



"مقاله پژوهشی"

بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما گندم نان (*Triticum aestivum*) بر اساس جابجایی های گندم-چاودار (1AL.1RS و 1BL.1RS) با استفاده از نشانگرهای اختصاصی

حسین دشتی^۱، مژگان قلی زاده وزوانی^۲ و محمدرضا بی همتا^۳

۱- استاد گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، (نویسنده مسؤول: dashti@vru.ac.ir)

۲- دانشجوی دکترا بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۱۱

صفحه: ۱۴۰ تا ۱۵۰

چکیده

بازوی کروموزومی 1RS چاودار (*Secale cereale*) یکی از موفق ترین منابع بیگانه انتقال یافته در گندم نان است که اثرات اصلاحی قابل توجهی در گندم داشته است. شناسایی جابجایی های 1AL.1RS و 1BL.1RS در ژرم پلاسما گندم در برنامه های اصلاحی اهمیت زیادی داشته است. جهت بررسی توزیع بازوی 1RS در ۹۵۶ ژنوتیپ گندم نان از سه آغازگر اختصاصی استفاده شد. آغازگر O-SEC با تکثیر نوارهای ۱۵۳۰ و ۷۱۰ جفت باز در ۶/۶۸ درصد از ژنوتیپ ها جابجایی 1BL را شناسایی نمود و نوار ۹۰۰ و ۱۵۳۰ جفت باز را در دو ژنوتیپ تولید کرد که بیانگر حضور جابجایی از نوع 1AL است. آغازگر PAW161 در ۲۱/۸۶ درصد از ژنوتیپ ها نوار ۳۶۶ و در ۱۴/۸۵ درصد نوار ۷۵۰ جفت باز را تکثیر کرد و آغازگر RyeR3/F3 نیز در ۱۱/۲۹ درصد از ژنوتیپ ها نوار ۱۴۵۱ جفت باز را تکثیر نمود. این آغازگرها نوارهای ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۸۰۰ و ۴۰۰ جفت باز را در این جمعیت تولید کردند که در منابع گزارش نشده است. گونه آگروپیرون اینترمدیوم نیز با آغازگر PAW161، نوارهای ۳۶۶، ۷۵۰ و ۱۲۰۰ جفت باز را تکثیر نمود، احتمالاً این گونه نیز حامل قطعاتی از 1RS بوده که به گندم انتقال یافته است. به طور کلی این سه آغازگر، ژنوتیپ های مورد بررسی را به دو گروه تقسیم نمودند؛ ۶۸۶ ژنوتیپ هیچ نواری تولید نکردند و ۲۷۰ ژنوتیپ حداقل یک نوار را تکثیر نمودند و در تجزیه خوشه ای این ۲۷۰ ژنوتیپ دامنه تغییرات فاصله از ۱۰ تا ۲۵ را نشان دادند و در فاصله ژنتیکی ۱۵ به پنج گروه تقسیم شدند. به طور کلی با توجه به ارتباط این نشانگرها با تحمل به انواع تنش ها از نتایج این پژوهش می توان در برنامه های به نژادی برای تولید ارقام گندم مقاوم به تنش های زیستی و غیرزیستی و همچنین با عملکرد بالا استفاده نمود.

واژه های کلیدی: آغازگر اختصاصی، گندم، جابجایی، بازوی 1RS، آگروپیرون اینترمدیوم

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L. $2n = 6x = AABBDD$) گیاهی خودگشن و آلوپلوئید و دارای ساختار ژنومی می باشد و چاودار (*Secale cereale* L. $2n = 2x = 14$) گیاهی دگرگشن و دیپلوئید با ساختار ژنومی RR می باشد، که به عنوان یک گونه زراعی در نواحی دارای تنش های محیطی کشت می شود (۱۵). اطلاعات ژنتیکی بین دو گونه گیاهی، به وسیله وقوع جابجایی کروموزومی معاوضه می شود. بر روی بازوی کوتاه کروموزوم یک چاودار (1RS)، منابع ژنی مفیدی برای بهبود ویژگی های گندم شناسایی شده و به شکل های مختلفی (1AL.1RS، 1BL.1RS و 1DL.1RS) به کروموزوم های گروه یک گندم در طی تکامل منتقل شده است، که جابجایی 1BL.1RS نقش مهمی در اصلاح گندم دارد. چهار منبع جابجایی و جایگزینی در جهان گزارش شده، که دو مورد از این منابع جابجایی (1BL.1RS) از کشور آلمان (۱۹۳۰-۱۹۲۰)، یک منبع جابجایی از ژاپن (۱۹۶۰) و یک منبع جابجایی (1AL.1RS) از آمریکا (۱۹۷۰) می باشد، که این چهار منبع در تولید صدها رقم تجاری در کشورهای مختلف از پنج قاره جهان شرکت داشته اند (۲۳). جابجایی

1BL.1RS از ارقام گندم روسی Kavkaz و Aurora بوده که منشأ این جابجایی واریته Petkus چاودار می باشد. این جابجایی دارای ژن های مقاومت به زنگ زرد، زنگ سیاه، زنگ قهوه ای و سفیدک پودری در گندم می باشد (۲۳). منشأ جابجایی 1AL.1RS، رقم گندم Amigo است که 1AL.1RS را از واریته Insave چاودار دریافت کرده است، این جابجایی دارای ژن های مقاومت به زنگ قهوه ای، شته گندم و سفیدک پودری است (۲۵، ۲۱). لذا منشأ این جابجایی ها نیز اهمیت زیادی در خصوصیات گندم دارد، به طور کلی گزارش ها نشان داده است که ارقام حاوی 1RS مشتق شده از ارقام E12165 CMMYT و Amigo دارای عملکرد بیشتری نسبت به ارقام حاوی 1RS مشتق شده از BH1146/Blanco rye هستند (۲۷، ۱۶).

نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR زیادی برای شناسایی بازوی کروموزومی 1RS و تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما گندم استفاده شده اند (۲۹، ۲۵، ۲۰، ۱۹). ژنوتیپ گندم از ۳۵ کشور متفاوت شناسایی شده اند که دارای بازوی 1RS چاودار هستند (۲۳). توزیع 1BL.1RS در ۳۳ رقم بهاره و زمستانه گندم های ایرانی بررسی و وجود این جابجایی در ارقام فلات، اترک، رسول و مغان شناسایی شد (۱۸). همچنین حضور

و شناسایی ژنوتیپ‌های حامل بازوی کوتاه چاودار است که این ژنوتیپ‌ها می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی و مقاومت به بیماری‌ها، به‌خصوص بیماری زنگ مورد استفاده قرار گیرند و نوارهای جدیدی توسط آغازگرهای اختصاصی در ژرمپلاسزم گندم شناسایی شود.

مواد و روش‌ها

منبع ژنتیکی مورد استفاده

در این بررسی ۹۵۶ ژنوتیپ گندم نان که از مناطق مختلف ایران (خراسان، کرمانشاه، سیستان و بلوچستان، ایلام و خوزستان) و همچنین خارج از کشور (استرالیا، نیوزلند، افغانستان و ترکیه) تهیه شده بود، استفاده شد. این ژنوتیپ‌ها پس از کاشت در مزرعه تک‌خوشه (تک‌بوته) از درون آنها انتخاب و تکثیر شد و ارزیابی‌های اولیه از نظر خصوصیات زراعی و مقاومت به بیماری پاختوره بر روی آنها انجام گرفته (۹، ۱۰ و ۱۱) و اکنون بذر آنها در کلکسیون بذر دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان موجود است. این ژنوتیپ‌ها همراه با تعدادی از ارقام گندم نان (به‌عنوان شاهد) شامل رصد، فلات (دارای جابجایی کروموزومی) (۵، ۱۲ و ۲۶) و چینی بهاره (فاقد جابجایی کروموزومی) باضافه یک ژنوتیپ از گونه *Agropyron intermedium* مورد بررسی با آغازگرهای اختصاصی جابجایی‌های چاودار در گندم قرار گرفتند (جدول ۱). ژنوتیپ‌ها و ارقام در گلدان‌های کوچک پلاستیکی کشت شدند و پس از دو هفته اقدام به استخراج DNA ژنومی گیاه شد.

1BL.1RS و 1AL.1RS در ۴۴ رقم گندم ایرانی (۲۹ رقم گندم نان و ۱۵ رقم گندم دوروم) مورد بررسی قرار داده شد. نتایج نشان داد که این جابجایی در پنج رقم اترک، دز، فلات، رسول و مغان وجود دارد (۲۶). با به‌کاربردن آغازگر اختصاصی چاودار (RYER3/F3)، ارقام فلات، اترک، دز، Mv17، مهدوی و دریا حاوی جابجایی 1BL.1RS تشخیص داده شدند (۵). در ارقام گندم حامل جابجایی 1BL.1RS ژن‌های مقاومت به زنگ (Lr26, Yr9 و Sr31) در فاصله ۶/۶ سانتی‌مورگانی از Sec-1 قرار دارند (۷)، که از این پیوستگی نزدیک به عنوان نشانگری برای شناسایی این ژن‌های مقاومت استفاده شده است (۱). از طرفی حضور جایگاه ژنی 1 – Sec بیانگر حضور سکالین چاودار در گندم است لذا از این ویژگی در شناسایی بازوی 1RS بر اساس محتوای پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه استفاده می‌شود (۶). به‌طور کلی حضور جابجایی‌های چاودار در ارقام مختلف گندم موجب افزایش تحمل به تنش‌های محیطی و زیستی در این گیاه شده است؛ لذا شناسایی لاین‌ها و ژنوتیپ‌های حامل این جابجایی‌ها در ژرمپلاسزم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، تا در برنامه‌های اصلاحی گندم و تولید ارقام متحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد استفاده قرار گیرند. امروزه شناسایی جابجایی‌های چاودار در گندم از طریق نشانگرهای انجام می‌شود که دارای آغازگرهای اختصاصی است. از آنجایی که تاکنون تعداد زیادی از ژنوتیپ‌های گندم با آغازگرهای اختصاصی چاودار بررسی نشده‌اند. هدف از این پژوهش شناسایی تنوع ژنتیکی در بین ۹۵۶ ژنوتیپ گندم نان

جدول ۱- ارقام گندم شاهد مورد بررسی و محصولات تکثیر شده

ارقام	آغازگر / جابجایی / نوار تکثیری (جفت باز)		
	RyeR3/F3	O-SEC	PAW161
فلات	1RS arm	1BL.1RS و 1AL.1RS	1BL.1RS
رصد	۱۴۵۰	۱۵۳۰ و ۷۱۰	۳۶۶
چینی بهاره	۱۴۵۰	۱۵۳۰ و ۷۱۰	۳۶۶
منبع	شجره		
(۲۶، ۵)	KVZ/Buho"s"//Kal/Bb=seri82 (1369)		
(۲۶، ۵، ۱۲)	Fenkang 15*Sefid (1386)		
تمام منابع جابجایی کروموزومی 1RS چاودار	(China) LV/Sichuan		
	عدم تولید نوار	عدم تولید نوار	عدم تولید نوار

استخراج DNA و آغازگرهای مورد استفاده

استخراج DNA از برگ‌های گندم با روش CTAB (۸)، با کمی تغییر انجام گرفت. به‌منظور حذف RNA، یک میکرولیتر RNAase به هر میکروتیوب اضافه شد.

جدول ۲- جزئیات آغازگرهای اختصاصی استفاده شده برای جابجایی گندم-چاودار

آغازگر	توالی آغازگر (۵→۳)	جابجایی	منبع
RyeR3/F3	F: GATCGCCTCTTTTGCCAAGA R: TCACTGATCACAAGAGCTTG	دارای بازوی 1RS	۲۹
O-SEC5/A	F: CTATTAGTTGGAAGGCTTATGA R: GCATATGACTCAAATTATTTTT	1BL.1RS و 1AL.1RS	۳۰
PAW161	F: TGAGGGCCAGACGGCCTTTTGG R: TTATCGCAATTACAACCTCAAATTT	دارای بازوی 1RS	۲۶

و dNTPs، MgCl₂، PCR 10x، (Taq DNA Polymerase)، هفت میکرولیتر آب دیونیزه، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر و در نهایت ۲ میکرولیتر

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و شرایط آن واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نمونه‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر Master Mix (بافر

DNA ۳۰ نانوگرمی بود. شرایط PCR برای هر آغازگر در جدول ۳ نشان داده شده است. پس از پایان واکنش، برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE 1x و به منظور نمایان کردن قطعات DNA در روی ژل از Red Safe، دستگاه Gel Document و لامپ UV استفاده شد.

۳۰ نانوگرمی بود. شرایط PCR برای هر آغازگر در جدول ۳ نشان داده شده است. پس از پایان واکنش، برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر

جدول ۳- شرایط واکنش PCR برای آغازگرهای مورد استفاده

Table 3. PCR reaction conditions for the used primers

آغازگر	دما (درجه سانتی گراد)	مرحله	زمان	چرخه
Rye	۹۵	واسرشت سازی اولیه	۳ دقیقه	۳۵ چرخه
	۹۴	واسرشت	۶۰ ثانیه	
	۵۵	اتصال	۶۰ ثانیه	
	۷۲	تکثیر	۳ دقیقه	
	۷۲	بسط نهایی	۱۰ دقیقه	
PAW161	۹۵	واسرشت سازی اولیه	۳ دقیقه	۳۰ چرخه
	۹۴	واسرشت	۴۵ ثانیه	
	۶۰	اتصال	۶۰ ثانیه	
	۷۲	تکثیر	۹۰ ثانیه	
	۷۲	بسط نهایی	۵ دقیقه	
O-SEC	۹۵	واسرشت سازی اولیه	۵ دقیقه	۳۵ چرخه
	۹۴	واسرشت	۶۰ ثانیه	
	۵۰	اتصال	۶۰ ثانیه	
	۷۲	تکثیر	۳ دقیقه	
	۷۲	بسط نهایی	۱۰ دقیقه	

قدرت تفکیک (Rp) طبق فرمولهای $Rp = \sum Ibi$ و $Ibi = \frac{(\sum Ibi)}{n}$ محاسبه می‌شود. n برابر است با تعداد آل‌های هر آغازگر (۲۲).

نتایج و بحث

نتایج مربوط به آغازگر PAW161

در این آزمایش رقم رصد به‌عنوان شاهد مثبت و رقم چینی بهاره به‌عنوان شاهد منفی (فاقد جابجایی کروموزومی) مورد استفاده قرار گرفت. سه نوار ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ جفت باز با آغازگر PAW161 شناسایی شده است (۹). از بین ۹۵۶ ژنوتیپ و رقم گندم نان، فقط ۲۱۱ ژنوتیپ با آغازگر PAW161 نوار تکثیر نمودند، به‌طوری که ۲۱/۸۶ درصد از ژنوتیپ‌ها نوار ۳۶۶ جفت‌باز (معادل ۴۰۰ جفت باز) و ۱۴/۸۵ درصد نوار ۷۵۰ جفت‌باز (معادل ۸۰۰ جفت باز) را تکثیر نمودند. می‌توان بیان نمود این ژنوتیپ‌ها، حامل 1RS چاودار درون ژنوم خود می‌باشند. در این پژوهش دو نوار ۱۲۰۰ جفت‌باز در ۱۰۳ ژنوتیپ (۱۰/۷۷ درصد از کل ژنوتیپ‌ها) و ۱۵۰۰ جفت‌باز در ۳۷ ژنوتیپ (۳/۸۷ درصد از کل ژنوتیپ‌ها) از نوارهایی بودند که در هیچ منبعی ذکر نشده‌اند. در پژوهش‌های گذشته نیز، با نوع دیگری از آغازگر اختصاصی چاودار به‌نام PAW S5/S6، دو نوار ۲۳۳ و ۳۳۸ جفت باز تکثیر شد (۳۱)؛ ولی در پژوهشی در سال ۲۰۰۷ که توسط ونگ و همکاران (۳۰) انجام شده بود، بین چهار تا پنج نوار شناسایی شد؛ ولی در هر دو، دو نوار مشترک وجود داشت، که بیان داشتند که احتمالاً به شرایط آزمایش و PCR بستگی داشته باشد و همین طور امکان دارد که این ارقام از چاوداری با منشا و محل جغرافیایی متفاوتی ریشه گرفته باشند. نوار

تجزیه‌های آماری

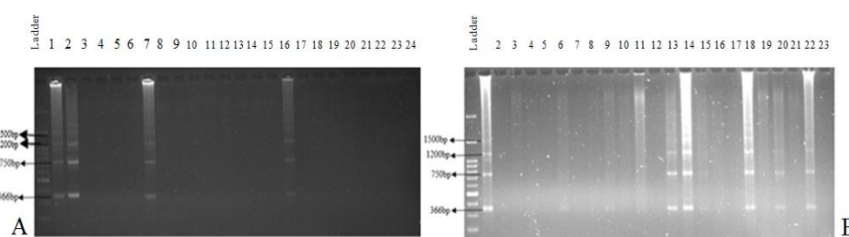
بعد از به‌کارگیری آغازگرهای مولکولی مورد استفاده، به حضور نوار، عدد یک و به عدم حضور آن عدد صفر داده شد. ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با نرم‌افزار SPSS بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده (Simple Matching) و به‌منظور انجام تجزیه خوشه‌ای و رسم دندروگرام از روش اتصال کامل استفاده شد (بر اساس فاصله ژنوتیپ‌ها). برای محاسبه درصد چندشکلی، تعداد مکان‌های دارای چندشکلی برای هر آغازگر به تعداد مکان‌های تکثیرشده توسط همان آغازگر تقسیم شد. همچنین برای محاسبه فراوانی نسبی نوارهای چندشکل تعداد نوار چندشکل تولیدشده توسط هر آغازگر به تعداد کل مکان تکثیرشده توسط همان آغازگر تقسیم شد. شاخص تنوع یک نوار (D_i) به‌صورت فرمول $D_i = 1 - \sum p_i^2$ تعریف می‌شود که در آن p_i فراوانی آمین آل (وجود نوار) می‌باشد (۱۷) و شاخص تنوع برای آغازگر عبارت است از جمع D_i های نوارهای آن آغازگر و DI متوسط شاخص تنوع برای هر آغازگر می‌باشد ($DI = \frac{(\sum D_i)}{n}$). n تعداد لوکوس‌های هر آغازگر می‌باشد.

قدرت تفکیک بر اساس توزیع آل درون ژنوتیپ‌های نمونه است. ارزش موقعیت یک نوار از طریق تطبیق آن با شرایط ایده‌آل (۵۰ درصد ژنوتیپ‌ها دارای آن نوار باشند) قابل محاسبه است. این ارزش را میزان اطلاع‌رسانی نوار (Ibi) گویند، که از صفر تا یک تغییر می‌کند و به‌صورت فرمول $Ibi = 1 - [2 \times |0.5 - Pi|]$ محاسبه می‌شود، که Pi نسبت افراد دارای نوار موردنظر است.

توانایی یک آغازگر برای تشخیص بین تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها عبارت است از مجموع Ibi های مربوط به نوارها یا مکان‌های مورد شناسایی آن آغازگر. این توانایی به‌عنوان

واریته *Insave* چاودار و گونه *Agropyron elangatum* دریافت کرده است (۲۴ و ۲۸). با توجه به این که *Agropyron intermedium* نوارهای مذکور را تکثیر نموده است، می‌توان احتمال داد که، ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارای جابجایی کروموزومی بر روی کروموزوم D نیز باشند. همان‌طور که، در پژوهش ژانگ و همکاران (۲۵)، مشخص شد که بعضی از جابجایی‌ها و جایگزینی‌ها، بر روی ژنوم D گندم و هیبرید بین گندم و *intermedium* صورت گرفته است. شکل یک نمونه‌ای از ژل آگارز ۱/۵ درصد حاصل از تکثیر DNA با آغازگر اختصاصی PAW161 را نشان می‌دهد. با صرف نظر از شرایط PCR می‌توان نوارهای ۱۲۰۰ و ۱۵۰۰ جفت‌باز تولیدشده توسط این آغازگر را به‌عنوان نوارهای جدید معرفی نمود که توسط دیگران گزارش نشده.

۲۳۳ جفت‌باز حاصل از آغازگر PAW S5/S6 از چاودار رقم *Insave* و گندم کالتیوار GRS1201 مشتق شده است (۳۱). در پژوهش ما می‌توان حضور نوارهای ۱۲۰۰ و ۱۵۰۰ جفت‌باز را به منشأ چاوداری آن مربوط دانست. وجود نوارهای ۳۶۶ و ۷۵۰ جفت‌باز به منشأ این ژنوتیپ‌ها، از واریته *Petkus* چاودار و رقم قفقاز بر می‌گردد و وجود دو نوار ۱۲۰۰ و ۱۵۰۰ جفت‌باز احتمالاً به واریته دیگری از چاودار مربوط می‌باشد. از آنجایی که در این پژوهش از *Agropyron intermedium* نیز استفاده شد، و این گونه با این آغازگر هر چهار نوار ذکر شده را تکثیر نمود، می‌توان احتمال داد که این ژنوتیپ‌ها (حامل هر چهار نوار) از ارقام بومی یک منطقه بوده که به تدریج در طی تکامل گندم در تلاقی با چاودار و گونه‌های مختلف *Agropyron*، منشأ گرفته باشند. همان‌طور که رقم *Amigo* گندم دارای جابجایی کروموزومی می‌باشد که از



شکل ۱- چندشکلی مشاهده شده در ژنوتیپ‌های گندم با بکارگیری آغازگر اختصاصی PAW161
A: شماره‌های ۱ تا ۲۴ شامل ژنوتیپ‌های رصد، ۱۶۸، ۱۸۲، ۱۵۷۶، ۴۰۵، ۱۴۸۱، ۲۰۱، ۱۵۰۷، ۵۶۶-۲، ۵۶۸، ۷۴۳، ۱۴۰۸، ۴۷۸، ۹۶۰، ۱۷۹۹، ۸۴۴، ۴۰۶، ۱۸۷۸، ۵۹۷، ۲۰۳، ۸۸۶، ۲۰۳۱، ۱۴۳، چینی بهاره
B: شماره‌های ۱ تا ۲۳ شامل ژنوتیپ‌های رصد، ۹۰۱۹، ۲۰۲۷، ۹۴۲، ۴۱۲، ۹۰۱۰، ۱۴۴۰، ۴۱۷، ۱۹۰۲، ۹۵۲، ۸۷۴، ۳۷۹۵، ۵۲۷، ۵۸۵، روشن، ۱۴۱۹، ۲۰۷۶، ۲۰۳، ۴۰۳، ۱۱-۱۱۳، ۶۶۱، فلات، چینی بهاره
Figure 1. Polymorphism observed in wheat genotypes using specific primer PAW161
A: 1 - 24 Number of genotype including: Rasad, 168, 182, 1576, 405, 1481, 201, 1507, 566-2, 568, 743, 1408, 478, 960, 1799, 844, 406, 1878, 597, 203, 886, 2031, 143, Chinese Spring
B: 1 - 23 Number of genotype including: Rasad, 9019, 2027, 942, 412, 9010, 1440, 417, 1902, 952, 874, 3795, 527, 585, Roshan, 1419, 2076, 723, 403, 11-113, 661, Falat, Chinese Spring

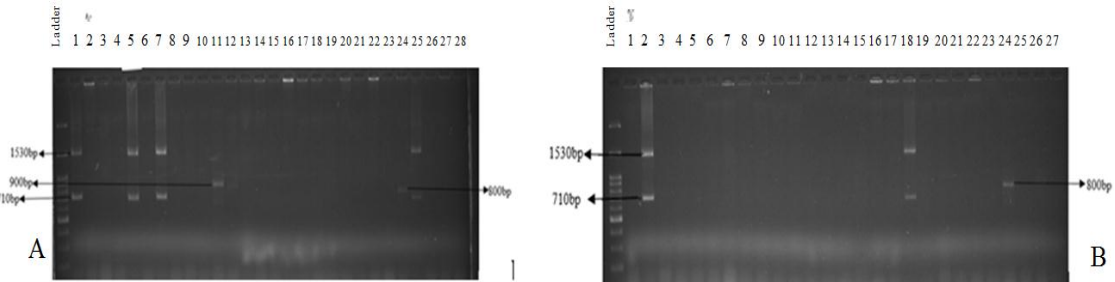
چاودار (غیر از *Petkus* و *Insave*) مربوط دانست یا می‌توان حضور این نوارهای اضافه را به ارقام وحشی و خوشاوندان نزدیک گندم طی تکامل در تلاقی با گندم بوده‌اند، نسبت داد، همچنین می‌توان احتمال داد که نوار ۹۰۰ جفت باز، همان نوار ۱۰۹۵ جفت‌باز باشد که در طول زمان در نتیجه حذف (Deletion) بازهای آلی (آدنین، سیتوزین، گوانین و تیمین) قرار گرفته باشد، همان‌طور که در بعضی منابع مختلف در خصوص آغازگر PAW161 نوارهای ۳۵۰، ۴۰۰ و ۳۶۶ جفت‌باز اشاره نموده‌اند که همگی حاکی از وجود بازوی 1RS در ژنوم گندم است (۳، ۱۳، ۲۶). با این توصیف می‌توان گفت از بین ۹۵۶ ژنوتیپ گندم مورد بررسی دو ژنوتیپ ۴۰۴ و ۲۱۶۱ دارای دو نوار ۹۰۰ و ۱۵۳۰ جفت‌باز می‌باشند، که احتمالاً دارای جابجایی از نوع AL باشند، این جابجایی در ارقام بسیار کمی شناسایی شده است، ارقام گندم ایرانی فقط رقم شعله دارای این نوع جابجایی می‌باشد (۴). و از آنجایی که هیچ کدام از این دو ژنوتیپ دارای نوار ۷۱۰ جفت‌باز (جابجایی از نوع BL) نیستند، می‌توان این احتمال را پذیرفت، ولی اظهار نظر قطعی نیازمند تکرار آزمایش و بررسی توالی این دو ژنوتیپ و مقایسه توالی با رقم شعله و TAM107 (دارای

نتایج مربوط به آغازگر O-SEC5/A

۸۳ ژنوتیپ (۶/۶۸ درصد) از ژنوتیپ‌های مورد بررسی، نوارهای ۷۱۰ و ۱۵۳۰ جفت‌باز را تکثیر نمودند، که می‌توان گفت این ارقام دارای جابجایی کروموزومی از نوع 1BL.1RS و با منشأ واریته *Petkus* چاودار و ارقام گندم روسی *Kavkaz* و *Aurora* می‌باشند. آغازگر اختصاصی O-SEC، بر اساس ژن‌های امگاسکالین در جایگاه ژنی *Sec-1* طراحی شده است. این جایگاه روی ناحیه ماهواره کروموزوم یک چاودار واقع است. این آغازگر قادر به شناسایی جابجایی 1AL.1RS و 1BL.1RS است (۲۵). می‌توان گفت که تکثیر قطعات موردنظر با این آغازگر، بیانگر وجود احتمالی ژن‌های Lr26، Sr31 و Yr9 در اثر جابجایی 1RS با گروه همپولوگ شماره یک گندم می‌باشد. طبق مطالعات گذشته، این آغازگر برای جابجایی 1AL.1RS دو نوار ۱۵۳۰ و ۱۰۹۵ جفت‌باز و برای جابجایی 1BL.1RS دو نوار ۱۵۳۰ و ۷۱۰ جفت‌باز را تکثیر می‌نماید. نوارهای ۱۰۹۵ و ۷۱۰ جفت‌باز از نوارهایی هستند که بین این دو جابجایی تمایز ایجاد می‌کنند (۳۰). حضور نوار ۸۰۰ جفت‌باز در ۰/۷۳ درصد و حضور نوار ۹۰۰ جفت‌باز در ۰/۴۱ درصد از ژنوتیپ‌ها را می‌توان به واریته دیگری از

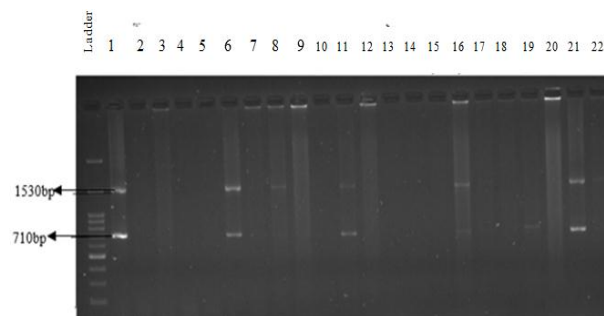
گندم ایرانی و ۷۰ رقم بومی خارجی مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های مقاومت به زنگ (زنگ قهوه‌ای، زنگ زرد و زنگ سیاه) به واسطه حضور *Sec-1* در ۱۵ رقم ایرانی و دو رقم خارجی مورد تایید قرار گرفت (۴). جایگاه ژنی *Sec-1* روی بازوی 1RS، رمزکننده دو نوع پروتئین ذخیره‌ای دانه به نام‌های ω -secalins و γ -secalins است (۱۴). در ارقام گندم حامل جابجایی 1BL.1RS ژن‌های مقاومت به زنگ (Yr9 و Lr26، Sr31) در فاصله ۶/۶ سانتی‌مورگانی از *Sec-1* قرار دارند (۷)، که از این پیوستگی نزدیک به عنوان نشانگری برای شناسایی این ژن‌های مقاومت استفاده شده است (۱).

جابجایی از نوع 1AL.1RS می‌باشد. تکثیر نواری ۱۵۳۰ جفت‌باز در ۸۳ ژنوتیپ (۸/۶۸ درصد) بیانگر حضور ژن *Sec-1* در ژنوتیپ‌های حامل این جابجایی است. از آنجایی که ژن‌های مقاومت به بیماری‌های زنگ و سفیدک پودری با این ژن پیوستگی نزدیکی دارند (۷)، این ۸۳ ژنوتیپ می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی برای مقاومت به بیماری زنگ مورد استفاده قرار گیرند. شکل‌های ۲ و ۳، نمونه‌ای از ژل آگارز ۱/۵ درصد حاصل از تکثیر DNA با آغازگر اختصاصی O-SEC5/A را نشان می‌دهد. در آزمایشی حضور *Sec-1* با استفاده از آغازگر اختصاصی چاودار (O-SEC) در ۶۶ رقم



شکل ۲- چندشکلی مشاهده شده در ژنوتیپ‌های گندم با به کارگیری آغازگر اختصاصی O-SEC
A: شماره‌های ۱ تا ۲۸ شامل ژنوتیپ‌های رصد، چینی بهار، ۸۲۶، ۷۸۶، ۸۴۵، ۱۴۸۵-۱، ۱۴۱۶-۲، ۱۵۲۷-۱، ۸۵، ۹۶۱، ۷۶۴، ۲۰۶۹، ۹۱۷، ۲۰۵۹، ۹۵۳، ۵۸۸، ۶۷۳، ۶۲۴، ۹۰۵۴، ۷۸۷، ۱۴۴۷، ۶۲، ۱۴۸۶-۲، ۹۰۵۲، ۹۰۴۷، ۶۱، ۹۰۱۵، ۸۰۳۵
B: شماره‌های ۱ تا ۲۷ شامل ژنوتیپ‌های چینی بهار، رصد، ۴۲، ۱-۶۲۶، ۶۰۳، ۶۲۲، ۴۰۹، ۹۱۶، ۹۰۱۸، ۶۹۹، ۵۲۳، ۱۵۶۳، ۶۰۱، ۹۲۱، ۵۷۹، ۹۰۶، ۱۸۹۸، ۱۸۹۷، ۲۱۰۹، ۴۲۲، ۱-۹۶۳، ۲۰۵۰، ۸۶۱، ۹۱۸، ۴۷، ۱۴۱۶، ۱۰۸-۱

Figure 2. Polymorphism observed in wheat genotypes using specific primer O-SEC
A: Numbers 1 – 28 include genotypes: Rasad, Chinese Spring, 826, 786, 845, 1485-1, 1416-2, 1527-1, 85, 961, 764, 2069, 917, 8035, 9015, 61, 9047, 9052, 1486.2, 62, 1447, 787, 9054, 624, 673, 588, 953, 2059.
B: Numbers 1 – 27 include genotypes: Chinese Spring, Rasad, 42, 676-1, 603, 622, 409, 916, 9018, 699, 523, 1563, 601, 921, 579, 906, 1898, 1897, 2109, 422, 963-1, 2050, 861, 918, 47, 1416, 108-1



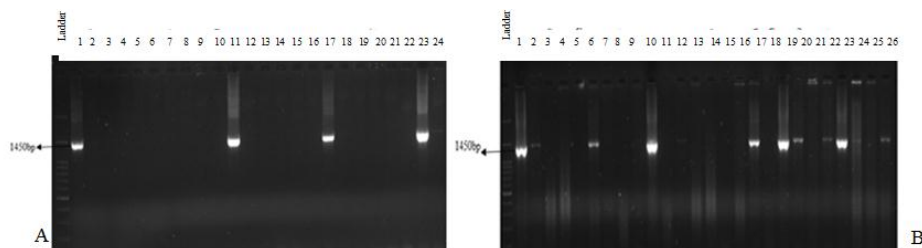
شکل ۳- چندشکلی مشاهده شده در ژنوتیپ‌های گندم با به کارگیری آغازگر اختصاصی O-SEC
شماره‌های ۱ تا ۲۲ شامل ژنوتیپ‌های رصد، چینی بهار، ۹۰۱۰، ۲۱۵۵، ۱۹۰۰، ۷۲۳، ۶۱۲، ۵۲۷، ۱۸۱، ۳۷۹۵، ۵۸۵، ۶۶۱، ۴۱۲، ۹۴۲، ۲۰۷۶، ۱۱۳-۱۱، ۱۰۴، ۱۴۶۸، ۱۵۵۵، ۸۷۴، فلات، روشن

Figure 3. Polymorphism observed in wheat genotypes using specific primer O-SEC
Numbers 1 – 22 include genotypes: Rasad, Chinese Spring, 9010, 2155, 1900, 723, 612, 527, 181, 3795, 585, 661, 412, 942, 2076, 11-113, 104, 1468, 1555, 874, Falat, Roshan

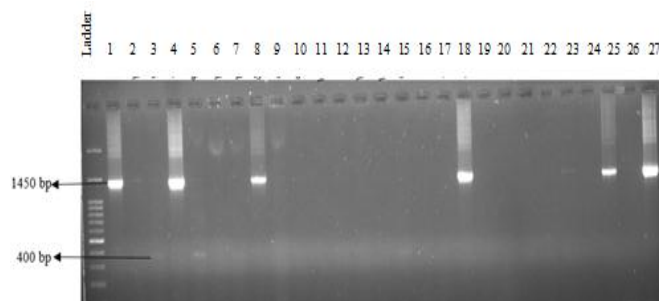
نواحی تکراری و ترانسپوزون می‌باشد و همچنین این آغازگر بر اساس نواحی رتروترانسپوزونی چاودار که وارد ژنوم گندم شده است، طراحی شده است (۱۵)، می‌توان از این آغازگر برای شناسایی نواحی رتروترانسپوزونی گندم و شناسایی توالی آن برای اهداف خاص (مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده) استفاده نمود.

نتایج مربوط به آغازگر Rye3/F3

۱۱/۲۹ درصد از ژنوتیپ‌های مورد بررسی بازوی کروموزومی 1RS را حمل می‌کنند (تکثیر نواری ۱۴۵۰ جفت‌باز). ۴۹ ژنوتیپ (۵/۱۲ درصد) هم نواری در محدوده ۴۰۰ جفت باز تکثیر نمودند. شکل‌های چهار و پنج نمونه‌ای از ژل حاصل از تکثیر DNA، با آغازگر اختصاصی RyeF3/R3 را نشان می‌دهد. از آنجایی که بیش از ۸۰ درصد از ژنوم گندم



شکل ۴- چندشکلی مشاهده شده در ژنوتیپ‌های گندم با به کارگیری آغازگر اختصاصی RyeR3/F3
 A: شماره‌های ۱ تا ۲۴ شامل ژنوتیپ‌های رصد، چینی بهار، ۱۷۹۹، ۱۸۷۸، ۱۴۸، ۲۰۷، ۹۰۱۹، ۱۵۷۶، ۴۷۸، ۲۰۳۱، ۱۳۷، ۱۴۸۵، ۲۰۸۷، ۵۹۱، ۹۴۱، ۴۰۶، ۱۴۶۰، ۷۸۱، ۱۸۲، ۵۶۶-۲، ۵۵۵، ۸۴۵، ۲۰۱، ۵۶۷
 B: شماره‌های ۱ تا ۲۶ شامل ژنوتیپ‌های رصد، ۱۰۴، چینی بهار، ۹۴۲، ۳۷۹۵، ۵۲۷، ۸۹۰، ۱۹۰۰، ۸۸۶، ۹۴۷، ۱۱۶، ۵۵۰، ۶۱۲، ۹۰۱۹، ۲۰۵۷، ۱۵۳۲، ۱۱-۱۱۳، ۲۱۵۵، ۷۲۲، روشن، ۹۵۲، ۹۵۰، ۵۸۵، ۸۷۴، ۶۶۱، ۱۶۸
 Figure 4. Polymorphism observed in wheat genotypes using specific primer RyeR3/F3
 A Numbers 1 – 24 include genotypes: Rasad, Chinese Spring, 1799, 1878, 148, 207, 9019, 1576, 478, 2031, 137, 1485, 2087, 591, 941, 1460, 781, 182, 566-2, 555, 845, 201, 567
 B Numbers 1 – 26 include genotypes: Rasad, 104, Chines Spring, 942, 3795, 527, 890, 1900, 886, 947, 116, 550, 612, 9019, 2057, 1532, 11-113, 2155, 722, Roshan, 952, 950, 585, 874, 661, 168



شکل ۵- چندشکلی مشاهده شده در ژنوتیپ‌های گندم با به کارگیری آغازگر اختصاصی RyeR3/F3
 شماره‌های ۱ تا ۲۷ شامل ژنوتیپ‌های رصد، ۱۴۱۶، ۱۴۱۶، ۱۵۷۸، ۹۱۸، ۲-۱۴۸۶، ۱۴۲۳، ۵۳۰، ۱-۹۶۳، ۹۵۳، ۵۲۷-۱، ۸۳۶، ۱۷۹۷، ۱۴۴۷، ۹۶۵، ۷۸۷، ۴۰۷، ۱۸۹۹، ۷۶۴، ۹۹۹، ۷۰، ۹۰۳، ۳۷۸۴، ۶۷۲، ۵۲۳، ۶۶۸-۲
 Figure 5. Polymorphism observed in wheat genotypes using specific primer RyeR3/F3
 Numbers 1 – 27 include genotypes: Rasad, 1416-2, 1416, 1578, 918, 1486-2, 1423, 530, 963.1, 953, 527-1, 836, 1797, 1447, 965, 787, 407, 1899, 764, 699, 695, 70, 9003, 3784, 672, 523, 668.2

احتمالا وجود این نوارها (۱۲۰۰ و ۱۵۰۰ جفت‌باز) که در ژنوتیپ آگروپیرون هم مشاهده شد را می‌توان به منشأ این ژنوتیپ‌ها از وارسته دیگری از چاودار یا حتی ارقام وحشی و خویشاوندان نزدیک به گندم نان که با چاودار تلاقی یافته‌اند، دانست.

جدول ۴، ژنوتیپ‌های دارای نوار جدید با سه آغازگر اختصاصی چاودار را نشان می‌دهد که در هیچ منبعی ذکر نشده است. البته معرفی نوارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ جفت‌باز به عنوان نوار جدید مستلزم تکرار آزمایش می‌باشد، ولی نوارهای ۱۲۰۰ و ۱۵۰۰ از جمله نوارهایی می‌باشند، که با تکرار آزمایش نیز این نوارها تکثیر شده‌اند.

جدول ۴- شماره ژنوتیپ‌هایی که نوار جدیدی با نشانگرهای اختصاصی چاودار تولید کردند

Table 4. The Number of genotypes that produced new bands with rye-specific primers

ویژگی	ژنوتیپ
نوار ۴۰۰ جفت‌باز در آغازگر RyeR3/F3	۲۰۲۷، ۱۴۹۸، ۲-۷۵۲، ۲۱۵۲، ۱۶۱۹، ۱۵۸۶، ۱۵۳۷، ۱۵۳۱، ۹۴۱، ۸۹۳، ۸۶۵، ۱۹۰۲، ۱۵۵۵، ۶۷۱، ۷۳۲، ۹۱۸، ۲۱۶۱، ۵۶۷، ۲۲۰۱، ۲-۸۰۴۰، ۲-۸۰۴۰، ۵۹۸، ۲۰۴۳، ۱-۱۹۶، ۲۱۱، ۷۴۵، ۲-۸۵۱، ۷۱۱، ۱۴۱۹، ۱۵۹۹، ۲-۲۰۲۹، ۲-۲۰۴۰، ۱-۸۰۴۰، ۲-۲۶، ۱۷۶، ۱-۴۲۶، ۴۳۱، ۵۰۸، ۶۱۹، ۷۳۳، ۸۵۸، ۱-۸۶۰، ۹۲۵، ۹۳۴، ۹۶۵، ۲-۱۴۹۱، ۲۰۴۷، ۲۱۳۸، ۲۲۰۸، ۲۲۰۶، ۲۰۳۷، ۸۰۳۲، ۸۸۷، ۷۲۸، ۶۲۴، ۲۰۶۹، ۲۱۶۱، ۶۶۹
	۶۷۳، ۶۷۳، ۲-۶۶۸، ۶۶۰، ۵۵۹، ۵۸۵، ۵۳۰، ۲۰۱، ۱۸۰، ۱۶۸، ۱۳۷، ۲۰۶۹، ۶۶۹، ۴۰۴، ۲۰۴۳، ۲-۷۵۲، ۶۷۱، ۷۳۲، ۶۷۳، ۷۰۵، ۷۰۵، ۸۴۶، ۸۴۶، ۷۰۸، ۹۳۷، ۱۳۸۱، ۱۳۹۸، ۲-۱۴۱۶، ۱۴۶۰، ۲-۱۵۲۷، ۹۰۱۱، رصد، ۱۱-۱۱۳، ۲۷، ۴۱۱، ۴۱۴، ۴۲۹/۳، ۸۴۵، ۸۵۳، ۹۴۷، ۹۵۰، ۱۳۸۷، ۱۴۷۹، ۱۵۹۵، ۱۸۸۲، ۱۸۹۷، ۱۸۹۹، ۹۰۰۴، فلات، ۶۹۳، ۲-۵۶۶، ۷۴۲، ۱۲۲، ۴۲۵، ۵۲۶، ۵۷۲، ۷۳۱، ۷۵۳، ۹۶۲، ۳۳، ۱۱۹، ۴۲۳، ۱۵۸۴، ۱۰۴، ۱۳۲، ۵۰۷، ۵۵۳، ۵۳۴، ۷۳۴، ۷۸۹، ۱۴۰۳، ۱-۱۹، ۲۰۵۳، ۲۰۹۴، ۲۰۹۷، ۵۷۳، ۲۰۸۶، آگروپیرون اینترمدیوم، ۱۶، ۱۷۲، ۴۷۸، ۵۰۱، ۵۱۵، ۵۱۶، ۵۲۸، ۵۷۸، ۶۱۲، ۶۱۷، ۱-۶۴۵، ۱-۶۶۶، ۲-۶۶۶، ۸۸۰، ۹۲۶، ۱۴۴، ۱۹۰۰، ۲۰۴۸، ۲۰۵۷، ۲-۲۱۴۶، ۲-۲۱۴۷، ۳۷۹۵، ۳۷۹۷، ۳۸۰۷، ۳۸۰۸
	۷۰۸، ۷۰۵، ۶۹۸، ۶۷۳، ۶۷۲، ۲-۶۶۸، ۶۶۰، ۶۵۹، ۵۸۵، ۵۳۰، ۲۰۱، ۱۸۰، ۱۶۸، ۱۳۷، ۲۰۶۹، ۶۶۹، ۴۰۴، ۲-۷۵۲، ۷۳۲، ۸۴۶، ۸۴۶، ۱۳۸۱، ۱۳۹۸، ۲-۱۴۱۶، ۱۴۶۰، ۲-۱۵۲۷، ۹۰۱۱، رصد، ۱۱-۱۱۳، ۲۷، ۴۱۱، ۴۱۴، ۴۲۹/۳، ۸۴۵، ۸۵۳، ۹۴۷، ۹۵۰، ۱۳۸۷، ۱۴۷۹، ۱۵۹۵، ۱۸۸۲، ۱۸۹۷، ۱۸۹۹، ۹۰۰۴، فلات، ۶۹۳، ۲-۵۶۶، ۷۴۲، ۱۲۲، ۴۲۵، ۵۲۶، ۵۷۲، ۷۳۱، ۷۵۳، ۹۶۲، ۳۳، ۱۱۹، ۴۲۳، ۱۵۸۴، ۱۰۴، ۱۳۲، ۵۰۷، ۵۵۳، ۵۳۴، ۷۳۴، ۷۸۹، ۱۴۰۳، ۱-۱۹، ۲۰۵۳، ۲۰۹۴، ۲۰۹۷، ۵۷۳، ۲۰۸۶، آگروپیرون اینترمدیوم
نوار ۱۲۰۰ جفت‌باز در آغازگر PAW161	۷۰۸، ۷۰۵، ۶۹۸، ۶۷۳، ۶۷۲، ۲-۶۶۸، ۶۶۰، ۶۵۹، ۵۸۵، ۵۳۰، ۲۰۱، ۱۸۰، ۱۶۸، ۱۳۷، ۲۰۶۹، ۶۶۹، ۴۰۴، ۲-۷۵۲، ۷۳۲، ۸۴۶، ۸۴۶، ۱۳۸۱، ۱۳۹۸، ۲-۱۴۱۶، ۱۴۶۰، ۲-۱۵۲۷، ۹۰۱۱، رصد، ۱۱-۱۱۳، ۲۷، ۴۱۱، ۴۱۴، ۴۲۹/۳، ۸۴۵، ۸۵۳، ۹۴۷، ۹۵۰، ۱۳۸۷، ۱۴۷۹، ۱۵۹۵، ۱۸۸۲، ۱۸۹۷، ۱۸۹۹، ۹۰۰۴، فلات، ۶۹۳، ۲-۵۶۶، ۷۴۲، ۱۲۲، ۴۲۵، ۵۲۶، ۵۷۲، ۷۳۱، ۷۵۳، ۹۶۲، ۳۳، ۱۱۹، ۴۲۳، ۱۵۸۴، ۱۰۴، ۱۳۲، ۵۰۷، ۵۵۳، ۵۳۴، ۷۳۴، ۷۸۹، ۱۴۰۳، ۱-۱۹، ۲۰۵۳، ۲۰۹۴، ۲۰۹۷، ۵۷۳، ۲۰۸۶، آگروپیرون اینترمدیوم
نوار ۱۵۰۰ جفت‌باز در آغازگر PAW161	۷۰۸، ۷۰۵، ۶۹۸، ۶۷۳، ۶۷۲، ۲-۶۶۸، ۶۶۰، ۶۵۹، ۵۸۵، ۵۳۰، ۲۰۱، ۱۸۰، ۱۶۸، ۱۳۷، ۲۰۶۹، ۶۶۹، ۴۰۴، ۲-۷۵۲، ۷۳۲، ۸۴۶، ۸۴۶، ۱۳۸۱، ۱۳۹۸، ۲-۱۴۱۶، ۱۴۶۰، ۲-۱۵۲۷، ۹۰۱۱، رصد، ۱۱-۱۱۳، ۲۷، ۴۱۱، ۴۱۴، ۴۲۹/۳، ۸۴۵، ۸۵۳، ۹۴۷، ۹۵۰، ۱۳۸۷، ۱۴۷۹، ۱۵۹۵، ۱۸۸۲، ۱۸۹۷، ۱۸۹۹، ۹۰۰۴، فلات، ۶۹۳، ۲-۵۶۶، ۷۴۲، ۱۲۲، ۴۲۵، ۵۲۶، ۵۷۲، ۷۳۱، ۷۵۳، ۹۶۲، ۳۳، ۱۱۹، ۴۲۳، ۱۵۸۴، ۱۰۴، ۱۳۲، ۵۰۷، ۵۵۳، ۵۳۴، ۷۳۴، ۷۸۹، ۱۴۰۳، ۱-۱۹، ۲۰۵۳، ۲۰۹۴، ۲۰۹۷، ۵۷۳، ۲۰۸۶، آگروپیرون اینترمدیوم

بررسی چندشکلی آغازگرهای اختصاصی در شناسایی

ژنوتیپ‌های دارای جابجایی کروموزومی گندم-چاودار
آغازگرهای اختصاصی چاودار (PAW-161، O-SEC و RyeR3/F3) ۹۵۶ ژنوتیپ مورد بررسی را به دو گروه تقسیم نمودند. با استفاده از ۳ آغازگر اختصاصی چاودار روی ۹۵۶ ژنوتیپ گندم نان، ۸۲۰ نوار تولید شد که از ۱۰ مکان ژنی تکثیر گردیدند. تمامی آغازگرها، دارای درصد چندشکلی برابر با ۱۰۰ درصد بودند. آغازگر PAW161 با بیشترین نوار تولید شده (۴۹۱) دارای متوسط نوار بیشتری نسبت به دو آغازگر دیگر بود. میانگین تعداد نوار هر آغازگر مناسب بودن هر مکان

ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد و آغازگرهایی که بیشترین متوسط نوار در هر مکان را داشته باشند، آغازگرهایی مناسب برای مطالعه تنوع ژنتیکی حاصل از جابجایی‌های صورت گرفته از 1RS بدخل گندم می‌باشند. متوسط شاخص تنوع یکی از معیارهای توان تمایز آغازگرها بود که مستقل از تعداد نمونه مورد مطالعه می‌باشد. به‌طور کلی می‌توان گفت که آغازگر PAW161 با بیشترین متوسط نوار در مکان، شاخص تنوع و قدرت تفکیک بالا به‌عنوان مناسب‌ترین آغازگر در شناسایی قطعات چندشکلی و بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشد (جدول ۵).

جدول ۵- تعداد کل نوار، تعداد مکان تکثیرشده، متوسط نوار در مکان، تعداد مکان‌های چندشکلی، درصد لوکوس‌های چند شکل، متوسط شاخص تنوع و قدرت تفکیک برای سه آغازگر مورد مطالعه

Table 5. Number of total bands, Number of amplified locus, The average of band in locus, Number of polymorphic locus, percent of polymorphic loci, average of diversity index and separation power for the three used primers

آغازگر	تعداد کل نوار	تعداد مکان تکثیر شده	متوسط نوار در مکان	تعداد نوار چندشکلی	درصد چندشکلی	متوسط شاخص تنوع	قدرت تفکیک
PAW161	۴۹۱	۴	۱۲۲/۷۵	۴	۱۰۰	۰/۲۱۵	۱/۰۲۷
O-SEC	۱۷۲	۴	۴۳	۴	۱۰۰	۰/۰۸۲	۰/۳۵۹
Rye	۱۵۷	۲	۷۸/۵	۲	۱۰۰	۰/۰۷۴	۰/۳۲۸

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی چاودار

۹۵۶ ژنوتیپ مورد بررسی با نشانگرهای اختصاصی چاودار به‌طور کلی به دو گروه تقسیم شدند؛ ۶۸۶ ژنوتیپ با هیچ یک از نشانگرهای اختصاصی نوار تولید نمودند و ۲۷۰ ژنوتیپ حداقل یک نوار تولید نمودند. ۲۷۰ ژنوتیپی که تولید نوار نمودند برای رسم دندروگرام انتخاب شدند. ابتدا ماتریس تشابه با ضریب تطابق ساده (Simple matching) تشکیل و سپس دندروگرام به‌روش اتصال کامل و بر اساس فاصله ژنوتیپ‌ها رسم شد (شکل ۶). تنوع بالایی بین ژنوتیپ‌های گندم با این سه آغازگر اختصاصی چاودار مشاهده می‌شود. دامنه فاصله از ۱۰٪ تا ۲۵٪ متغیر است. ژنوتیپ‌ها در فاصله ژنتیکی ۱۵ در پنج گروه قرار گرفتند (شکل ۶). اعضای هر گروه در جدول ۸ نشان داده شده است. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای این پنج گروه به‌عنوان پنج جمعیت انجام شد و میانگین مربعات بین جمعیت‌ها در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار بود (جدول ۶). تنوع زیادی بین گروه‌ها وجود داشت. ۶۵٪ از واریانس کل مربوط به تفاوت بین گروه‌ها بود.

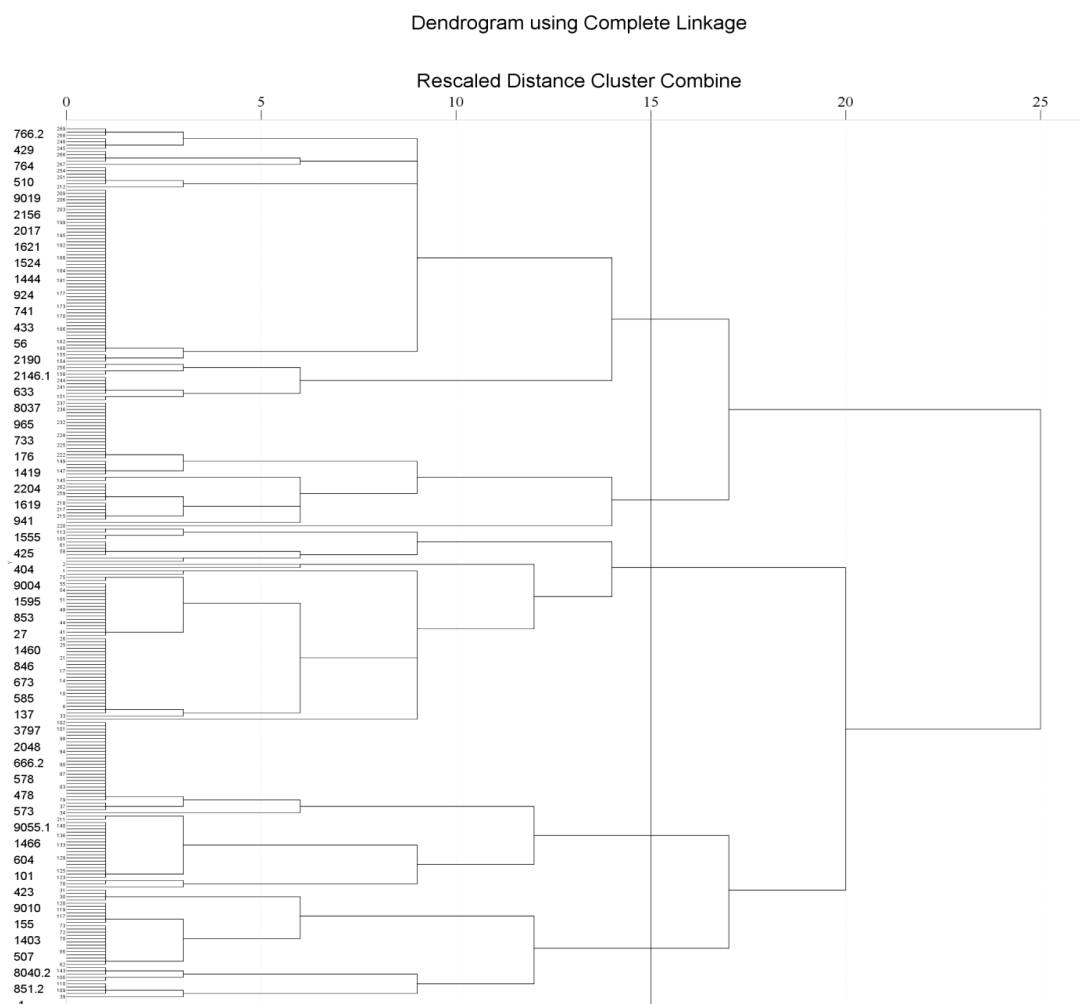
تنوع ژنتیکی بین و درون گروه‌ها می‌تواند برای انتخاب والدین جهت انجام تلاقی مورد استفاده قرار گیرند، که آغازگرهای مولکولی که تفاوت‌ها را در سطح ژنوم مشخص می‌نمایند در این باره به متخصص اصلاح‌نباتات کمک زیادی می‌نمایند. احتمالاً گروه‌بندی این ژنوتیپ‌ها را می‌توان به ژنتیک و منشا جغرافیایی آنها نسبت داد، همان‌طور که در پژوهشی با غربالگری ۳۳۳ کالتیوار گندم که دارای جابجایی و جایگزینی کروموزومی بودند، نتیجه گرفته شد که گندم‌های مورد بررسی بر اساس قاره، کشور مبدأ و سال معرفی طبقه‌بندی می‌شوند و بیان شد که منابع جابجایی مختلف، ژنتیک و منشا جغرافیایی متفاوتی نیز دارند (۲۳). در پژوهش دیگری روی تنوع ژنتیکی ۱۱۱ رقم گندم بر اساس جابجایی

کروموزومی، با به‌کارگیری ۷۰۰۰ نشانگر DArT، تنها ۱۶۳۷ نشانگر چندشکلی بودند. در این پژوهش، ماتریس تشابه به‌روش جاکارد و رسم دندروگرام به روش UPGMA بر اساس فاصله ارقام رسم شد و ارقام گندم بر اساس وجود قطعات کروموزومی و منشا جغرافیایی به دو گروه و شش زیر گروه تقسیم شدند. تجزیه واریانس مولکولی بیانگر اختلاف معنی‌دار بین و درون گروه‌ها بود (۳۱).

در پژوهش حاضر، گروه‌های یک و پنج بیشترین تنوع داخل گروهی را داشتند (جدول ۷). ژنوتیپ‌های گروه یک، ژنوتیپ‌هایی هستند که همزمان با هر سه آغازگر اختصاصی چاودار تولید نوار نموده‌اند. ۸۸/۲۳ درصد از ژنوتیپ‌های گروه پنج (۷۵ ژنوتیپ) از ژنوتیپ‌هایی هستند که با آغازگر PAW161 تولید یک نوار در محدوده ۳۶۶ جفت‌باز و با آغازگر RyeR3/F3 تولید یک نوار در محدوده ۱۴۵۱ جفت‌باز را نمودند. این آغازگرها قادر به شناسایی نواحی رتروترانسپوزونی هستند که در نواحی تلومری کروموزوم تمرکز بیشتری دارند. نوار تکثیرشده در محدوده ۱۴۵۱ جفت‌باز مربوط به رتروترانسپوزون gypsy-like می‌باشد. که از توالی‌های رمزکننده برای ژن‌های رونوشت‌بردار معکوس، توالی‌های تکراری انتهایی، جایگاه اتصال آغازگر و ناحیه غنی از پورین می‌باشد (۱۵، ۲) و آغازگر PAW161 با تکثیر نوار ۳۵۰ جفت‌باز (در پژوهش ما ۳۶۶ جفت‌باز) قادر به شناسایی نواحی تلومری چاودار هست (۳). همچنین در این گروه، تعدادی از ژنوتیپ‌ها یک نوار ۱۵۳۰ جفت‌باز با آغازگر O-SEC تکثیر نمودند. انتقال قطعات کروموزومی چاودار به گندم منجر به مقاومت گندم به بیماری‌ها می‌شود، و پژوهش‌های قبلی نیز اثبات نموده است که وجود نوار ۱۵۳۰ جفت‌باز به مقاومت به بیماری‌های زنگ گندم رابطه دارد و همچنین از آنجایی که از رتروترانسپوزون‌ها برای شناسایی ژن‌های جدید و نقشه‌یابی ژنتیکی استفاده زیادی می‌شود، از

علاوه بر این، می‌توان در پژوهش‌های بعدی ارتباط هریک از این گروه‌ها و نوارها را با مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از طریق تجزیه ارتباط بررسی نمود.

ژنوتیپ‌های گروه پنج با اهداف مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده و با به‌کارگیری مارکرهای مولکولی پیشرفته‌تر (SNP، dArT، رتروترانسپوزونی) به منظور انجام نقشه‌یابی ژنتیکی، می‌توان مکان ژن‌های مقاومت را شناسایی نمود.



شکل ۶- دندروگرام ۲۷۰ ژنوتیپ و رقم گندم نان براساس نوارهای تولیدشده توسط آغازگرهای اختصاصی (به‌روش اتصال کامل و ضریب تشابه تطابق ساده)

Figure 6. Dendrogram of 270 genotypes and bread wheat cultivars based on produced bands by specific primers via complete linkage method and simple matching similarity coefficient

جدول ۶- نتایج تجزیه واریانس مولکولی با در نظر گرفتن پنج گروه

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس برآورد شده	درصد واریانس
بین کلاستر	۴	۲۶۲/۹۰۱	۶۵/۷۲۵	۱/۲۳۹	۶۵٪
داخل کلاستر	۲۶۵	۱۷۵/۸۹۲	۰/۶۶۴	۰/۶۶۴	۳۵٪
کل	۲۶۹	۴۳۸/۷۹۳		۱/۹۰۳	۱۰۰٪

جدول ۷- تعداد ژنوتیپ و تنوع داخل هر گروه

کلاستر	کلاستر ۱	کلاستر ۲	کلاستر ۳	کلاستر ۴	کلاستر ۵
تعداد اعضای هر کلاستر	۶۰	۳۴	۵۲	۳۹	۸۵
مجموع مربعات داخل	۳۸/۴۱۷	۲۶/۰۵۹	۲۱/۹۴۲	۲۳/۸۹۷	۶۵/۵۷۶

Table 8. Members of each cluster in cluster analysis of wheat genotypes

[illegible]

انتخاب و شناسایی ژن‌ها و قطعات کروموزومی موردنظر در جوامع گیاهی و اصلاحی با استفاده از آغازگرهای مولکولی یکی از تسهیلات مهمی است که بیولوژی مولکولی فراوری اصلاح نباتات گشوده است. بازوی کروموزومی 1RS چاودار طی تکامل گندم با بازوی بلند کروموزوم‌های 1B و 1A گندم جابجا شده است. این بازو حاوی ژن‌های مقاومت به بیماری و همچنین افزایش عملکرد گندم تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد. بنابراین ضروری به‌نظر می‌رسد که ژنوتیپ‌ها و ارقام گندم نان، نسبت به این جابجایی غبرال گردیده و ژنوتیپ‌های حاوی این جابجایی‌ها شناسایی شوند. در این پژوهش، با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی چاودار، در ژرم پلاسما گندم نان، حاوی ۹۵۶ ژنوتیپ، ۲۱۱ ژنوتیپ (با آغازگر PAW161) و ۱۰۸ ژنوتیپ (با آغازگر RyeR3/F3) دارای بازوی کروموزومی RS چاودار می‌باشند که از این میان ۶۱ ژنوتیپ، دارای نوارهای ۷۱۰ و ۱۵۳۰ جفت‌باز بودند و از آنجایی که این نوارها، نمایانگر جابجایی از نوع BL می‌باشند، می‌توان گفت که ۶/۵۸ درصد از ژنوتیپ‌ها حامل جابجایی BL می‌باشند. وجود بازوی RS در ژنوتیپ‌هایی که با دو آغازگر ذکر شده نوار تشکیل داده‌اند و از فاقد نوارهای ۷۱۰، ۱۵۳۰ و یا ۱۰۹۵ جفت‌باز می‌باشند را می‌توان به نوع دیگری از جابجایی (احتمالا جابجایی روی ژنوم D) دانست و یا این ژنوتیپ‌ها باید با آغازگرهای اختصاصی دیگری از چاودار که قادر به شناسایی جابجایی کروموزومی باشند، بررسی شوند. ژنوتیپ‌های ۴۰۴ و ۲۱۶۱، با تکثیر نوارهای ۹۰۰ و ۱۵۳۰ جفت‌باز احتمالا دارای جابجایی از نوع 1AL باشند. از آنجایی که نشانگر RyeR3/F3 بر اساس نواحی رتروترانسپوزونی چاودار طراحی شده است،

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی شماره
AGR97GG8684 دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان می باشد.

1. Afshari, F. 2006. Protein marker assisted identification of yr9, lr26 and sr31 genes in a group of Iranian wheat cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 8: 265-268.
2. Ahmadi, S. and M.R. Naghavi. 2012. Identification of rye RS fragments chromosome in *Aegilops* genus using by DNA molecular specific marker. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 43: 501-506 (In Persian).
3. Ali, N., H. Heslop-Harrison, R.A. Ahmad, G. Graybosch, L. Heinand and T. Schwarzbacher. 2016. Introgression of chromosome segments from multiple alien species in wheat breeding lines with wheat streak mosaic virus resistance. *Heredity*, 117: 114-123.
4. Bagherika, S., G. Karimzadeh and M.R. Naghavi. 2013. Identification of rust- resistance genes (Lr26, Sr31, Yr9) using specific PCR. *Journal of Crop Biotechnology*, 5: 129-138 (In Persian).

5. Bagherikia, S., G. Karimzadeh and M.R. Naghavi. 2014. Distribution of 1AL. 1RS and 1BL. 1RS wheat-rye translocations in *Triticum aestivum* using specific PCR. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55: 20-26.
6. Berzonsky, A.W. and G.M. Francki. 1999. Biochemical, molecular and cytogenetic technologies for characterizing 1RS in wheat: A review. *Euphotic*, 108: 1-19.
7. Crespo-Herrera, L., L. Garkava-Gustavsson and I. Ahman I. 2017. A systematic review of rye (*Secale cereal* L.) as a source of resistance to pathogens and pests in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Heredites*, 154:14.
8. Doyle, J. and J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Photochemistry Bull*, 19: 11-15.
9. Gholizadeh Vazvani, M., H. Dashti, R. Saberi Riseh and M.R. Bihamta. 2016. Study of relationship between of vegetative traits and resistance to take-all disease in greenhouse condition. *Iranian Journal of Plant Protection*, 47(1): 11-21 (In Persian).
10. Gholizadeh Vazvani, M., H. Dashti, R. Saberi Riseh and M.R. Bihamta. 2017. Screening Bread Wheat germplasm for resistance to take-all disease (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) in greenhouse conditions. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 19: 1173-1184.
11. Gholizadeh Vazvani, M., H. Dashti, R. Saberi Riseh and M.R. Bihamta. 2015. Comparison between spring and autumn growth types of different wheat (*Triticum aestivum*) genotypes in response to Take-all disease. *Iranian Journal of Plant Protection*, 46(2): 307-316 (In Persian).
12. Golkari, S. 2017. The evaluation of rye 1RS translocation distribution in some Iranian wheat promising genotypes and wheat cultivars using molecular markers. *Journal of Genetics*, 12(1): 133-142 (In Persian).
13. Guberac, S., S. Petrović, V. Guberac and S. Marić. 2014. 1RS translocation in Croatian winter wheat varieties. *Original scientific paper Izvorni znanstveni članak*, 1: 8-14.
14. Jian Fang, C., L. Xu and J. Ji Zeng. 2005. Homologous cloning of ω -secalin gene family in a wheat 1BL/1RS translocation. *Cell Research*, 15: 658-664.
15. Katto, M.C., T.R. Endo and S. Nasuda. 2004. A PCR-based marker for targeting small rye segments in wheat background. *Genes and genetic systems*, 9: 245-250.
16. Kim, W. and J. Johnson. 2004. Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources. *Crop Science*, 1254-1258
17. Milbourne, D., R. Meyer, E. Bradshaw, E. Baird, N. Bonar, J. Proving, W. Powell and R. Wough. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3: 127-136.
18. Mirzaghaderi, G., G. Zeinali, M. Rafiepour and G. Karimzadeh. 2011. Wheat-rye translocation in Iranian bread wheat cultivars and their ion distribution in response to salinity stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13: 1163-1172.
19. Nadella, K.D., A.S., Peake, H.S., Bariana, M. Cooper, I.D. Godwin and B.J. Carroll. 2002. A rapid PCR protocol for marker assisted detection of heterozygotes in segregating generations involving 1BL/1RS translocation and normal wheat lines. *Crop and Pasture Science*, 53: 931-938.
20. Nagy, E.D. and T. Lelley. 2003. Genetic and physical mapping of sequence-specific amplified polymorphic (SSAP) markers on the 1RS chromosome arm of rye in a wheat background. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 1271-1277.
21. Porter, D.R., J.A. Webster, R.L. Burton, G.J. Puterka and E.L. Smith. 1991. New sources of resistance to Greenburg in wheat. *Crop Science*, 31: 1502-1504.
22. Prevost, A. and M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107-112.
23. Rabinovich, S.V. 1998. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivar of *Triticum aestivum* L. *Euphytica*, 100: 323-340.
24. Sebesta, E.E., E.A. Wood, D.R. Porter, J.A. Webster and E.L. Smith. 1995. Registration of amigo wheat germplasms resistant to Greenburg. *Crop Science*, 35: 293-293.
25. Shimizu, Y., S. Nasuda and T.R. Endo. 1997. Detection of the Sec-1 locus of rye by a PCR-based method. *Genes and genetic systems*, 72: 197-203.
26. Tabibzadeh, N., G. Karimzadeh and M.R. Naghavi. 2013. Distribution of 1AL. 1RS and 1BL. 1RS wheat-rye translocations in Iranian wheat, using PCR based markers and SDS-PAGE. *Cereal Research Communications*, 41:458-467.
27. Tang, Z., S. Fu, Z. Ren, T. Zhang, Y. Zou and Z. Yang. 2011. Diversity and evolution of four dispersed repetitive DNA sequences in the genus secale. *Genome*, 54: 285-300.
28. The, T.T., R.B., Gupta, P.L, Dyck, R. Appels, V. Hohhman and R.A. McIntosh. 1992. Characterisation of stem rust resistance Derivatives of wheat cultivar Amigo. *Euphytica*, 58: 245-252
29. Weng, Y., P. Azhaguve, R.N. Devkota and J.C. Rudd. 2007. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL. 1RS and 1BL. 1RS wheat-rye translocations in wheat background. *Plant Breeding*, 126: 482-486.
30. Yediay, F.E., F.S. Baloch, B. Kilian and H. Özkan. 2010. Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL. RS and 1BL. RS translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces. *Genetic resources and crop evolution*, 57: 119-29.
31. Zhang, L., D. Liu, X. Guo, W. Yang, J. Sun, D. Wang, P. Sourdille and A. Zhang. 2011. Investigation of genetic diversity and population structure of common wheat cultivars in northern China using DaRT markers. *BMC genetics*, 12: 1-11.

Study of Genetic Diversity of Bread Wheat Germplasm Based on Wheat-Rye Translocations (1AL.1RS and 1BL.1RS) using Specific Primers

Hossein Dashti¹, Mozghan Gholizadeh Vazvani² and Mohammad Reza Bihamta³

1- Professor, Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran (Corresponding author: dashti@vru.ac.ir)

2- PhD Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan

3- Professor, Department of Crop Science & Plant Breeding, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: June 1, 2019

Accepted: August 1, 2020

Abstract

Chromosomal arm 1RS of rye (*Secale cereale*) is one of the most successful foreign resources which was transferred into bread wheat (*Triticum aestivum*) and have significant effects on wheat breeding. Identifying of two 1AL.1RS and 1BL.1RS translocations in wheat germplasm had important role in breeding programs. In order to study of distribution of 1RS arm in 956 genotype of bread wheat three specific primers were used. The O-SEC primer identified 1BL translocation by amplification of 1530 and 710 bp bands in 63 genotypes (6.68 percent of genotypes) and amplified 900 and 1530 bp bands in two genotypes that can be attributed to the translocation of 1AL. The PAW161 primer was able to amplified 366bp band in 21.86% and 750bp in 14.85% of genotypes and the RyeR3/F3 primer amplified 1451 bp band in 11.29% of the genotypes which indicates the presence of rye arm (1RS) in these genotypes. These primers has amplified several new bands including 1200bp, 1500bp, 800and 400bp in this population. The *Agropyron intermedium* species has produced 366, 750 and 1200 bp bands by PAW161 primer. Probably this species also carries pieces of 1RS that transmitted into wheat. Generally, these three primers divided the studied genotypes into two groups; 686 genotypes not produced any bands and 270 genotypes produced at least one band. Cluster analysis based on molecular data divided 270 genotypes into five groups, at a genetic distance of 15. The range of rescaled distance was from 10 to 25. In general, because of relationship between these markers and various stresses tolerance, the results of this study can be used to improve wheat cultivars for resistance to biotic and abiotic stresses and as well as high yield.

Keywords: 1RS arm, *Agropyron intermedium*, Specific Primer, Translocation, Wheat