Archive of SID

بررسی تنوع ژنتیکی مقاومت به بیماری بلایت باکتریایی گندم (*Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR در ارقام گندم بومی ایران

سیده زهرا فاطمی‌فرد، اسد معصومی‌اصل* و رسول رضایی

ایران، یاسوج، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

گندم نان مهمترین محصول جهان است که عملکرد آن تحت تأثیر چندین بیماری از جمله بیماری باکتریایی برگ قرار دارد. مناسب ترین روش برای مدیریت این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم است. نشانگرهای DNA در زمینه مقاومت به بیماریها در گروه‌بندی گیاه بسیار موثر هستند و در میان این نشانگرها، نشانگر ISSR توصیه می‌شود زیرا اطلاعات پیشین از توالی DNA لازم نیست و پیاده سازی آن آسان و سریع می‌باشد. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۲۷ ارقام بومی گندم بومی ایران با توجه به مقاومت در برابر بلایت باکتریایی با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت که ۱۷۰ باند قابل بررسی را تولید کرد که ۱۵۶ باند چندشکل است. بالاترین درصد نوارهای چندشکل متعلق به آغازگرهای F7juinkhliF8 ، F10 و پایین‌ترین مقدار آن مربوط به آغازگر F9 بود. بالاترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) متعلق به آغازگرهای F10 و F5 و کمترین مقدار آن متعلق به آغازگر F7 بود. تجزیه خوشه‌ای این ارقام را به چهار گروه تقسیم کرد: ارقام قدس، امید و آتاک در گروه مقاوم و سایر ارقام در گروه حساس و بسیار حساس قرار گرفتند. چندشکلی بالای به دست آمده در این تحقیق می‌تواند به کارایی بالای نشانگر ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام گندم از نظر مقاومت در برابر بیماری‌های مختلف نسبت داده شود.

واژه‌های کلیدی: ژنوتیپ، تجزیه خوشه‌ای، چندشکلی، نشانگر مولکولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۴۳۳۲۲۴۸۴۰ ، پست الکترونیکی: Masoumiasl@yu.ac.ir

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) از نظر تولید و سطح زیر کشت جهانی نسبت به دیگر غلات دانه‌ای رتبه اول را دارا می‌باشد (۱۵). بنابراین با توجه به وسعت سطح زیر کشت این گیاه و افزایش نیاز روزافزون به آن، نیازمند ارقام سازگار و پایدار از جهت عملکرد نسبت به تنش‌های زنده و غیر زنده می‌باشیم. براساس آمار منتشر شده، بیماری‌های گیاهی منجر به کاهش ۳۵ درصدی تولیدات گندم می‌شوند (۱۰). در صورت مناسب بودن شرایط محیطی، بیماری بلایت برگی می‌تواند سبب کاهش قابل ملاحظه محصول شود (۲۵، ۲ و ۲۳). این بیماری در ایران نخستین بار در استان کرمان مشاهده شد (۲) و تاکنون از مزارع گندم استان‌های کهگیلویه و بویراحمد، فارس (۱)، سیستان و بلوچستان و گیلان (۲۲) نیز گزارش شده است. مناسب‌ترین روش مدیریت این بیماری استفاده از ارقام مقاوم است (۸).

در برنامه‌های اصلاحی، از نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزاری مناسب و مکمل روش‌های اصلاح کلاسیک استفاده می‌شود. این نشانگرها به علت پوشش وسیع ژنومی و همچنین سهولت آشکارسازی و تشخیص، کاربرد فراوانی داشته و استفاده از اطلاعات به‌دست آمده در مدیریت بهتر

www.SID.ir

Archive of SID

ژرم‌پلاسم موجود و استفاده بهینه از آن در برنامه به‌نژادی مفید می‌باشد. نشانگرهای مولکولی به‌ویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA با ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و با حذف اثرات ناشی از عوامل محیطی، توانسته اند بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیک را برطرف کنند (۱۸ و ۱۹). در تکنیک گزینش به کمک نشانگر، همبستگی بین نشانگرهای DNA و صفات مهم زراعی همچون مقاومت به عوامل بیماری‌زا، حشرات، نماتدها، تحمل به تنش‌های غیرزنده، پارامترهای کیفیت و صفات کمی مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این روش نشانگرهایی که در مجاورت ژن هدف قرار دارند، شناسایی و انتخاب می‌شوند. به این ترتیب این روش به شناسایی گیاهان حامل ژن‌های هدف به طور هم زمان و بدون قرار دادن در معرض هجوم بیمارگر یا حشره در نسل‌های اولیه، کمک خواهد کرد (۳). در تحقیق دیگر بیان شد که شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های کنترل کننده صفات، به عنوان روشی بسیار مفید جهت شناسایی ارقام مقاوم می‌باشد (۲۶).

نشانگرهای بین ریزماهوارهای ژنومی یا ISSR، یک دسته از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر تکثیر قطعات کوتاه DNA، درون توالی‌های تکراری ساده می‌باشند. این قطعات، حتی در میان ژنوتیپ‌های بسیار نزدیک، چندشکلی بالایی نشان می‌دهند که ناشی از فقدان محدودیت‌های کارکردی در این مناطق ژنومی می‌باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی ۴۸ رقم گندم نان و ۵۱ رقم گندم دوروم در کشور پرتغال که با استفاده از ۱۸ آغازگر ISSR انجام شد، در مجموع ۹۶/۳ درصد چندشکلی برای ارقام گندم نان و ۹۸/۵ درصد چندشکلی برای ارقام گندم دوروم گزارش کردند (۱۴). این پژوهشگران اشاره کردند که ISSR بازتاب خوبی از تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای، بین گونه‌ای و بین ارقام‌ها را نشان می‌دهد. فتحی و همکاران (۷) تنوع ژنتیکی ۴۰ گونه از توده *Aegilops triuncialis* جمع‌آوری شده از مناطق غربی ایران را با استفاده از آغازگر ISSR بررسی کردند که ۱۱۸ نوار چندشکل به دست آمد و از بین آنها آغازگر UBC_{817} با ۱۶ نوار و آغازگرهای UBC_{811} و UBC_{823} با ۱۴ نوار بیشترین و آغازگر UBC_{825} با ۴ نوار، کمترین تعداد نوار را تشکیل دادند. تجزیه خوشه‌ای، ۴۰ توده بررسی شده را در سه گروه طبقه بندی کرد که هر گروه به ترتیب شامل ۱۳، ۹ و ۱۸ توده بودند. استفاده از ۹ آغازگر ISSR برای شناسایی تنوع ژنتیکی مرتبط با بیماری فوزاریوم در گیاه نخود مشخص کرد از این آغازگرها در مجموع ۶۱ باند تولید شد که در این میان ۴۴ نوار چندشکل (۷۲/۱ درصد) ایجاد شد (۱۷). همچنین در پژوهش مسعودی و همکاران (۱۱) برای ارزیابی مقاومت به بیماری سفیدک پودری که با استفاده از نشانگرهای ISSR، iBPS و IRAP، بر روی ۱۱۵ ژنوتیپ گندم انجام گردید، بیشترین و کمترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر نوع ISSR و iBPS به ترتیب با ۱۰۰ و ۵۰ درصد بود و آلل PR50-60 بیشترین ارتباط را با صفات مورد ارزیابی در این پژوهش داشت.

هدف از این پژوهش، بررسی تنوع ژنوتیپ‌های گندم ایرانی از لحاظ مقاومت به بیماری بلایت باکتریایی می‌باشد. از آنجا که ایران از کشورهای غنی از ذخایر توارثی برخی محصولات مهم از جمله گندم است، ارزیابی اولیه و پیشرفته ذخایر ارزشمند گندم در ارتباط با اهداف اصلاحی این محصول که برطرف کننده مشکلات تولید است باید در اولویت قرار گیرد.

مواد و روشها

۲۷ رقم گندم بومی ایران از موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد که اسامی آنها در جدول ۱ آورده شده است. این ارقام در گلدان حاوی خاک جمع آوری و الک شده (خاک زراعی، کود حیوانی و ماسه شسته بود) در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه یاسوج و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار کشت شدند. گیاهان از زمان کاشت تا زمان برداشت در شرایط کنترل شده نور، دما، کنترل آلودگی و رطوبت نگهداری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- ارقام گندم مورد مطالعه

۱- آزادی	۲- الموت	۳- الوند	۴- اترک	۵- امید	۶- اینیاء	۷- بزوستایا
۸- بولانی	۹- تجن	۱۰- چمران	۱۱- داراب۲	۱۲- روشن	۱۳- زرین	۱۴- سبلان
۱۵- سرخ‌تخم	۱۶- سرداری	۱۷- شعله	۱۸- طبسی	۱۹- فلات	۲۰- قدس	۲۱- کارچیا
۲۲- کویر	۲۳- گلستان	۲۴- ماهوتی	۲۵- مهدوی	۲۶- میهن	۲۷- نیک‌نژاد	

برای انجام محلول پاشی برگی، از سوسپانسون اولیه باکتری که از گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج تهیه شد، کشت ۱۶ خطی انجام گردید و سپس از کشت مجدد اولیه، کشت ۲۴ ساعته انجام شد. از کشت ۲۴ ساعته کلونی باکتری درون ارلن حاوی آب مقطر یک بار تقطیر اتوکلاو شده منتقل و سوسپانسون تهیه شد. سپس میزان جذب نوری سوسپانسیون باکتری در طول موج نوری ۶۰۰ قرائت گردید. اسپری پاشی دستی در مرحله ۵-۴ برگی انجام شد (۲۴). گیاهان شاهد نیز با آب یک بار تقطیر اتوکلاو شده، اسپری پاشی برگی گردیدند. به منظور بررسی میزان آلودگی برگی بوسیله باکتری Pss، نمونه‌برداری در بازه‌های زمانی ۷، ۱۴ و ۱۸ روز پس از محلول‌پاشی برگی انجام گرفت. سپس از برگهای تلقیح شده عکس تهیه شده و سطح آلودگی با استفاده از نرم‌افزار IMAGE J محاسبه گردید. گروه‌بندی ارقام در ۶ گروه و طبق رده‌بندی (۱۹) انجام گرفت. بر طبق این رده‌بندی، صفر: یعنی فاقد هرگونه علامت قابل مشاهده. یک: یعنی کلروز بدون بافت‌مردگی. دو: یعنی بافت‌مردگی کمتر از ۱۰ درصد. سه: یعنی بافت‌مردگی بین ۱۱ تا ۳۰ درصد. چهار: یعنی بافت‌مردگی بین ۳۱ تا ۷۰ درصد. پنج: یعنی بافت‌مردگی بین ۷۱ تا ۱۰۰ درصد. و شش: یعنی گسترش بافت‌مردگی به ناحیه فراتر از ناحیه مایه‌زنی شده. نتایج بین صفر تا دو به عنوان واکنش مقاومت و بین ۲/۱ تا ۶ به عنوان واکنش حساسیت در نظر گرفته شد.

در مرحله ۶-۴ برگی و در بازه‌های زمانی ۱، ۳ و ۵ روز پس از مایه‌زنی، نمونه‌های برگی جمع آوری و استخراج DNA از برگ خشک شده گیاه، بدون نیاز به نیتروژن مایع و SDS، با تغییراتی در روش اسفندانی بزچلوئی (۱۳۹۶) انجام گردید. پس از تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتری، واکنش PCR با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR (جدول ۲) انجام گردید. واکنش PCR با استفاده از PCR Master Mix(2X) شرکت آمپلی‌کون آماده مصرف (تهیه شده از شرکت سیناژن) به میزان ۱۰ میکرولیتر، ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) و ۲ میکرولیتر از آغازگر (۱۰ میکرومول) و ۶/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام گردید. الگوی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک چرخه واسرشت اولیه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتگراد، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی به مدت ۳۰ ثانیه و در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال آغازگر به الگو در دمای ۶۳/۶-۴۰/۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه (جدول ۲)، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و به مدت ۱/۳ دقیقه. و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۲/۵ درصد با ولتاژ ۱۰۰ با استفاده از دستگاه الکتروفورز از هم تفکیک شدند. قطعات DNA تکثیر شده به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) امتیازبندی و از ضریب تشابه جاکارد برای محاسبه تشابه بین هر یک از زوج‌های ژنوتیپی استفاده گردید. جهت به دست آوردن تعداد آلل مشاهده شده (N_a)، تعداد آلل موثر (N_e)، شاخص شانن (I)، میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) از نرم‌افزار GenAlex استفاده گردید. همچنین ترسیم درخت فیلوژنی و نمودار

www.SID.ir

Archive of SID

دو بعدی و سه بعدی با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ver 2.02 انجام گردید. جهت تعیین گروه‌بندی ارقام، از آزمون T^2 هتلینگ در نرم افزار SAS استفاده گردید. برای محاسبه PIC از نرم‌افزار آنلاین PIC COLTIVATUR استفاده گردیده و MI از رابطه MI= PIC × EMR بدست آمد.

جدول۲- توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده

اسم آغازگر	توالی آغازگر ('3 → '5)	دمای اتصال (درجه سانتیگراد)
F1	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	۶۳/۶
F2	ACA CAC ACA CAC ACA CCG	۵۶/۳
F3	CTC TCT CTC TCT CTC TG	۵۲/۴
F4	GAT AGA TAG ACA GAC A	۴۳/۲
F5	GGG TGG GGT G	۳۶
F6	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	۵۲/۶
F7	CTC TCT CTC TCT CTC TGC	۵۶/۳
F8	CTC TCT CTC TCT CTA	۴۳/۵
F9	CAG CAG CAG GC	۳۸
F10	GTG TGT GTG TGT CC	۴۳/۷
F11	CAC ACA CAC ACA AC	۴۰/۸
F12	CAC ACA CAC ACA GT	۴۰/۸

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل درصد آلودگی برگی ارقام گندم در دومین زمان برداشت (۱۴ روز پس از محلول‌پاشی برگی)، نشان داد که ارقام امید، اترک و قدس جزو ارقام مقاوم (کمتر از ۱۰ درصد بافت‌مردگی) و سایر ارقام جزو ارقام حساس (بیشتر از ده درصد آلودگی در ناحیه مایه‌زنی شده) به بیماری بلایت باکتریایی قرار گرفتند. همچنین ارقام آزادی، چمران، داراب۲، فلات و کویر حساسیت زیادی (۳۱ تا ۷۰ درصد آلودگی برگی) نسبت به این بیماری نشان دادند تا جایی که حساسیت آن‌ها از رقم گلستان (رقم حساس- شاهد) نیز بیشتر بود. همچنین رقم اترک مقاومت بیشتری نسبت به رقم امید (رقم مقاوم- شاهد) نشان داد.

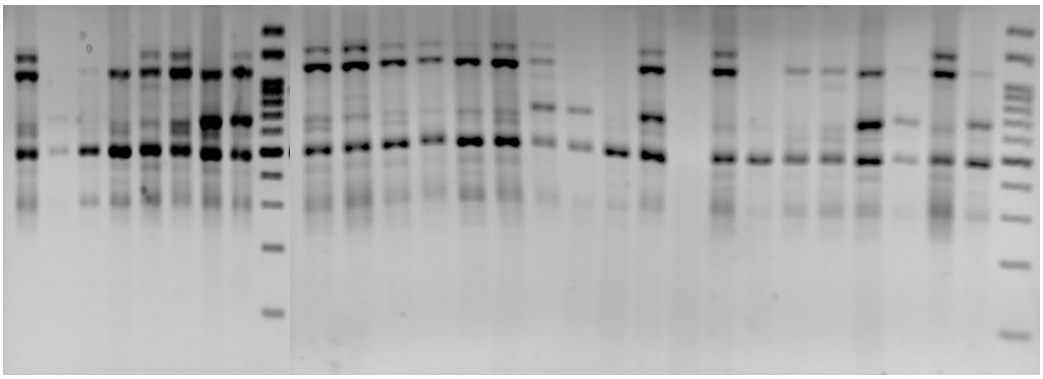
در این پژوهش، بالاترین میزان چندشکلی مربوط به آغازگرهای F_{10} ، F_5 و F_6 بود (شکل ۱) و لذا از این آغازگرها برای آنالیز مجموعه ژرم‌پلاسم‌های ارقام دیگر گندم در پژوهش‌های بعدی می‌توان بهره گرفت. کمترین میزان چندشکلی مربوط به آغازگر F_7 بود. این آغازگر توانایی خوبی برای جداسازی ژرم‌پلاسم‌ها از خود نشان نداد در حالیکه دیگر آغازگرهای مطالعه شده در این تحقیق به شدت چندشکلی را نشان دادند (جدول ۳). مقدار چندشکلی برای نشانگرهای غالب حداکثر باید ۰/۳۷۵ باشد (۲۱). هر چه این عدد بزرگتر باشد و به مقدار ۰/۳۷۵ نزدیکتر باشد، بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در جمعیت تحت بررسی است. محتوای اطلاعات چندشکلی در اکثر آغازگرهای مورد استفاده عدد بزرگی بود که نشان دهنده انتخاب صحیح و کارائی بالای این آغازگرها می‌باشد. شاخص نشانگری (MI) آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه بین ۶/۳۱۷ تا ۰/۱۶۶ متغیر بود. از MI به عنوان معیاری مناسب برای پیشگوئی کارایی نشانگر در یک ژرم‌پلاسم استفاده می‌گردد. آغازگرهای F_5 و F_{12} در این مطالعه بالاترین مقدار شاخص نشانگری را به

www.SID.ir

Archive of SID

خود اختصاص دادند (جدول ۳). از شاخص نشانگری به عنوان معیاری مناسب برای پیشگویی کارایی نشانگر در یک ژرم‌پلاسم استفاده می‌گردد. بنابراین آغازگرهایی که بالاترین مقدار شاخص نشانگری را به خود اختصاص دادند، می‌توانند برای مطالعه ژرم‌پلاسم گندم در سطح وسیع استفاده گردند.

1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 M



شکل ۱- الگوی باندی مربوط به آغازگر F_{ε}، شماره‌ها به ترتیب مربوط به ارقام: ۱- آزادی، ۲- الموت، ۳- الوند، ۴- اترک، ۵- امید، ۶ - اینیاء، ۷ - بزوستایا، ۸- بولانی، ۹- تجن، ۱۰- چمران، ۱۱- داراب۲، ۱۲- روشن، ۱۳- زرین، ۱۴- سبلان، ۱۵- سرخ‌تخم، ۱۶- سرداری، ۱۷- شعله، ۱۸- طبسی، ۱۹- فلات، ۲۰- قدس، ۲۱- کارچیا، ۲۲- کویر، ۲۳- گلستان، ۲۴- ماهوتی، ۲۵- مهدوی، ۲۶- میهن و ۲۷- نیک‌نژاد و M : نشان دهنده نشانگر وزنی می‌باشد.

آغازگر F_7 کمترین و آغازگرهای F_{10}، F_5 و F_6 بیشترین He را نشان دادند (جدول ۳). هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای کل جمعیت در تمام جایگاه‌ها به طور متوسط ۰/۳۷ بدست آمد که با سیستم گرده‌افشانی گندم تطابق دارد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، معیاری برای ارزیابی تنوع ژنی بوده و با تعداد آلل موثر ارتباط مستقیم دارد (۱۶).

مقدار میانگین I در این تحقیق ۰/۵۵۰ بوده است که در این میان کمترین داده مربوط به آغازگر F_7 و حداکثر آن مربوط به آغازگر F_{10} بود. شاخص شانون در این مطالعه برای اکثر آغازگرهای انتخاب شده بالا بود. شاخص شانون (I) بیانگر میزان تنوع در هر آغازگر می‌باشد. حداقل و حداکثر آلل موثر به دست آمده در این تحقیق، به ترتیب مربوط به آغازگرهای F_7 و F_{10} بود. تعداد آلل‌های موثر (Ne)، بیانگر تعداد آلل‌هایی است که برای دستیابی به هتروزیگوسیتی انتظار می‌رود. تعداد آلل‌های متفاوت (Na)، بیان کننده تعداد آلل‌های مشاهده شده و تعداد واقعی آلل‌هایی است که در جمعیت وجود دارند. کمترین مقدار به دست آمده برای Na متعلق به آغازگر F_9 و بیشترین مقدار آن مربوط به سایر آغازگرها (به جز F_9 و F_{12}) بود (جدول ۳). کاهش غنای آللی می‌تواند منجر به کاهش پتانسیل جمعیت برای سازگاری با تغییرات زیست محیطی آینده شود، زیرا این تنوع خام برای تکامل با انتخاب طبیعی است. بنابراین غنای آللی یک شاخص قوی برای پتانسیل تکاملی جمعیت است. همچنین غنای آلل، تعداد واقعی آلل را در هتروزیگوسیت اندازه می‌گیرد، در حالی که تعداد آلل موثر، تعداد آلل هایی که انتظار می‌رود در جمعیت با همان هتروزیگوسیتی است. با توجه به عواقب بوم شناسی و تکاملی هتروزیگوسی در مقابل غنای آللی، هر دو اقدامات باید در تلاش‌های حفاظت و مدیریت با هدف حفظ تنوع ژنتیکی در نظر گرفته شود (به نقل از ۱۶).

جدول ۳- مقادیر شاخص‌های نشانگری آغازگرهای مورد مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

اسم آغازگر	تعداد نوار تکثیر شده	تعداد نوار چندشکل	درصد نوارهای چندشکل	PIC	MI	He	I	Ne	Na
F_1	۱۱	۱۰	۹۰/۹	۰/۲۴۴	۲/۲۱۷	۰/۳۰۲	۰/۴۶۲	۱/۵۰۸	۲
F_2	۱۷	۱۵	۸۸/۲۳	۰/۳۰۶	۴/۰۴۹	۰/۳۸۴	۰/۵۶۹	۱/۶۵۱	۲
F_3	۱۳	۱۲	۹۲/۳۰	۰/۳۰۲	۳/۳۴۴	۰/۳۸۶	۰/۵۶۲	۱/۶۸۷	۲
F_4	۱۷	۱۶	۹۴/۱۱	۰/۳۰۵	۴/۵۹۲	۰/۳۸۷	۰/۵۶۹	۱/۶۸۲	۲
F_5	۲۰	۱۹	۹۵	۰/۳۵۰	۶/۳۱۷	۰/۴۵۶	۰/۶۴۷	۱/۸۵۳	۲
F_6	۱۳	۱۲	۹۲/۳۰	۰/۳۲۳	۳/۵۷۷	۰/۴۱۵	۰/۶۰۰	۱/۷۵۱	۲
F_7	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۱۶۶	۰/۱۶۶	۰/۱۹۸	۰/۳۲۵	۱/۳۰۳	۲
F_8	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۱۵	۰/۱۸۹	۰/۴۰۷	۰/۵۸۷	۱/۷۵۴	۲
F_9	۲۰	۱۶	۸۰	۰/۳۰۴	۳/۸۹۱	۰/۳۰۹	۰/۴۵۳	۱/۵۴۴	۱/۸
F_{10}	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۳۶۲	۴/۳۴۴	۰/۴۷۵	۰/۶۶۸	۱/۹۱۰	۲
F_{11}	۱۳	۱۱	۸۴/۶۱	۰/۳۱۵	۲/۹۳۱	۰/۴۰۱	۰/۵۸۶	۱/۷۱۳	۲
F_{12}	۱۸	۱۷	۹۴/۴۴	۰/۳۳۱	۵/۳۱۴	۰/۴۰۲	۰/۵۷۹	۱/۷۳۲	۱/۹۴۴
میانگین	۱۳	۱۴/۱۶۶	۹۲/۶۵۷	۰/۳۰۱	۳/۴۱۰	۰/۳۷۶	۰/۵۵۰	۱/۶۷۴	۱/۹۷۸

صفری و همکاران (۵) در بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های چچم دائمی (*Lolium prenne*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR گزارش کردند که این نشانگر توانسته چندشکلی مطلوبی را بین ژنوتیپ‌ها نشان دهد طوریکه محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرها بین ۰/۲۵ تا ۰/۴۵ متغیر بود.

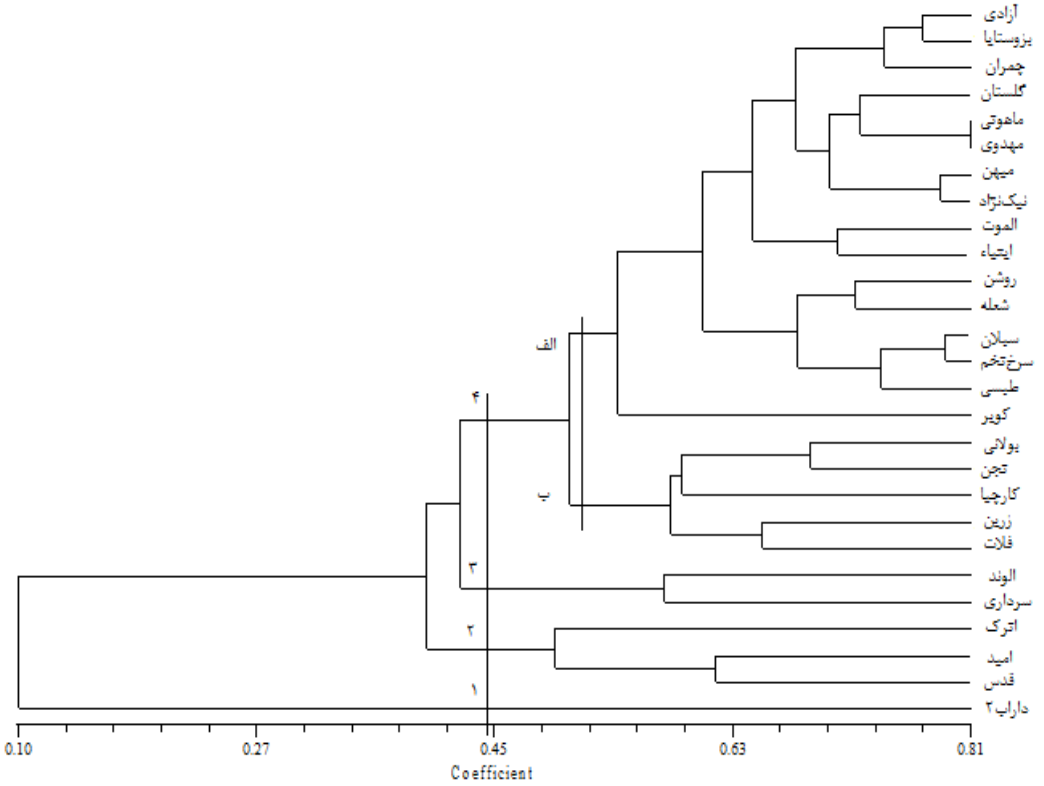
خط برش در دندروگرام شکل ۲ از محل فاصله ژنتیکی ۰/۴۱۱، بهترین گروه‌بندی را نشان داد که توسط آزمون T^2 هتلینگ و CCC تعیین گردید. بر این اساس، با رسم خط برش در محل تعیین شده بر روی نمودار، چهار گروه ایجاد گردید که شامل گروه‌های: (۱) داراب۲، (۲) قدس، امید و اترک، (۳) سرداری و اروند و (۴) شامل دو زیر گروه می‌باشد: الف) فلات، زرین، کارچیا، تجن، بولانی و کویر و ب) طبسی، سرخ‌تخم، سبلان، شعله، روشن، اینیا، الموت، نیک‌نژاد، میهن، مهدوی، ماهوت، گلستان، چمران، بزوستایا و آزادی می‌باشند. تجزیه خوشه‌ای یک روش آماری چند متغیره می‌باشد که هدف اولیه آن گروه‌بندی افراد براساس میزان تشابه می‌باشد، به طوریکه افراد مشابه از نظر صفات (نشانگرهای) مورد بررسی، در یک خوشه واحد کنار هم قرار می‌گیرند. یکی از نکات مهم در ارزیابی دندروگرام ترسیم شده، بررسی اطمینان نقاط شاخه‌های مختلف داخل یک درخت می‌باشد. آزمون‌های آماری متفاوتی برای ارزیابی درخت ترسیم شده وجود دارد، اما این آزمون‌ها پیچیده هستند زیرا درخت ترسیم شده بیشتر ژئومتریک است تا عددی. بنابراین صحت و دقت یک بخش از درخت ممکن است کمتر یا بیشتر از صحت بخش‌های دیگر باشد (۱۳).

بر اساس داده‌های علائم بیماری و همچنین گزارش‌های فلاحی‌چرخابی (۸) و تقوی و کشاورز (۱)، رقم امید به عنوان رقم مقاوم به بیماری بلایت و رقم گلستان به عنوان رقم حساس به بلایت در مجموعه ارقام انتخابی قرار دارند. بر این اساس، گروه اول که شامل رقم داراب۲ بود، در برخی آغازگرها باند تشکیل نداد و در خوشه‌ای جداگانه قرار گرفت. لذا گروه اول و دوم شامل ارقام مقاوم، گروه سوم شامل ارقام نیمه حساس و گروه چهارم شامل ارقام حساس می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

صحراگرد (۴) بررسی مقاومت ارقام تجاری گندم به *Pss* را در مرحله سه برگی ارزیابی و مشخص نمود که پس از ۴۰ روز (مرحله به ساقه رفتن) در ارقام گندم روشن، امید، قدس و گاسپارت و ارقام جو علائم بیماری کاهش یافت و فقط لکه بافت مرده کوچک باقی ماند. همچنین بر طبق گزارش تقوی و کشاورز (۱)، ارقام فلات، TR80، C 73-5 و اروند جهش‌یافته مصون و ارقام اروند، اترک، سرخ‌تخم، نیک‌نژاد، M-73-18 و Fr 319 به عنوان ارقام مقاوم گزارش شدند. در حالی که در پژوهش حاضر بر اساس داده‌های مولکولی و درصد آلودگی برگی محاسبه شده و نیز در پژوهش فلاحی چرخابی (۸) ارقام سرخ‌تخم و نیک‌نژاد به *Pss* حساس بودند. همچنین در پژوهش فلاحی چرخابی (۸) ارقام اترک، فلات، اروند نیز حساس معرفی شدند در حالیکه در این پژوهش رقم اترک در گروه ارقام مقاوم به بیماری قرار گرفت. همچنین ارقام سرداری و اروند در گروهی جدا، مابین ارقام مقاوم و حساس قرار گرفتند. بیشترین فاصله ژنتیکی میان ارقام داراب۲ و قدس با رقم آزادی به دست آمد. ارقام ماهوتی و مهدوی دارای کمترین فاصله ژنتیکی نسبت به یکدیگر بودند. ارقام قدس و امید و اترک را که از نظر مولکولی و مورفولوژیکی به عنوان والد مقاوم تشخیص داده شده‌اند را در صورت مناسب بودن صفات موردنظر، در برنامه به‌نژادی به عنوان والد دهنده مقاومت در روش اصلاحی تلاقی برگشتی می‌توان استفاده کرد. همچنین در سایر برنامه‌های به‌نژادی، مانند استفاده از هتروزیس و مهندسی ژنتیک در جهت سازگاری بیشتر با شرایط کشور می‌توان از این ارقام مقاوم استفاده نمود. بیشترین فراوانی ارقام در گروه ۴ بود که این نشان دهنده تشابه ژنتیکی بسیار نزدیک این ارقام نسبت به یکدیگر می‌باشند. در ارقام حساس تفاوت اندکی بین گروه‌بندی مولکولی و مورفولوژیکی مشاهده گردید.

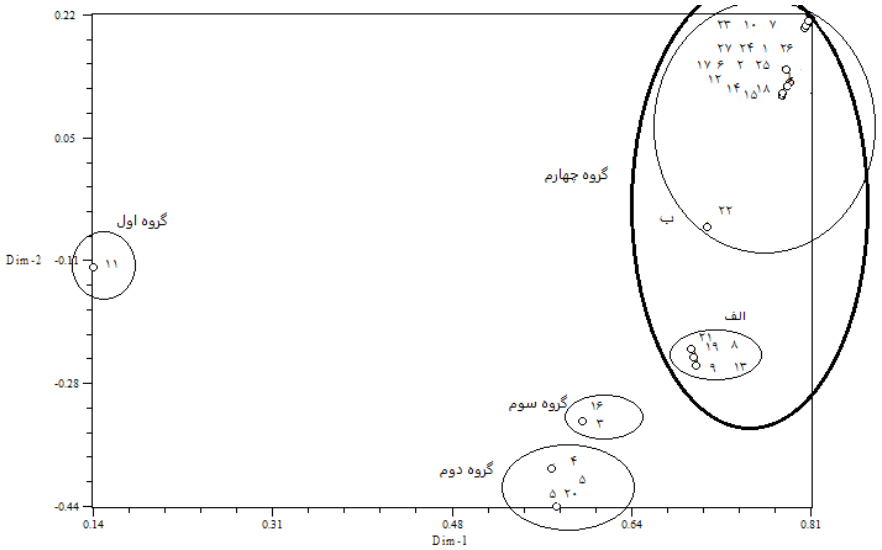


شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۷ ژنوتیپ گندم مورد مطالعه بر مبنای مشاهدات مولکولی

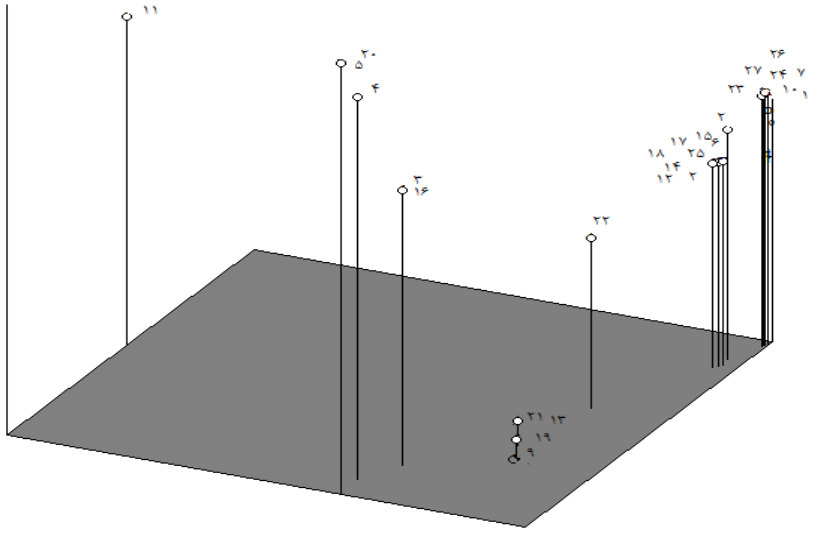
www.SID.ir

Archive of SID

به نقل از نظری و عبدالشاهی (۱۲) عدم تشابه بین نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی در مطالعات مختلف گزارش و دلایل مختلفی برای آن بیان شده است. علت عدم مطابقت دندروگرام‌های حاصل از صفات مختلف را شاید بتوان در تعداد کم نشانگر ریزماهواره مورد استفاده در تحقیق دانست. همچنین از آنجا که منابع ژنی می‌توانند فنوتیپ‌های مشابهی را برای ژن‌های متفاوت آشکار کنند، این نتایج دور از انتظار نیست. نمودارهای دو بعدی (شکل ۳) و سه بعدی (شکل ۴) پراکنش ارقام نیز تا حدودی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تایید کردند.



شکل ۳- نمودار دو بعدی مربوط به ۲۷ ژنوتیپ گندم مورد مطالعه: اسامی ارقام با اعداد جایگزین گردیده اند: ۱- آزادی، ۲- الموت، ۳- الوند، ۴- اترک، ۵- امید، ۶- اینیاء، ۷-بزوستایا، ۸- بولانی، ۹- تجن، ۱۰- چمران، ۱۱- داراب۲، ۱۲- روشن، ۱۳- زرین، ۱۴- سبلان، ۱۵- سرخ‌تخم، ۱۶- سرداری، ۱۷- شعله، ۱۸- طبسی، ۱۹- فلات، ۲۰- قدس، ۲۱- کارچیا، ۲۲- کویر، ۲۳- گلستان، ۲۴- ماهوتی، ۲۵- مهدوی، ۲۶- میهن و ۲۷- نیک‌نژاد.



شکل ۴- نمودار سه بعدی مربوط به ۲۷ ژنوتیپ گندم مورد مطالعه: اسامی ارقام با اعداد جایگزین گردیده اند: ۱- آزادی، ۲- الموت، ۳- الوند، ۴- اترک، ۵- امید، ۶- اینیاء، ۷-بزوستایا، ۸- بولانی، ۹- تجن، ۱۰- چمران، ۱۱- داراب۲، ۱۲- روشن، ۱۳- زرین، ۱۴- سبلان، ۱۵- سرخ‌تخم، ۱۶- سرداری، ۱۷- شعله، ۱۸- طبسی، ۱۹- فلات، ۲۰- قدس، ۲۱- کارچیا، ۲۲- کویر، ۲۳- گلستان، ۲۴- ماهوتی، ۲۵- مهدوی، ۲۶- میهن و ۲۷- نیک‌نژاد.

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد زیاد مکان‌های تکثیر شده در این آزمایش نشان می‌دهد که تعداد کمی از آغازگرهای ISSR با میزان اطلاعات چندشکل بالا، می‌تواند تعداد زیادی نمونه و جمعیت‌های مختلف گندم را تفکیک کند. چندشکلی بالا در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای نشانگر ISSR، پراکندگی جغرافیایی و تعداد ژنوتیپ مورد بررسی نسبت داد. این میزان چندشکلی از یک طرف نشان دهنده کارایی کاربرد این نشانگرها در مطالعه ژرم‌پلاسم گندم ایرانی و از طرف دیگر نشان دهنده توزیع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی وسیع این گیاه در ایران می‌باشد. همچنین می‌توان از این ارقام و لاین‌ها جهت معرفی ژن‌های جدید در داخل خزانه ژنی گندم استفاده کرد. در این پژوهش، ۱۲ آغازگر مورد استفاده ۱۷۰ مکان قابل ارزیابی تولید کردند که از این تعداد ۱۵۶ باند چندشکل ایجاد گردید. نتایج این پژوهش بیان کرد که یافتن مارکر ISSR مرتبط با ژن مقاومت به بلایت باکتریایی در گندم به اصلاح‌گران این گیاه کمک می‌نماید تا ژنوتیپ‌ها را با سرعت و کارایی بالا برای این ژن مورد غربالگری قرار دهند. همچنین این مارکر به تکمیل نقشه ژنتیکی گندم کمک می‌نماید و از میان آغازگرهای استفاده شده، آغازگرهای F_5 و F_{10} به دلیل نشان دادن He و PIC بالا مناسب‌ترین آغازگرها برای مطالعات بعدی تشخیص داده شدند.

منابع

۱- تقوی، س. م. و کشاورز، ک. ۱۳۸۱. شناسایی عامل سوختگی برگ گندم و واکنش ارقام مختلف گندم نسبت به آن‌ها در استان فارس و استان کهگیلویه و بویراحمد. علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی). ۶: ۱۷۹-۱۷۱.

۲- رحیمیان، ح. ۱۳۶۸. وقوع سوختگی برگ باکتریایی در گندم. نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، مشهد، ایران. ص ۱۴۶.

۳- شفیعی، ا.، ملکی زنجانی، ب.، کرمی، ث. و ایمانی خواه، ف. ۱۳۸۹. ردیابی ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای Lr_{32} در ارقام و لاین‌های گندم ایرانی با استفاده از آزمون تیپ آلودگی و نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن Lr_{32}. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی. ۷(۳): ۳۷-۲۱.

۴- صحراگرد، ن. ۱۳۷۹. مقاومت گندم به بلایت برگی باکتریایی. مجموعه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. صفحه ۲۴۳.

۵- صفری، ه.، شیروانی، ه. و فریدونی ل. ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های چچم دائمی (*Lolium prenne*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی و بیوشیمیایی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۰(۴): ۵۳۳-۵۲۳.

۶- عبدمیشانی، س. و شاه‌نجات بوشهری، ع. ا. ۱۳۷۷. اصلاح‌نباتات تکمیلی (جلد دوم). انتشارات دانشگاه تهران. ۳۵۲ صفحه.

۷- فتحی، ط.، سوهانی، م. م.، سمیع‌زاده لاهیجانی، ح. ا. و مهرابی، ع. ا. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های *Aegilops triuncialis* L. در مناطق غربی ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۵(۱): ۹۳-۸۵.

۸- فلاحی چرخابی، ن.، شمس‌بخش، م.، رحیمیان، ح.، خدایگان، پ. و رستگار، م. ح. ۱۳۹۴. تعیین ویژگی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae (Pss)* عامل بیماری بلایت باکتریایی گندم در استان کرمان و ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های ایرانی گندم نسبت به آن. آفات و بیماری‌های گیاهی، ۸۳(۱): ۵۰-۳۹.

۹- قره‌یاضی، ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح‌نباتات. مجموعه مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح‌نباتات. اصفهان. صفحات ۳۲۸-۳۳۰.

۱۰- کیا، ش. و ترابی، م. ۱۳۸۷. تاثیر آلودگی به سپتوریوز برگ (*Septoria tritici* Rob. Ex Desm.) در مراحل مختلف رشد بر عملکرد و اجزای عملکرد ارقام گندم در گرگان. به نژادی نهال و بذر. ۲۴(۲): ۲۳۷-۲۵۰.

۱۱- مسعودی، ح.، صبوری، ح.، طلیعی، ف. و آلت‌جعفر بای، ج. ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط برای صفات مورفوفنولوژیک و مقاومت به بیماری سفیدک پودری در ژرم‌پلاسم گندم با استفاده از نشانگرهای ISSR، IRAP، iPBS. زیست‌فناوری گیاهان زراعی. ۷(۱۸): ۵۶-۴۱.

www.SID.ir

Archive of SID

۱۲- نظری، م. و عبدالشاهی، ر. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان (*Triticum aestivum* L.) از طریق صفات مورفوفیزیولوژیک و نشانگر مولکولی SSR. بیوتکنولوژی کشاورزی. ۶(۱): ۲۱۵-۲۳۱.

۱۳- نقوی، م. ر.، قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. ۱۳۹۲. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۸ صفحه.

14- Carvalho, A., Lima Brito, J., Macas, B. and Guedes-Pinto, H. (2009). Genetic diversity and variation among botanical varieties of old Portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. Biochemistry Genetics, 47: 276-294.

15- FAO. 2009. Statistical database. Available online: Http//www. FAO.org.

16- Greenbaum, G., Templeton, A. R., Zarmi, Y. and Bar-David, S. 2014. Allelic Richness following Population Founding Events – A Stochastic Modeling Framework Incorporating Gene Flow and Genetic Drift. PLOS ONE, 1-23.

17- Haji Allahverdipoor, K., Bahramnejad, B. and Amini, J. 2011. Selection of Molecular markers associated with resistance to Fusarium wilt disease in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using multivariate statistical techniques. Australian Journal of crop science, 5(13): 1801- 1809.

18- Li, Q., Liu, Q.C., Zhai, H., Ma, D.F., Wang, X., Li, X.Q. and Wang, Y.P. 2008. Genetic diversity in main parents of sweet potato in china as revealed by ISSR Markers. Acta Agronomica Sinicia, 34 (6): 972-977.

19- Mengoni, A., Gori, A. and Bazzicalupo, M. 2000. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, Medicago sativa. Plant Breeding, 119: 113-117.

20- Milus, E. A. and Chalkley, D. B. 1994.Virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* on selected wheat genotypes. Plant Disease, 78: 612-615.

21- Mirzaei, K. and Mirzaghaderi, G. 2015. Genetic diversity analysis of Iranian *Nigella sativa* L. Iandraces using SCoT markers and evaluation of adjusted polymorphism information content. Plant Genetic Resources, 15(1): 64-71.

22- Niknejad Kazempour, M., Kheyrgoo, M., Pedramfar, H. and Rahimian, H. 2010. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. African Journal of Biotechnology, 9: 2860-2865.

23- Toben, H., Mavridis, A. and Rudolph, K. 1991. Zum Vorkommen der basalen Spelzenfäule and Weizen und Gerste, hervorgerufen durch *Pseudomonas syringae* pv. atrofaciens, in West-Deutschland. Zeitschrift für P flanzenkrankheiten und P flanzenschutz. 98: 225–235.

24- Valencia Botin, A. J., Mendoza Onofre L. E., Silva Rojas, H. V., Valadez Moctezuma, E., Cordova Tellez, L. and Villase Nor Mir, H. E. 2011. Effect of *Pseudomonas syringae* subsp. *syringaeon* yield and biomass distribution in wheat. Spanish Journal of Agricultural Research, 9: 1287–1297.

25- Valencia Botin, A. J., Mendoza Onofre, L. E., Silva Rojas, H. V., Cordova, L., EspinosaVictoria, D., Valadez Moctezuma, E. and Villasenor Mir, H. E. 2007. Aggressiveness estimates and inoculation methods of pathogenic bacteria on seeds and seedlings of wheat 'Seri M82'. Revista Fitotecnia Mexicana, 30 (3): 255–259.

26- Younis, R. A. A., Ismaeil O. M. and S.Soliman, S. 2008. Identification of Sex- specific DNA Markers for Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Using RAPD and ISSR Techniques. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4: 278-284.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of genetic diversity of wheat bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*) using ISSR molecule marker in Iranian native wheat cultivars

FatemiFard S.Z., Masoumiasl A. and Rezaei R.

Dept. of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Yasuj, Yasuj, I.R. of Iran

Abstract

Bread wheat is the most important crop in the world whose yield is affected by several diseases including bacterial leaf blight. The most appropriate method for managing this disease is using resistant cultivars. DNA markers are highly effective in plant grouping in terms of resistance to diseases, and among these markers, the ISSR marker is recommended because of the do not need for prior information from the DNA sequencing and its easy and fast implementation. In this research, genetic variation of 27 Iranian indigenous wheat cultivars with respect to resistance to bacterial blight was investigated using 12 ISSR primers, which produced 170 evaluable bands, of which 156 were polymorphic bands. The highest percentage of polymorphic bands was belonged to F7, F8 and F10 primers, and the lowest of it was related to F9 primer. The highest content of the polymorphism information content (PIC) was belonged to the F10 and F5 primers and the smallest value belonged to the F7 primer. Cluster analysis classified these cultivars into four groups: Ghods, Omid and Atrak cultivars in the cluster of resistant group and other cultivars in sensitive and very sensitive group. The high polymorphism obtained in this study can be attributed to the high efficiency of the ISSR marker in evaluating the genetic diversity of wheat cultivars in terms of resistance to various diseases.

Key words: genotype, cluster analysis, polymorphism, molecular marker

www.SID.ir