



بررسی مولکولی تنوع ژنتیکی در لاین‌های دابل هاپلوئید گندم نان با استفاده از نشانگرهای SSR

مهدی زرگانی^۱، غلامعلی رنجبر^۲ و شاهپور ابراهیم‌نژاد^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(نویسنده مسؤل: dreamymehdi@yahoo.com)

۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی مازندران (قراخیل)

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۳

چکیده

گندم با نام علمی (*Triticum aestivum* L.) گیاهی یک‌ساله و خودگشن، از خانواده گندمیان و دارای سه گروه ۱۴، ۲۸ و ۴۲ کروموزومی با فرمول ژنومی AA، AABB، AABBDD می‌باشد که کروموزوم‌ها در سه ژنوم همیولوگ A، B و D قرار گرفته‌اند. ژنوم گندم بسیار بزرگ، شامل 1.6×10^9 جفت باز بوده و دارای حدود ۸۰ درصد DNA تکراری با متوسط ۸۱۰ مگا جفت باز در هر کروموزوم با طول ۱۰ میکرومتر است. گندم به‌عنوان مهم‌ترین گیاه زراعی در جهان و ایران و از جمله محصولات اساسی و استراتژیک است. این گیاه که نقش و اهمیت زیادی از جنبه‌های مختلف، هم در تولید و هم مصرف دارد و دارای ژنوتیپ‌های زیادی است که لازمه استفاده کارآمد و صحیح از آنها، شناسایی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و تعیین سطوح تنوع می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین فاصله ژنتیکی بین تعداد ۹۱ لاین دابل هاپلوئید موجود به همراه دو والد آنها با استفاده از نشانگرهای SSR (میکروساتلایت یا ریزماهوره) و ارزیابی توانایی ریزماهوره در تشخیص محتوای چندشکلی بر اساس تفاوت‌های موجود در ژرم پلاسما آنها می‌باشد. بر این اساس، تعداد آلل‌های چندشکل از ۲ تا ۸ با میانگین ۵/۶ متغیر بود و آغازگر *Xgwm186* با ۶ آلل بیشترین مقدار چندشکلی (۰/۸۷) و آغازگر *Xgwm46* با ۲ آلل کمترین مقدار چندشکلی (۰/۱۲) را نشان دادند. علاوه تعداد کل باندهای محاسبه شده توسط ۱۱ جفت آغازگر SSR برابر ۳۹ باند بود. تنوع و روابط ژنتیکی نمونه‌ها توسط روش‌های آماری نی و لی و UPGMA بررسی شد و هرکدام از لاین‌های مورد بررسی در گروه‌های مشترک طبقه‌بندی شدند.

واژه‌های کلیدی: گندم نان، نشانگرهای SSR، چندشکلی، تنوع ژنتیکی

مقدمه

گروه‌بندی ذخایر ژنتیکی گندم، از نشانگرهای مختلف مورفولوژیکی، پروتئینی و DNA استفاده شده است (۲۱، ۱۵، ۹، ۲). نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی به خاطر میزان چند شکلی کمتر نسبت به نشانگرهای DNA کاربرد کمتری در طبقه‌بندی گیاهی دارند (۱۱). در حالی که نشانگرهای DNA معمولاً علاوه بر نواحی کدکننده، تفاوت‌های بین ردیف‌های غیرکدکننده و توالی‌های حاشیه‌ای ژنوم را نیز آشکار می‌سازند. از طرف دیگر نشانگرهای DNA مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، تسهیلاتی را در مطالعات پایه‌ای و کاربردی بیولوژی مولکولی فراهم کرده‌اند (۲۰). ریزماهوره‌ها، توالی‌های تکراری ۶-۲ نوکلئوتیدی هستند که در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها و عمدتاً در نواحی غیرکدکننده DNA پراکنده‌اند (۲۸، ۱۴). این جایگاه‌ها از تنوع آلی بسیار بالا برخوردار هستند و دارای توارث مندلی هم بارز می‌باشند (۲۰). همچنین سطح بسیار بالای چند شکلی را در تعداد توالی تکرارشونده دارند (۱۳، ۲۱). نشانگر مولکولی ریزماهوره بر پایه تکثیر قطعه DNA تکرارشونده، با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از نواحی احاطه‌کننده توالی‌های تکراری می‌باشد (۱۳) و نتایج مربوط به آن در

آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد میزان آن در ژرم‌پلاسماهای گیاهی و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات می‌باشد (۷). تولید گیاهان دابل هاپلوئید (DH) در بیوتکنولوژی گیاهی بسیار ارزشمند است چرا که به‌نژادگران را قادر می‌سازد که به‌طور مستقیم لاین‌ها یا گیاهان صد در صد هموزیگوت از افراد هیبرید بدست آورند (۳). مزیت اصلی استفاده از لاین‌های اصلاحی دابل هاپلوئید، کاهش زمان مورد نیاز برای رسیدن به هموزیگوسیتی، کاهش هزینه‌های اصلاحی و کاهش عملیات سخت و طاقت‌فرسای یادداشت‌برداری و نگهداری لاین‌ها است. لاین‌های اصلاحی واقعی را می‌توان به جای اینکه در چند سال تلاقی برگشتی یا خودگشتی بدست آورد در یک نسل تولید نمود. بدلیل هموزیگوسیتی و خلوص بالا، گندم دابل هاپلوئید می‌تواند به‌عنوان یک رقم گندم نان و همچنین به‌عنوان ماده ژنتیکی اولیه در تولید هیبرید مورد استفاده واقع شود. بنابراین، درک تنوع ژنتیکی لاین‌های دابل هاپلوئید گندم بر اساس پلی مورفیسم DNA مهم است. در برنامه‌های اصلاحی و

تعدادی بذر در گلخان در گلخانه دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری کشت گردید. بعد از رسیدن گیاه به مرحله ۵ الی ۶ برگ (۳۳) نمونه های برگی از بافت های تازه گیاه در تیوب ۲ میلی استریل دارای ساچمه گرفته شده سپس درون ازت مایع به فریزر ۲۰- و در نهایت به فریزر ۸۰- منتقل شدند. بعد از آن برای استخراج DNA نمونه ها توسط دستگاه TissueLyser II در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان به صورت پودر در آمده و در ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج DNA: DNA لاین ها طبق روش سقائی معروف و همکاران با اندکی تغییرات استخراج گردید (۲۷). کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و کمیت آنها توسط روش اسپکتوفتومتری اندازه گیری شد و DNA همه نمونه ها به غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر برای واکنش های PCR رقیق گردیده و در فریزر ۲۰- نگهداری شدند.

نشانه های مورد استفاده: پلاشک و همکاران (۱۹) بیان داشتند که تعداد کمی نشانگر هم برای تمایز ژنوتیپ های نزدیک گندم و انجام مطالعات فیلوژنتیک کافی است. لذا از میان آغازگرهای ریزماهوره گندم که توسط رادر و همکاران (۲۴) گزارش شده و در پایگاه داده GrainGenes وجود دارند تعداد ۱۱ جفت آغازگر مناسب برای این تحقیق انتخاب و از شرکت سیناکلون تهیه گردیدند.

واکنش زنجیره پلی مرز: واکنش زنجیره پلی مرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر TECHNE TC-512 انجام شد. شرایط معمول انجام واکنش PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتری بر اساس روش رادر و همکاران (۲۴) با کمی تغییر در جدول ۱ و جدول ۲ آمده است.

آزمایشگاه های مختلف قابل تکرار است (۱۳). ریزماهوره اولین بار در جلبک (۳۰) و سویا (۲) مورد بررسی قرار گرفتند و سپس بطور گسترده ای در برنج (۳۱)، ذرت (۲۸)، جو (۲۶)، و جهت تهیه نقشه ژنتیکی در گندم (۲۴،۴،۲۳)، و در بررسی چندشکلی (۹) و نقشه یابی صفات مهم زراعی (۹،۲۹) بکار برده شدند. تاکنون مطالعات زیادی در مورد بررسی تنوع مولکولی ارقام و ژنوتیپ های مختلف گندم به کمک نشانگرهای ریزماهوره صورت گرفته است. ماکافری و همکاران (۱۶) ۵۸ ژنوتیپ گندم دوروم را با استفاده از ۷۰ جایگاه ریزماهوره مورد بررسی قرار دادند و تعداد آلل را از ۲ تا ۱۲ با میانگین ۵/۶ برای هر جایگاه گزارش نمودند. آنها همچنین محتوای اطلاعات چندشکلی را از ۰/۷ تا ۰/۸ گزارش کردند. پلاشک و همکاران (۱۹)، ۴۰ رقم گندم نان اروپایی را با استفاده از ۲۳ آغازگر ریزماهوره مورد مقایسه قرار دادند و میانگین تعداد آلل را از ۵/۲ تا ۶/۲ گزارش نمودند. پستسو و همکاران (۱۸)، ۱۱۳ جمعیت گندم تائوشی را با استفاده از ۱۸ آغازگر ریزماهوره مورد مقایسه قرار دادند و در مجموع با شناسایی ۳۳۸ آلل آنها را در ۲ گروه مختلف قرار دادند. هدف از این تحقیق بررسی چندشکلی و تعیین فاصله ژنتیکی بین تعدادی از لاین های دابل هاپلوئید گندم نان و ارزیابی توانایی ریزماهوره در تشخیص محتوای چندشکلی لاین ها می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی شامل ۹۱ لاین دابل هاپلوئید گندم نان به همراه والدین آنها بوده است. این لاین ها از تلاقی بین گونه ای هیبریدهای F1 حاصل از تلاقی ارقام ترایدنت و مولینکس با ذرت حاصل شده اند (۲۲). از این جمعیت در آبان ماه سال ۹۲ برای هر لاین

جدول ۱- ترکیب مواد واکنش PCR برای نشانه های SSR

اجزای واکنش	غلظت پایه	غلظت نهایی	۱ واکنش (میکرولیتر)
آب مقطر			۸/۹
بافر PCR	۱۰X	۱X	۱/۲۵
MgCl ₂	۵۰ mM	۱/۶ mM	۰/۴
dNTPs	۱۰ mM	۲۰۰ μM	۰/۲۵
پرایمر Forward	۱۰ μM	۰/۲ μM	۰/۲۵
پرایمر Reverse	۱۰ μM	۰/۲ μM	۰/۲۵
Taq polymerase	۵U/μM	۱U	۰/۲
DNA الگو	۵۰ ng/μl	۵۰ ng/μl	۱
مجموع			۱۲/۵

جدول ۲- چرخه دمایی PCR در نشانگرهای SSR

مرحله	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۴	۴ دقیقه	۱
واسرشت	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال	۶۳ و ۵۵	۳۰ ثانیه	
بسط	۷۲	۳۰ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱
نگهداری	۴		

استفاده از فرمول $PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$ (Pj) فراوانی آلل زام در تمامی ژنوتیپ‌ها) محاسبه گردید. سنپور و همکاران (۲۸) عنوان کردند که همان PIC همان DI می‌باشد. همچنین تجزیه خوشه‌ای با ترسیم دندروگرام براساس الگوریتم UPGMA^۳ و با نرم افزار NTSYS pc V.2/02e (۲۵) انجام گردید.

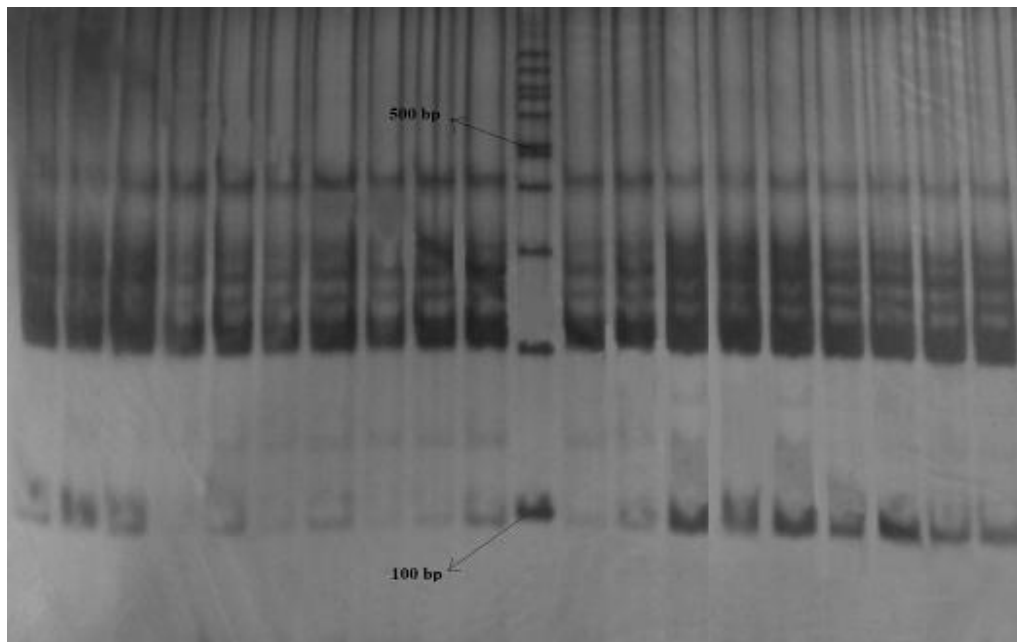
نتایج و بحث

چند شکلی در جایگاه‌های ریزماهواره

از ۱۱ جفت آغازگر مورد استفاده، تعداد ۹ جفت آغازگر چند شکلی مناسب از خود نشان دادند (شکل ۱). دو تا از آغازگرها هیچ‌گونه باندی نشان ندادند که آنها را حذف کرده و ادامه کار با همان تعداد ۹ آغازگر انجام گرفت. در مجموع ۳۹ آلل شناسایی شد که آغازگر Xgwm46 با ۲ آلل کمترین تعداد و آغازگر Xgwm190 با ۸ آلل بیشترین تعداد را در میان آلل‌های تولیدی توسط هر آغازگر داشتند. میانگین تعداد آلل در کل جایگاه‌ها برابر با ۵/۶ بود. هوکانسون و همکاران (۱۴) برای ریزماهواره گندم میانگین آللی ۳/۸ تا ۶/۲، پلاشک و همکاران (۱۹) و همچنین استاکل و همکاران (۲۹) میانگین ۵/۲ تا ۶/۲ و یوجایل و همکاران (۸) میانگین آللی ۵/۵ را گزارش نمودند. شکل ۱ نمونه‌ای از الگوی نواری ایجاد شده توسط آغازگر Xgwm190 و همچنین جدول ۳ تعداد آلل، دامنه اندازه و میانگین تعداد آلل در هر گیاه، موتیف، جایگاه هر آغازگر روی کروموزوم، شاخص چند شکلی و دمای اتصال را نشان داده است.

بعد از پایان واکنش، جهت اطمینان از تکثیر آغازگرها به‌منظور تفکیک در ژل پلی‌اکریل‌آمید، محصولات PCR روی ژل آغاز ۱ درصد با بافر TBE(1x) با ولتاژ ۹۰ به مدت ۷۵ دقیقه الکتروفورز شدند و برای مشاهده الگوی نواریندی طبق روش رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید عمل شد. محصولات PCR سپس به‌منظور تفکیک آللی قبل از بارگذاری، واسرشته شد. برای این منظور مقدار ۳-۵ میکرولیتر از بافر بارگذاری حاوی فرمامید به ۱۲/۵ میکرولیتر محصول PCR اضافه شد. همچنین نشانگر وزنی استاندارد نیز که به آن بافر بارگذاری حاوی فرمامید اضافه شده بود همراه دیگر نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر قرار داده و بلافاصله روی یخ منتقل شد. سپس مقدار ۳-۵ میکرولیتر از هر کدام از محصولات برای بارگذاری روی ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز ۸ درصد مورد استفاده قرار گرفت. عمل پیش ران با توان ثابت ۹۰ وات و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد (زمان تا رسیدن به دمای ۵۵) و عمل الکتروفورز با توان ثابت ۸۵ تا ۹۰ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با مدت زمانی خاص بسته به طول قطعه تکثیر شده توسط هر آغازگر انجام گردید و رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از روش نیتراز نقره بر اساس دستور کار شرکت پرومگا (Promega) با کمی تغییر انجام شد (۳۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: نمره‌دهی باندها به‌صورت حضور(یک) و عدم حضور(صفر) هر باند صورت گرفت (۱). ماتریس تشابه با استفاده از ضریب نی و لی محاسبه گردید (۱۷). شاخص چندشکلی DI^۱ (۱۱،۱) یا محتوای اطلاعات چندشکلی PIC^۲ (۴،۱) برای هر جایگاه ریزماهواره با



شکل ۱- نمونه‌ای از الگوی باندهای پرایمر Xgwm190

جدول ۳- نام، مکان، موتیف، اندازه آلل تولیدی، دمای اتصال هر آغازگر، تعداد آلل و شاخص چندشکلی

نام جایگاه	مکان	موتیف	تعداد آلل	اندازه آلل تولیدی	PIC	دمای اتصال (°C)
Xgwm160	4A	(GA)21	۴	۱۸۴-۱۹۶	۰/۴۱	۶۰
Xgwm186	5A	(GA)26	۶	۱۰۶-۱۳۲	۰/۸۷	۶۰
Xgwm459	6A	(GA)>28	۴	۱۱۸-۱۲۶	۰/۷	۵۵
Xtaglgap	1B	(CAA)31	۳	۲۰۰-۲۸۲	۰/۶۱	۶۳
Xgwm501	2B	(CA)33	۴	۱۶۶-۱۷۶	۰/۴۸	۶۰
Xgwm46	7B	(GA)2GC(GA)33	۲	۱۷۹-۱۸۷	۰/۱۲	۶۰
Xgwm337	1D	(CT)5(CACT)6(CA)43	۳	۱۸۲-۱۹۱	۰/۲۳	۵۵
Xgwm190	5D	(CT)22	۸	۱۰۰-۵۰۰	۰/۵۵	۶۰
Xgwm192	4A,4B,4D	(CT)46	۴	۱۳۵-۱۸۹	۰/۵۷	۶۰

توسط بریان و همکاران (۴)، ۰/۵۱ و توسط ماکفری و همکاران (۱۶)، ۰/۵۶ گزارش شده است. همچنین رادر و همکاران (۲۳) محتوای چندشکلی را در گندم نان از ۰/۲۳ تا ۰/۷۵ و پلاشک و همکاران (۱۹) این مقدار را از ۰/۲۹ تا ۰/۷۹ گزارش نموده‌اند. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که محتوای چندشکلی عدد ثابتی نداشته و بستگی به عواملی نظیر تعداد آلل، محتوای (Gt)n در نواحی تکرارشونده و تکرارهای دی‌نوکلئوتیدی دارد، بطوریکه در جایگاه‌های با تکرارهای دو نوکلئوتیدی چندشکلی بیشتری نسبت به جایگاه‌های با سه و چهار نوکلئوتیدی ایجاد می‌گردد (۳۱،۱۶). البته تعداد ژنوتیپ و تعداد آغازگر ریزماهوره هم همبستگی مثبتی با محتوای چندشکلی دارند (۲۱) بطوریکه رادر و همکاران (۲۳) میانگین محتوای چندشکلی را در تحقیقی با ۱۸ ژنوتیپ و ۱۵ آغازگر در گندم ۰/۵۳ و زمانیکه تعداد ژنوتیپ‌ها به عدد ۶ رسید مقدار ۰/۶۴ گزارش نمودند.

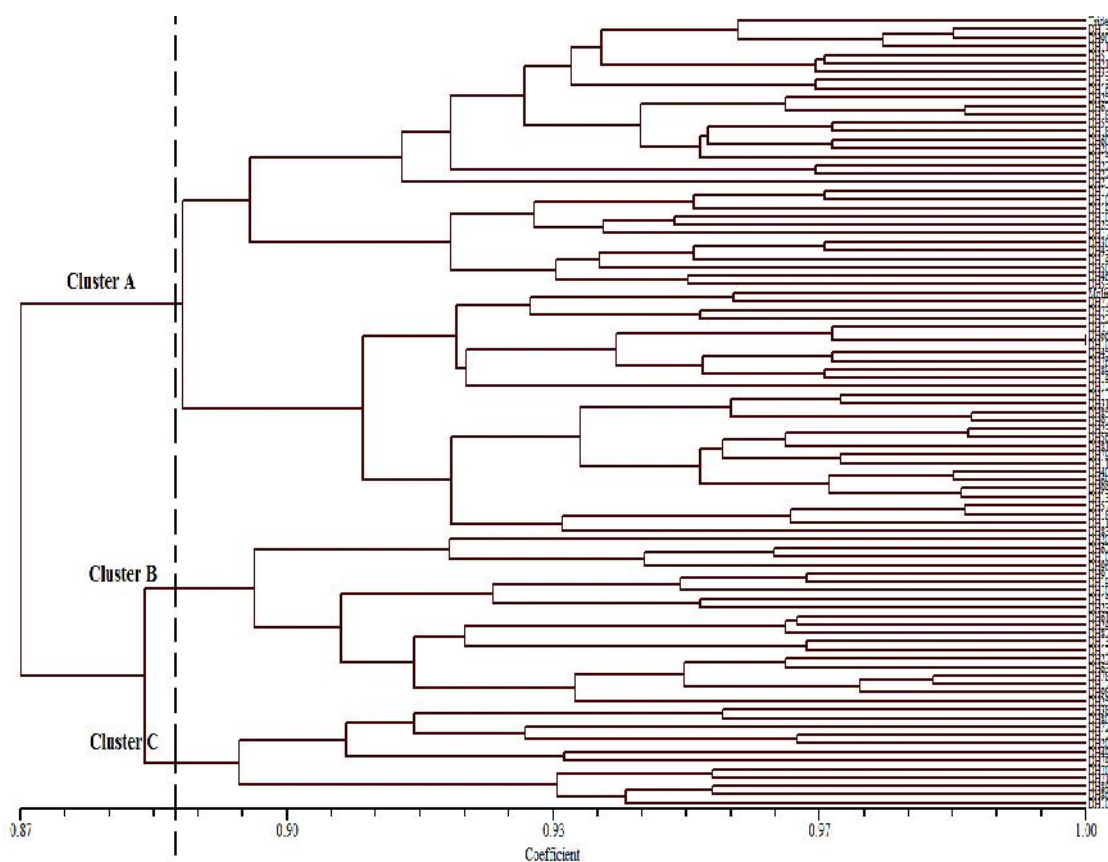
شاخص چندشکلی

شاخص چندشکلی برای هر جایگاه در تمامی لاین‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین شاخص چندشکلی (محتوای اطلاعات چندشکلی) با مقدار ۰/۸۷ مربوط به آغازگر Xgwm186 و کمترین مقدار با ۰/۱۲ مربوط به آغازگر Xgwm46 بود و میانگین شاخص چندشکلی ۰/۵ بدست آمد (جدول ۳). شاخص چندشکلی (DI) یا محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) به‌عنوان تخمینی از قدرت تمایز هر ریزماهوره با در نظر گرفتن تعداد و فراوانی نسبی آلل‌ها می‌باشد (۱). بنابراین اگر چه برخی از ریزماهوره‌ها دارای تعداد آلل مشابه می‌باشند، ولی به واسطه اینکه فراوانی این آلل‌ها متفاوت است، شاخص چندشکلی مختلفی را نشان داده‌اند (۱۰،۵). تفاوت در فراوانی آلل‌ها می‌تواند به‌عنوان یک معیار با ارزش برای هر ریزماهوره در ژنتیک جمعیت در نظر گرفته شود. میانگین شاخص چندشکلی جایگاه‌های ریزماهوره در گندم

همکاران (۲۱) میانگین $0/۲۳$ را گزارش نمودند. تعداد کل باندهای مشاهده شده (هر باند به منزله یک آلل) در کل ۹۳ نمونه موجود برابر با ۲۸۲۶ بود که لاین DH92 با ۳۶ آلل بیشترین و لاین‌های DH27 و DH62 با ۲۶ آلل کمترین تعداد آلل در گیاه را برای تمام جایگاه‌ها داشتند. به عبارت دیگر لاین DH92 با میانگین $۴/۵۴$ بیشترین و لاین‌های DH27 و DH62 با میانگین $۲/۹۷$ کمترین تعداد آلل در هر جایگاه برای هر گیاه را داشتند. تجزیه کلاستر لاین‌های مختلف گندم بر اساس شباهت ژنتیکی نی و لی محاسبه گردید و دندروگرام مربوطه ترسیم شد (شکل ۲).

ضریب تشابه

بیشترین میزان تشابه بر اساس ضریب نی و لی (۱۷) مربوط به تعدادی از لاین‌ها با رقمی معادل $0/۹۷$ و کمترین میزان تشابه معادل $0/۷۹$ و با میانگین ضریب تشابه $0/۸۹$ مشاهده گردید که این ضریب تشابه بالا حاکی از شباهت فراوان موجود بین مجموعه لاین‌های مورد بررسی می‌باشد. پلاشک و همکاران (۱۹) میانگین میزان تشابه برای ریزماهواره گندم را $0/۳۱$ گزارش دادند. بر اساس گزارشات موجود تا حدودی تحت تاثیر تعداد ژنوتیپ و تعداد آغازگر قرار دارد. مثلاً پراساد و



شکل ۲- تجزیه کلاستر لاین‌های گندم بر اساس ماتریس تشابه نی و لی و روش UPGMA

معنی‌داری با یکدیگر داشتند. با توجه به نحوه قرارگیری لاین‌ها در ۳ گروه مشاهده می‌شود که تعداد زیادی از لاین‌های دابل هاپلوئید مشابه والدین خود بوده و در یک گروه (Cluster A) طبقه‌بندی گردیدند (جدول ۴). در کل نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نشانگرهای میکروستلایت نشانگرهای بسیار مناسبی جهت تفکیک و شناسایی لاین‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف گندم می‌باشند. از این نشانگرها نه تنها در گروه‌بندی ارقام گندم بلکه در

نتایج تجزیه کلاستر نشان می‌دهد که برخی از لاین‌ها به واسطه داشتن شباهت بیشتر از نظر جایگاه ژنی ریزماهواره‌ها در یک گروه قرار گرفته‌اند، بطوریکه برخی لاین‌ها با دو والد خود در یک گروه وارد شدند و مجموعه‌ای از سایر لاین‌ها نیز وارد گروه‌های دیگری شدند. بر اساس دندروگرام حاصل و در نظر گرفتن خط برش در مقدار ضریب $0/۸۹$ این لاین‌ها در ۳ گروه مختلف طبقه بندی شدند که این ۳ گروه از نظر آماری اختلاف

می‌توان روند انتقال و جریان ژنی را از ارقام وحشی به ارقام زراعی بررسی نمود.

تشکر و قدردانی

از کارکنان آزمایشگاه سیتوژنتیک و پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان بابت همکاری‌های ارزشمندشان سپاسگزاری می‌شود.

شناسایی ژن‌های مختلف مقاومت به استرس‌های زنده و غیره زنده می‌توان استفاده نمود. از آنجائیکه تلاقی ارقامی که از نظر ژنتیکی دورتر می‌باشند می‌تواند جمعیت‌های با تنوع بیشتر را ایجاد نماید، نتایج این تحقیق می‌تواند در جهت برنامه‌ریزی اصلاحی به‌منظور ایجاد جمعیت‌های متنوع‌تر برای صفات و جایگاه‌های مختلف کروموزومی مدنظر قرار گیرد. از طرف دیگر با مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج ارزیابی این ریزماهورها روی ارقام وحشی

جدول ۴- گروه‌بندی لاین‌های گندم بر اساس ماتریس تشابه نی و لی و روش UPGMA

Cluster A	Trident, DH13, DH90, DH117, DH5, DH218, DH33, DH138, DH164, DH25, DH67, DH189, DH55, DH181, DH60, DH203, DH156, DH22, DH224, DH2, DH17, DH101, DH100, DH238, DH173, DH30, DH43, DH147, DH50, DH46, DH53, DH192, Molineux, DH77, DH73, DH222, DH7, DH66, DH109, DH45, DH76, DH89, DH145, DH124, DH1, DH31, DH85, DH92, DH23, DH56, DH81, DH79, DH114, DH40, DH69, DH94, DH132, DH57, DH185, DH111, DH83.
Cluster B	DH20, DH62, DH108, DH96, DH9, DH196, DH103, DH151, DH232, DH27, DH63, DH78, DH98, DH170, DH250, DH61, DH244, DH87, DH136, DH175.
Cluster C	DH70, DH71, DH84, DH86, DH102, DH38, DH80, DH72, DH126, DH207, DH49, DH74.

منابع

1. Agrama, H. and M.R. Tuinstra. 2003. Phylogenetic diversity and relationship among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *African Journal of Biotechnology*, 2(10): 334-340.
2. Akkaya, M.S., A.A. Bhagwat and P.B. Cregan. 1992. Length polymorphism of simple sequence repeats of DNA in soybean. *Genetics*, 132: 1131-1139.
3. Barakat, M.N., A.A. Al-Doss, A.A. Elshafei, K.A. Moustafa and E.I Ahmed. 2012. Anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes with HMW alleles. *Cereal Research Communications*, 40(4): 583-591.
4. Bryan, G.J., A.J. Collins, P. Stephanson, A. Orry, J.B. Smith and M.D. Gale. 1997. Isolation and characterization of microsatellite from hexaploid bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 557-563.
5. Christiansen, M.J., S.B. Anderson and R. Ornz. 2002. Diversity changes in an intensively bread wheat germplasm during the 20th century. *Molecular Breeding*. 9: 1-11.
6. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 19-21.
7. Donini, P., P. Stephenson, G.J. Bryan and R.M.D Kobner. 1998. The potential of microsatellites for high throughput genetic diversity assessment in wheat and barley. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45: 415-421.
8. Eujayl, I., M.E. Sorrells, M. Baum, P. Wolters and W. Powel. 2002. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 399-407.
9. Fahima, T., M. Roder, A. Grama and E. Nevo. 1998. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 187-195.
10. Gupta, P.K., R.K. Varshney, P.C. Sharma and R. Ramesh. 1999. Molecular markers and their application in wheat breeding. *Plant Breeding*. 118: 369-390.
11. Gupta, P.K., H.S. Balyan, K.J. Edwards, P. Isaac, V. Korzun, M. Roder, M.F. Gautier, A.R. Schlatter, J. Dubcovsky, R.C. Delapena, M. Khairallah, G. Penner, M.J. Hayden, P. Sharp, B. Keller, R.C.C. Wang, J.P. Hardouin, P. Jack and P. Leroy. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 413-422.
12. Zhou, H.F., Z.W. Xie and S. Ge. 2003. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of wild rice (*Oryza rufipogon* griff) in China. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 332-339.
13. Halton, T.A. 2001. Plant genotyping by analysis of microsatellite. In R. J. Henry(Ed). *Plant genotyping, The DNA fingerprinting of plant*. 15-29 pp.
14. Hokanson, S.C., A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* borkh core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 671-683.
15. Ma, Z.Q., M. Roder and M.E. Sorrellis. 1996. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetranucleotide microsatellites in wheat. *Genome*. 39:123-130.

16. Maccaferri, M., M.C. Sanguineti, P. Donini and R. Tuberosa. 2003. Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 783-797.
17. Nei, N. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269-5273.
18. Pestsov, E., V. Korzun, N.P. Goncharov, K. Hammer, M.W. Ganal and M.S. Roder. 2000. Microsatellite analysis of *Tauschii* germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 100-106.
19. Plaschke, J., M.W. Ganal and M.S. Roder. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 1001-1007.
20. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalsky. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
21. Prasad, M., R.K. Varsheny, J.K. Roy, H.S. Balyan and P.K. Gupta. 2000. The use of microsatellite for detection DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 584-592.
22. Ranjbar, G.A., G.J. Hollamby, K.W. Shepherd and A.K.R.F. Islam. 1996. Comparison of different source of pollen for F1 wheat haploid production via intergeneric hybridization system. *Proceedings of the 6th Wheat Breeding Conference*, 179-182 pp., Australia.
23. Röder, M.S., J. Plaschke, S.U. König, A. Börner, M.E. Sorrells, S.D. Tanksley and M. W. Ganal. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 246: 327-333.
24. Röder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy and M.W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149: 2007-2023.
25. Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Setauket, New York: Exeter Publishing Ltd.
26. Saghai Maroof, M.A., R.M. Blyashev, G.P. Yang, Q. Zhang and R.M. Allera. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 5466-5470.
27. Saghai-Maroof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 8014-8018.
28. Senior, M.L. and M. Heun. 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT Primer Genome. 36: 884-889.
29. Stachel, M., T. Lelley, H. Grausgruber and J. Vollmann. 2000. Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 242-248.
30. Tautz, D. and M. Renz. 1984. Simple sequence is ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12: 4127-4137.
31. Wu, K.S. and S.D. Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 241: 225-235.
32. www.omega.com, Silver Sequence™ DNA Sequencing System Instructions for USA of Products Q4130 and Q4131.
33. Zar, M., J. Ahmadi, G.A. Gerosi and A.H. Beyki. 2011. Evaluation of genetic diversity in some of tolerant and susceptible varieties of bread wheat using ISSR markers. *Journal of modern genetic*, 5(4): 69-76. (In Persian)

Molecular assessment of genetic diversity among bread wheat (*Triticum aestivum* L.) doubled haploid lines using SSR markers

Mehdi Zergani¹, Gholamali Ranjbar² and Shahpour Ebrahimnezhad³

1- M.Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: dreamymehdi@yahoo.com)

2- Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

3- Assistant Professor, Agricultural Research Center, Mazandaran, Sari, Iran

Received: October 11, 2014

Accepted: November 24, 2014

Abstract

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the Poaceae family, an annual and self-pollinated crop which has three groups of 14, 28 and 42 chromosomes with genome formula AA, AABB, AABBDD that the chromosomes are located in three homeologous genomes A, B and D. Wheat has an extremely large genome of 16×10^9 base pairs with more than 80% repetitive DNA and an average of 810 mega base pairs in each chromosome with 10 μ m length. Wheat is the most important crop in universe and in Iran, known as strategic and basic commodities. This crop plays an important role in both aspects of production and consumption with a lot of genotypes that requires efficient and accurate means of identifying their relationships and determining their genetic diversity levels. Present study aims to determine the genetic diversity and genetic distances of 91 doubled haploid lines of wheat and their parents using SSR markers and assess the ability of microsatellite markers for detecting polymorphisms based on the variants among their germplasm. Results showed that the number of alleles per locus ranged from 2 to 8 and the allelic value of polymorphism information content (PIC) ranged from 0.12 for *Xgwm46* to 0.87 for *Xgwm186* with an average of 0.5. A total of 39 alleles were detected. Diversity and genetic relationships of the samples were analyzed using Nei and Li and UPGMA statistical methods and the studied lines were classified into three common groups.

Keywords: *Triticum aestivum*, SSR Marker, Polymorphism, Genetic diversity