Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره پانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹
صفحه ۷۳-۶۹

ارزیابی تنوع ژنتیکی اکسشن‌های علف گندمی تاج‌دار (*Agropyron cristatum*) با استفاده از نشانگر ISSR

Genetic diversity assessment of *Agropyron cristatum* accessions using ISSR marker

فاطمه زرافشانی[۱]، هوشمند صفری*[۲]، علیرضا اطمینان[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، گروه ژنتیک و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

۲- مربی، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، تهران، ایران

Zarafshan F[1], Safari H[*2], Etminan AR[1]

1.Msc Student, Associate Professor, Department of Plant breeding and Genetics, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
2. Instructor, Agricultural and Natural Resources Research Center of Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Hooshmandsafari@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۲۷)

چکیده

تنوع ژنتیکی ۱۵ اکسشن از گونه علف گندمی تاج‌دار با استفاده از ۱۵ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از این ۱۵ آغازگر ۱۲ عدد دارای باندهای قابل امتیاز دهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۷۱ باند تولید کنند، که ٦٦ باند چند شکل بودند. آغازگرهای IS_1 و $UBC_{۸۵۷}$ بیشترین تعداد باند (هشت باند) و آغازگرهای IS_7 و $UBC_{۸۶۹}$ کمترین تعداد باند (سه باند) را تولید کردند. آغازگر $UBC_{۸٤٤}$ کمترین درصد چندشکلی را به میزان ۸۳/۳۳ درصد نشان داد و بیشترین درصد چندشکلی برای آغازگرهای IS_2، IS_6، IS_7، $UBC_{۸٤۸}$، $UBC_{۸٦٥}$، $UBC_{۸٦۸}$ و $UBC_{۸٦۹}$ به میزان ۱۰۰٪ بود. میانگین درصد چندشکلی ۹٤/۱۵٪ بود. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۵ ژنوتیپ برابر ۵/۹۲ بود و متوسط تعداد باندهای چندشکل ۵/۵۰ بود. آغازگرهای IS_6، $UBC_{۸٦٥}$ و $UBC_{۸٦۹}$ بهتر از سایر آغازگرها توانستند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص کنند. ژنوتیپ‌های G٤ با G۲ دارای بیشترین تشابه بودند و ژنوتیپ‌های G۱ با G۸ کمترین تشابه را نشان دادند. نتایج تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد ژنوتیپ‌ها را در سه گروه قرار داد، که نتایج با تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه واریانس مولکولی تایید شد. تنوع ژنتیکی اکسشن‌ها براساس نشانگر مورد بررسی با پراکنش جغرافیایی آن‌ها مطابقت نشان داد و جمعیت‌های گرگان و اصفهان شباهت بالایی داشتند که از طرف دیگر با جمعیت‌های کرج فاصله بیشتری نشان دادند.

واژه‌های کلیدی

آگروپایرون
پراکنش جغرافیایی
تنوع زیستی
نشانگر مولکولی

www.SID.ir

Downloaded from mg.genetics.ir at 16:05 +0330 on Tuesday January 5th 2021

Archive of SID

Downloaded from mg.genetics.ir at 16:05 +0330 on Tuesday January 5th 2021

علف گندمی تاج‌دار (*Agropyron cristatum*) یک گراس چندساله است که در زیستگاه‌های مختلف رشد می‌کند. تا کنون بیش از ۱۲۲ اسم مترادف برای این گونه ثبت شده‌است. منشاء آن منطقه اورآسیاست و در استپ‌های روسیه و سیبری گسترش یافته است. با توجه به سیستم ریشه‌ای فیبری عمیق و تحمل زیاد به یخبندان، خشکسالی، چرا و آتش سوزی و همچنین توانایی آن در تولید مقادیر زیاد بذر در مراتع باعث ایجاد پوششی تک گونه‌ای می‌شود، به نحوی که گونه‌های دیگر را حذف می‌کند (Quiroz 2018).

به‌نژادگران معتقدند کمبود تنوع ژنتیکی پیشرفت‌های اصلاحی را در آینده مختل می‌کند (Rajaram 2010). اطلاعات در مورد تنوع ژنتیکی برای توسعه استراتژی‌های مناسب در زیست‌شناسی حفاظتی و در بسیاری دیگر از زمینه‌های کاربردی ضروری است (Poczai et al. 2012). فن‌آوری PCR منجر به توسعه‌ی تکنیک ساده و سریع تکثیر بین توالی‌های تکرای ساده (ISSR) شد (Zietkiewicz at al. 1994)، که از شرایط محیطی مستقل بوده و تحت تاثیر مراحل رشد گیاه قرار نمی‌گیرند. از این نشانگر برای مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در گونه‌های مختلف آگروپایرون استفاده شده است (Shirvani et al. 2014; Farshadfar et al. 2018; Moradi et al. 2015)، در سایر گراس‌های مرتعی نیز کارایی نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی گزارش شده است (Fasih et al. 2013; Safari et. 2014; Abbaszade et al. 2016). هدف از گزارش حاضر بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف علف گندمی تاج‌دار با استفاده از نشانگر ISSR و تطابق این تنوع با پراکنش جغرافیایی آن‌هاست.

تعداد ۱۵ اکسشن از گونه *Agropyron cristatum* از تیره گرامینه جمع‌آوری شده از سه منطقه گرگان، اصفهان و کرج با توجه به بذرهای موجود در بانک ژن منابع طبیعی موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور انتخاب شدند (جدول ۱).

از هر جمعیت ۱۰ بذر داخل گلدان کشت شدند و DNA از برگ گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای با روش CTAB طبق دستورالعمل تغییر یافته (Doyle and Doyle 1987) و به‌صورت بالک از ۱۰ گیاه کشت شده در هر گلدان استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با دستگاه Bio Rad در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. در جدول شماره ۲ برای هر آغازگر مورد استفاده کد، توالی و دمای اتصال ارائه شده‌است. چرخه حرارتی بر اساس گزارش Abbaszade et al. (2016) انجام شد. دماهای اتصال در این تحقیق ٤٧ تا ٦٥/٢٥ درجه سانتی‌گراد بودند. در مرحله بعد الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵ درصد با بافر واکنش TBE، توسط دستگاه Bio Rad انجام شد و رنگ‌آمیزی با Safe View صورت گرفت. نهایتا به‌منظور عکس برداری از نمونه‌ها از Gel Document (شرکت کیاژن) استفاده شد.

جدول ۱- لیست اکسشن‌های مورد مطالعه

اکسشن	منشاء	کد بانک ژن	اکسشن	منشاء	کد بانک ژن
G1	گرگان	1727m	G9	کرج	208P8
G2	گرگان	1727P10	G10	کرج	208s
G3	گرگان	1727P12	G11	اصفهان چادگان	4056P1
G4	گرگان	1727P7	G12	اصفهان چادگان	4056P4
G5	کرج	208m	G13	اصفهان	619m
G6	کرج	208P10	G14	اصفهان	619P13
G7	کرج	208P13	G15	اصفهان	619s
G8	کرج	208P2			

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mg.genetics.ir at 16:05 +0330 on Tuesday January 5th 2021

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی

کد آغازگر	توالی آغازگر	دمای آغازگر
IS_{01}	5'- AC AC AC AC AC AC AC AC YC -3'	۵۷/۰۰°C
IS_{02}	5'- AC AC AC AC AC AC AC AC C -3'	۵۶/۱۹°C
IS_{06}	5'- CA CA CA CA CA CA CA CA G-3'	۵۶/۱۹°C
IS_{07}	5'- GT GT GT GT GT GT GT GT C-3'	۵۶/۲۰°C
IS_{16}	5'-DBD AC AC AC AC AC AC AC A-3'	۶۵/۲۵°C
UBC_{844}	5'-CTC TCT CTC TCT CTC TRC-3'	۵۵/۰۰°C
UBC_{848}	5'-CAC ACACAC ACACAC ARG-3'	۵۵/۰۰°C
UBC_{857}	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CYG-3'	۵۵/۰۰°C
UBC_{865}	5'-CCG CCG CCG CCG CCG-3'	۶۵/۰۰°C
UBC_{866}	5'-CTC CTC CTC CTC CTC CTC-3'	۶۰/۰۰°C
UBC_{868}	5'-GAA GAA GAA GAA GAA GAA-3'	۴۷/۰۰°C
UBC_{869}	5'-GTT GTT GTT GTT GTT GTT-3'	۴۷/۰۰°C

جدول ۳- تعداد کل باند، درصد چند شکلی و اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده

کد آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC
IS_1	8.00	7.00	87.50	0.42
IS_2	5.00	5.00	100.00	0.46
IS_6	5.00	5.00	100.00	0.47
IS_7	3.00	3.00	100.00	0.36
IS_{16}	7.00	6.00	85.71	0.39
UBC_{844}	6.00	5.00	83.33	0.33
UBC_{848}	6.00	6.00	100.00	0.41
UBC_{857}	8.00	7.00	87.50	0.40
UBC_{865}	6.00	6.00	100.00	0.48
UBC_{866}	7.00	6.00	85.71	0.35
UBC_{868}	7.00	7.00	100.00	0.46
UBC_{869}	3.00	3.00	100.00	0.47
میانگین	5.92	5.50	94.15	0.42

تعداد مکان‌های تکثیر شده، تعداد مکان‌های چندشکل، درصد چندشکلی و شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)[1] برای هر آغازگر محاسبه شد. با استفاده از نرم‌افزارهای NTSYS، DARwin 6.0، GenAlEx 6.41 و SYSTAT 13 ماتریس تشابه، تجزیه واریانس مولکولی، تجزیه کلاستر، تجزیه به مختصات اصلی در بین جمعیت‌ها محاسبه شد.

آغازگرهای ISSR در مجموع ۷۱ مکان ژنی را شناسایی کردند که تعداد ۵ مکان یک شکل و سایر مکان‌ها چند شکل بودند. آغازگرهای IS1 و UBC857 بیشترین تعداد باند را نشان دادند. هر ژنوتیپ به‌طور متوسط ۴۰/۴۷ مکان تکثیر شده برای ۱۲ آغازگر نشان داد. ژنوتیپ G13 بیشترین تعداد باند را داشت.

چندشکلی مطلوبی بر اساس نشانگر ISSR در بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد. از آنجا که ریزماهواره‌ها در نقاط مختلف ژنوم واقع شده‌اند، بنابراین باندهای مختلفی با اندازه‌های متفاوت بر روی ژل حاصل می‌شود و تمام سطح ژنوم را تحت پوشش قرار می‌دهند (Borem and Fritch-neto, 2014). در گزارشات متعدد نشان داده شد که استفاده از نشانگر ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی بین یا درون گونه‌ای جنس آگروپایرون مناسب می‌باشد (Moradi et al. 2015, Farshadfar et al. 2018; Shirvani et al. 2014). کمترین میزان درصد چند شکلی را آغازگر UBC_{844} و بیشترین درصد چند شکلی برای آغازگرهای IS_2، IS_6، IS_7، UBC_{848}، UBC_{865}، UBC_{868} و UBC_{869} بود (جدول ۳). متوسط تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر برابر ۵/۹۲ بود و متوسط

[1] Polymorphism information content

www.SID.ir

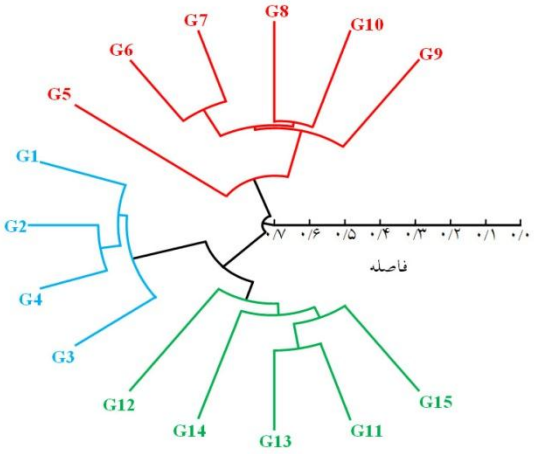
Archive of SID

Downloaded from mg.genetics.ir at 16:05 +0330 on Tuesday January 5th 2021

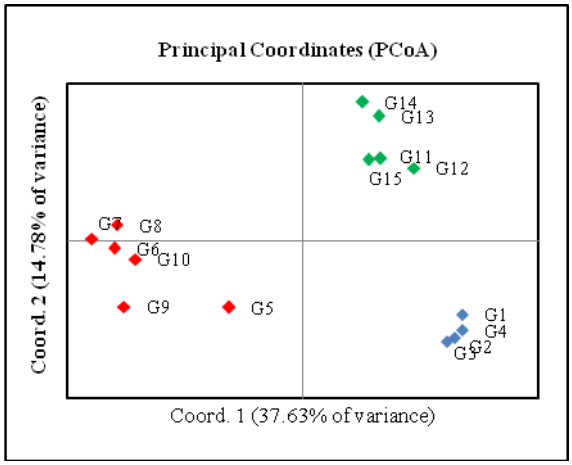
تعداد باندهای چندشکل ۵/۵۰ بود. بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگرهای IS_6، UBC_{865} و UBC_{869} بود، بنابراین مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی‌های این گونه تعیین شدند. در بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌های مختلف *Ag. cristatum*، آغازگر IS_6 (Moradi et al. 2015) و در بررسی روابط بین ژنوم‌های D، S، U در گندم‌نیای وحشی با ژنوم A در گندم آغازگرهای IS_6 و UBC_{865} (Feridooni et al. 2017) به‌عنوان آغازگر برتر معرفی شدند. متوسط تعداد باند تولید شده (۵/۹۲) در این تحقیق با گزارش Moradi et al. (2015) مطابقت بالایی داشت.

تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس از ۰/۳٦۸ تا ۰/۸۸۹ متغیر بود، میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/٦۰۹ بود. بیشترین تشابه را ژنوتیپ‌های $G_٤$ با $G_٢$ و کمترین تشابه را ژنوتیپ $G_١$ با $G_٨$ داشتند. نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب فاصله جاکارد باعث گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در سه گروه شد (شکل ۱). گروه اول شامل ژنوتیپ‌های G۱، G۲، G۳ و G٤ بود، که منشاء این ژنوتیپ‌ها گرگان بود. ژنوتیپ‌های G۵، G٦، G۷، G۸، G۹ و G۱۰ در گروه دوم قرار گرفتند و منشاء ژنوتیپ‌های این گروه کرج بود. ژنوتیپ‌های G۱۱، G۱۲، G۱۳، G۱٤ و G۱۵ در گروه سوم جای گرفتند که منشاء این ژنوتیپ‌ها اصفهان بود. بنابراین مشاهده شد که ژنوتیپ‌های هر منطقه کاملا از همدیگر تفکیک شدند. بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های آگروپایرون براساس نشانگر RAPD نشان داده بود که گونه‌های مورد ارزیابی تاحدودی تفکیک شده‌اند، اما گروه‌بندی براساس منشاء پراکنش مشاهده نشد بود (Asghari et al. 2011).

همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد محور مختصات اول و دوم به‌ترتیب ۳۷/٦۳ و ۱٤/۷۸ درصد از واریانس موجود را توجیه کرده و در مجموع ۵۲/٤۱ درصد از واریانس با این دو محور بیان شد (شکل ۲). دیاگرام شکل ۲ با نتایج تجزیه خوشه‌ای کاملا مطابقت داشت و ژنوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم شدند و با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های هر گروه متعلق به یک منطقه جغرافیایی بودند، این گروه‌بندی با پراکنش جغرافیایی آن‌ها کاملا مطابقت داشت. در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چچم دائمی و یکساله مطابقت بالایی بین تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی و ماتریس تشابه حاصل از داده‌های ISSR گزارش شد (Safari et al. 2014; Abbaszade et al. 2016). تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که در بین سه منشاء جغرافیایی در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت. سهم تنوع درون جمعیتی (۵۰٪) برابر با تنوع بین جمعیتی (۵۰٪) بود. تنوع بالای درون و بین گونه‌ای موجود در بین جمعیت‌های آگروپایرون منبع خوبی برای برنامه‌های اصلاحی در این جنس می‌باشد (Asghari et al. 2011).



شکل ۱- نمودار تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های ISSR با روش UPGMA و بر اساس ضریب فاصله‌ی جاکارد



شکل ۲- بای پلات ژنوتیپ‌ها برای نشانگر ISSR بر اساس دو محور مختصات اصلی اول و دوم

در هر حال مشاهده شد که جمعیت‌های گرگان و اصفهان با همدیگر فاصله نزدیک‌تری داشتند و جمعیت‌های کرج دارای فاصله دورتری با جمعیت‌های این دو منطقه بودند. در مجموع بر

www.SID.ir

Archive of SID

اساس آغازگرهای مورد استفاده و با توجه به تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی بیشترین تشابه را ژنوتیپ‌های G٤ با G۲ و بیشترین فاصله ژنوتیپ G۱ با G۸ داشتند. پیشنهاد می‌شود از ژنوتیپ‌هایی که حداکثر فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگر مورد استفاده داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه های اصلاحی استفاده شود.

منابع

Abbaszade S, Jafari AA, Safari H, Shirvani H (2016) The study of genetic variation in *Lolium multiflorum* using ISSR molecular marker and karyotype traits. Modern Genetics Journal 11 (4):579-590 (In Farsi).

Asghari A, Jafari AA, Shokrpour M, Mohammaddoust-e-Chamanabad HR (2011) Genetic variation between and within populations of *Agropyron* Gaertn. using RAPD markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 18(2): 143-153 (In Farsi).

Borem A, Fritch-neto R (2014) Biotechnologye and plant breeding. Academic Press is an imprint of Elsevier, Pp19-45.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapd DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical* bulletin 19: 11-15.

Farshadfar M, Nowrozi R, Safari H, Shirvani H, Amjadian M (2018) Assessment of genetic diversity in *Agropyron desertorum* accessions using ISSR molecular marker. Future of Food: Journal on Food, Agriculture and Society 6 (1): 20-29.

Fasih Z, Farshadfar M, Safari H (2013) Genetic diversity evaluation of within and between populations for *Festuca arundinacea* by ISSR markers. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 5(10): 1468- 1472.

Feridooni L, Mehrabi AA, Safari H (2017) Evaluation of relationships of D, S and U genomes of *Aegilops* with A genome of *Triticum* using ISSR molecular marker. Journal of Crop Biotechnology 20:41-53 (In Farsi).

Moradi M, Farshadfar E, Safari H (2015) Evaluation of genetic diversity in Agropyron cristatum using ISSR molecular marker. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 6 (5): 425-432.

Poczai P, Varga I, Bell NE, Hyvonen J (2012) Genomics Meets Biodiversity: Advances in Molecular Marker Development and Their Applications in Plant Genetic Diversity Assessment, The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0157-4, InTech, 374 P.

Quiroz D (2018) *Agropyron cristatum* (crested wheatgrass). Technical Report, 33 p. DOI: 10.13140/RG.2.2.17663.10408.

Rajaram S (2010) International Wheat Breeding. The Proceeding of 11th Iranian Crop Science Congress: Crop Production. Tehran, Shahid Beheshti University, Pp 225-238.

Safari H, Shirvani H, Jafari AA, Mahdavi S (2014) The study of genetic variation for *Lolium perenne* using ISSR molecular markers. International Journal of Biosciences 4 (1): 75-81.

Shirvani H, Etminan A, Safari H (2014) Genetic variation of *Agropyron trichophorum* accessions using ISSR molecular marker. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 5(4): 23-30.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - Anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.

Downloaded from mg.genetics.ir at 16:05 +0330 on Tuesday January 5th 2021

www.SID.ir