مطالعه تنوع ژنتیکی در ارقام مختلف گندم با استفاده از نشانگرهای میکروستلایت *DNA* در شرایط تنش خشکی

علیرضا اصغری میرک۱*سیدیعقوب سیدمعصومی۲ محمدرضا بی همتا ۳

۱ - عضو هیئت علمی دانشگاه پیام نور مشگین شهر

۲ - مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (مغان)

۳- عضو هیئت علمی دانشگاه تهران

alirezapnu8475@gmail.com

چکیده

به منظور بررسی چند شکلی ، تعیین فاصله ژنتیکی و شناسایی ژنهای مختلف مقاومت به تنش خشکی تعداد ۱۱ رقم گندم با استفاده از مارکرهای میکروستلایت مورد بررسی قرار گرفتند.محتوای چند شکلی (*PIC*) هر آغازگر میکروستلایتی برای تمام ارقام محاسبه گردید که بیشترین میزان چند شکلی با مقدار ۰/۸۹ مربوط به آغازگر *XGWM295-7D* و کمترین میزان چند شکلی مربوط به آغازگر *XGWM608-4D* با مقدار ۰/۵ بود. تعداد کل باند های مشاهده شده(هر باند به منزله یک آلل) در ۱۱ ژنوتیپ برابر با ۱۹۸ بود که رقم هیرمند با ۲۵ آلل بیشترین و رقم بولانی و هامون با ۱۰ آلل کمترین تعداد آلل را به ازای هر ژنوتیپ در تمام جایگاهها داشتند. به عبارت دیگر رقم هیرمند با میانگین ٤/١٦ بیشترین و رقم بولانی و هامون با میانگین ١/٦٦ کمترین تعداد آلل در هر جایگاه به ازای هر ژنوتیپ را دارا بودند. با محاسبه ضریب تشابه ژنتیکی در بین ۱۱ ژنوتیپ مورد استفاده با استفاده از فرمول جاکارد و فرمول نی و لی بیشترین میزان تشابه با استفاده از ضریب جاکارد بین کلک افغان و استار(۰/۸۲) و کمترین میزان تشابه بین ارقام هامون و *V.8187/Arvand-1* به مقدار (۰/۰۸) بدست آمد. همچنین با استفاده از ضریب نی و لی نیز بیشترین میزان تشابه مربوط به ارقام کلک افغان و استار(۰/۹۰) و کمترین میزان تشابه مربوط به ژنوتیپ های هامون و *V.8187/Arvand-1* به میزان(۰/۱۵) بود. در مجموع ، میانگین (۰/٤٨) برای ضریب جاکارد و (۰/٦٢) برای ضریب نی و لی محاسبه گردید..به منظور ترسیم دندوگرام برای تجریه کلاستر، ضریب همبستگی کوفنتیک در الگوریتم مختلف محاسبه گردید.که روش *UPGMA* و ضریب جاکارد که بالاترین ضریب کوفنتیک را دارا بودند (r=./٨٥٦) جهت ترسیم دندروگرام تعیین گردیدند.که بر این اساس ارقام در ٤ گروه قرار گرفتند.

واژه های کلیدی: ارقام گندم، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای میکروستلایت،*DNA*

مقدمه و بررسی منابع:

درسالهای اخیر بیولوژی مولکولی ابزار مناسبی را برای تجزیه ژنتیکی موجودات عالی از جمله گیاهان زراعی فراهم آورده است وشاید اساسی ترین ابزارها، نشانگرهای *DNA* هستند که به سادگی اختلاف در اطلاعات ژنتیکی حمل شده توسط فرد یا افراد را مشخص می سازد (۳) .از وسیع ترین کاربرد آنها ، مطالعه تنوع ژنتیکی وسازماندهی جمعیت ها وگونه می باشد. در مقایسه با نشانگرهای دیگر تجزیه تنوع ژنتیکی مانند ایزوزآیم ها وصفات مورفولوژیکی، نشانگرهای *DNA*، حساس، تکرار پذیر و سریعتر می باشند(۱).

رادر و همکاران (*Roder., 1999*) ۷۰ اینبرد لاین بدست آمده از گندم *Chinese spring* برای کشف میکروساتلیت مورد بررسی قرار دادند و در مجموع ۱۳۸۰ کلون بدست آوردند که بعد از توالی یابی کلونها، برای ۷۲۰ کلون پرایمر طراحی

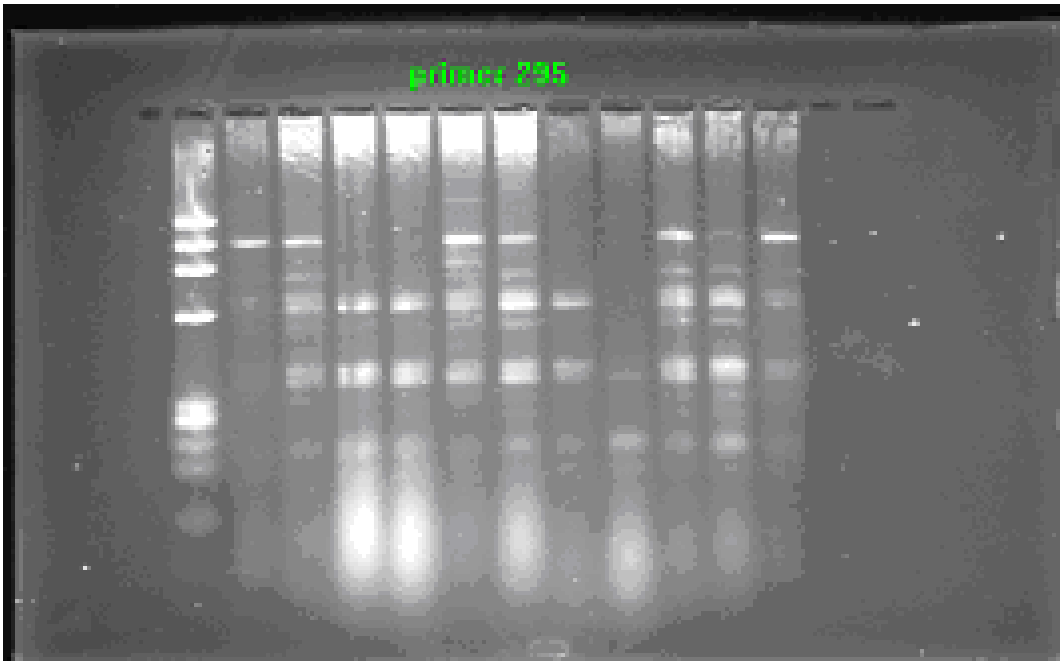
کردند و نهایتا ۲۷۹ لوکوس میکروساتلیت(۹۳ لوکوس متعلق به ژنوم A ، ۱۱۷ لوکوس متعلق به ژنوم B و ۷۱ لوکوس متعلق به ژنوم D) که مربوط به ۲۳۰ آغازگر بودند تکثیر و کشف شدند. در کل بایستی بیش از ۸۰٪ آغازگرهای طراحی شده اختصاصی و تک مکانی و فقط یک لوکوس در هر سه گروه قابل تکثیر بود(۱۶).مانیفستو و همکاران با استفاده از نشانگرهای مولکولی میکروستلایت و *AFLP*(*Amplified Fragment Length Polymorphism*) به بررسی چند شکلی و شناسایی ژرم پلاسمهای مختلف گندم پرداختند. در این تحقیق از ۱۰۵ رقم گندم نان که از سالهای ۱۹۳۲ تا ۱۹۹۵ بصورت مقطعی جمع آوری شده بودند، بوسیله دو نشانگر میکروساتلیت و AFLP شناسایی و مورد ارزیابی قرار گرفتند. زیرا عنوان کرده اند که کاهش چند شکلی ممکن است باعث کاهش توانایی ژرم پلاسم در مقابل آفات، بیماریها، شرایط محیطی و.... بشود و به همین دلیل ژرم پلاسم ها را در دهه های مختلف جمع آوری و میزان چند شکلی بدست آمده در مقطع های مختلف را مورد بررسی قرار دادند تا کاهش تنوع را مورد بررسی قرار دهند. از ده آغازگر میکروستلایت که دارای محتوای چند شکلی بسیار بالایی بودند برای این تحقیق استفاده کردند و سپس اطلاعات میکروستلایت را با استفاده از نشانگر *AFLP* مورد تایید قرار دادند. آنها بین ژرم پلاسمها تا قبل از ۱۹۶۰ هیچ اختلاف معنی داری پیدا نکردند. اختلاف معنی داری بین ژرم پلاسمها در دهه ۱۹۶۰ پیدا نشد و متوسط چند شکلی بدست آمده دراین دهه دقیقا برابر با متوسط چند شکلی بدست آمده در چهار دهه قبلی (۱۹۶۰،۱۹۵۰،۱۹۴۰،۱۹۳۰) بود و همین مقدار توسط نشانگر *AFLP* مورد بررسی و تایید قرار دادند. اما بین ژرم پلاسمها در سطح یک درصد در دو دهه ۱۹۷۰(با متوسط محتوای چند شکلی ۰/۲۸) و ۱۹۸۰(با متوسط محتوای چند شکلی ۰/۳۴) اختلاف معنی داری پیدا شد. نتیجه گرفتند که ژرم پلاسمهای گندم نان در طول حدود نیم قرن محتوای چند شکلی خود را ثابت نگه می دارند(۱۴).

مواد و روشها

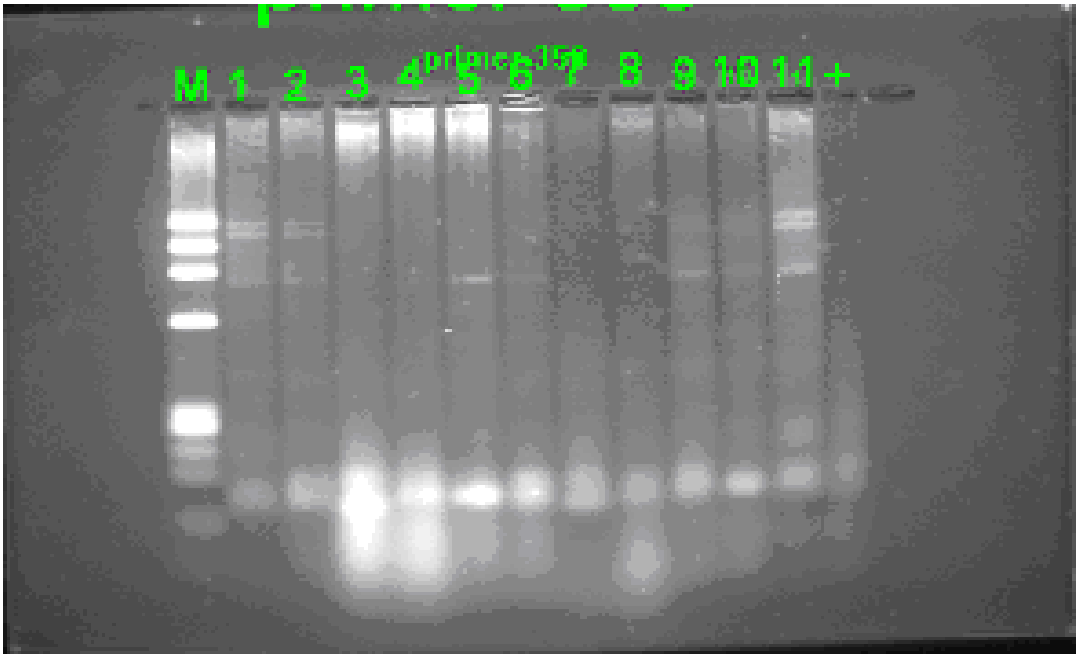
در این تحقیق از نشانگر *SSRs* به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ارقام و لاینهای گندم استفاده گردید. در هنگام استفاده از نشانگرهای مولکولی، صفات مورد بررسی در واقع باند هایی می باشند که با یک جفت آغازگر تولید می شوند. نشانگرهای *SSRs*جزء نشانگر های همبارز محسوب می شوند و با استفاده از سیستم وجود(۱) و عدم وجود(۰) باند می توان آنها را تجزیه و تحلیل کرد. برای تجزیه داده ها بایستی ماتریس تشابه صفر و یک یا ماتریس فاصله را تشکیل داد. از آنجائیکه صفات مورد مطالعه، باند هایی می باشند که در فواصل مختلف ژل از یک مبدا مشترک و ثابت یعنی ته چاهک قرار گرفته اند. بنابراین فاصله هر باند، یک صفت کمی محسوب می شود(فاصله بر حسب میلی متر) و برای تجزیه، نیاز است که به صفات کیفی تبدیل شوند. این تبدیل به صورت حضور و عدم حضور یک باند در یک فاصله مشخص از ته چاهک انجام می گیرد.حال می توان ماتریس تشابه صفر و یک را تشکیل داد. اگر تمام نمونه های ما بر روی یک ژل الکتروفورز شوند مشکلی از لحاظ تفسیر داده ها وجود ندارد. اما اگر در دو یا چند ژل الکتروفورز شوند، بایستی استاندارد کردن داده ها(استاندارد به خاطر حذف خطا می باشد) صورت گیرد. این خطا بواسطه یکسان نبودن حرکت های الکتروفورزی و تغییر بزرگنمائی در هنگام عکسبرداری در مورد ژل های مختلف بوجود می آید.امتیاز بندی باند ها با استفاده از خط کش و تجزیه داده ها با استفاده از نرم افزار *NTSYS-pc* (رولف ۲۰۰۰) انجام گرفت(۱۷).تجزیه کلاستر با استفاده از دوروش جاکارد و نی و لی توسط الگوریتم *UPGMA* و با استفاده از نرم افزارهای *Excel*، *NTSYSpc V2.02*، *SPSS Ver11.5* صورت گرفت(۱۲و۱۵).

نتایج و بحث:

امتیاز بندی(*Scornig*) باندها بصورت حضور(یک) و عدم حضور(صفر) برای هر ردیف باندی با استفاده از خط کش صورت گرفت؛ و سپس وجود چند شکلی و فاصله ژنتیکی از لحاظ جایگاههای ریز ماهواره ای در تمامی ارقام مورد اندازه گیری و بررسی قرار گرفت و از ٦ جفت آغازگر مورد استفاده تعداد ۵ جفت آغازگر در تمام محصولات تکثیر شده چند شکلی مناسبی از خود نشان دادند(شکل ژلها). در مجموع ۳۳ آلل شناسایی شد که آغازگر *XGWM295-7D* با ۱۱ آلل بیشترین و آغازگر *XGWM608-4D* با سه آلل کمترین تعداد را در میان آللهای تولیدی توسط هر آغازگر دارا بودند. میانگین تعداد آلل در کل جایگا ها برابر ۵/۵ بود و با نتایجی که توسط هوکانسون و همکاران(۱۹۹۸) برای میکروستلایت گندم با میانگین آللی ۳/۸ تا٦/۲، استاکل و همکاران(۲۰۰۰) با میانگین آللی ۵/۲ تا ٦/۲، ماکافری وهمکاران(۲۰۰۳) با تعداد آلل ۲ تا ۱۲ و مبانگین آللی٥/٦ و یوحابل و همکاران(۲۰۰۲) با میانگین آللی ۵/۵ گزارش گردید، مطابقت داشت(۱۳).



شکل (۱)الگوی نواری تولید شده توسط آغازگر xgwm295 -7D



شکل(۲)الگوی نواری تولید شده توسط آغازگر xgwm350- 7D

تعداد آلل در هر لوکوس از جمله پارامتر هایی است که در تجزیه و تحلیل داده ها محاسبه می گردد. محتوای چند شکلی، همبستگی مثبتی با تعداد آلل در هر لوکوس از خود نشان می دهد و حتی می توان با استفاده از تعداد آلل های تولید شده در هر لوکوس و در هر ژنوتیپ میزان ناخالصی را محاسبه کرد. در این تحقیق محتوای چند شکلی (*PIC*) هر آغازگر میکروستلایتی با استفاده از فرمول $PIC=1-\sum_{j=1}^{n} PJ^{2}$ اسمیت و همکاران(۱۹۹۷) برای تمام ارقام محاسبه گردید. در این تحقیق بیشترین میزان چند شکلی با مقدار ۰/۸۹ مربوط به آغازگر *XGWM295-7D* و کمترین میزان چند شکلی مربوط به آغازگر *XGWM608-4D* با مقدار ۰/۵ بود تاکنون مقادیر مختلفی برای چند شکلی گزارش شده است، مثلا ماکافری و همکاران (۲۰۰۳) مقدار *PIC* را از ۰/۰۷ تا ۰/۸ و با میانگین ۰/۵٦، های فیزو و همکاران(۲۰۰۳) از ۰/٤ تا ۱ و با میانگین ۰/۸۳۳ گزارش کرده اند.از نتایج بالا می توان فهمید که محتوای چند شکلی نمی تواند عدد ثابتی باشد و وابسته به عواملی مثل تعداد آلل تولیدی توسط هر جایگاه، تعداد n(*GT*) موجود در نواحی تکرار شونده که همبستگی مثبتی با محتوای چند شکلی دارد،می باشد(رادر و همکاران۱۹۹۵). تکرارهای دی نوکلئوتیدی نسبت به تکرارهای تری و تترا نوکلئوتیدی چند شکلی بیشتری می توانند تولید کنند. االبته تعداد آغازگرها و تعدادژنوتیپها نیز همبستگی مثبتی با محتوای چند شکلی دارد (پراساد و همکاران۲۰۰۰). بطوریکه رادر و همکاران(۱۹۹۵)، میانگین محتوای چند شکلی را در تحقیقی با ۱۸ ژنوتیپ و ۱۵ آغازگر در گندم، ۰/٦۳ و همین مقدار را زمانیکه تعداد ژنوتیپ ها به ٦ عدد کاهش یافت برابر با ۰/٥٤ بدست آوردند(پراساد و همکاران۲۰۰۰). برای تجزیه خوشه ای ژنوتیپ های گندم از ماتریس تشابه حاصله بر اساس ضریب تشابه جاکارد استفاده شد علت انتخاب این ضریب بعنوان ضریب مناسب برای تشکیل ماتریس تشابه آنست که اولا ضریب کوفنتیک مربوط به آن بالا بود(r= ۰/۸٥٦) و ثانیا این ضریب از قابلیت بالایی برای تجزیه و تحلیل نشانگر های همبارز بر خوردار است.برای انجام این محاسبات از نرم افزار *NTsys* 2.02(رولف ۲۰۰۰) استفاده شد.بر اساس تجزیه کلاستر ارقام در ٤ گروه قرار گرفتند.

گروه اول شامل ارقام کلک افغان و استار بود که در پایین ترین سطح به همدیگر پیوستند و در سطوح بالاتر ارقام هیرمند، *Petheenr-2123/Hirmand* و *V.8187/Hirmand* به آنها پیوستند.ارقام اروند و مهدوی که دارای منشاء غیر بومی بودند در گروه دوم را قرار گرفتند ارقام.*Petheenr-2123/Bolani* و*Vees/3/Bows/ Vees//Kaf/4/Bolani* همدیگر را در سطح پایینتر قطع کردند و رقم بولانی در سطح بالاتر به آنها پیوست و گروه سوم را تشکیل دادند و نهایتا رقم هامون به تنهایی در گروه چهارم قرار گرفت.

منابع مورد استفاده:

۱- احمدیان تهرانی، پ .۱۳۷۷. مقدمه ای بر همسانه سازی ژنها(ترجمه). انتشارات دانشگاه تهران. ٤١٥ صفحه.

۲- ارزانی، ا. ۱۳۷۸. اصلاح گیاهان زراعی(تالیف جی. ام. پولمن و دی. ا. اسلیپر). مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان. ٦٠٦ ص.

۳- Ablett, G. R., W. D. Beversdorf, and V. A. Dirks. 1989. Performance and stability of indeterminate and determinate soybean in short-season environments. Crop Sci. 29:1428-1433.

۴- Aruna, C., and P. Raghaviah. 1997. Correlation and path analysis of yield and quality in bread wheat. J. research Angrau. 25(4):21-25.

۵-Atale, sb., P. W. Deshmukh, P. W. Korgade, and D. G. Vitkare. 1990. Evalution of some yield contributing characters under rainfed and irrigated conditions in durum wheat. Annals of plant physiology. 4(1):80-85.

۶-Bakhit, B. R., M. G. Mosaad., M. A. EL-Morshidy, and A. M. Tamam. 1989. Correlation under normal field and aphid infestation conditions and path analysis in durum wheat. J. Assiut-Agric. sci. 20(3):207-220.

۷- Balfourier, F., and G. Charmet. 1991. Spaced plant evalution of Mediterranean germplasm collection rye grass. Euphytica. 57: 57-66.

۸- Bartual, R., E. A. Carbonell, and D. E. Green. 1985. Multi variate analysis of a collection of soybean cultivars for south eastern spain. Euphytica. 34:113-123.

۹- Bhatt, G. H. 1970. Multivariate analysis approach to selection of parents for hybridization aiming at yield improvement in self-pollinated crops. Aus. J. Agric. Res 21: 1-7.

۱۰- Bizzaro. W. and Kenneth a Marx. 2003. Poly A quantitive analysis tools for simple sequence repeat(ssr) treat in DNA. Biomed Central.

۱۱- Bramel, P. I., P. N. Hinz, D. E. Green, and R. M. Sibles. 1984. Use of principal factor analysis in the study of tree stem termination types of soybean.Euphytica. 33:387-400**.**

۱۲ - Jaccard.P.(1912).The Distribution of flora in the alpine zone.The New Phytologist.11(2):37-50

۱۳-Macaferri., M. Sanguineti, P. Donini and R. Tuberosa. 2003. microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. Theor. Appl. Genet.

۱۴-Manifesto M. M., A. R. Schlatter, H. E. Hopp, E. Y. Sua' rez, and J. Dubcovsky. Quantitative Evaluation of Genetic Diversity in Wheat Germplasm Using Molecular Markers. Published in Crop Sci. 41:682-690(2001).

۱۵-Nei, N., and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proc. Natl. Acad. Sci(USA) 76:5269-5273.

۱۶-Roder M. S., J. Plaschke, S. U . Konig, A. Borner, and M. E. Sorrells et al. 1995. Abundance, Variability and chromosomal lacation of microsatellies in wheat. Mol. Gen. Genet. 246-327-333.

۱۷-Rohif, F. J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software: Setauket, NY.

Studying Genetic Diversity of Different Cultivars of Wheat Using Microsatellite DNA Markers in Drought Stress Condition

Alireza. Asghari Mirak[1] S.Yaghub S. Masoumi[2] M. Behamta[3]
1. Faculty member, Meshkinshahr, Payame Noor University (PNU)
2. Reasercher of Cotton Research Institute of Iran
3. Faculty member of Tehran University
Email: alirezapnu8475@gmail.com

Abstract

This paper reports on a research done to identify the polymorphism information content, genetic distance and different genes resisting drought stress in 11 cultivars of wheat using Microsatellite markers. Polymorphism information content (PIC) of each Microsatellite initiator for all cultivars was calculated. The maximum amount of polymorphism information content was for XGWM295-7D initiator (0.89) and the minimum amount was for XGWM608-4D initiator (0.5). The all observed bonds (each bond as an Allele) in 11 genotypes were 198. The Hirmand cultivar with 25 alleles had the maximum number and Hamoon with 10 alleles had the minimum number of alleles for each genotype in all positions. In other words, the Hirmand cultivar with the average of 4.16 had the maximum number and the Boloaman and Hamon with the average of 1.66 had the minimum number of alleles in each position for a genotype. Genetic similarity coefficient between 11 used genotypes was calculated using Jaccard as well as Nee and Lee formulas. The most similarity was found between Kelke Afghan and Star (0.82) and the least similarity was found between Hamoon and V. 8187/Arvand-1(0.08) using Jaccard's coefficient. Moreover, the most similarity was found for Kelke Afghan and Star (0.90) and the least amount was found for Hamoon and V. 8187/Arvand-1 genotypes (0.15) using Nee and Lee coefficient. In general, the average of 0.48 was calculated for Jaccard coefficient and the average of 0.62 was calculated for Nee and Lee coefficient. To illustrate dendrogram for breaking down the cluster, the correlation coefficient in different Algorithm was calculated. UPGMA method and Jaccard coefficient which had the highest coefficient (r=0.856) were selected to illustrate the dendrogram. Taken into account these findings, cultivars were classified into four groups.

Key words: wheat cultivar, genetic diversity, Microsatellite markers,DNA