ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷
صفحه ۳۱۱ - ۳۰۷

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم نان ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای SSR

Evaluation of Genetic diversity in Iranian and Exotic wheat genotypes using SSR markers

هانیه کافی[۱]، سعید نواب‌پور*[۱]، خلیل زینلی‌نژاد[۱]، محمدهادی پهلوانی[۱]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Kafi H[1], Navabpour S*[1], Zaynali Nezhad KH[1], Pahlavani MH[1]

1- Ms Graduated, Associate Professors, Assistant Professor, Associate Profesore of Plant Breeding and Biotechnology Department Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

گندم از جمله قدیمی‌ترین و مهم‌ترین گیاهان زراعی مورد استفاده انسان است. به‌طور حتم موفقیت در برنامه اصلاحی در گرو میزان تنوع ژنتیکی است. روش‌هایی مختلفی برای تخمین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله آن‌ها می‌توان ثبت شجره، خصوصیات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی را نام برد. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ۳۵ ژنوتیپ گندم نان بر اساس نشانگرهای ریزماهواره بود. برای این منظور از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد. تعداد آلل‌های مشاهده شده توسط ۱۳ نشانگر مورد استفاده بین دو تا ۱۱ بود که بیش‌ترین تعداد آلل مربوط به نشانگر *Xgwm190–5D* و کم‌ترین تعداد آلل مربوط به نشانگر *Xcn13-6B* بود. میانگین کل آلل‌های مشاهده شده در مجموع مکان‌های ژنی ٦/٨٤ به‌دست آمد. آغازگرهای WMC420 و BARC328 باند قابل امتیازدهی تکثیر نکردند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۱۱ تا ۳۸۵ با میانگین ۰/۲۲ متغیر بود. میزان تنوع ژنی مشاهده شده برای مکان‌های ژنی از ۰/۱۰۷ تا ۳۵۷ با میانگین ۰/۲۱٤ به‌دست آمد. بر اساس ضرایب تشابه به‌دست آمده، ارزش‌های تشابه دامنه‌ای از ۰/۹۰ تا ۰/۹۸ درصد را نشان دادند. بیش‌ترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ترکیه و ایران و کم‌ترین آن بین ژنوتیپ‌های عراق و افغانستان مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل، بالاترین ضریب کوفنتیک (r= ۰/۷۳) مربوط به زمانی بود که از روش جاکارد برای تشکیل ماتریس تشابه و از الگوریتم UPGMA برای ترسیم نمودار درختی استفاده شد. بنابراین نمودار درختی حاصل از این روش ملاک دسته‌بندی قرار گرفت. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه طبقه‌بندی کرد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
ضریب تشابه
محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)
نشانگر ریزماهواره

گندم از خانواده‌ی گندمیان (Gramine) و جنس تریتیکوم (*Triticum* L) مهم‌ترین غله در تامین کالری و تغذیه بشر می‌باشد (Ijaz and Khan 2009). آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد میزان آن در ژرم‌پلاسم گیاهان و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات به‌شمار می‌رود (Zhang et al. 2002). ریزماهواره‌ها (SSR) نشانگرهای مبتنی بر PCR هستند به‌دلیل سطوح بالای چندشکلی[1] چند اللی بودن، وراثت هم‌بارز، پوشش وسیع ژنوم و سهولت در آشکارسازی، می‌توان از آن‌ها برای بررسی تنوع بین گونه‌های وحشی و زراعی استفاده کرد (Liu and Cordes 2004). محتوای اطلاعات چندشکلی به‌عنوان تخمینی از قدرت تمایز هر ریزماهواره با در نظر گرفتن تعداد و فراوانی نسبی آلل‌ها می‌باشد (Agrama et al. 2003). Darikvand et al. (2013) ۹۲ ژنوتیپ گندم را با استفاده از ٤٠ آغازگر SSR بررسی کردند که در مجموع ۸۰ آلل شناسایی شد و میزان اطلاعات چند شکلی آغازگرها از ۰/۱۲–۰/۸۰ متغیر بوده و به‌طور میانگین برابر ۰/۵۲ گزارش کردند. هدف از انجام این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم نان به منظور استفاده از ژنوتیپ‌های برتر در پروژه‌های اصلاحی با استفاده از نشانگر ریزماهواره بود. در این مطالعه، ۳۵ ژنوتیپ گندم نان (موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی (آی پی کا) در کشور آلمان) ارزیابی شدند. ژنوتیپ‌ها به‌طور تصادفی انتخاب شده و از ایران و کشورهای اطراف، هرکدام چند ژنوتیپ داشته است. انتخاب ژنوتیپ‌ها بر اساس صفت خاصی نبوده و تنها سه رقم هیرمند، سیستان و مغان ۳ از ارقام اصلاح ایرانی هستند و بقیه لاین‌های خالص حاصل از انتخاب بین توده‌های محلی هستند که منشا آن‌ها در جدول ۱ آمده است. صفات مورفولوژیک این ژنوتیپ‌ها در مطالعه دیگر ثبت شد. نحوه نامگذاری ژنوتیپ‌ها مطابق بانک ژن آلمان است که نمونه‌ها با این نحوه نامگذاری از آنجا تهیه شده‌اند. برای مثال در ATRI494، A بیانگر بهاره بودن ژنوتیپ است. TRI نشان‌دهنده جنس تریتیکوم است و اعداد هم کد نمونه است.

[1] Polymorphism

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های گندم نان مطابق بانک ژن گیاهی کشور آلمان

مکان جمع آوری	نام ژنوتیپ	شماره ژنوتیپ	ردیف	مکان جمع آوری	نام ژنوتیپ	شماره ژنوتیپ	ردیف
ایران	ATRI 6112	۲٤۸	۱۹	ترکیه	ATRI1494	۲۲	۱
پاکستان	ATRI8178	۲۵۹	۲۰	ترکیه	ATRI2183	٤۳	۲
پاکستان	ATRI8184	۲٦۲	۲۱	ترکیه	ATRI2184	٤٤	۳
هند	ATRI8418	۲۸۷	۲۲	ترکیه	ATRI2188	٤۵	٤
پاکستان	ATRI10002	۳۲۸	۲۳	نپال	ATRI2439	٦۱	۵
ترکیه	ATRI10005	۳۲۹	۲٤	نپال	ATRI2443	٦٤	٦
عراق	ATRI11528	۳٤٤	۲۵	افغانستان	ATRI2585	۸٤	۷
عراق	ATRI11530	۳٤۵	۲٦	افغانستان	ATRI2658	۱۰۲	۸
عراق	ATRI11538	۳٤٦	۲۷	هند	ATRI3304	۱۵۸	۹
عراق	ATRI11545	۳٤۷	۲۸	هند	ATRI3512	۱٦۲	۱۰
تاجیکستان	ATRI17558	۳۷۸	۲۹	افغانستان	ATRI4113	۱۷۹	۱۱
تاجیکستان	ATRI17561	۳۸۱	۳۰	ایران	ATRI 548	۱۸۳	۱۲
تاجیکستان	ATRI17562	۳۸۲	۳۱	ایران	ATRI 549	۱۸۵	۱۳
	سیستان	٦۵۹	۳۲	ایران	ATRI 551	۱۸۷	۱٤
	هیرمند	٦٦۲	۳۳	ایران	ATRI5581	۱۹۵	۱۵
	مغان ۳	٦۷۷	۳٤	ایران	ATRI 570	۲۰۸	۱٦
Chinese Spring	ATRI12922	۵۳۷	۳۵	ایران	ATRI 575	۲۱٦	۱۷
				ایران	ATRI 604	۲٤۳	۱۸

A معرف بهاره بودن ژنوتیپ‌های گندم مطابق بانک ژن گیاهی آلمان است.

جدول۲- محتوای اطلاعات چندشکل، آلل نادر و تعداد آلل برای ارقام مورد مطالعه با ۱۳ جفت نشانگرSSR

نام آغازگر	تعداد آلل چند شکل	محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)	آلل نادر
Xgwm95	۹	۰/۱۸۰	٤
Xgwm247	۱۰	۰/۱۸۵	٥
Xgwm639	٦	۰/۲٦۰	۱
Xgwm160	۷	۰/۲۲٤	۲
Xgwm538	۳	۰/۱۹۰	۱
Xgwm44	۸	۰/۲۲۱	۲
Xgwm67	۹	۰/۲۰۲	۲
Xgwm205	٤	۰/۳۸٥	–
Xgwm190	۱۱	۰/۱٥۸	٦
Xgwm33	٥	۰/۳۰۱	۱
Xgwm186	٦	۰/۲٦۹	۱
Xcn13	۲	۰/۱۰۷	۱
Xtaglgap	۹	۰/۱۸٦	٤
میانگین	۸۹	۰/۲۲	۳۰

تعدادی بذر در سینی‌های نشا در گلخانه دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان کشت شد. بعد از رسیدن گیاه به مرحله پنج الی شش برگی نمونه‌های برگی از گیاهچه‌ها گرفته شد و سپس درون ازت مایع به فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

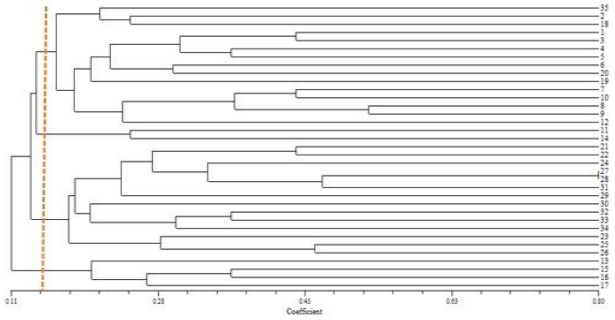
استخراج DNA و مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: DNA ژنوتیپ‌ها طبق روش CTAB (Doyle and Doyle 1988) استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA ژنومی با استفاده از ژل آگارز ۸/۰ درصد تعیین شد. ۱۵ جفت آغازگر از نوع GWM بررسی (Röder et al. 2000) و آن‌هایی که الگوی باندی بهتری داشتند انتخاب شدند. قطعات DNA تکثیرشده با استفاده از الکتروفورز عمودی و بستر ژل پلی‌اکریل‌آمید شش درصد تفکیک شد. رنگ‌آمیزی و ظهور باندها با استفاده از نیترات نقره (Creste et al. 2001) در سه مرحله انجام شد.

حضور باندها و عدم حضور آن‌ها به ترتیب با یک و صفر امتیازبندی شد. از نرم‌افزار NTSYS، Excel و GenALEx برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد و برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد و از الگوریتم UPGMA استفاده شد. تعیین تعداد کل آلل‌های چند شکل (برای مارکر SSR که پرایمرهای SSR دارای مکان اختصاصی هستند) و تعداد آلل‌های نادر ($P<0.05$) با استفاده از روش (Nei. 1973) و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با رابطه $PIC = 1- \sum_j^n p_{ij}^2$ با استفاده از روش (Anderson et al. 1993) و آنالیزهایی همانند فاصله ژنتیکی و ضریب تشابه محاسبه شد.

در این پژوهش از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهواره جهت بررسی تنوع ژنتیکی یک جمعیت متنوع گندم نان استفاده شد. از بین آغازگرهای استفاده شده ۱۳ آغازگر در تمام ژنوتیپ‌ها مکانی برای تکثیر داشتند ولی آغازگرهای WMC420 و BARC328 باند قابل امتیازدهی تکثیر نکردند. تعداد آلل، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای ارقام گندم مورد بررسی محاسبه شد. آغازگرهای مورد استفاده در مجموع ۸۹ آلل را در تمام ژنوتیپ‌ها شناسایی و تکثیر کردند. تعداد آلل‌های مشاهده شده توسط ۱۳ نشانگر مورد استفاده بین دو تا ۱۱ بود که بیش‌ترین تعداد آلل مربوط به نشانگر*Xgwm190–5D* و کم‌ترین تعداد آلل مربوط به نشانگر 6B-*Xcn13* بود. میانگین کل آلل‌های مشاهده شده در کل لوکوس‌ها ٦/۸٤ به‌دست آمد. تعداد آلل‌های نادر برای هر پرایمر محاسبه شد (جدول ۲). شاخص چندشکلی برای هر جایگاه در تمامی لاین‌ها مورد بررسی قرار گرفت. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)[1] از ۰/۱۱ تا ۰/۳۸۵ با میانگین ۰/۲۲ متغیر بود که بالاترین مقدار مربوط به *Xgwm538-4B* و کم‌ترین مقدار مربوط به 6B-*XCn13* بود (جدول ۲). میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها می‌باشد.

[1] Polymorphism Information Index

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 (Carvalho et al. 2010). محتوای اطلاعات چندشکل می‌تواند برای تعیین آغازگرهای کارآمد با بیش‌ترین چندشکلی استفاده شود. این شاخص ظرفیت هر آغازگر را در شناسایی جایگاه‌های چندشکل توصیف می‌کند. مقادیر PIC برای SSR از محدوده‌ی صفر (monomorphic) تا ۱ (polymorphic) می‌باشد (Agrama and Tuinstra et al. 2003). تفاوت در فراوانی آلل‌ها می‌تواند به‌عنوانیک معیار با ارزش برای هر ریزماهواره در ژنتیک جمعیت در نظر گرفته شود. Wei et al. (2013) ٦٢ ژنوتیپ گندم را با استفاده از ١١٤ نشانگر SSR شناسایی کردند در مجموع ٥٤٧ آلل با میانگین ٧٦/٤ برای هر لوکوس مشاهده کردند و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) به‌طور میانگین برابر ٠/٥٧٤ بود. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که محتوای چندشکلی عدد ثابتی نداشته و بستگی به عواملی نظیر تعداد آلل در نواحی تکرارشونده و تکرارهای دی‌نوکلئوتیدی دارد، به‌طوری‌که در جایگاه‌های با تکرارهای دو نوکلئوتیدی چندشکلی بیش‌تری نسبت به جایگاه‌های با سه و چهار نوکلئوتیدی ایجاد می‌شود (Maccaferri et al. 2003 ; Wu et al. 1993). تعداد ژنوتیپ و تعداد آغازگر ریزماهواره همبستگی مثبتی با محتوای چندشکلی دارند (Prasad et al. 2000). بیش‌ترین میزان تشابه بر اساس ضریب نی مربوط به تعدادی از رقم‌ها معادل ٠/٩٨ و کم‌ترین میزان تشابه معادل ٠/٩٠ با میانگین ٠/٩٤ مشاهده شد که این ضریب تشابه بالا حاکی از شباهت فراوان موجود بین مجموعه رقم‌های مورد بررسی بود. میانگین میزان تشابه برای ریزماهواره گندم را ٠/٣١ گزارش دادند (Plaschke et al. 1995). Zargani et al. (2015) در گیاه گندم با تعداد ٩١ لاین دابل هاپلوئید موجود به‌همراه دو والد آن‌ها با استفاده از نشانگرهای SSR، میانگین ضزیب تشابه را ٠/٨٩ گزارش کردند که این ضریب تشابه بالا حاکی از شباهت فراوان موجود بین مجموعه لاین‌های مورد بررسی می‌باشد. ماتریس تشابه و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA[1] تشکیل شد. بر اساس نتایج حاصل، بالاترین ضریب کوفنتیک (r=٠/٧٣) مربوط به زمانی بود که از روش جاکارد برای تشکیل ماتریس تشابه و از الگوریتم UPGMA برای رسم نمودار درختی استفاده شد. بنابراین نمودار درختی حاصل از این روش ملاک دسته‌بندی قرار گرفت. نمودار درختی حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش جاکارد و UPGMA در شکل شماره ١ نشان داده شده‌است.



شکل ١- دندروگرام ژنوتیپ‌های گندم نان (بر اساس داده‌های نشانگرهای SSR) با استفاده از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه طبقه‌بندی کرد. نتایج نمودار درختی، ارتباط نداشتن تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی را نشان داد، به‌طوری که جمعیت‌های جمع‌آوری شده در یک کشور در گروه‌ها یا زیرگروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی زیاد آن‌ها بود. از طرف دیگر بسیاری از جمعیت‌هایی که در یک گروه قرار گرفتند از مناطق جغرافیایی متفاوت بودند، که به‌دلیل تشابه ژنتیکی گسترده این جمعیت‌ها در مناطق مختلف بود. دو ژنوتیپ ٢٧ و ٢٨ هر دو از کشور عراق در یک شاخه قرار گرفته‌اند به معنای مشابه بودن ژنوم دو ژنوتیپ می‌باشد. Mirdrikvand et al. (2015) در مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم نان و دوروم دیم با استفاده از نشانگرهای SSR گزارش کردند که همبستگی بین ماتریس ضرایب کوفنتیک و ماتریس ضرایب تشابه جاکارد ٨٦/٠ بود که بیانگر صحت گروه‌بندی ارقام بود. وقایعی مانند جهش، حذف و اضافه شدن قطعات در ایجاد چندشکلی‌ها دخیل می‌باشند. با توجه به اینکه نشانگرهای SSR توانست ژنوتیپ‌های مورد بررسی را تفکیک نماید، می‌توان از تنوع موجود در برنامه‌های اصلاحی گندم استفاده نمود. ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با

[1] Unwighted Pair Group Means Analysis (UPGMA)

استفاده از ضریب تشابه جاکارد و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA توانست ژنوتیپ‌ها را به سه گروه طبقه‌بندی کرده و ژنوتیپ‌های گندم بهاره و زمستانه و ژنوتیپ‌های گندم نان و دوروم را از هم تفکیک نماید. هم‌چنین این گروه‌بندی توانست فاصله ژنتیکی بین گندم‌های نان را نشان دهد. تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه در این پژوهش موید امکان استفاده از این جمعیت ژنتیکی در پروژه‌های اصلاحی بعدی و انجام تلاقی بین ژنوتیپ‌ها (با رعایت به سطح پلوئیدی آن‌ها)، به‌منظور بالا بردن کیفیت و کمیت عملکرد بود.

منابع

Agrama HA, Tuinstra, MR (2003) Phylogenetic diversity and relationship among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. African Journal of Biotechnology 2: 334-340.

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36: 181-186.

Creste, S, Neto AT, Figueria A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequenceing gels by silver staining. Plant Molcular Biology Reporter 19: 299-306.

Carvalho A, Lima-Brito J, Macas B, Guedes-Pinto H (2010) Genetic variability analysis of collection of old Portuguese bread wheat using ISSRs. Options Mediterraneennes 81: 35-38.

Darikvand R, Bihamt MR, Najafian G, Ebrahimi A (2013) Investigation of genetic diversity among bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. Journal of Agricultural Science 1: 122-129.

Doyle JJ, Doyle JL (1988) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Ijaz S, Khan IA (2009) Molecular characterization of wheat germplasm using microsatellite markers. Genetics and Molecular Biology 8: 809-815.

Liu ZJ, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238: 1-37.

Maccaferri M, Sanguineti MC, Donini P, Tuberosa R (2003) Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. Theoretical and Applied Genetics 107: 783-797.

Mir Drikvand R, Khyrolahi A, Ebrahimi A, Rezvani M (2015) Study of Genetic Diversity Among Some Rainfed Bread and Durum Wheat Genotypes, Using SSR Markers. Plant Genetic research 1:35-44. (In farsi).

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 70: 3321-3323.

Plaschke J, Ganal MW, Röder MS (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics 91: 1001-1007.

Prasad, M, Varsheny RK, Roy JK, Balyan HS, Gupta PK (2000) The use of microsatellite for detection DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theoretical and Applied Genetics 100: 584-592.

Roussel V, Leisova L, Exbrayat F, Stehno Z (2005) SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000. Theoretical and Applied Genetics 111: 162-170.

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

Wei LI, Chun-mei B, Yu-ming W, An-jun L, Guo-yue C, Zhi-en P, Ya-xi L, You-liang ZH (2013) Evaluation of genetic diversity of Sichuan common wheat landraces in China by SSR markers. Journal of Integrative Agriculture 12: 1501-1511.

Wu K, Tanksley SD (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Molecular Genetics and Genomics 241: 225-235.

Zargani M, Ranjbar G, Abrahymnzhad N (2015) Discussion molecular analysis of genetic variation in wheat lines using SSR markers. Journal of Crop Breeding 15: 88-95. (In farsi).

Zhang XY, Li CW, Wang LF, Wang HM, You GX, 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. Theoretical and Applied Genetics 106: 67-73.