بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دیم با استفاده ازآغازگرهای نیمه تصادفی اینترونی- اگزونی

احمد اسماعیلی[۱،*]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۱]، کامران سمیعی[۲] و رضا دریکوند[۳]

۱ لرستان، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۲] کنگاور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کنگاور، گروه مهندسی کشاورزی

[۳] خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم‌آباد

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۲۲

چکیده

امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی در برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی استفاده فراوانی دارد. یکی از این نشانگرها که حالت توسعه یافته تری از نشانگر RAPD است، نشانگر نیمه تصادفی مربوط به ناحیه اتصال اینترن-اگزون می باشد. نتایج مطالعه حاضر که بر روی ۲۳ لاین و رقم گندم نان دیم و ۲ رقم گندم دوروم دیم پرکاربرد در غرب کشور صورت گرفت، نشان داد که از ۳۲ آغازگر نیمه‌تصادفی، ۱۷ آغازگر بین ارقام و لاین‌های گندم چندشکلی نشان دادند. درصد چندشکلی از ۳۸ تا ۸۸ درصد متغیر بود. با استفاده از ماتریس تشابه مشخص گردید که بیشترین تشابه بین ارقام مارون و گهر وجود داشت. تجزیه خوشه‌ای ضرایب تشابه جاکارد و روش اتصال کامل و قطع دندروگرام در ضریب تشابه ۰/۶۵، ارقام و لاین‌های گندم را در ۷ گروه قرار داد و ۲ رقم و لاین دیگر نیز به طور جداگانه تشکیل دو گروه مجزا را دادند. تجزیه هماهنگ اصلی نیز توانست ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه را به خوبی بر اساس فاصله فضائی گروه‌بندی کند. هفده آغازگر مورد استفاده در این مطالعه بطور قابل ملاحظه‌ای ارقام و لاین‌های گندم را با توجه به میزان تنوع ژنتیکی گروه‌بندی نمودند، هر چند فاصله ژنتیکی اندک تا متوسطی بین آنها مشاهده شد. این گروه‌بندی توانست ارقام و لاین‌های بهاره و زمستانه، و ژنوتیپ‌های گندم نان و گندم دوروم را به خوبی از همدیگر تفکیک نماید. همچنین گروه‌بندی بدست آمده از آغازگرهای اگزونی توانست ارقام و لاین‌های بهاره و پائیزه و همینطور ارقام و لاین‌های گندم دوروم و گندم نان را بهتر از آغازگرهای اینترونی و در فاصله دورتری تفکیک نماید.

واژه‌های کلیدی: گندم دیم، تنوع ژنتیکی، اینترون- اگزون، گروه‌بندی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۲۰۰۰۱۲-۰۶۶۱، پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

مقدمه

کمبود مواد غذایی و افزایش روزافزون جمعیت جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه، نگرانی‌های جدی را در رابطه با آینده تولید غذا بوجود آورده است (۱۲). یکی از مهمترین روشها جهت رفع نگرانی‌های مرتبط با غذا استفاده از علوم و فنون اصلاح نباتات به منظور ارزیابی و بهره برداری از تنوع می‌باشد. بعبارتی دیگر اصلاح نباتات، انتخاب افراد برتر از درون جوامع متنوع گیاهی است و موفقیت انتخاب بستگی به وجود تنوع در جمعیت گیاهی دارد (۸).

ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA، در استفاده بهینه از تنوعات ژنتیکی موجود، از دستاوردهای مهم بیوتکنولوژی گیاهی برای اصلاح‌نباتات محسوب می‌گردد و تاکنون نشانگرهای مولکولی فراوانی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان

Archive of SID
www.SID.ir

زراعی تولید و مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳، ۱۸). در روش RAPD که در سال ۱۹۹۰ گزارش شده است از تک آغازگرهایی با طول غالباً ۱۰ نوکلئوتید استفاده می‌شود (۲۱). با وجود کاربردهای فراوان نشانگر RAPD در گیاهان زراعی مختلف، بهبود سایر سیستم‌های مبتنی بر PCR با استفاده از تک آغازگرها، ضمن حفظ مزایا و کاهش معایب روش RAPD، قدم بسیار مهمی در جهت جایگزینی آن می‌باشد (۷). نوعی از این سیستم‌های نشانگری استفاده از آغازگرهایی است که مکان هدف آنها بر اساس نواحی برش اتصال اینترون- اکسون (=ISJ Intron-Exon Splice Junction) در فرآیند پردازش ملکول RNA پیام‌بر است. این روش توسط وینینگ و لانگریج (۲۰) پیشنهاد شد و بعداً توسط رافالسکی و همکاران (۲۱) ارتقاء یافت. این فن می‌تواند در تمام گیاهان زراعی کاربرد داشته باشد، زیرا بر اساس توالی‌های حفاظت شده بوده و مکان اتصال بسیار اختصاصی را مورد هدف قرار می‌دهد. استفاده از این توالی‌ها می‌تواند مکان اتصالی برای آغازگرهای PCR باشد که آغازگرهای نیمه‌تصادفی را به وجود می‌آورند. این دسته از آغازگرها با توالی‌های ۱۰ تا ۱۸ نوکلئوتیدی، به دو دسته آغازگرهای مکان هدف اکسون (ET= Exon Targeting) و اینترون (IT= Intron Targeting) تقسیم‌بندی می‌شوند. آغازگرهای IT نواحی از اینترون و آغازگرهای ET نواحی از اکسون را شناسائی و مورد تکثیر قرار می‌دهند (۱۰، ۱۴، ۱۶). این نشانگر برخلاف نشانگر RAPD کاملاً تصادفی نبوده و نتایج حاصل از آن نسبت به نشانگر RAPD تکرارپذیری بالاتر و چندشکلی بالایی دارد. مهمترین مزیت و کاربرد این آغازگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی و نیز اجتناب از هدف قرار دادن مناطق هتروکروماتینی در ژنوم گیاهان است (۱۵، ۲۰). چندشکلی حاصل از این نوع آغازگرها ناشی از تفاوت در تکثیر قطعاتی از ژنوم است که مورد رونویسی قرار می‌گیرند (۱۷).

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) اولین گیاه زراعی اهلی شده است و مهمترین گیاه زراعی به عنوان منبع اصلی جهت تهیه غذا برای انسان و دام بر کسی پوشیده نیست. از طرفی کشور ایران دارای اقلیم خشک و نیمه خشک بوده و کاهش بارندگی در برخی سال‌ها در اکثر مناطق منجر به بروز تنش خشکی می‌گردد. به همین دلیل در حال حاضر نیاز مبرمی به تحقیقات در زمینه شناسایی، جمع‌آوری و تولید ژنوتیپ‌های برتر در گندم بویژه گندم دیم در کشور احساس می‌گردد. برای این منظور، استفاده از روش‌های مولکولی از جمله نشانگرهای مولکولی بعنوان ابزاری کارا در جهت ارزیابی و بهره‌برداری از ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده حائز اهمیت فراوان است. بر این اساس در این پژوهش به برآورد تنوع ژنتیکی مهمترین ارقام و لاینهای گندم دیم نان در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان پرداخته شده است.

مواد و روشها

مواد گیاهی و استخراج DNA: در مطالعه حاضر که در آزمایشگاه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان اجرا شد، از ۲۵ ژنوتیپ گندم شامل ۲۳ رقم و لاین گندم نان و ۲ رقم گندم دوروم جمع‌آوری شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان، استفاده گردید (جدول ۱). استخراج DNA گیاهی به روش ریزنمونه‌ای دلاپورتا و همکاران (۵) به صورت بالک با استفاده از مقدار مساوی برگ از ۱۵ بوته از هر ژنوتیپ انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA از طریق روش اسپکتووفتومتری با استفاده از دستگاه بیوفتومتر اپندورف تعیین گردید. از کلیه نمونه‌های DNA، محلول پایه ۵ نانوگرمی در هر میکرولیتر تهیه و در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

آغازگرها، شرایط PCR و الکتروفورز ژل‌آگارز: تعداد ۳۲ آغازگر نیمه‌تصادفی ۱۰ تا ۱۸ نوکلئوتیدی با توجه به مطالعات انجام شده قبلی تهیه شده از شرکت فزابیوتک

www.SID.ir

(ساخت کشور کانادا) مورد استفاده قرار گرفت. از این آغازگرها برای اجرای واکنش PCR (با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر) استفاده شد. مواد dNTPs، بافر۱۰X، $MgCl_2$ و آنزیم تک پلی‌مراز از شرکت BIORON تهیه شدند. .

بیست میکرولیتر مخلوط واکنش برای آغازگرهای تصادفی در نظر گرفته شد و برای انجام واکنش‌های PCR از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf مدلGradient5331 استفاده‌گردید. با توجه به اینکه آغازگرهای نیمه تصادفی دارای توالی‌هائی با تعداد نوکلئوتید متفاوت بوده و همچنین بخشی از آن اختصاصی است، لذا تکثیر در دو مرحله اجرا گردید (جدول۲).

جدول۱- ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی و شجره آنها

شماره ژنوتیپ	ژنوتیپ*	شجره
۱	آذر ۲	حاصل کراس با ژنوتیپ‌های داخلی
۲	سرداری	خالص‌سازی شده از گندم بومی منطقه‌کردستان
۳	سیمره (تتراپلوئید–دوروم)	رقم معرفی شده با منشا ICARDA (با نام اولیه Omrabi-5)
۴	شاهیوندی (تتراپلوئید–دوروم)	از توده های بومی استان لرستان
۵	زاگرس	Tan"s"/Vee"//Opata
۶	کوهدشت	رقم معرفی شده با منشا ICARDA
۷	گهر	Nd/Vg9144//Kal/Bb/3/Yaco
۸	مارون	Avd*Pchu((28mt54A*N10-Brv21-c/Kt54B)
۹	چمران	Attila.(CM85836-50Y-OM-OY-3M-OY)
۱۰	IRENA	IRENA/BABAKAS/PASTOR-CM
۱۱	TV2	TEV2/3/URES/FUN/KAUZ-CM
۱۲	NESTOR	NESTOR/3/HE1/3*CNO72//2* SERI/CMS92
۱۳	FLORKWA-2	FLORKWA-2/KAUZ1CA94
۱۴	PASTOR	PASTORCM(CM=CIMMYT)
۱۵	HAMAM-4	HAMAM-4 -1CA92
۱۶	CHEN/AEGILOPS	CHEN/AGILOPS.SQUAROSA(TAUS)BCN3/NE
۱۷	SERI/RAYON	SERI/RAYON CRG 2753
۱۸	SITTA/CHIL	SITTA/CHIL/IRENA/CM
۱۹	ZEMAMRA-8	ZEMAMRA-8-ICW91
۲۰	BERKUT	BERKUT CM96
۲۱	PIGO	PASTOR CM95
۲۲	SERI	SERI/3//RL6010/4* YR CM96
۲۳	CROC	CROC_1/AE.SGUAROSA.
۲۴	BAVIACORA	BAVIACORA M92 CM 92...
۲۵	SERI82	SERI82/SHUHA"S" ICW 89 …

* دو مورد اول زمستانه و بقیه بهاره است. رقمهای شماره ۳ و ۴ گندم دوروم دیم می‌باشند.

از الکتروفورز افقی ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد استفاده شد و عکس‌برداری ژلها زیر نور UV به کمک دستگاه

www.SID.ir

ژل‌خوان UVItec مدل GAS9000 صورت گرفت. قطعات تکثیر شده توسط آغازگرها بر اساس وجود (۱) و عدم وجود باند (۰) نمره‌گذاری شدند. درصد چند شکلی (نسبت تعداد باند چند شکل به تعداد کل باندها) بر اساس روش تیماپایاه و همکاران (۲۰) محاسبه شد.

از نتایج حاصل از نمره‌دهی قطعات تکثیری برای محاسبه ماتریس تشابه برای هر دسته از آغازگرها و مجموع داده‌های دو گروه آغازگرها استفاده شد. با توجه به ماهیت روش نمره‌دهی باندهای تکثیریافته (که از نوع داده‌های کیفی با حالت دوگانه یا دودویی برای هر باند می‌باشد)، از روش ضریب تشابه جاکارد برای محاسبه ماتریس تشابه استفاده شد. نهایتاً از این ماتریس تشابه برای تجزیه کلاستر با نرم‌افزار(NTSYS.pc (Version 2.02e بر اساس روش اتصال کامل استفاده شد. این روش گروه‌بندی سبب شد که حالت زنجیره‌ای در دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر برطرف شود.

جدول۲- زمان و دمای مورد نیاز برای مراحل مختلف هر یک از دوره‌های حرارتی در واکنش PCR با آغازگرهای نیمه‌تصادفی

تعداد چرخه	نام چرخه	زمان	دمای مورد نیاز
۷ چرخه	تک‌رشته‌ای شدن	۴۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتیگراد
	اتصال آغازگر	۱ دقیقه	(Tm+۲) درجه سانتیگراد
	بسط	۲ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد
۳۳ چرخه	تک‌رشته‌ای شدن	۴۰ ثانیه	۹۴درجه سانتیگراد
	اتصال آغازگر	۱ دقیقه	(Tm+۶) درجه سانتیگراد
	بسط	۲ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد
۱ چرخه	بسط نهائی	۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد

Tm= دمای ذوب آغازگر

نتایج و بحث

آغازگرها مجموعاً ۹۷ باند چندشکل تولید نمودند که ۶۴٪ درصد از کل ۱۵۰ عدد باند تولید شده را شامل گردید. بیشترین تعداد باند چندشکل بترتیب متعلق به آغازگرهای ET18-6 وIT15-33 و کمترین تعداد باند متعلق به آغازگر ET18-4 بود (جدول ۳). متوسط تعداد باند به ازای هر آغازگر ۸/۶ عدد و برای هر ژنوتیپ ۲/۸ عدد بود. در همین زمینه نوزیلسکی و همکاران (۱۴) در مطالعه خود بر روی تنوع ژنتیکی ارقام لوبیا با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی، متوسط تعداد باند به ازای هر ژنوتیپ را ۱۱/۵ باند گزارش نمودند. از علل اینکه متوسط تعداد باند در پژوهش حاضر نسبت به برخی پژوهشهای گذشته کمتر است احتمالا به مواردی متعددی می‌تواند برگردد. ازجمله اینکه توالی ناحیه حفظ شده اینترون-اگزونی با اینکه در بسیاری از گیاهان حفظ شده است ولیکن تفاوتهای جزئی در این ناحیه بین جنسهای دور گیاهی وجود دارد (۳). هر دو گروه آغازگرهای اینترونی (ET) و اگزونی (IT) توانستند قطعات تکثیر شده با وضوح بالائی تولید نمایند. ضمن اینکه درصد چندشکلی کلی آغازگرهای گروه IT بیشتر بود (جدول ۳). در میان آغازگرها، آغازگر ET18-6 و IT15-34 با ۱۴ و ۱۱ باند و ۸۶ و ۸۸ درصد بیشترین چندشکلی را در میان آغازگرها به خود اختصاص دادند. بالاترین میانگین اندازه قطعات تولید شده مربوط به آغازگر IT15-31 بود و کمترین میانگین طولی قطعات تولید شده مربوط به آغازگرهای ET18-2 و IT15-33 با میانگین ۵۰۰ و ۴۰۰ جفت باز بود.

بر اساس ضرایب تشابه بدست آمده از داده‌های هر دو گروه آغازگر، ارزش‌های تشابه دامنه‌ای از ۳۶ تا ۹۲ درصد داشتند (نتایج نشان داده نشده‌اند). کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۳۶) بین رقم Pastor با دو رقم سیمره و شاهیوندی و

www.SID.ir

Archive of SID

بیشترین شباهت (۰/۹۲) بین ارقام مارون و گهر وجود داشت. ضمن اینکه میانگین ضریب تشابه بین ارقام و لاین‌های گندم نان نیز ۶۸ درصد بود و ضریب تشابه بین دو رقم گندم دوروم نیز ۶۵ درصد برآورد شد که دلیل این میزان شباهت می‌تواند ناشی از علل مختلفی ازجمله وجود والدین مشترک در برنامه‌های اصلاحی گندم دانست. در مطالعه رافالسکی و همکاران (۱۶) میانگین ضریب تشابه بین اینبردهای ذرت، ۰/۶۲ بدست آمد در حالی که در مطالعه جاروسلاو و همکاران (۱۰) این مقدار از ۰/۱۹ تا ۰/۶۱ متغیر بود. گاول و همکاران (۷) میانگین شباهت بین ارقام گندم و تریتیکاله با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی را ۰/۶۳ گزارش نمودند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر، دریکوند و همکاران (۶) نشان دادند که نشانگرهای اینترون – اگزونی توانسته‌اند جوهای دیم دوردیفه و شش ردیفه و ژنوتیپ‌های جو بدون پوشینه و با پوشینه را از همدیگر تفکیک نمایند. با توجه به ضرایب تشابه بدست آمده مشاهده شد که بین ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی شباهت ژنتیکی بالائی وجود داشت که بیانگر ضعیف بودن پایه ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه بود. این شباهت بالای ژنتیکی احتمالاً به دلیل مشترک بودن منشا در تولید ارقام گندم نان می‌باشد و به همین دلیل بهتر است در مطالعات و برنامه‌های اصلاحی آینده، از منابع ژرم‌پلاسم متنوع‌تری جهت بهره‌برداری بیشتر از تنوع ژنتیکی استفاده نمود.

جدول۳- مقایسه آغازگرهای دارای چندشکلی در ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی

ردیف	نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی(′۳-′۵)	تعداد قطعات تکثیر شده	تعداد قطعات چندشکل	درصد چندشکلی
۱	ET_{18-1}	ACTTACCTGAGGCGCGAC	۹	۵	۵۶
۲	ET_{18-2}	ACTTACCTGCTGGCCGGA	۸	۵	۶۳
۳	ET_{18-4}	ACTTACCTGCCTGCCGAG	۷	۴	۵۷
۴	ET_{18-6}	ACTTACCTGCCTACGCGG	۱۴	۱۲	۸۶
۵	ET_{15-35}	ACTTACCTGCCGCAG	۸	۴	۵۰
۶	ET_{15-36}	ACTTACCTGGGGCTC	۱۱	۷	۶۴
۷	ET_{12-25}	AGCAGGTGACTG	۹	۴	۴۴
۸	ET_{12-26}	AGCAGGTGGACT	۸	۳	۳۸
۹	ET_{12-28}	AGCAGGTCGAAG	۷	۵	۷۱
۱۰	IT_{10-4}	ACGTCCACCA	۶	۴	۶۷
۱۱	IT_{10-6}	ACGTCCATCC	۸	۵	۶۳
۱۲	IT_{15-31}	GAAGCCGCAGGTAAG	۱۰	۷	۷۰
۱۳	IT_{15-32}	GACTCGCCAGGTAAG	۸	۶	۷۵
۱۴	IT_{15-33}	GATGCCCCAGGTAAG	۱۱	۸	۷۳
۱۵	IT_{15-34}	GCGGCATCAGGTAAG	۸	۷	۸۸
۱۶	IT_{15-35}	CGAAGCCAGGTAAG	۷	۴	۵۷
۱۷	IT_{15-36}	ACCTACCTGGGGCTC	۱۱	۷	۶۴

در مطالعات متعددی که به بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های مختلف گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی پرداخته است، ضعیف بودن پایه ژنتیکی و کم بودن فاصله ژنتیکی در این جنس مورد تاکید قرار گرفته است. بوتا و

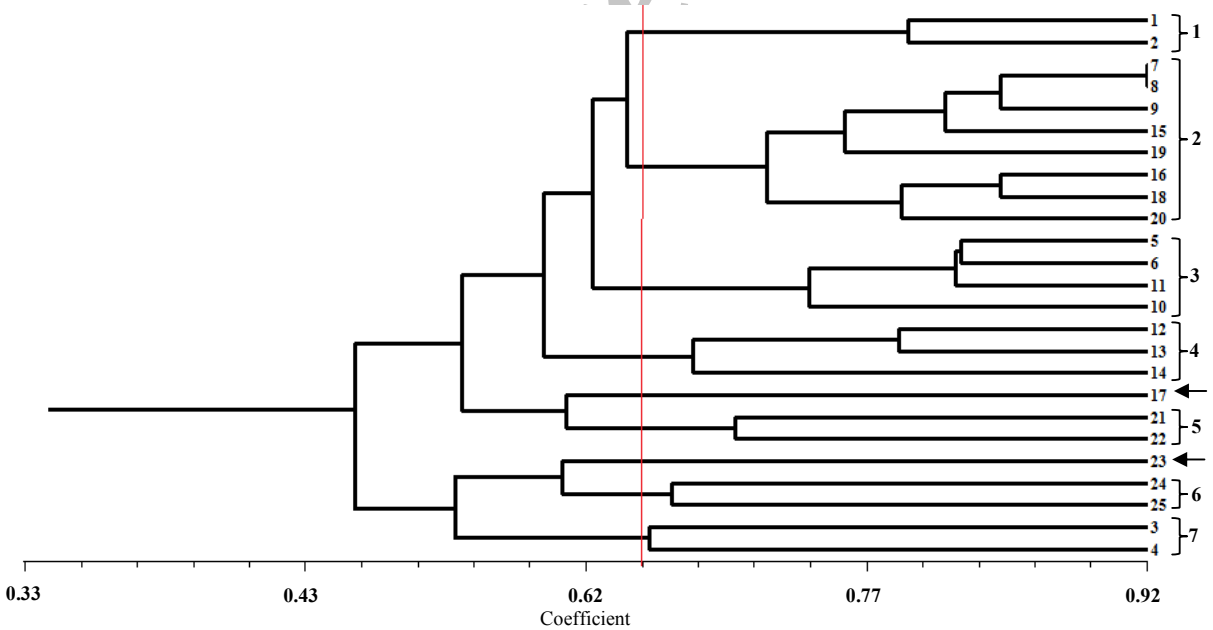
Archive of SID

www.SID.ir

همکاران (۴) و اقبال و همکاران (۹) در مطالعات مشابهی که با استفاده از نشانگرهای مولکولی بر روی برآورد تنوع ژنتیکی ارقام و لاینهای مختلف گندم انجام داده‌اند، شباهت ژنتیکی و ضعیف بودن پایه ژنتیکی جنس گندم را مورد تاکید قرار داده و توسعه پایه ژنتیکی گندم (مثل استفاده از منابع ژرم‌پلاسمی جدید و یا استفاده از منابع ژنی گونه‌های وحشی دارای ژنهای مقاومت به تنشها) را کاملاً جدی دانسته‌اند. خودباروری بالا، پیچیدگی ژنومی، اندازه بزرگ ژنوم و پخش بودن آن در تعداد زیادی کروموزوم، تکراری بودن بخش زیادی از DNA و ضعیف بودن پایه ژنتیکی در جنس گندم سبب کاهش راندمان استفاده از نشانگرهای ژنتیکی و موفقیت در برنامه‌های اصلاحی این گیاه شده است (۱۱).

شکل ۱- الگوی باندی تولید شده توسط آغازگر IT15-31 (اعداد شماره ژنوتیپ و M بیانگر نشانگر اندازه 100bp می باشد).

بر اساس ضرایب تشابه بدست آمده، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به روش **اتصال کامل** انجام گرفت و دندروگرام بدست آمده در ضریب تشابه ۰/۶۵ قطع شد (شکل۲). در این حالت ارقام گندم به ۷ گروه تقسیم شدند و ۲ ژنوتیپ نیز به تنهایی هر یک تشکیل یک گروه جداگانه دادند.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۵ ژنوتیپ گندم با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد و روش اتصال کامل (اعداد، شماره ژنوتیپ را نشان می‌دهند)

گروه اول شامل دو رقم آذر ۲ و سرداری بود. این دو رقم برخلاف سایر ارقام مورد مطالعه از جمله ارقامی هستند که

www.SID.ir

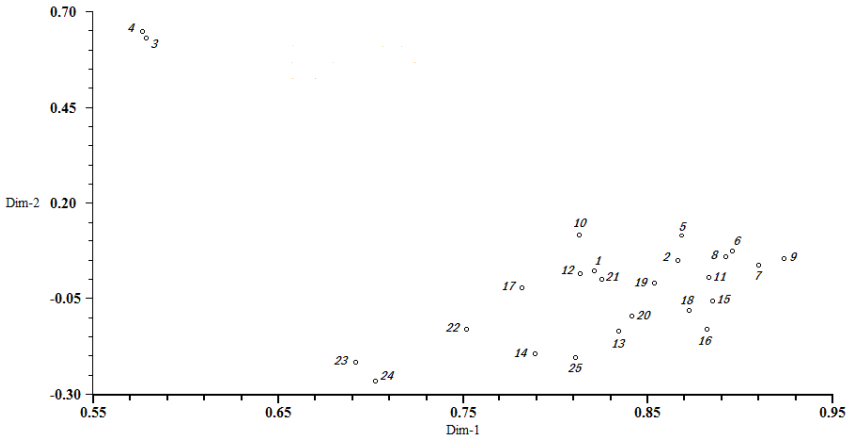
دارای تیپ رشد بهاره می‌باشند. گروه دوم شامل ارقام و لاین‌های گهر، مارون، چمران، ZEMAMRA، CHEN، SITTA، BERKUT و HAMAM4 بود. ارقام داخلی عمدتاً در این گروه قرار گرفتند. گروه سوم شامل ارقام ایرانی زاگرس و کوهدشت و دو لاین TRV2 و IRENA بود. گروه چهارم شامل لاین‌های PASTOR، NESTOR و FLORKWA-Z بود. لاین‌های PIGO و SERI در گروه پنجم، لاین‌های BAVIACORA و SERI82 در گروه ششم و دو رقم گندم دوروم سیمره و شاهیوندی نیز بطور جداگانه گروه هفتم را تشکیل دادند. در این بین لاین‌های SERI/RAYON و CROC نیز هر کدام جداگانه تشکیل یک گروه دادند. گروه هفتم (شاهیوندی و سیمره) در ضریب تشابه ۰/۵۶ و با فاصله ژنتیکی زیادی با سایر گروه‌ها ادغام شد که نشان دهنده فاصله ژنتیکی بیشتر (کمترین تشابه) این ارقام دوروم (تتراپلوئید) با ارقام و لاین‌های گندم نان بود. به نظر می‌رسد علت مشاهده چنین حالتی نیز تا حد زیادی امری طبیعی است زیرا نوع ترکیب ژنوتیپ‌هایی که انتخاب شده است سبب رخداد این وضعیت شده است. به عبارتی دیگر در این پژوهش هدف، بررسی تنوع ژنتیکی برترین لاینها و ژنوتیپهای دیم بهاره مرکز تحقیقات استان و غرب کشور بود تا محققین را در انتخاب والدین تلاقی آنها را یاری کند، ولی جهت کنترل کارایی روش ملکولی اتخاذ شده برای بررسی تنوع ژنتیکی، یکسری ژنوتیپ‌های شاهد (ارقام تتراپلوئید و ارقام زمستانه) نیز به ژنوتیپ‌های مورد بررسی اضافه گردید. در نهایت نیز در کلاستر نیز دیده می‌شود این ارقام تتراپلوئید از ارقام هگزاپلوئید کاملاً تفکیک گردیدند.

به منظور بررسی توزیع فضائی ژنوتیپ‌ها بر اساس فاصله آنها از همدیگر از تجزیه هماهنگ اصلی (PCOOA= Principle Co-Ordinate Analysis) استفاده گردید. نتیجه تجزیه هماهنگ اصلی در شکل ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده است. با مقایسه فواصل ژنوتیپ‌ها بر روی نمودار تجزیه هماهنگ اصلی و فواصل ژنتیکی که در روش تجزیه خوشه‌ای بدست آمده بود، مشاهده شد که هر دو روش ژنوتیپ‌ها را به طور مشابهی از همدیگر تفکیک نموده‌اند. در این روش ژنوتیپ‌هائی که در تجزیه خوشه‌ای به طور جداگانه گروه‌های مجزائی را به خود اختصاص داده بودند در فاصله دورتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها قرار گرفته‌اند. علاوه بر این در این روش ارقام گندم دوروم (ژنوتیپ‌های شماره ۳ و ۴) بطور مناسبتری از سایر ارقام گندم نان در فاصله فضائی دورتری قرار گرفته است که نشان دهنده اختلاف ژنتیکی بالا بین این دو گونه می‌باشد.

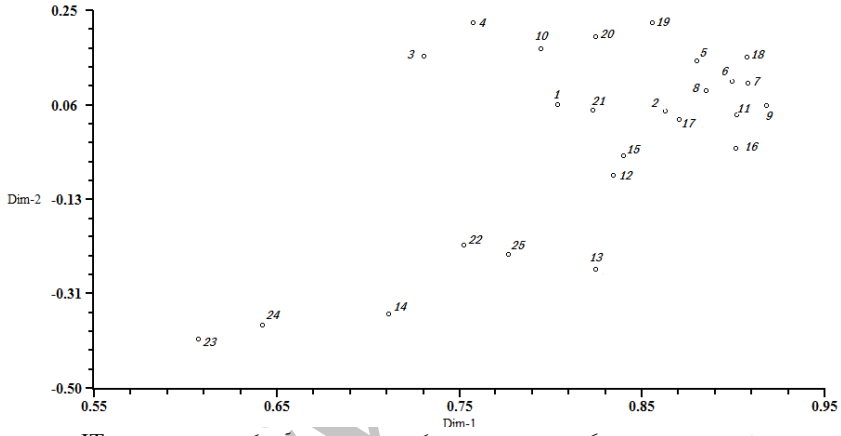
گروه بندی بدست آمده توسط آغازگرهای ET توانست همانند ترکیب دو گروه آغازگری ارقام بهاره و زمستانه را بهتر از آغازگرهای IT جدا کنند. احتمالاً به نظر می‌رسد که بدلیل تکثیر بخشی از DNA توسط این آغازگرها است که صفت بهاره‌سازی را کنترل می‌کند. همچنین آغازگرهای گروهET توانستند ارقام گندم دوروم را بهتر از آغازگرهای IT از سایر ارقام گندم نان تفکیک نمایند. در مجموع با آنکه استفاده از نشانگرهای تصادفی در بسیاری از مطالعات مرسوم می‌باشد (۱، ۲)، ولیکن برتری استفاده از نشانگرهای نیمه‌تصادفی در مطالعات متعددی گزارش شده است (۳).

در مجموع از آن جایی که ارقام مذکور از بهترین ژرم‌پلاسم مورد استفاده در اصلاح گندم دیم منطقه مورد نظر می‌باشد در صورت استفاده صحیح و انتخاب والدین تلاقی‌ها با فاصله ژنتیکی مناسب، می‌تواند منجر به بهبود کمیت و کیفیت عملکرد (که هدف نهائی در اصلاح گیاهان است) گردد. از آنجایی که اطلاعات حاصل از نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق بخشی از اطلاعات ژنوم گیاه هدف را تشکیل می‌دهد؛ بنابراین توصیه می‌گردد که از نتایج تنوع ژنتیکی برآورد شده از این تحقیق در کنار اطلاعات حاصل از سایر نشانگرها (مثل نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی دیگر) برای اصلاح این گیاه استفاده کرد.

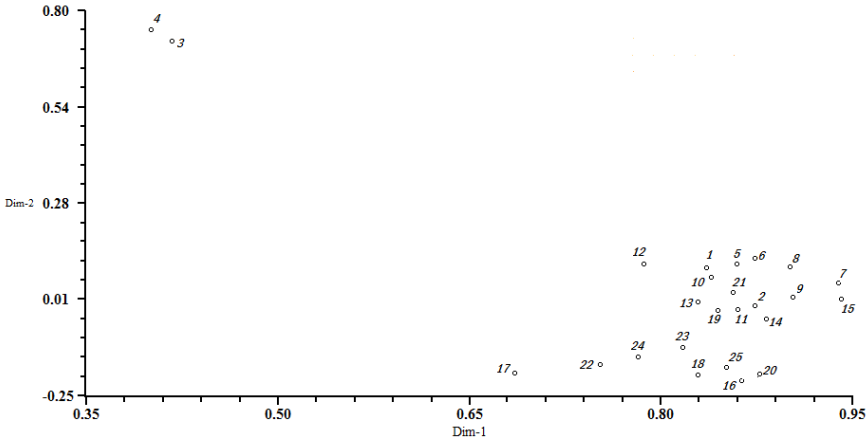
www.SID.ir



شکل ۳- تجزیه هماهنگ اصلی ژنوتیپ‌های گندم با استفاده از ترکیب دو گروه آغازگرهای نیمه‌تصادفی



شکل ۴- تجزیه هماهنگ اصلی ژنوتیپ‌های گندم با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی IT



شکل ۵- تجزیه هماهنگ اصلی ژنوتیپ‌های گندم با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی ET

سپاسگزاری: از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان که هزینه انجام طرح را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان که ما را در تهیه مواد ژنتیکی یاری نمودند

www.SID.ir

سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱- ابدالی، ن.، حسینی مزینانی، م.، عطایی، س.، حسینی، س.م. و نقوی، م.ر. ۱۳۹۰. بررسی میزان تنوع در چهار رقم زیتون ایرانی با مطالعه صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی RAPD. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۴، شماره ۶، ۸۷۹-۸۶۸.

۲- قربانزاده، م. و افضل، ر. ۱۳۹۴. ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های ایرانی و ژنوتیپهای خارجی گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگر مولکولی RAPD. مجله پژوهشهای سلولی و ملکولی (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۸، شماره ۱، ۹۴-۱۰۶.

۳- مجیری، ف.، اسماعیلی، ا.، نظریان فیروزآبادی، ف. مومنی، ر. ۱۳۹۳. مقایسه نشانگرهای اینترونی و اگزونی در ارزیابی تنوع ژنتیکی آویشن کرک‌آلود. مجله پژوهشهای سلولی و ملکولی (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۷، شماره ۳، ۴۷۲-۴۶۲.

4- Bhutta WM, Shahzad A, Akhtar J, Ibrahim M (2005) Assessment of genetic diversity among wheat genotypes using RAPD analysis. Biologia Brastislava, 60: 671-674.

5- Dellaporta SL, Wood J, Ticks J B (1983) A plant molecular DNA minipreparation Version II. Plant Molecular Biology Rapport, 1: 19-21.

6- Drikvand R, Salahvarzi E, Salahvarzi A, Hossinpour T. (2012). Study of Genetic Diversity among Rainfed Barley Genotypes Using ISJ Markers and Morphological Traits. Journal of Agricultural Science 4(9): 137-144.

7- Gawel, M, Wisnewska I, Rafalski A (2002) Semi-specific PCR for evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale. Cell Molecular Biology Letters, 7: 577-582.

8- Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I (1993) Plant Breeding, Principle and Prospects. Chapman and Hall. London.

9- Ighbal A, Khan AS, Khan IA, Awan FS, Khan AA (2007) Study of genetic divergence among wheat genotypes through RAPD. Genetic and Molecular Research, 6: 476-481.

10- Jaroslaw P, Nadolska-Orczyk A, Orczyk W (2002) The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrid between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. Cell Molecular Biology Letters, 7:671-676.

11- Joshi CP, Nguyen HT (1993) Application of random amplified polymorphic DNA technique for detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats. Genome, 36: 602-609.

12- Khush GS (1999) Green revolution: preparing for the 21st century. Genome, 42: 646-655.

13- Mohan M, Nair S, Bagwat A, Krishna TG, Yano M, Bhatia CR, Sasaki T (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Molecular Breeding, 3: 87-103.

14- Nowoseielski J, Podyma W, Sielska DNW (2002) Molecular research on the genetic diversity of Polish varieties and landraces of *Phaseolus cocclineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. Cell Molecular Biology Letters, 7: 753-762.

15- Przetakiewicz J, Nadolska-Orczyk A, Orczyk W (2002) The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. Cellular and Molecular Biology Letters, 7: 671-676.

16- Rafalski A, Madej L, Wisniewska I, Gawelo M (2002) The genetic diversity of components of rye hybrids. Cell Molecular Biology Letters, 7: 471-475.

17- Rafalski A, Gidzinska M, Wisniewska I (1997) PCR-based system for evolution of relationships among maize inbreds, In: Tsaftaries AS (ed.), Genetics and Biotechnology of Maize and Sorghum. Royal. Soc. Chem. Cambridge. UK. pp217.

18- Sharma SK, Koneox MR, Ellis THN (1996) AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with RAPD analysis. Theoretical Applied Genetic, 93: 751-758.

20- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G.S. 2008. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Scientia Horticulturae. 118: 1-7.

20- Weining S, Lngridge P (1991) Identification and mapping of polymorphisms in cereals on the polymerase chain reaction. Theoretical Applied Genetic, 82: 209-216.

21- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingly SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as

Archive of SID

www.SID.ir

genetic markers. Nucleic Acid Research, 18: 6531-6535.

Archive of SID

Assessment of genetic diversity among rain-fed wheat genotypes, using intron-exon semi random primers

Ismaili A.[1], Nazarian Firoozabadi F.[1], Samiey K.[2] and Drikvand R.[3]

[1]Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

[2] Agriculture Engineering Dept., Kangavar Branch, Islamic Azad University, Kangavar, I.R. of Iran

3 Agriculture Dept., Islamic Azad University, Khorramabad Branch, Khorramabad, I.R. of Iran

Abstract

Molecular markers have many applications in estimation of genetic diversity in crops and intron-exon splicing junction is a developed marker from RAPD that use as semi-random primers. In this research, 25 wheat genotypes including 23 rain-fed bread wheat cultivars/lines and 2 rain-fed durum genotypes were studied. Results showed that 17 primers from 32 semi-random primers had polymorphism among wheat cultivars/lines and percent of polymorphism varied from 38 to 88. Similarity matrices identified the highest similarity had between Maroon and Gahar cultivars. Cluster analysis on the basis of complete linkage method and Jacard similarity coefficient at 0.65 discriminated genotypes to 7 clusters and 2 genotypes were separated in 2 different clusters. Co-ordinate component analysis also could group the studied wheat genotypes based on their spatial distances. Although wheat cultivars/lines were well classified via 17 polymorphism primers, a low to medium genetic distance was estimated. This clustering could distinguish and isolate spring wheat cultivars/lines from winter ones and also hexaploid from tetraploid. Results showed that clustering via exon-targeting (ET) primers could distinguish and isolate winter wheat cultivars/lines from spring ones and durum wheat genotypes from hexaploid ones with a significant distance compared to intron-targeting (IT) primers.

Key words: *Rain fed Wheat, Genetic Diversity, intron-exon, Clustering*

www.SID.ir