

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم نان ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای SSR

Evaluation of Genetic diversity in Iranian and Exotic wheat genotypes using SSR markers

هانیه کافی^۱، سعید نواب‌پور^{۱*}، خلیل زینلی‌نژاد^۱، محمدهادی پهلوانی^۱

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه
علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Kafi H¹, Navabpour S^{*1}, Zaynali Nezhad KH¹, Pahlavani MH¹

1- Ms Graduated, Associate Professors, Assistant Professor, Associate Profesore of
Plant Breeding and Biotechnology Department Gorgan University of Agriculture
Science and Natural Resources

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.navabpour@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

گندم از جمله قدیمی‌ترین و مهم‌ترین گیاهان زراعی مورد استفاده انسان است. به‌طور حتم موفقیت در برنامه اصلاحی در گرو میزان تنوع ژنتیکی است. روش‌هایی مختلفی برای تخمین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله آن‌ها می‌توان ثبت شجره، خصوصیات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی را نام برد. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ۳۵ ژنوتیپ گندم نان بر اساس نشانگرهای ریزماهواره بود. برای این منظور از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد. تعداد آلل‌های مشاهده شده توسط ۱۳ نشانگر مورد استفاده بین دو تا ۱۱ بود که بیش‌ترین تعداد آلل مربوط به نشانگر *Xgwm190-5D* و کم‌ترین تعداد آلل مربوط به نشانگر *Xcn13-6B* بود. میانگین کل آلل‌های مشاهده شده در مجموع مکان‌های ژنی ۶/۸۴ به‌دست آمد. آغازگرهای WMC420 و BARC328 باند قابل امتیازدهی تکثیر نکردند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۱۱ تا ۳۸۵ با میانگین ۰/۲۲ متغیر بود. میزان تنوع ژنی مشاهده شده برای مکان‌های ژنی از ۰/۱۰۷ تا ۳۵۷ با میانگین ۰/۲۱۴ به‌دست آمد. بر اساس ضرایب تشابه به‌دست آمده، ارزش‌های تشابه دامنه‌ای از ۰/۹۰ تا ۰/۹۸ درصد را نشان دادند. بیش‌ترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ترکیه و ایران و کم‌ترین آن بین ژنوتیپ‌های عراق و افغانستان مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل، بالاترین ضریب کوفتیک ($r=0.73$) مربوط به زمانی بود که از روش جاکارد برای تشکیل ماتریس تشابه و از الگوریتم UPGMA برای ترسیم نمودار درختی استفاده شد. بنابراین نمودار درختی حاصل از این روش ملاک دسته‌بندی قرار گرفت. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه طبقه‌بندی کرد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی

ضریب تشابه

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)

نشانگر ریزماهواره

گزارش کردند. هدف از انجام این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم نان به منظور استفاده از ژنوتیپ‌های برتر در پروژه‌های اصلاحی با استفاده از نشانگر ریزماهواره بود. در این مطالعه، ۳۵ ژنوتیپ گندم نان (موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی (آی پی کا) در کشور آلمان) ارزیابی شدند. ژنوتیپ‌ها به‌طور تصادفی انتخاب شده و از ایران و کشورهای اطراف، هرکدام چند ژنوتیپ داشته است. انتخاب ژنوتیپ‌ها بر اساس صفت خاصی نبوده و تنها سه رقم هیرمند، سیستان و مغان ۳ از ارقام اصلاح ایرانی هستند و بقیه لاین‌های خالص حاصل از انتخاب بین توده‌های محلی هستند که منشا آن‌ها در جدول ۱ آمده است. صفات مورفولوژیک این ژنوتیپ‌ها در مطالعه دیگر ثبت شد. نحوه نامگذاری ژنوتیپ‌ها مطابق بانک ژن آلمان است که نمونه‌ها با این نحوه نامگذاری از آنجا تهیه شده‌اند. برای مثال در ATRI494، A بیانگر بهاره بودن ژنوتیپ است. TRI نشان‌دهنده جنس تریتیکوم است و اعداد هم کد نمونه است.

گندم از خانواده‌ی گندمیان (Gramine) و جنس تریتیکوم (*Triticum L.*) مهم‌ترین غله در تامین کالری و تغذیه بشر می‌باشد (Ijaz and Khan 2009). آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد میزان آن در ژرم‌پلاسما گیاهان و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات به‌شمار می‌رود (Zhang et al. 2002). ریزماهواره‌ها (SSR) نشانگرهای مبتنی بر PCR هستند به‌دلیل سطوح بالای چندشکلی^۱ چند الی بودن، وراثت هم‌بازر، پوشش وسیع ژنوم و سهولت در آشکارسازی، می‌توان از آن‌ها برای بررسی تنوع بین گونه‌های وحشی و زراعی استفاده کرد (Liu and Cordes 2004). محتوای اطلاعات چندشکلی به‌عنوان تخمینی از قدرت تمایز هر ریزماهواره با در نظر گرفتن تعداد و فراوانی نسبی آلل‌ها می‌باشد (Agrama et al. 2003). (Darikvand et al. 2013) ۹۲ ژنوتیپ گندم را با استفاده از ۴۰ آغازگر SSR بررسی کردند که در مجموع ۸۰ آلل شناسایی شد و میزان اطلاعات چند شکلی آغازگرها از ۰/۱۲-۰/۸۰ متغیر بوده و به‌طور میانگین برابر ۰/۵۲

¹ Polymorphism

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های گندم نان مطابق بانک ژن گیاهی کشور آلمان

ردیف	شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	مکان جمع آوری	ردیف	شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	مکان جمع آوری
۱	۲۲	ATRI1494	ترکیه	۱۹	۲۴۸	ATRI 6112	ایران
۲	۴۳	ATRI2183	ترکیه	۲۰	۲۵۹	ATRI8178	پاکستان
۳	۴۴	ATRI2184	ترکیه	۲۱	۲۶۲	ATRI8184	پاکستان
۴	۴۵	ATRI2188	ترکیه	۲۲	۲۸۷	ATRI8418	هند
۵	۶۱	ATRI2439	نپال	۲۳	۳۲۸	ATRI10002	پاکستان
۶	۶۴	ATRI2443	نپال	۲۴	۳۲۹	ATRI10005	ترکیه
۷	۸۴	ATRI2585	افغانستان	۲۵	۳۴۴	ATRI11528	عراق
۸	۱۰۲	ATRI2658	افغانستان	۲۶	۳۴۵	ATRI11530	عراق
۹	۱۵۸	ATRI3304	هند	۲۷	۳۴۶	ATRI11538	عراق
۱۰	۱۶۲	ATRI3512	هند	۲۸	۳۴۷	ATRI11545	عراق
۱۱	۱۷۹	ATRI4113	افغانستان	۲۹	۳۷۸	ATRI17558	تاجیکستان
۱۲	۱۸۳	ATRI 548	ایران	۳۰	۳۸۱	ATRI17561	تاجیکستان
۱۳	۱۸۵	ATRI 549	ایران	۳۱	۳۸۲	ATRI17562	تاجیکستان
۱۴	۱۸۷	ATRI 551	ایران	۳۲	۶۵۹	سیستان	
۱۵	۱۹۵	ATRI5581	ایران	۳۳	۶۶۲	هیرمند	
۱۶	۲۰۸	ATRI 570	ایران	۳۴	۶۷۷	مغان ۳	
۱۷	۲۱۶	ATRI 575	ایران	۳۵	۵۳۷	ATRI12922	Chinese Spring
۱۸	۲۴۳	ATRI 604	ایران				

A معرف بهاره بودن ژنوتیپ‌های گندم مطابق بانک ژن گیاهی آلمان است.

جدول ۲- محتوای اطلاعات چندشکل، آلل نادر و تعداد آلل برای ارقام مورد مطالعه با ۱۳ جفت نشانگر SSR

آلل نادر	محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)	تعداد آلل چند شکل	نام آغازگر
۴	۰/۱۸۰	۹	Xgwm95
۵	۰/۱۸۵	۱۰	Xgwm247
۱	۰/۲۶۰	۶	Xgwm639
۲	۰/۲۲۴	۷	Xgwm160
۱	۰/۱۹۰	۳	Xgwm538
۲	۰/۲۲۱	۸	Xgwm44
۲	۰/۲۰۲	۹	Xgwm67
-	۰/۳۸۵	۴	Xgwm205
۶	۰/۱۵۸	۱۱	Xgwm190
۱	۰/۳۰۱	۵	Xgwm33
۱	۰/۲۶۹	۶	Xgwm186
۱	۰/۱۰۷	۲	Xcn13
۴	۰/۱۸۶	۹	Xtaglgap
۳۰	۰/۲۲	۸۹	میانگین

تعدادی بذر در سینی‌های نشا در گلخانه دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان کشت شد. بعد از رسیدن گیاه به مرحله پنج الی شش برگگی نمونه‌های برگگی از گیاهچه‌ها گرفته شد و سپس درون ازت مایع به فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج DNA و مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراس: DNA ژنوتیپ‌ها طبق روش CTAB (Doyle and Doyle 1988) استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA ژنومی با استفاده از ژل آگارز ۸/۰ درصد تعیین شد. ۱۵ جفت آغازگر از نوع GWM بررسی (Röder et al. 2000) و آن‌هایی که الگوی بانندی بهتری داشتند انتخاب شدند. قطعات DNA تکثیرشده با استفاده از الکتروفورز عمودی و بستر ژل پلی‌اکریل‌امید شش درصد تفکیک شد. رنگ‌آمیزی و ظهور باندها با استفاده از نیترا ت نقره (Creste et al. 2001) در سه مرحله انجام شد.

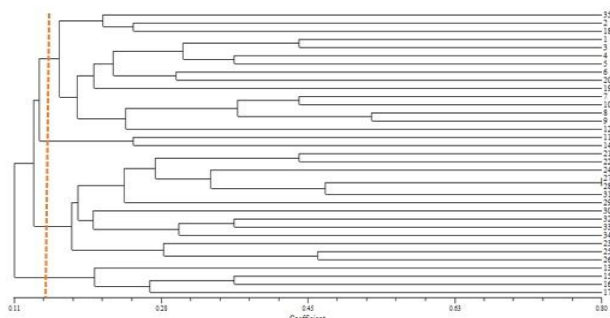
حضور باندها و عدم حضور آن‌ها به ترتیب با یک و صفر امتیازبندی شد. از نرم‌افزار NTSYS، Excel و GenALEx برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد و برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد و از الگوریتم UPGMA استفاده شد. تعیین تعداد کل آلل‌های چند شکل (برای مارکر SSR که پرایمرهای SSR دارای مکان اختصاصی هستند) و تعداد آلل‌های نادر ($P < 0.05$) با استفاده از روش (Nei, 1973) و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با رابطه $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$ با استفاده

از روش (Anderson et al. 1993) و آنالیزهایی همانند فاصله ژنتیکی و ضریب تشابه محاسبه شد.

در این پژوهش از ۱۵ جفت آغازگر ریزوماهواره جهت بررسی تنوع ژنتیکی یک جمعیت متنوع گندم نان استفاده شد. از بین آغازگرهای استفاده شده ۱۳ آغازگر در تمام ژنوتیپ‌ها مکانی برای تکثیر داشتند ولی آغازگرهای WMC420 و BARC328 باند قابل امتیازدهی تکثیر نکردند. تعداد آلل، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای ارقام گندم مورد بررسی محاسبه شد. آغازگرهای مورد استفاده در مجموع ۸۹ آلل را در تمام ژنوتیپ‌ها شناسایی و تکثیر کردند. تعداد آلل‌های مشاهده شده توسط ۱۳ نشانگر مورد استفاده بین دو تا ۱۱ بود که بیش‌ترین تعداد آلل مربوط به نشانگر *Xgwm190-5D* و کم‌ترین تعداد آلل مربوط به نشانگر *6B-Xcn13* بود. میانگین کل آلل‌های مشاهده شده در کل لوکوس‌ها ۶/۸۴ به دست آمد. تعداد آلل‌های نادر برای هر پرایمر محاسبه شد (جدول ۲). شاخص چندشکلی برای هر جایگاه در تمامی لاین‌ها مورد بررسی قرار گرفت. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)^۱ از ۰/۱۱ تا ۰/۳۸۵ با میانگین ۰/۲۲ متغیر بود که بالاترین مقدار مربوط به *Xgwm538-4B* و کم‌ترین مقدار مربوط به *Xcn13-6B* بود (جدول ۲). میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها می‌باشد.

¹ Polymorphism Information Index

ضریب کوفتیک ($r=0.73$) مربوط به زمانی بود که از روش جاکارد برای تشکیل ماتریس تشابه و از الگوریتم UPGMA برای رسم نمودار درختی استفاده شد. بنابراین نمودار درختی حاصل از این روش ملاک دسته‌بندی قرار گرفت. نمودار درختی حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش جاکارد و UPGMA در شکل شماره ۱ نشان داده شده‌است.



شکل ۱- دندروگرام ژنوتیپ‌های گندم نان (بر اساس داده‌های نشانگرهای SSR) با استفاده از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه طبقه‌بندی کرد. نتایج نمودار درختی، ارتباط نداشتن تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی را نشان داد، به‌طوری که جمعیت‌های جمع‌آوری شده در یک کشور در گروه‌ها یا زیرگروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی زیاد آن‌ها بود. از طرف دیگر بسیاری از جمعیت‌هایی که در یک گروه قرار گرفتند از مناطق جغرافیایی متفاوت بودند، که به دلیل تشابه ژنتیکی گسترده این جمعیت‌ها در مناطق مختلف بود. دو ژنوتیپ ۲۷ و ۲۸ هر دو از کشور عراق در یک شاخه قرار گرفته‌اند به معنای مشابه بودن ژنوم دو ژنوتیپ می‌باشد. (Mirdrikvand et al. 2015) در مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم نان و دوروم دیم با استفاده از نشانگرهای SSR گزارش کردند که همبستگی بین ماتریس ضرایب کوفتیک و ماتریس ضرایب تشابه جاکارد $86/0$ بود که بیانگر صحت گروه‌بندی ارقام بود. وقایعی مانند جهش، حذف و اضافه شدن قطعات در ایجاد چندشکلی‌ها دخیل می‌باشند. با توجه به اینکه نشانگرهای SSR توانست ژنوتیپ‌های مورد بررسی را تفکیک نماید، می‌توان از تنوع موجود در برنامه‌های اصلاحی گندم استفاده نمود. ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با

مقادیر بالای این معیار دلالت بر چند شکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است و بیانگر قدرت تفکیک و تمایز بالای آن نشانگر می‌باشد (Carvalho et al. 2010). محتوای اطلاعات چندشکل می‌تواند برای تعیین آغازگرهای کارآمد با بیش‌ترین چندشکلی استفاده شود. این شاخص ظرفیت هر آغازگر را در شناسایی جایگاه‌های چندشکل توصیف می‌کند. مقادیر PIC برای SSR از محدوده‌ی صفر (monomorphic) تا ۱ (polymorphic) می‌باشد (Agrama and Tuinstra et al. 2003). تفاوت در فراوانی آلل‌ها می‌تواند به عنوان یک معیار با ارزش برای هر ریزماهواره در ژنتیک جمعیت در نظر گرفته شود. (Wei et al. 2013) ۶۲ ژنوتیپ گندم را با استفاده از ۱۱۴ نشانگر SSR شناسایی کردند در مجموع ۵۴۷ آلل با میانگین $7/4$ برای هر لوکوس مشاهده کردند و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) به‌طور میانگین برابر $0/574$ بود. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که محتوای چندشکلی عدد ثابتی نداشته و بستگی به عواملی نظیر تعداد آلل در نواحی تکرارشونده و تکرارهای دی‌نوکلئوتیدی دارد، به‌طوری که در جایگاه‌های با تکرارهای دو نوکلئوتیدی چندشکلی بیش‌تری نسبت به جایگاه‌های با سه و چهار نوکلئوتیدی ایجاد می‌شود (Maccaferri et al. 1993 ; Wu et al. 2003). تعداد ژنوتیپ و تعداد آغازگر ریزماهواره همبستگی مثبتی با محتوای چندشکلی دارند (Prasad et al. 2000). بیش‌ترین میزان تشابه بر اساس ضریب نی مربوط به تعدادی از رقم‌ها معادل $0/98$ و کم‌ترین میزان تشابه معادل $0/90$ با میانگین $0/94$ مشاهده شد که این ضریب تشابه بالا حاکی از شباهت فراوان موجود بین مجموعه رقم‌های مورد بررسی بود. میانگین میزان تشابه برای ریزماهواره گندم را $0/31$ گزارش دادند (Plaschke et al. 1995). (Zargani et al. 2015) در گیاه گندم با تعداد ۹۱ لاین دابل هاپلوئید موجود به همراه دو والد آن‌ها با استفاده از نشانگرهای SSR، میانگین ضریب تشابه را $0/89$ گزارش کردند که این ضریب تشابه بالا حاکی از شباهت فراوان موجود بین مجموعه لاین‌های مورد بررسی می‌باشد. ماتریس تشابه و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA^۱ تشکیل شد. بر اساس نتایج حاصل، بالاترین

¹ Unweighted Pair Group Means Analysis (UPGMA)

ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه در این پژوهش موید امکان استفاده از این جمعیت ژنتیکی در پروژه‌های اصلاحی بعدی و انجام تلاقی بین ژنوتیپ‌ها (با رعایت به سطح پلئیدی آن‌ها)، به‌منظور بالا بردن کیفیت و کمیت عملکرد بود.

استفاده از ضریب تشابه جاکارد و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA توانست ژنوتیپ‌ها را به سه گروه طبقه‌بندی کرده و ژنوتیپ‌های گندم بهاره و زمستانه و ژنوتیپ‌های گندم نان و دوروم را از هم تفکیک نماید. همچنین این گروه‌بندی توانست فاصله ژنتیکی بین گندم‌های نان را نشان دهد. تنوع ژنتیکی و فاصله

منابع

Agrama HA, Tuinstra, MR (2003) Phylogenetic diversity and relationship among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *African Journal of Biotechnology* 2: 334-340.

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-186.

Creste, S, Neto AT, Figueria A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299-306.

Carvalho A, Lima-Brito J, Macas B, Guedes-Pinto H (2010) Genetic variability analysis of collection of old Portuguese bread wheat using ISSRs. *Options Mediterraneennes* 81: 35-38.

Darikvand R, Bihamt MR, Najafian G, Ebrahimi A (2013) Investigation of genetic diversity among bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. *Journal of Agricultural Science* 1: 122-129.

Doyle JJ, Doyle JL (1988) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

Ijaz S, Khan IA (2009) Molecular characterization of wheat germplasm using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 8: 809-815.

Liu ZJ, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.

Maccaferri M, Sanguineti MC, Donini P, 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.

Mir Drikvand R, Khyrolahi A, Ebrahimi A, Rezvani M (2015) Study of Genetic Diversity Among Some Rainfed Bread and Durum Wheat Genotypes, Using SSR Markers. *Plant Genetic research* 1:35-44. (In farsi).

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70: 3321-3323.

Plaschke J, Ganai MW, Röder MS (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1001-1007.

Prasad, M, Varsheny RK, Roy JK, Balyan HS, Gupta PK (2000) The use of microsatellite for detection DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 584-592.

Roussel V, Leisova L, Exbrayat F, Stehno Z (2005) SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 162-170.

Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganai MW (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.

Wei LI, Chun-mei B, Yu-ming W, An-jun L, Guo-yue C, Zhi-en P, Ya-xi L, You-liang ZH (2013) Evaluation of genetic diversity of Sichuan common wheat landraces in China by SSR markers. *Journal of Integrative Agriculture* 12: 1501-1511.

Wu K, Tanksley SD (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular Genetics and Genomics* 241: 225-235.

Zargani M, Ranjbar G, Abrahymnzhad N (2015) Discussion molecular analysis of genetic variation in wheat lines using SSR markers. *Journal of Crop Breeding* 15: 88-95. (In farsi).

Zhang XY, Li CW, Wang LF, Wang HM, You GX, Dong YS (2002) An estimation of the minimum number of SSR alleles needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement and production. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 67-73.