

بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم نان و دوروم دیم با استفاده از نشانگرهای SSR

رضا میردریکوند^{۱*}، اسما خیرالهی^۲، آسا ابراهیمی^۳ و محمد رضوانی^۴

- ۱- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، خرم‌آباد
 - ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، خرم‌آباد
 - ۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران
 - ۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق، تهران
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۹)

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ گندم نان و دوروم دیم با استفاده از ۲۰ جفت آغازگر SSR، انجام شد. از روش CTAB برای استخراج DNA استفاده شد. در مجموع ۶۹ آلل مختلف در تمام ژنوتیپ‌ها تکثیر و شناسایی گردید. تعداد آلل تکثیر شده توسط آغازگرها از ۲ آلل (آغازگرهای Xgwm369 و Xcfd40) تا ۵ آلل (آغازگر Xbarc54) متغیر بود. میانگین تعداد آلل ۳/۴۵ آلل در هر مکان ژنی بود. در این مطالعه بیشترین و کمترین میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) به ترتیب مربوط به آغازگرهای Xcfd40، Xcfd168، Xgwm350، Xbarc178 و Xgwm30 بود. ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA تشکیل گردید. بر اساس ضرایب تشابه به دست آمده، ارزش‌های تشابه دامنه‌ای از ۰/۱۴ تا ۰/۸۶ درصد را نشان دادند. بیشترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های Seri82 و Seri کمترین آن بین ژنوتیپ‌های Baviacora و Sita/chil به ترتیب به میزان ۰/۸۶ و ۰/۱۴ مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای توانست ژنوتیپ‌های گندم بهاره و زمستانه و ژنوتیپ‌های گندم نان و دوروم را از هم تفکیک نماید. با توجه به تنوع ژنتیکی که با استفاده از نشانگرهای SSR به دست آمد، می‌توان از فواصل ژنتیکی بطور مطلوب در برنامه‌های به‌نژادی گندم استفاده کرد.

واژگان کلیدی: اطلاعات چندشکلی، تنوع ژنتیکی، گندم دیم، نشانگر SSR

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: mirderikvand@khoiau.ac.ir

مقدمه

گندم (*Triticum sp L.*) از خانواده‌ی پواسه (Poaceae) با اهمیت حیاتی و اقتصادی در جهان و مهمترین غله در تامین کالری تغذیه‌ای بشر می‌باشد (Ijaz and Khan, 2009). اهمیت ارزیابی تنوع ژنتیکی آن، بدان دلیل است که یکی از پیامدهای اجتناب ناپذیر کشاورزی نوین که مبتنی بر استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت قابل قبول می‌باشد، باعث کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی شده است. یکنواختی ژنتیکی در گیاهان زراعی نامطلوب بوده و این پدیده باعث آسیب پذیری گیاهان نسبت به اپیدمی‌ها و متغیرهای محیطی می‌شود (Garner et al., 1994). استفاده از نشانگرهای ملکولی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بسیار شایع بوده و توالی‌های ساده تکراری (SSRs) به طور وسیعی در گندم به علت داشتن سطح بالایی از چندشکلی (Polymorphism)، وراثت هم‌باز و توزیع یکسان در ژنوم گندم مورد استفاده قرار می‌گیرند (Roder et al., 1995; Parker et al., 2002)، نشانگر SSR دارای مزایای فراوانی است که می‌توان به فراوانی بالا در ژنوم و کاربرد آسان با استفاده از PCR اشاره کرد (Kuleung et al., 2004). از این نشانگر برای تمایز بین ارقام مختلف از جمله: برنج (Rahman et al., 2009)، گندم (Fujita et al., 2009)، سویا (Tantasawat et al., 2011) و سایر محصولات استفاده شده است. همچنین از نشانگر SSR بطور گسترده برای تعیین نقشه مکان‌های کمی کنترل کننده صفات گندم نان استفاده شده است (Somers et al., 2004). تنوع ژنتیکی در گندم با استفاده از نشانگر SSR در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته که به چند مورد از آنها اشاره می‌شود. احمد (Ahmad, 2002)، در مطالعه‌ای که برای برآورد تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گندم نان با استفاده از نشانگرهای SSR انجام داد، سیزده ژنوتیپ مختلف گندم را با استفاده از ۴۳ آغازگر SSR مورد بررسی قرار داد. نتایج بدست آمده نشان داد که به طور کلی ۱۵۶ آلل

در ۴۳ مکان ژنی تکثیر شدند. تعداد آلل‌های هر مکان ژنی بین ۲ تا ۹ متغیر بود و به طور متوسط ۳/۶ آلل برای هر مکان ژنی وجود داشت. میزان اطلاعات چند شکلی آغازگرها (Polymorphic Information Content) بین ۰/۱۰ برای آغازگر Xgwm264 تا ۰/۸۹ برای آغازگرهای Xgwm471 و Xgwm577 متغیر بود. دامنه‌ی شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها از ۰/۳۰ تا ۰/۹۰ متغیر بود.

راسل و همکاران (Roussel et al., 2005)، تنوع ژنتیکی ۴۸۰ نمونه از واریته‌های گندم نان را که از اروپا منشاء گرفته بودند با ۳۹ آغازگر SSR مورد بررسی قرار دادند. تعداد آلل‌ها برای هر مکان ژنی بین ۴ تا ۴۰ متغیر بود و به طور میانگین ۱۶/۴ آلل برای هر مکان شناسایی شد. در تحقیقی دیگر سالم و همکاران (Salem et al., 2008) تنوع ژنتیکی هفت واریته گندم را با استفاده از ۴۸ آغازگر SSR و ۹ خصوصیت مورفولوژیکی مورد بررسی قرار دادند که آغازگرها ۱۵ مکان ژنی در ۱۵ کروموزوم را شناسایی کردند و ۴۸ مکان آللی با میانگین ۳/۲ برای هر مکان مشخص شد. تعدادی از جفت آلل‌ها در محدوده‌ی مکانهای ژنی ۲ تا ۷ بودند و میزان محتوی چندشکلی در محدوده‌ی ۰/۲۷ (برای آغازگر Xgwm95) تا ۰/۸۱ (برای آغازگر Xgwm437) و با میانگین ۰/۵۴ بود.

دیکوند و همکاران (Drikvand et al., 2013) در پژوهشی تنوع ژنتیکی ۹۲ رقم گندم نان را با استفاده از ۴۰ آغازگر SSR، مورد بررسی قرار دادند که ۸۰ آلل تکثیر گردید و ۲ آلل برای هر مکان ژنی تشخیص داده شد. میزان اطلاعات چند شکلی آغازگرها از ۰/۱۲ تا ۰/۸۰ متغیر و بطور میانگین برابر ۰/۵۲ بود و ارزش تشابه ژنتیکی دارای محدوده‌ی ۰/۱۷ تا ۰/۸۸ بود. هدف از انجام این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم دیم کشت شده در ایران با استفاده از نشانگر SSR بود. مطالعه‌ی تنوع برخی از این ژنوتیپ‌ها با استفاده از این نشانگر تا کنون انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

فریزر ۸۰- نگهداری شدند. تعداد ۲۰ جفت آغازگر SSR برای بررسی تنوع ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). آغازگرها بر اساس مطالعات قبلی انجام شده بر روی جنس گندم انتخاب شدند. توالی، دمای اتصال و سایر خصوصیات تمام آغازگرها در پایگاه اینترنتی به نشانی <http://wheat.pw.usda.gov/GG2> قابل دسترسی است.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد (<http://www.diversityarrays.com>). غلظت نمونه‌های DNA با دستگاه پیکودراپ مدل Pico 200 (ساخت شرکت Picodrop انگلستان)، اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها با غلظت ۵۰ نانوگرم رقیق شدند.

مواد گیاهی: جمعیت مورد استفاده در این تحقیق شامل ۲۵ ژنوتیپ گندم دیم بود که در ایران کشت می‌شوند یا در دست معرفی قرار دارند. ارقام شاهپوندی و سیمره دوروم و مابقی گندم نان هستند (جدول ۱). بذور از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان تهیه شد. از هر کدام از ارقام ۲۰ بذر در گلدان کشت شد و برای جلوگیری از آلودگی احتمالی خاک گلدان‌ها از قبل بررسی شد تا عاری از سایر بذور به ویژه بذر غلات باشند. پس از گذشت ۱۰ روز از هر رقم تعدادی برگ جمع‌آوری شده و با استفاده از ازت مایع پودر گردیده و در تیوپ‌های دو میلی‌لیتری ریخته شده و سپس در

جدول ۱- اسامی، تیپ رشد و شجره‌ی ژنوتیپ‌های گندم دیم

Table 1. Names, growth habitation and pedigree of rainfed wheat genotypes

شماره No.	ژنوتیپ Genotype	تیپ رشد Growth type	شجره Pedigree	شماره No.	ژنوتیپ Genotype	تیپ رشد Growth type	شجره Pedigree
1	Azar2	Winter	حاصل کراس با ژنوتیپ‌های داخلی Progenies of the coss by internal genotype خالص سازی شده از گندم بومی	14	Berkut	Spring	BERKUT CM96
2	Sardari	Winter	منطقه کردستان Purification of local wheat in the Kurdistan Region	15	Florkawa-2	Spring	FLORKWA- 2/KAUZ1CA94
3	Shahivandi	Spring	از توده های بومی استان لرستان Landraces of Lorestan province	16	16-Hamam-4	Spring	HAMAM-4 -1CA92
4	Symareh	Spring	رقم معرفی شده با منشا ICARDA Cultivar from ICARDA	17	Zemamra-8	Spring	ZEMAMRA-8-ICW91
5	TV2	Spring	TEV2/3/URES/FUN/KAUZ-CM	18	Irena	Spring	IRENA/BABAKAS/PAS TOR-CM
6	Nestor	Spring	NESTOR/3/HE1/3*CNO72//2* SERI/CMS92	19	Chen/Agilops	Spring	CHEN/AGILOPS.SQUA ROSA(TAUS)BCN3/NE E
7	Seri/Rayon	Spring	SERI/RAYON CRG 2753	20	Pigo	Spring	PASTOR CM95
8	Chamran	Spring	(ATTILA).(CM85836-50Y-OM- OY-3M-OY	21	Seri	Spring	SERI/3//RL6010/4* YR CM96
9	Pastor	Spring	PASTORCM(CM=CIMMYT)	22	Croc	Spring	CROC_1/AE.SGUARO SA.
10	Zagros	Spring	رقم معرفی شده با منشا ICARDA Cultivar from ICARDA	23	Seri-82	Spring	SERI82/SHUA"S"ISW8 9....
11	Ghahar	Spring	رقم معرفی شده با منشا ICARDA Cultivar from ICARDA	24	Bavicora	Spring	BAVIACORA M92 CM 92...
12	Maroon	Spring	Avd*Pchu((28mt54A*N10-Brv21- 1c/Kt54B) Nar59> 1093))7	25	Sitta/Chil	Spring	SITTA/CHIL/IRENA/C M
13	Koohdasht	Spring	رقم معرفی شده با منشا ICARDA Cultivar from ICARDA				

جدول ۲- نام، توالی، دمای اتصال و محل کروموزومی آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش

Table 2. Name, sequence, annealing temperature and chromosomal location of primers used in this study

شماره	نام نشانگر	توالی آغازگرها	دمای اتصال (سانتی‌گراد)	محل کروموزومی
No.	Marker	Primer sequence (5' - 3')	Annealing temperature (°C)	Chromosomal location
1	XGWM30	ATCTTAGCATAGAAGGGAGTGGG TTCTGCACCCTGGGTGAT	60	2D
2	XGWM155	CAATCATTTCCCCCTCCC AATCATTGGAAATCCATATGCC	54.5	3A
3	XGWM265	TGTTGCGGATGGTCACTATT GAGTACACATTTGGCCTCTGC	55	2A
4	XGWM577	ATGGCATAATTGGTCAAATTG TGTTTCAAGCCCAACTTCTATT	55	7B
5	XGWM99	AAGATGGACGTATGCATCACA GCCATATTTGATGACGCATA	54.5	1A
6	XGWM159	GGGCCAACACTGGAACAC GCAGAAGCTTGTGGTAGGC	66.2	2B
7	XGWM124	GCCATGGCTATCACCCAG ACTGTTTCGGTGAATTTGAG	61.1	1B
8	XGWM369	CTGCAGGCCATGATGATG ACCGTGGGTGTTGTGAGC	58	3A
9	XGWM149	CATTGTTTTCTGCCTCTAGCC CTAGCATCGAACCTGAACAAG	55	4B
10	XGWM344	CAAGGAAATAGGCGGTAAC ATTTGAGTCTGAAGTTTGCA	55	7B
11	XGWM350	ACCTCATCCACATGTTCTACG GCATGGATAGGACGCC	60	7D
12	XGWM129	TCAGTGGGCAAGCTACACAG AAAACCTTAGTAGCCGCGT	50	2B
13	XBARC13	GCAGGAACAACCACGCCATCTTAC GCGTCGCAATTTGAAGAAAATCAT C	60	2B
14	XBARC148	GCGCAACCACAATGTATGCT GGGGTGTTTTCTATTTCTT	60	1A
15	XBARC54	GCGAACAGGAGGACAGAGGGCAC GAGAG	40	3A
16	XBARC178	GCGCTTTCCCACGTTCCATGTTTCT GCGTATTAGCAAAAACAGAAGTGAG	52	6B
17	XCF2164	GCGACTAGTACGAACACCACAAAA GGGTTGGTGCCTAGATTGAA	60	3A
18	XCFD168	TCAAGGTGCCAACACTTACG CTTCGAAAATCGAGGATGAT	60	2D
19	XCFD5	TTCACGCCAGTATTAAGGC TGCCCTGTCCACAGTGAAG	60	6D
20	XCFD40	TTGCCAGTTCCAAGGAGAAT GCGACAAGTAATTCAGAACGG CGCTTCGGTAAAGTTTTTGC	60	5D

درجه (بسته به نوع آغازگر)، سپس تکثیر نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه و در دمای ۷۲ درجه و تکثیر نهایی در همین دما و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. واکنش در حجم ۱۵ میکرولیتر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ساخت کمپانی Bio Rad، آمریکا) انجام شد.

واکنش‌های PCR: برای انجام واکنش‌های PCR از روش رودر و همکاران (Roder *et al.*, 1998)، به این صورت استفاده شد: یک چرخه در دمای ۹۴ درجه و به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه و به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به مدت ۱ دقیقه و در دمای بین ۴۰ تا ۶۷

مکانی برای تکثیر داشتند، به طوری که در تمام ژنوتیپ‌ها باند قابل امتیازدهی تکثیر شد. بنابراین این آغازگرها توالی مکمل بر روی ژنوم A دارند و در همه‌ی ژنوتیپ‌ها این توالی وجود داشته است. ولی آغازگرهای Xgwm193، Xgwm610 و Xgwm124 در تعدادی از ژنوتیپ‌ها باند قابل امتیازدهی تکثیر نکردند. آغازگرهایی که تعداد آلل زیادی را تکثیر کردند، برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب تشخیص داده می‌شوند.

در این مطالعه بیشترین و کمترین PIC به ترتیب برابر با ۰/۹۸ و ۰/۶۴ مربوط به نشانگرهای Xcfd40 و Xgwm30 بود و میانگین PIC آغازگرها برابر با ۰/۸۱ بود. بیشترین و کمترین تعداد آلل به ترتیب مربوط به آغازگرهای Xcfd40 و Xbarc54 بود که به ترتیب ۵ و ۲ آلل را تکثیر کردند. میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریز ماهواره مناسب بودن هر مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (Roder *et al.*, 1998). بوت‌استاین و همکاران (Botstain *et al.*, 1980) گزارش دادند که آغازگرهایی که PIC بزرگتر از ۰/۵ داشته باشند دارای اطلاعات سودمند زیادی هستند، آغازگرهایی که مقادیر PIC آنها بین ۰/۲۵ و ۰/۵ باشد سودمند هستند و آنهایی که کمتر از ۰/۲۵ باشد حاوی اطلاعات سودمند اندکی هستند. در مطالعات قبلی لندجوا و همکاران (Landjeva *et al.*, 2006) مقادیر PIC را در گندم‌های زمستانه بلغاری بین ۰/۱ تا ۰/۸۱ گزارش دادند. همچنین بریان و همکاران (Bryan *et al.*, 1997) مقادیر PIC را در ژرم‌پلاسم گندم‌های هگزاپلوئید به طور متوسط ۰/۵۱ گزارش نمودند. پراساد و همکاران (Prasad *et al.*, 2000) در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۵ رقم برگزیده‌ی گندم با استفاده از نشانگر SSR میزان

الکتروفورز، مشاهده نوارهای تکثیر شده و تحلیل داده‌ها: پس از انجام مراحل PCR، ژل ۳/۵ درصد آگارز با استفاده از بافر TBE تهیه شد. به هر نمونه ۳ میکرولیتر از محلول رنگ آمیزی ژل رد (Gel Red) و بافر بارگیری (Loading buffer) (به نسبت ۱/۵: ۱/۵ میکرولیتر) افزوده شد. سپس نمونه‌ها در چاهک‌ها بارگیری شدند. الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت ۱۵۰ دقیقه اجرا شد. برای تعیین اندازه‌ی قطعات از نشانگر با باندهای استاندارد ۵۰bp استفاده شد. مشاهده و عکس برداری باندهای تکثیر شده به کمک دستگاه ژل خوان (Bio Rad، آمریکا) انجام شد. پس از تشکیل ماتریس تشابه تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام شد. اطلاعات چند شکلی آغازگرها با استفاده از رابطه‌ی $PIC = 1 - \sum p_j^2$ (Anderson *et al.*, 1993).

نتایج و بحث

بررسی کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز (شکل ۱) و دستگاه پیکودراپ نشان داد که DNAها از کیفیت مطلوبی برخوردارند. آغازگرهای مورد استفاده در مجموع ۶۹ آلل را در تمام ژنوتیپ‌ها، برای هر مکان شناسایی و تکثیر کردند، تعداد آلل تکثیر شده توسط آغازگرها از ۲ آلل (آغازگرهای Xgwm369 و Xcfd40) تا ۵ آلل (آغازگر Xbarc54) متغیر بود. میانگین تعداد آلل ۳/۴۵ آلل در هر مکان ژنی بود و واکنش‌های PCR با استفاده از آغازگرهای SSR قطعاتی را تکثیر کرد که طول آنها بین ۵۰ تا ۳۵۰ جفت باز متغیر بود. آغازگرهای Xcfa2164 و Xbarc54 موجود بر روی کروموزوم 3A و Xbarc148 بر روی کروموزوم 1A در تمام ژنوتیپ‌ها

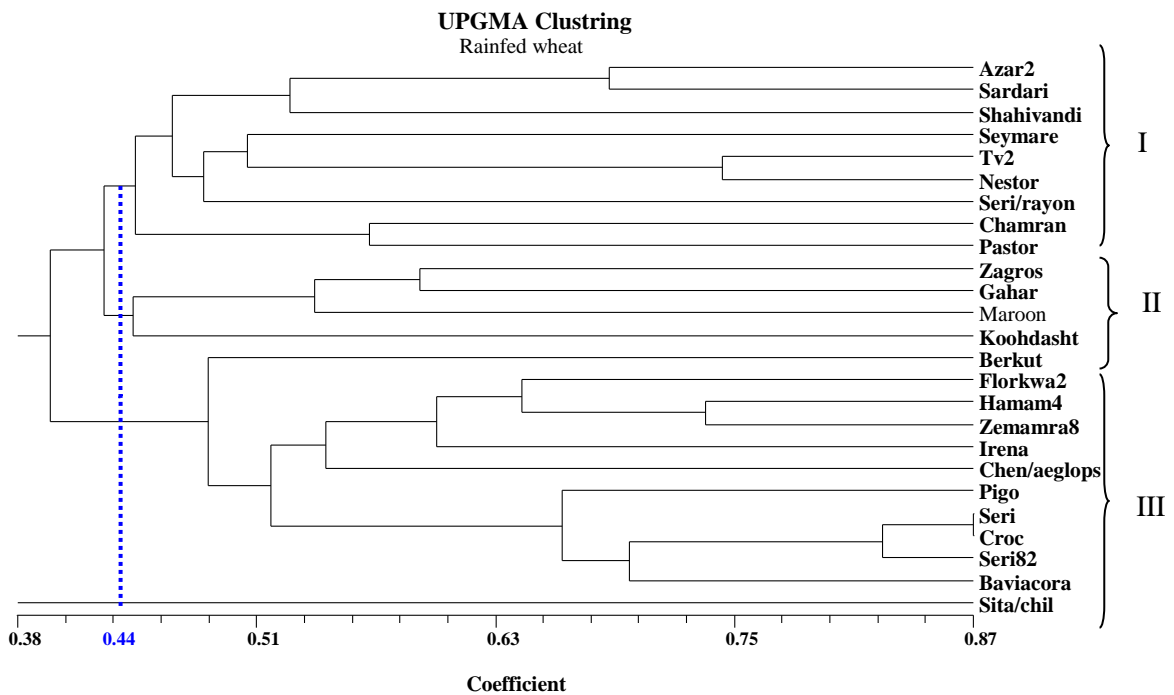


شکل ۱- DNA ژنومی استخراج شده تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم
Figure 1. Extracted genomic DNA from some wheat genotypes

PIC را به طور میانگین ۰/۷۱ گزارش کردند. در مطالعه حاضر همه آغازگرها PIC بیشتر از ۰/۵ داشتند که بیانگر این است که این آغازگرها حاوی اطلاعات مفیدی بوده و به عبارت دیگر دارای توالی‌های مکمل مکان‌هایی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی هستند که این توالی‌ها در ژنوتیپ‌ها تغییرات دارند زیرا پس از تکثیر چندشکلی نشان دادند.

ماتریس تشابه و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA تشکیل گردید. بر اساس ضرایب تشابه به دست آمده، ارزش‌های تشابه دامنه‌ای از ۰/۱۴ تا ۰/۸۶ درصد را داشتند. کمترین و بیشترین تشابه ژنتیکی به ترتیب بین ژنوتیپ‌های Sita/chil, Baviacora (۰/۱۴) و Seri 82, Seri (۰/۸۶) وجود داشت. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA گروه‌بندی شدند (شکل ۲). میانگین ضرایب تشابه جهت تعیین محل برش دندروگرام ژنوتیپ‌ها تعیین شد (Jamshidi, 2011) و متوسط ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/۴۴ بود. سه گروه عمده تشکیل شد، همانطور که ملاحظه می‌شود در گروه اول رقم آذر ۲ و سرداری همراه رقم محلی شاهپوندی در کنار هم در یک خوشه قرار گرفته‌اند. دو رقم آذر ۲ و سرداری گندم نان بوده و دارای تیپ رشد زمستانه هستند، که ضریب تشابه برابر ۰/۶۸ داشتند. در این دندروگرام ارقام شاهپوندی (رقم محلی) و سیمره (رقم اصلاح شده) که هردو گندم دوروم هستند نیز در کنار همدیگر قرار گرفته‌اند. این دو رقم ضریب تشابهی برابر با ۰/۴۶ داشتند، سایر ژنوتیپ‌ها که ترکیبی از ارقام زراعی و لاین‌های امیدبخش هستند، دارای تیپ رشد بهاره هستند. در بین این ژنوتیپ‌ها، ژنوتیپ‌های Seri 82, Seri و Seri 82, Corc دارای بیشترین ضریب تشابه هستند، که در گروه‌های دوم و سوم قرار گرفته‌اند. اغلب لاین‌های امید بخش که جز ژنوتیپ‌های گندم نان هستند در گروه سوم قرار گرفته‌اند. از دلایلی که برخی ژنوتیپ‌ها ضریب تشابه بالایی داشته‌اند شجره‌ی مشترک آنها است به عبارت دیگر والدین مشترکی در تولید آنها نقش داشته‌اند. همانطور که

ملاحظه می‌شود، گروه‌بندی بر اساس داده‌های نشانگرهای SSR تا حدودی توانسته است گندم‌های نان با تیپ رشد زمستانه را از همدیگر تفکیک نماید. همچنین دو رقم گندم دوروم نیز از گندم‌های نان تا حدودی تفکیک شده‌اند. این ژنوتیپ‌ها در تجزیه کلاستر کنار هم قرار دارند. مکافری و همکاران (Maccaferri et al., 2003)، در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی ۵۸ رقم گندم دوروم را با استفاده از ۷۰ نشانگر SSR مورد بررسی قرار دادند و میزان شباهت ژنتیکی ارقام مورد مطالعه بطور متوسط برابر با ۰/۴۴ بود، که نتایج آنها از این جهت به نتایج پژوهش حاضر نزدیک می‌باشد. های و همکاران (Hai et al., 2007) با استفاده از ۵۲ آغازگر SSR تنوع ژنتیکی ۶۹ رقم گندم بهاره را مورد بررسی قرار دادند و مشخص کردند که درصد تشابه ژنتیکی بین این ارقام از ۰/۲۴ تا ۰/۸۹ درصد متغیر است و میانگین درصد تشابه برابر ۰/۶۸ بود. دریکوند و همکاران (Drikvand et al., 2013) در مطالعه خود که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۹۲ ژنوتیپ گندم نان انجام شد، بالاترین میزان تشابه ژنتیکی را بین ارقام آزادی و مهدوی با درصد تشابه ۰/۸۸ و کمترین تشابه ژنتیکی را بین ارقام میهن و استار گزارش نمودند. در تحقیق حاضر با استفاده از تجزیه کلاستر و دندروگرام به دست آمده، ماتریس ضرایب کوفتینک برآورد شد. سپس همبستگی بین این ماتریس و ماتریس تشابه اولیه که بر اساس ضرایب تشابه جاکارد به دست آمده بود محاسبه گردید. همبستگی بین دو ماتریس $r=0.74$ بود که برازش مناسب ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و صحت گروه‌بندی را نشان می‌دهد. اسماعیلی و همکاران (Ismaili et al., 2010). در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دیم با استفاده از نشانگر نیمه تصادفی JSJ، همبستگی بین ماتریس ضرایب کوفتینک و ماتریس ضرایب تشابه جاکارد را ۰/۸۶ برآورد نمودند که بیانگر برازش مناسب ژنتیکی بین ارقام و صحت گروه‌بندی بود. پانوار و همکاران (Panwar et al., 2010)، در بررسی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های ارزن با استفاده از نشانگرهای SSR، RAPD و ژن نشانگر سیتوکروم P450، با انجام آزمون



شکل ۲- دندروگرام ژنوتیپ‌های گندم دیم (بر اساس داده‌های نشانگر SSR) با استفاده از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد

Figure 2. Dendrogram of rainfed wheat genotypes using UPGMA method based on Jaccard's coefficient for SSR data

وقایعی مانند جهش، حذف و اضافه شدن قطعات در ایجاد چند شکلی‌ها دخیل می‌باشند. با توجه به اینکه نشانگر SSR توانسته ژنوتیپ‌های مورد بررسی را تفکیک نماید، می‌توان از تنوع بدست آمده در مطالعات اصلاحی گندم استفاده نمود. گروه‌بندی صورت گرفته به خوبی توانست ارقام گندم بهاره و زمستانه را از هم تفکیک نماید بطوریکه ارقام بهاره در گروه‌های جداگانه نسبت به ارقام گندم با تیپ رشد زمستانه قرار گرفتند. همچنین این گروه‌بندی توانست فاصله ژنتیکی بین گندم‌های دوروم و گندم نان را نشان دهد. تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی که بین ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه مشاهده شده است، می‌تواند برای کارهای اصلاحی بعدی و انجام تلاقی بین ژنوتیپ‌ها (با رعایت سطح پلوئیدی آنها)، به منظور بالا بردن کیفیت و کمیت عملکرد که هدف نهایی در اصلاح گیاهان است بکار رود.

مانتل ضریب همبستگی کوفنتیک بالای (۰/۹۵)، بین ماتریس تشابه نشانگرها بدست آوردند. با توجه به نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر و مقایسه با نتایج دیگر محققین، نتیجه گرفته می‌شود که همبستگی مناسبی بین ماتریس ضرایب تشابه جاکارد و کوفنتیک وجود دارد که این موضوع صحت گروه‌بندی انجام شده را تأیید می‌کند. نتایج بدست آمده با استفاده از نشانگرهای SSR و محاسبه میزان اطلاعات چند شکلی آغازگرها نشان داده که مقدار PIC این آغازگرها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بالا بوده و بیانگر این است که آغازگرها نواحی مکمل برای تکثیر در ژنوتیپ‌ها را داشته و برای بررسی تنوع ژنتیکی گندم مناسب هستند. توزیع و فراوانی نشانگرها در طول ژنوم یکنواخت نبوده و دلیل توزیع غیریکنواخت این نشانگرها به مکانیسم‌های ایجاد چندشکلی در این نشانگرها نسبت داده می‌شود.

References

- Ahmad, M. (2002). Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats. *Genome*, **45**: 646-651.

- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E.** (1993). Optimization parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, **36**: 181-186.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.** (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, **32**: 314-331.
- Bryan, G.J., Collins, A.J.P., Stephenson, A., Orry, J., Smith, B. and Gale, M.D.** (1997). Isolation and characterization of microsatellite from hexaploid bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **94**: 557-563.
- Drikvand, R., Bihamt, M.R. Najafian, G. and Ebrahimi, A.** (2013). Investigation of genetic diversity among bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. *Journal of Agriculture Science*, **1**: 122-129.
- Fujita, Y., Fukuoka, H. and Yano, H.** (2009). Identification of wheat cultivars using EST-SSR markers. *Breeding Science*, **59**: 159-167.
- Garner, A., Ludwing, W.F. and Melchinger, A.E.** (1994). Relationship among European barley germplasm II: Comparison of RFLP and pedigree data. *Crop science*, **34**: 1199-1205.
- Hai, L., Wangner, C. and Friedt, W.** (2007). Quantitative structure analysis of genetic diversity among spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) From different geographical regions. *Genetica*, **130**: 213-225.
- Ijaz, S. and Khan, I.A.** (2009). Molecular characterization of wheat germplasm using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, **8**: 809-815.
- Ismaili, A., Nazarian, F., Samiei, K. and Drikvand, R.** (2010). Evaluation of genetic diversity among rainfed wheat genotypes using semi-random ISJ molecular marker. *Final Research Report Lorestan University* (In Persian).
- Jamshidi, S.** (2011). NTSYSpc 2.02, implementation in molecular biodata analysis (Clustering, screening, and individual selection). Proceedings of 4th International Conference on Environmental and Computer Science. Singapore, 16-18 September, pp. 165-169.
- Kuleung, C., Baenziger, P.S. and Dweikat, I.** (2004). Transferability of SSR markers among wheat, rye and triticales. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**: 1147-1150.
- Landjeva, S., Korzon, V. and Ganeva, G.** (2006). Evaluation of genetic diversity among Bulgarian winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties during the period 1925-2003 using microsatellites. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53**: 1605-1614.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Donini, P. and Tuberosa, R.** (2003). Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**: 783-797.
- Panwar, P., Nath, M., Yadav, V.K. and Kumar, A.** (2010). Comparative evaluation of genetic diversity using RAPD, SSR and cytochrome p450 gene based markers with respect to calcium content in finger millet (*Eleusine coracana* L.). *Journal of Genetics*, **89**: 121-133.
- Parker, G.D., Fox, P.N., Langridge, P., Chalmers, K., Whan, B. and Ganter, P.F.** (2002). Genetic diversity within Australian Wheat breeding programs based on molecular and pedigree data. *Euphytica*, **124**: 293-306.
- Prasad, M., Varshney, R.K., Roy, J.K., Balyan, H.S. and Gupta, P.K.** (2000). The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**: 584-592.
- Rahman, M.S., Molla, M.R., Alam, M.S. and Rahman, L.** (2009). DNA fingerprinting of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using microsatellite markers. *Australian Journal of Crop Science*, **3**: 122-128.
- Roder, M.S., Plaschke, J., Konig, S.U., Borner, A. and Sorrells, M.E.** (1995). Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular Genetic*, **246**: 327-333.
- Roder, M.S., Korsun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P. and Ganal, M.W.** (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, **149**: 2007-2023.
- Roussel, V., Leisova, L., Exbrayat, F., Stehno, Z. and Balfourier, F.** (2005). SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**: 162-170.

- Salem, K.F.M., El-zanaty, A.M. and Esmail, R.M.** (2008). Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using morphological characters and microsatellite markers. *World Journal of Agricultural Sciences*, **4**: 538-544.
- Somers, D.J., Isaac, P. and Edwards, K.** (2004). A high density microsatellite consensus map of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 1105-1114.
- Tantasawat, P., Trongchuen, J., Prajongjai, T., Jenweerawat, S. and Chaowiset, W.** (2011). SSR analysis of soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. *Australian Journal of Crop Science*, **5**: 283-290.

Study of Genetic Diversity Among Some Rainfed Bread and Durum Wheat Genotypes, Using SSR Markers

Reza Mir Drikvand^{1,*}, Asma Khyrolahi², Asa Ebrahimi³ and Mohammad Rezvani⁴

1- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Islamic Azad University Khoramabad Branch, Khoramabad, Iran

2- Former M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Islamic Azad University, Khoramabad Branch, Khorramabad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: October 02, 2014 – Accepted: February 18, 2015)

Abstract

In this study, genetic diversity of 25 rainfed bread and durum wheat genotypes were assessed using 20 SSR primers that all of them were generated scorable bands. Totally 69 alleles (ranged between 2 allele for Xcfd40 and Xgwm369, and 5 allele for Xbarc54 primers per each locus), were distinguished. Polymorphic information content (PIC) for all SSR primers was calculated. The highest (0.98) and the lowest (0.64) amount of PIC was pertained to Xcfd40 and Xgwm30 primers, respectively. Based on similarity matrix, the highest and lowest genetic similarity was belonged to Seri82 and Seri (0.86) and Sita/chil and Baviacora (0.14), respectively. Cluster analysis could distinct spring and winter wheat genotypes and as well as bread and durum wheat genotypes. It was concluded that SSR marker was suitable for evaluation of genetic diversity in rainfed wheat genotypes. This genetic diversity can be used in wheat breeding programs.

Keywords: Polymorphic information content, Genetic diversity, Rainfed wheat, SSR marker

* Corresponding Author, E-mail: mirderikvand@khoiau.ac.ir