتر متغیر بود. به منظور ورود مقادیر یکسان DNA الگو برای واکنش‌های AFLP غلظت نمونه‌های DNA استخراجی به ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر تقلیل یافت (شکل ۱).

برای بررسی چندشکلی DNA بین لاین‌های جو زراعی از ۸ جفت ترکیب آغازگری استفاده شد (جدول ۵). در مجموع ۷۴۹ باند قابل امتیازدهی که اندازه آنها در محدوده ۱۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز بود، ایجاد شد که تعداد ۹۳ باند چند شکل بودند.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴- برنامه PCR تاچدان برای انجام PCR ثانویه در روش AFLP

چرخه	زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	ملاحظات
۱ چرخه	۱۲۰	۹۴	
۱۰ چرخه	۳۰	۹۴	در هر چرخه دمای اتصال یک درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد
	۳۰	۶۳	
	۱۲۰	۷۲	
۲۳ چرخه	۳۰	۹۴	
	۳۰	۵۴	
	۳۰	۷۲	
	نامحدود	۴	



شکل ۱- DNA استخراج شده سه نمونه از ژنوتیپ‌های جو زراعی با روش CTAB. چاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست شامل نشانگر اندازه bp ۱۰۰؛ DNA مربوط به رقم صحرا، لاین ۱۸ و لاین ۵۰ جدول ۲.

توانایی ۸ جفت آغازگرهای مختلف در آشکارسازی چند شکلی بین لاین‌ها متفاوت بود (جدول ۶). بیشترین تعداد باند مربوط به ترکیب آغازگری E-ACA/M-CTT با ۱۱۲ باند و کمترین تعداد باند مربوط به ترکیب آغازگری E-ACA/M-CAT با ۷۹ باند بود. همچنین بیشترین باند چندشکل مربوط به ترکیب آغازگری M-E-ACA/CTA با ۱۶ باند و کمترین باند چند شکل مربوط به آغازگر E-ACA/M-CTC با ۷ باند بود. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر E-ACA/M-CAG با ۱۷/۲۸ درصد و کمترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر E-ACA/M-CTC با ۸/۱۳ درصد حاصل شد. بر طبق نتایج بدست آمده هیچ گونه ارتباط مستقیمی بین تعداد کل نوارها با مقدار چندشکلی مشاهده شده وجود نداشت. برای مثال ترکیب آغازگری E-ACA/M-CTT با تعداد باند ۱۱۲ نسبت به ترکیب آغازگری E-ACA/M-CAG با تعداد باند ۸۱ درصد چندشکلی پایین‌تری نشان داد. میانگین تعداد باندهای چند شکل ۱۱/۶۲ بود. شکل ۲ الگوی باندی AFLP ۶۴ نمونه با ترکیبات آغازگری E-ACA/M-CTT جهت تجزیه AFLP را نشان می‌دهد.

جدول ۵- جفت ترکیبات آغازگری مورد استفاده در آزمایش AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۴ لاین جو زراعی

باز انتخابی *Mse*I	باز انتخابی *Eco*RI
M-CTG	E-ACA
M-CAG	E-ACA
M-CTA	E-ACA
M-CTT	E-ACA
M-CAA	E-ACA
M-CTC	E-ACA
M-CAC	E-ACA
M-CAT	E-ACA

محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از ۰/۲۸ تا ۰/۴۱ متغیر بود (جدول ۷). بالاترین مقدار PIC مربوط به جفت آغازگر M-E-ACA/CAA با ۰/۴۱ بود. بنابراین می‌توان از آن برای تمایز بین ژنوتیپ‌های جو با خویشاوندی بسیار نزدیک استفاده کرد. کمترین مقدار PIC مربوط به جفت آغازگر E-ACA/M-CTA با

Archive of SID
www.SID.ir

۰/۲۸ بود. میانگین PIC برای تمام جفت آغازگرهای مورد استفاده ۰/۳۷ بود. Lombard et al. (2002) در مطالعات اینبرد لاین‌های خالص ذرت با استفاده از نشانگرهای AFLP، مقدار PIC برای آغازگرهای مختلف مورد استفاده را بین ۰/۳۱- ۰/۲۵ گزارش کردند. همچنین Mardi et al. (2011) در بررسی تنوع ژنتیکی گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای AFLP، مقدار میانگین PIC را برابر با ۰/۳ اعلام کرد. میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چند شکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است و بیانگر قدرت تفکیک و تمایز بالای آن نشانگر می‌باشد (Ribeiro-carvalho et al. 2004).

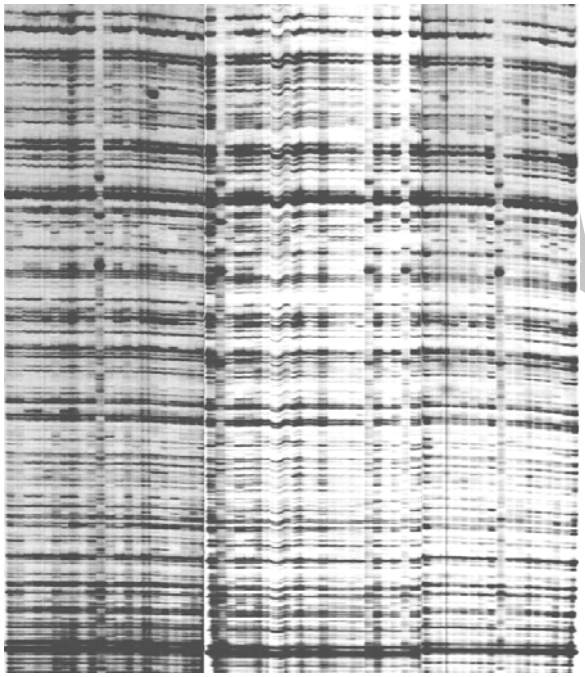
جدول۶- مشخصات آغازگرها و اطلاعات چند شکلی به دست آمده در آزمایش AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۴ لاین جو زراعی

جفت آغازگر اختصاصی	تعداد باند	تعداد باند چندشکل	درصد چندشکلی
E-ACA/M-CAG	۸۱	۱۴	۱۷/۲۸
E-ACA/M-CTA	۱۱۰	۱۶	۱۴/۵۴
E-ACA/M-CTT	۱۱۲	۱۳	۱۱/۶
E-ACA/M-CAA	۱۰۲	۱۱	۱۰/۷۸
E-ACA/M-CAC	۹۲	۱۰	۱۰/۸۶
E-ACA/M-CAT	۷۹	۱۰	۱۲/۶۵
E-ACA/M-CTG	۸۷	۱۲	۱۳/۷۹
E-ACA/M-CTC	۸۶	۷	۸/۱۳
میانگین	۹۳/۶۲	۱۱/۶۲	۱۲/۴۵

جدول ۷- میزان PIC نشانگرهای AFLP مورد مطالعه در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۴ لاین جو زراعی

PIC	جفت آغازگر اختصاصی
۰/۳۹	M-CAG/E-ACA
۰/۲۸	M-CTA/E-ACA
۰/۴۰	M-CTT/E-ACA
۰/۴۱	M-CAA/E-ACA
۰/۲۹	M-CAC/E-ACA
۰/۴۰	M-CAT/E-ACA
۰/۳۹	M-CTG/E-ACA
۰/۴۰	M-CTC/E-ACA
۰/۳۷	میانگین

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.02e، براساس الگوریتم‌های UPGMA، SLINK و CLINK، همچنین ضرایب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده به‌عنوان معیار مقایسه انجام شد. گروه‌بندی بر اساس ضریب جاکارد و روش UPGMA با ضریب کوفنتیک ۰/۸۹ نسبت به روش‌های دیگر ضریب بالاتری را به خود اختصاص داد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای جمعیت مورد نظر را به ۷ گروه مجزا تفکیک کرد (شکل ۳). خط برش با توجه به میانگین ضرایب تشابه (۰/۴۶) تعیین شد. همانطور که در جدول ۸ ارائه شده و با توجه به شکل ۳، گروه اول، دوم و پنجم هریک دارای تنها یک ژنوتیپ هستند، گروه چهارم با دو ژنوتیپ و گروه سوم با سه ژنوتیپ در رده بعدی قرار دارند و پس از آنها نیز گروه هفتم با ۲۰ ژنوتیپ قرار گرفته است. گروه ششم با ۳۶ ژنوتیپ بیشترین تعداد ژنوتیپ را به خود اختصاص داده بود.



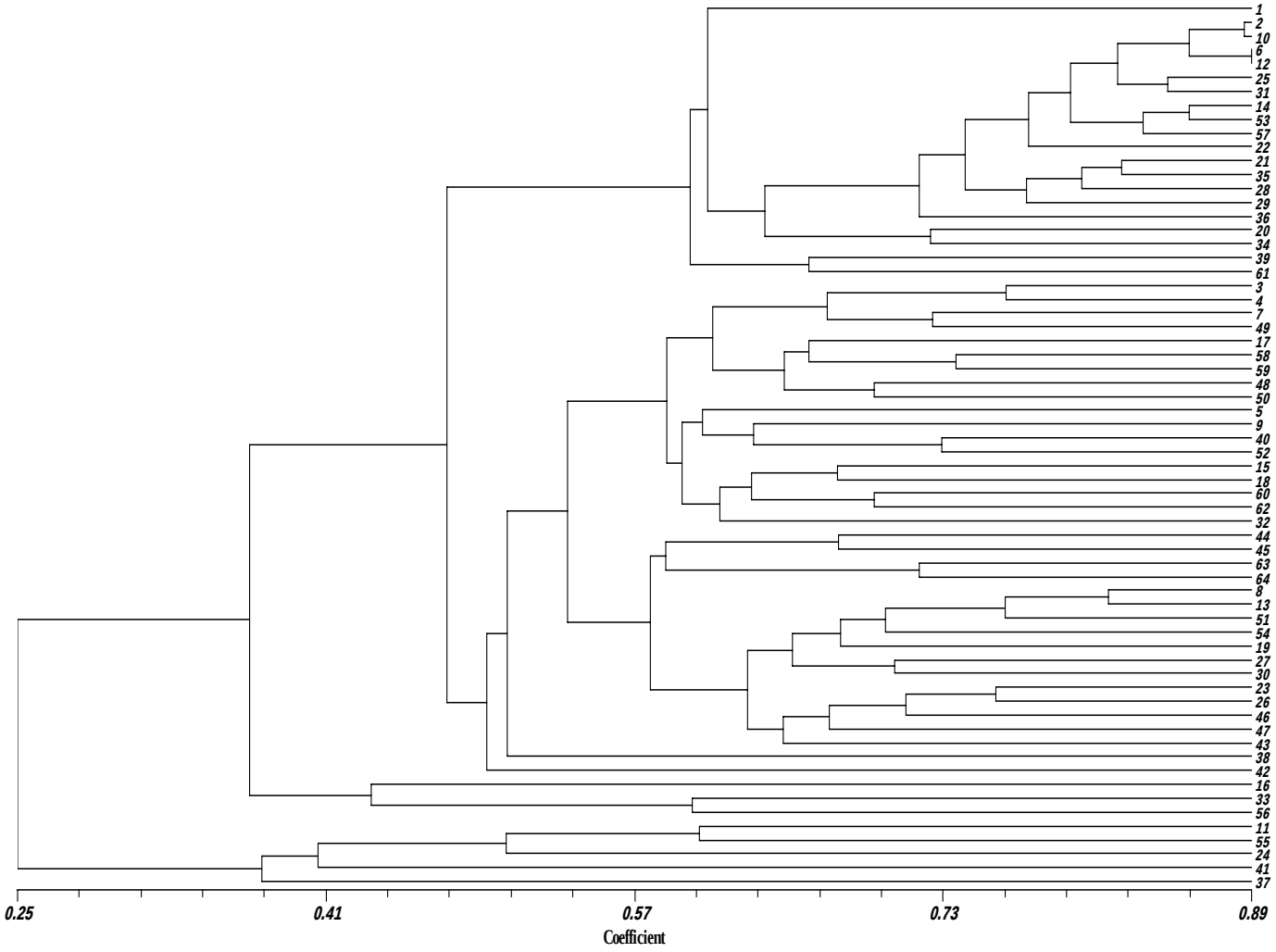
شکل ۲- الگوی نواری جفت آغازگر E-ACA/M-CTT به منظور بررسی نوارهای چندشکل بین لاین‌های جو زراعی روی ژل پلی‌اکریل‌آمید، در این ژل ۶۴ ژنوتیپ به ترتیب شماره (طبق جدول ۱ و ۲) از چپ به راست قرار گرفتند.

ماتریس تشابه با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.02e، براساس ضریب جاکارد محاسبه شد. ضریب تشابه ژنتیکی بین ۰/۱۱۲۹ تا ۰/۹۵۳۸ متغیر بود. براساس نتایج بدست آمده بیشترین تشابه

www.SID.ir

جدول ۸- تعداد ژنوتیپ‌های جو قرار گرفته در هر گروه بر اساس نشانگرهای مورد مطالعه

گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴	گروه ۵	گروه ۶	گروه ۷
۳۷	۴۱	۱۱-۲۴-۵۵	۳۳-۵۶	۱۶	۳-۴-۵-۷-۸-۹-۱۳-۱۵-۱۷-	۱-۲-۶-۱۰-۱۲-
					۱۸-۱۹-۲۳-۲۶-۲۷-۳۰-۳۲-	۱۴-۲۰-۲۱-۲۲-
					۳۸-۴۰-۴۲-۴۳-۴۴-۴۵-۴۶-	۲۵-۲۸-۲۹-۳۱-
					۴۷-۴۸-۴۹-۵۰-۵۱-۵۲-۵۴-	۳۴-۳۵-۳۶-۳۹-
					۵۸-۵۹-۶۰-۶۲-۶۳-۶۴	۵۳-۵۷-۶۱

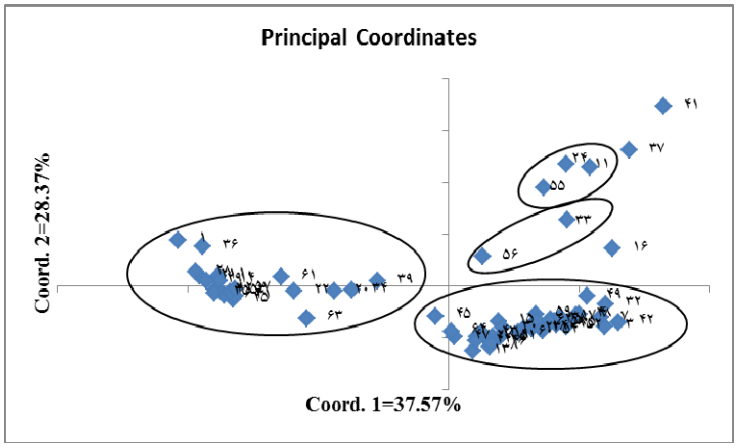


شکل ۳- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ۶۴ لاین جو زراعی بر اساس ضریب جاکارد و روش UPGMA با استفاده از ۸ ترکیب آغازگری AFLP

ژنتیکی بین دو لاین ۶ و ۱۲ (۰/۸۸۷۱) از لاین‌های مناطق ایکاردا در گروه هفتم و کمترین تشابه ژنتیکی بین لاین ۴۱ از مناطق معتدله در گروه دوم و رقم بومی صحرا در گروه ششم (۰/۰۴۶۲) مشاهده شد. در بررسی تنوع ژنتیکی بلوط ایرانی در غرب کشور با نشانگر مولکولی AFLP ضریب تشابه ژنتیکی بین ۰/۳۲ تا ۰/۷۴ حاصل شد (Mashayekhi et al. 2010). همچنین در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری با بهره‌گیری از نشانگر AFLP دامنه تشابه بین این اکوتیپ‌ها از ۰/۵۰ تا ۰/۸۹ متغیر بود (Osmani and Siosemarde 2009).

www.SID.ir

در این مطالعه تجزیه به مختصات اصلی به‌منظور بررسی توزیع مناسب ژنومی نشانگرهای AFLP، با استفاده از نرم‌افزار GenALEx V.6.2 انجام گرفت. تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ماتریس تشابه به‌دست آمده از ضریب جاکارد انجام شد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی، نتایج تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد. Messmer et al. (1992) پیشنهاد کردند که تجزیه به مختصات اصلی به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی خواهد شد. هفت گروه حاصل از دسته‌بندی لاین‌ها بر اساس تجزیه خوشه‌ای، در شکل ۴ کاملا قابل تشخیص می‌باشد که این مسئله موید قطع نمودار تجزیه خوشه‌ای از محل مناسب و دسته‌بندی صحیح اکوتیپ‌ها می‌باشد. اولین مولفه اصلی بیشترین تغییرات داده‌های اولیه (۳۷/۵۷ درصد) را در بردارد و داده‌ها همبستگی بالایی با یکدیگر نشان داده و دومین مولفه اصلی بیشترین تغییرات باقیمانده (۲۸/۳۷ درصد) را بعد از اولین مولفه اصلی توجیه می‌کند. در مجموع سه مولفه اول ۷۷/۸۶ درصد تغییرات واریانس را توجیه کردند. نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که ۸ جفت نشانگر AFLP مورد استفاده دارای توزیع مناسب ژنومی بوده است.



شکل ۴- تجزیه به مختصات اصلی بر اساس مولفه اول و دوم بر روی ۶۴ ژنوتیپ جو زراعی با استفاده از ۸ ترکیب آغازگری

تنوع ژنتیکی جو به عنوان یکی از مهم‌ترین غلات جهان به جهت اقتصادی با نشانگر مولکولی AFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی حاکی از وجود تنوع بالا در بین لاین‌های زراعی جو به ویژه لاین‌های مناطق معتدله بود. اغلب ژنوتیپ‌هایی که در گروه‌های اول، دوم، سوم و چهارم به صورت ژنوتیپ‌های انفرادی واقع شده‌اند، متعلق به لاین‌های مناطق معتدله هستند. در گروه هفتم از ۲۰ ژنوتیپ موجود، ۱۵ ژنوتیپ مربوط به لاین‌های منطقه ایکاردا هستند و تنها ۵ ژنوتیپ از لاین‌های مناطق معتدله در این گروه قرار گرفته است. رقم بومی صحرا نیز در گروه هفتم واقع شده است، در این گروه ۱۶ ژنوتیپ متعلق به لاین‌های ایکاردا و ۱۹ ژنوتیپ از لاین‌های مناطق معتدله هستند. با توجه به شجره لاین‌های مورد بررسی اغلب ژنوتیپ‌هایی که در یک گروه واقع شده‌اند، دارای حداقل یک ژنوتیپ مشترک در شجره خود هستند. از آنجا که تشابه ژنتیکی با فاصله ژنتیکی رابطه معکوس دارد، لذا لاین ۴۱ و رقم بومی صحرا که کمترین تشابه ژنتیکی را نشان دادند دارای بیشترین فاصله یا اختلاف ژنتیکی هستند. بنابراین در برنامه‌های اصلاحی می‌توان از این دو لاین برای انجام تلاقی و تولید نتاج دارای تنوع ژنتیکی بالا استفاده کرد. بیشترین میزان PIC مربوط به ترکیب آغازگری E-ACA/ M-CAA (۰/۴۱) بود. بنابراین می‌توان از آن برای تمایز بین ژنوتیپ‌هایی با خویشاوندی بسیار نزدیک استفاده کرد. روش AFLP به دلیل تکرارپذیری بالا و تعداد زیادی باند در یک آزمون، یک تکنیک مفید و قابل اعتماد می‌باشد زیرا تکرارپذیری، یک روش ساده برای ارزیابی کیفیت نشانگر محسوب می‌شود که در نتیجه می‌توان خوشه‌بندی صحیحی بر اساس داده‌های حاصل از آن برای ارقام متفاوت انجام داد.

منابع

Arzani A (1999) Plant Breeding (translation) Isfahan University of Technnology Press, Isfahan, Iran (in Farsi).
Ebrahimi A, Naghavi MR, Sabokdast M (2011) Evaluation and Comparision of ChloroPHyll Content, Carotenoid, Protein and Enzyme in Different Barley Species of Iran. Iranian Journal of Crop Science 41: 57-65.
Franco J, Crossa J, Ribaut JM, Bertran J, Warburton ML, Khairallah M (2001) A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. Theoretical and Applied Genetics 103:944-952.
Greg AP (1998) An AFLP based genome map of wheat (*Triticum aestivum*). Plant and Animal Genome VI Conference. San Diego., CA.
Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, Van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevschi A, Marmiroli N, Aert R, Volckaert G, Rueda

Archive of SID
www.SID.ir

J, Linacero R, Vazquez A, Karp A (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by network of European laboratories. Molecular Breeding 3: 381-390.

Khayam-Nekouei M, Jahantighi R, Solouki M, Mohammadi R, Emamjomeh AA (2001) Study on genetic diversity of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) genotypes using AFLP marker. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 16 (Special issue 1-b): 351-360. (in Farsi).

Langridge P, Lagudah ES, Holton TA, Apples R, Sharp PJ, Chalmers K (2001) Trends in genetic and genome analysis of wheat: a review. Australian Journal of Agricultural Research 52: 1043-1077.

Lombard V, Baril CP, Duberuil P, Blouet F, Zhang D (2000) Potential use of AFLP markers for distinction of rapeseed cultivars. Geves, La Miniere, F-78285 Guyancourt Cedex, France.

Mardi M, Naghavi MR, Pirseyedi SM, Kazemi Alamooti M, Rashidi Monfared S, Ahkami AH, Omidbakhsh MA, Alavi NS, Salehi Shanjani P, Katsiotis A (2011) Comparative Assessment of SSAP, AFLP and SSR Markers for Evaluation of Genetic Diversity of Durum Wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). Journal Agriculturl Science and Technology 13: 905-920.

Mashayekhi Sh, Shiran B, Jahanbazi H, Houshmand S, Soltani A, Sorkheh K (2010) Study of Genetic Variation of Quercus brantii in Chaharmahal va Bakhtiary Province using AFLP Molecular Markers, Journal of Forest and Wood Products 3: 77-90. (in Farsi).

Messmer MM, Melchinger AA, Boppenmair J, Hermann RG, Brunklaus-Jung E (1992) RFLP analysis of early-maturing European maize germplasm. I. Genetic diversity among flint and dent inbreds. Theoretical and Applied Genetics 83:1003- 1012.

Osmani J, Siosemarde A (2009) Evaluation of genetic diversity in Sardary wheat ecotypes by AFLP molecular markers. Modern Genetics Journal 4: 39-48. (in Farsi)

Patpour M (1998) study on resistance of some barley cultivars to powdery mildew and determination of Peroxidase activity in to susceptible and resistant cultivars, MSc thesis, University of Tehran, Iran. (in Farsi).

Paul S, Wachira FN, Powell W, Waugh R (1997) Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 94: 255-263.

Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morganet M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M (1998) Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLP, RAPDs, SSRs, and AFLPs. Theoretical and Applied Genetics 97: 1248-1255.

Rahaii M (2002) Genetic diversity assessment of canola using AFLP and RAPD markers. MSc thesis, University of Tehran, Iran. (in Farsi).

Ribeiro-carvalho C, Guedes-pinto H, Igregas G (2004) High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace Barbela. Annals of Botany 94: 699-705

Saghai-Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Exrraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosom locations, and population dynamics. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 91: 5466-5470.

Sasanuma T, Chabane K, Endo TR, Valkoun J (2002) Genetic diversity of wheat wild relatives in the Near East detected by AFLP. Euphytica 127: 81-93.

Sayed-Tabatabaei BE, Shahnejat-Bushehri AA (2001) Evaluation of genetic variation among wheat cultivars using AFLP markers. Journal of Agricultural Sciences 32: 607-614 (in Farsi).

Staub JE, Serquen C (1996) Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. Horticultural Science 31: 729-740.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijens M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research 21: 4407-4414.

Archive of SID

www.SID.ir