دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان (*Triticum aestivum* L.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

نسرین قاسمی[۱]، رضا قلی میرفخرایی[۲] و علیرضا عباسی[۳]

۱- کارشناس‌ارشد اصلاح نباتات، دانش‌آموخته دانشگاه تربیت مدرس
۲- استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران، (نویسنده مسوول: abdhoorz@modares.ac.ir)
۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۱۲
صفحه: ۹ تا ۱۶

چکیده

تعیین سطح تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی بین ارقام اساس شناسایی والدین مناسب برای اهداف اصلاحی مختلف به شمار می‌رود. در پژوهش حاضر، جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم گندم نان از ۲۲ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد که از مجموع ۲۲ آلل شناسایی شده ۱۱ جفت توانستند چند شکلی مطلوبی را نشان دهند. تعداد آلل‌های تولید شده با میانگین ۲/۱۸ آلل در هر مکان ژنی از ۲ تا ۳ آلل متغیر بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی، ۰/۵۷۳ به دست آمد که از بین نشانگرها Xgwm60 به دلیل داشتن بیشترین شاخص چندشکلی، می‌تواند نشانگر مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی باشد. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه دایس تشکیل داده شد و سپس ارقام با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای و با الگوریتم همبستگی متوسط گروه‌بندی شده و در ٤ گروه قرار گرفتند. تجزیه به مختصات اصلی نیز تا حد زیادی الگوی تنوع ژنتیکی حاصل از روش تجزیه خوشه‌ای را تایید نمود. نتایج این پژوهش محدوده وسیعی از تنوع ژنتیکی را در بین ارقام گندم نشان می‌دهد که امکان استفاده از آن‌ها را در برنامه‌های به‌نژادی مقدور می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: گندم، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره، تجزیه خوشه‌ای

مقدمه

نظر به اهمیت گندم در اقتصاد جهانی و از جمله ایران، لزوم توجه و شناسایی روابط ژنتیکی، آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد آن در ژرم پلاسم این محصول استراتژیک توسط به‌نژادگران گیاهی امری ضروری می‌باشد. تنوع که از تکامل طبیعی ناشی شده و از اجزای مهم پایداری نظام‌های زیستی می‌باشد، جزء مهم‌ترین نیازهای برنامه‌های به‌نژادی است. دامنه تنوع ژنتیکی در ارقام در حال کشت گندم، به دلیل کاربرد پایه‌های ژنتیکی محدود و افزایش تمایل به کشت گیاهان خالص، همچون سایر گیاهان زراعی رو به کاهش است. همچنین تنوع موجود در ارقام بومی گندم نیز به علت کاهش جمعیت در حال زوال است. بنابراین بهره‌برداری از تنوع موجود در یک ژرم پلاسم می‌تواند، منجر به شناسایی والدین مناسب و ارقام بهتر و همچنین استفاده از این تنوع در جهت بهبود خصوصیات ارقام زراعی گردد (۱۹). در برنامه‌های اصلاحی و گروه‌بندی ذخایر ژنتیکی گندم، از نشانگرهای مختلف مورفولوژیکی، پروتئینی و DNA برای بررسی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب والدین مناسب و بررسی شباهت یا تفاوت بین ژنوتیپ‌ها استفاده شده است (۳). به علت محدودیت تعداد نشانگرها، وجود اثرات اپیستاتیک و آلل‌های کشنده و چندشکلی کمتر نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی، امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNA به عنوان ابزارهای کارآمد و مکمل برای تعیین سطح تنوع و روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی، تعیین مکان ژن‌های مقاومت به بیماری و تنش‌های محیطی و هم‌چنین رابطه بین اجداد وحشی و رقم‌های اصلاح شده درگیاهان استفاده می‌شوند (۱۶). نشانگرهای DNA علاوه بر نواحی کد کننده، تفاوت‌های بین ردیف‌های غیرکدکننده و توالی‌های حاشیه‌ای ژنوم را نیز آشکار می‌سازند. از طرف دیگر این نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تسهیلاتی را در مطالعات پایه‌ای و کاربردی بیولوژی مولکولی فراهم کرده‌اند (۲۲،۱۲،۱۰). از بین نشانگرهای مبتنی بر DNA، نشانگرهای ریزماهواره (SSR[1]) به علت دارا بودن خاصیت چند آللی، وراثت هم‌بارز، فراوانی نسبی و پوشش وسیع ژنومی و هم‌چنین سهولت آشکارسازی و تشخیص آن‌ها کاربرد فراوانی دارند (۸،۱۲). ریزماهواره‌ها توالی‌های تکراری ۶-۲ نوکلئوتیدی هستند که به تعداد فراوان و به صورت یکنواخت در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها و در نواحی رمزکننده و غیر رمزکننده DNA پراکنده‌اند (۲۴،۳). تاکنون مطالعات زیادی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های گندم به کمک نشانگرهای ریزماهواره صورت گرفته است. پلاشکی و همکاران (۲۱)، ۴۰ رقم گندم نان اروپایی را با استفاده از ۲۳ آغازگر ریزماهواره مورد مقایسه قرار دادند و میانگین تعداد آلل را از ۵/۲ تا ۶/۲ گزارش نمودند و میزان اطلاعات چندشکلی از ۰/۲۹ تا ۰/۷۹ بدست آمد. مکافری و همکاران (۱۵)، ۵۸ ژنوتیپ گندم دوروم را با استفاده از ۷۰ جایگاه ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند و تعداد آلل را از ۲ تا ۱۲ با میانگین ۵/۶ برای هر جایگاه گزارش نمودند. در مطالعه‌ای که توسط پری انجام شد (۲۰) از یک مجموعه هفت نشانگری ریزماهواره جهت شناسایی ۱۸ رقم گندم دوروم که در کانادا جهت مقاصد تجاری ایجاد شده بود، استفاده کرد و تنوع بالایی را در بین نمونه‌های مورد بررسی مشاهده نمود. لیو و همکاران (۱۴)، ۳۰ رقم گندم را با ۲۴ آغازگر ریزماهواره ارزیابی و در مجموع ۱۱۵ آلل در دامنه‌ای از ۲ تا ۹ آلل و میانگین ۴/۶ آلل برای هر جایگاه گزارش کردند. محمدی و همکاران (۱۸) ۲۰ رقم گندم نان را با ۱۲ جفت آغازگر

1- Simple Sequence Repeat-SSR

ریزماهواره ارزیابی کردند که در مجموع ۴۰ آلل چند شکل بین ۲ تا ۶ آلل با میانگین ۳/۳۳ آلل برای هر آلل گزارش نمودند. وی و همکاران (۲۷) ۶۲ رقم گندم را با ۱۲۴ نشانگر ریزماهواره بررسی کردند که در مجموع توانستند ۵۴۷ آلل را با میانگین ۴/۷۶ آلل شناسایی و گزارش کنند. زرگانی و همکاران (۲۹) تنوع ژنتیکی ۹۱ لایل دابل هاپلوئید گندم را به همراه والدین آن‌ها بوسیله ۱۱ جفت آغازگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند و میانگین تعداد آلل چند شکل را بین ۲ تا ۸ گزارش نمودند. همچنین در پژوهش مذکور اشاره شده است که تعداد کم نشانگر نیز می‌تواند برای بررسی تمایز ژنوتیپ‌های گندم استفاده شود (۲۱،۲۹). هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین فاصله ژنتیکی بین ارقام گندم نان ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، به‌منظور شناسایی والدین مناسب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش از ۲۲ رقم گندم نان که از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد، استفاده گردید (جدول ۱).

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های برگی با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران انجام گرفت. جهت تعیین کمیت DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری و کیفیت آن به وسیله ژل آگارز ۱ درصد تعیین گردید.

جدول ۱- اسامی و اطلاعات شجره ارقام گندم نان مورد استفاده در آزمایش

Tabel 1. Names and pedigree information of bread wheat cultivars

نام رقم	شجره	نام رقم	شجره
آزادی	(4820*1-32-15409)*Mexp-Karaj-Iran	شاه‌پسند	Landrace-Saveh-Iran
اترک	Kauz"s"-CIMMYT-Mexico	شهریار	Kvz/\Ti71/3/Maya"s"//Bb/Inia/4/Karaj2/5/Anza/3/Pi/Nar//Hys2002
اینیا	Inia, Mexico	کرج۱	(200H*Vfn)Rsh-Karaj-Iran
اوحدی	KC-2758	کرج۲	(Fa*Th- Mt)Omid-Karaj-Iran
بیات	(C271*Wte-Son64)*CIR	کرج۳	(Drc*Mxp/Son64*Tzpp-Y54)Nai60-Iran
دریا	CHIL/SHA4	گلستان	Alondra"S"-Mexico
دز	Kauze*2/Opata//Kauze CRG-737-1Y-O10M-OY-CIMMYT	مروارید	Milan/Sha7
رسول	Veery"S"=Kvz/Buho"S"//Kal/Bb-Mexico	مغان۲	-
رصد	-	هامون	Falat* Roshan-Zabol-Iran
سپاهان	دورگ‌گیری گندم آزادی با چند لاین خارجی	هما	انتخاب از بین لاین‌های تشکیل دهنده گندم سرداری (Sar-HR39)
سیستان	Bank"s"/Vee"s"	هیرمند	Byt/4/Jar//Cfn/Sr70/3/Jup"s"-Zabol-Iran

نشانگرهای مورد استفاده

از میان آغازگرهای ریزماهواره معرفی شده توسط رودر و همکاران (۲۴)، ۲۲ جفت آغازگر برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان انتخاب شد (جدول ۲).

واکنش زنجیره ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر 1mM dNTPs، ۰/۶ میکرولیتر برای هر آغازگر ، ۰/۱ آنزیم Taq پلی‌مراز ۵ واحد، ۰/۶ میکرولیتر از کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار و در نهایت با ۱۰/۱ میکرولیتر آب دوبار تقطیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Eppendorf انجام شد. چرخه حرارتی مطابق با جدول ۳ انجام گردید و محصولات تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز–متافور ۳ درصد واسرشته‌ساز تفکیک و به وسیله ماده Safe Stain رنگ‌آمیزی شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوهای نواری به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) امتیازدهی شدند (شکل ۱). و ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA محاسبه گردید. برای رسم دندروگرام (با روش UPGMA) و تجزیه به مختصات اصلی از نرم‌افزار NTSYS-PC 2.02 استفاده شد. هم‌چنین از نرم‌افزار Excel جهت محاسبه میزان اطلاعات چندشکل (PIC[1])، فراوانی آلل رایج (CA) و تنوع ژنی (Di) استفاده گردید. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها می‌باشد. به همین دلیل شاخص PIC به منظور نمایش درجه چندشکلی هر جایگاه ریزماهواره برای هر یک از نشانگرهای مورد استفاده با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد.

$$PIC=1-\sum_{j=1}^{n} P_j^{\,2} \qquad \text{رابطه (۱)}$$

در این فرمول P_J فراوانی آلل و J تعداد آلل‌ها می‌باشد.

1- Polymorphic Information Content

جدول ۲- مشخصات نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم گندم نان

Table 2. The characteristics of microsatellite markers used in the study of genetic diversity of 22 bread wheat cultivars

مکان ژنی	موتیف	شماره کروموزوم
Xgwm4	(CA)13(TA)26	4A
Xgwm6	(GA)40	4B
Xgwm60	(CA)30	7A
Xgwm68	(GA)3(G)3(GA)25	7B
Xgwm111	(CT)32(GT)17	7D
Xgwm165	(GA)20	4D
Xgwm273	(GA)18	1B
Xgwm304	(CT)22	5A
Xgwm334	(GA)19	6A
Xgwm410	(CA)11(CA)10(CA)8	2B
Xgwm518	(CA)34	6B

جدول ۳ - چرخه دمایی واکنش زنجیره ای پلیمزار در نشانگرهای ریزماهواره

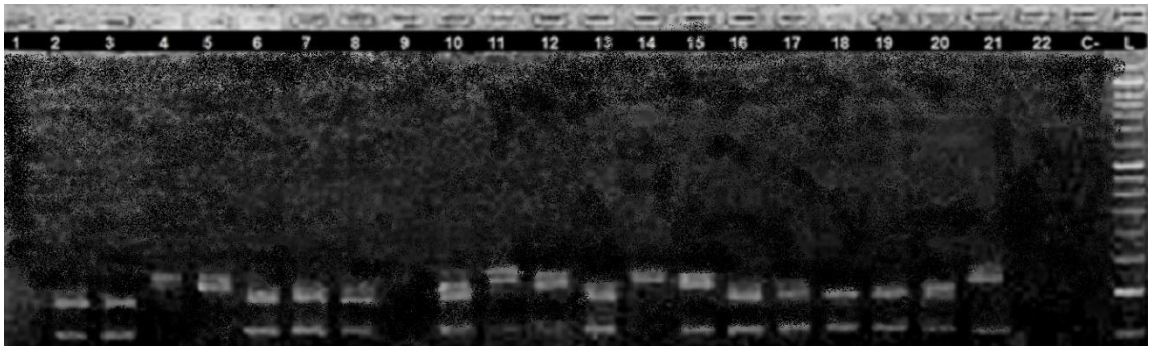
Table 3. Polymerase chain reaction temperature cycle in microsatellite markers

مرحله	تعداد چرخه	عمل	زمان	درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد)
اول	۱	واسرشته‌سازی اولیه	۴ دقیقه	۹۴
		واسرشته‌سازی	۳۰ ثانیه	۹۴
دوم	۱۰	اتصال	۳۰ ثانیه	با توجه به نوع آغازگر تعیین شد.
		بسط	۳۰ ثانیه	۷۲
		واسرشته‌سازی	۳۰ ثانیه	۹۴
سوم	۲۵	اتصال	۳۰ ثانیه	با توجه به نوع آغازگر تعیین شد.
		بسط	۳۰ ثانیه	۷۲
چهارم	۱	بسط نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

نتایج و بحث

چندشکلی در جایگاه های ریزماهواره

جهت بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان، از ۲۲ نشانگر ریزماهواره استفاده گردید که ۱۱ نشانگر چندشکلی مناسبی را نشان دادند و امتیازدهی شدند. بطوری که از این ۱۱ نشانگر در مجموع ۲۴ آلل چند شکل مشاهده گردید (جدول ۴). تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر مکان ژنی بین ۲ تا ۳ متغیر بود که بیشترین تعداد آلل مربوط به جایگاه‌های ژنی Xgwm60 و Xgwm273 با ۳ آلل چندشکل بود. هم‌چنین میانگین تعداد آلل ۲/۲ برای هر نشانگر مشاهده شد. پژوهشی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان صورت گرفت، که از ۸ جفت آغازگر ریزماهواره مورد استفاده، در مجموع ۲۲ آلل شناسایی شد و میانگین تعداد آلل مشاهده شده، ۲/۷۵ آلل در هر مکان ژنی بود (۴). زرگانی و همکاران (۲۹) نیز میانگین تعداد آلل را ۵/۶ در لاین‌های دابل‌هاپلوئید گزارش نمودند و آغازگر Xgwm190 با ۸ آلل بیشترین تعداد آلل را نشان داد. میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریزماهواره مناسب بودن هر مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (۱۷). بنابراین جایگاه‌های ژنی Xgwm60 و Xgwm273 به دلیل تولید تعداد آلل بیشتر می‌توانند برای تخمین تنوع ژنتیکی بین ارقام مورد بررسی مناسب‌تر باشند.



شکل ۱- آغازگر تکثیریافته Xgwm60 در ۲۲ رقم گندم نان بر روی ژل آگارز- متافور ۳٪

Figure 1. Extensive Xgwm60 primer in 22 bread wheat cultivars on agarose-metaphor gel 3%

محتوای اطلاعات چندشکلی

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) به عنوان تخمینی از قدرت تمایز هر ریزماهواره با در نظر گرفتن تعداد و فراوانی نسبی آلل‌ها برای هر نشانگر به طور جداگانه برآورد گردید (جدول ۴) (۲). جایگاه‌های ژنی Xgwm60 و Xgwm6 به ترتیب بیشترین (۰/۹۱) و کمترین (۰/۰۹) مقدار PIC را دارا بودند. با توجه به نتایج بدست آمده، اکثر نشانگرهای مورد بررسی دارای تعداد آلل مشابه می باشند، ولی به دلیل فراوانی آللی متفاوت، مقادیر بدست آمده برای شاخص چندشکلی متفاوت می‌باشد (۹،۷). در مطالعات متعددی که در زمینه بررسی تنوع‌ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در گندم انجام شده، مقادیر متفاوتی برای میانگین شاخص چندشکلی به دست آمده است. همچنین در برخی مطالعات نظیر مطالعه رودر و همکاران (۲۴) محتوای اطلاعات چندشکلی برای گندم نان از ۰/۲۳ تا ۰/۷۹ گزارش شده است که در پژوهش حاضر نیز ۰/۵۷ بدست آمد. در پژوهشی که توسط بریان و همکاران (۶) انجام شد میانگین شاخص چندشکلی ۰/۵۱ محاسبه گردید که به نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر نیز نزدیک است. بدین ترتیب شاخص چندشکلی عدد ثابتی نداشته و به‌عنوان تخمینی از قدرت تمایز هر ریزماهواره با در نظر گرفتن تعداد و فراوانی نسبی آلل‌ها می‌باشد (۲). با توجه به مطالعات و بررسی‌های انجام شده می‌توان تفاوت در تعداد آلل شناسایی شده و محتوای اطلاعات چندشکلی را به خاستگاه و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌ها و نیز تفاوت در تعداد نوکلئوتید و واحدهای تکراری نشانگرهای ریزماهواره نسبت داد (۱۵،۲۸). مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در این جایگاه ژنی است و می‌تواند در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی داشته باشد. از آن جایی که جایگاه ژنی Xgwm60 بالاترین مقدار چندشکلی را نسبت به سایر نشانگرها نشان می‌دهد، می‌تواند نشانگر مناسب‌تری نسبت به سایر نشانگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی باشد. رودر و همکاران گزارش نمودند که محتوای چندشکل با تعداد ژنوتیپ و آغازگر همبستگی مثبتی دارد و با کاهش تعداد ژنوتیپ مقدار شاخص چندشکلی افزایش می یابد (۲۹،۲۳).

ضریب تشابه و تجزیه خوشه‌ای

به منظور تعیین ضریب تشابه و الگوریتم مناسب برای گروه‌بندی ارقام، ضرایب کوفنتیک برای ضرایب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس با استفاده از الگوریتم‌های UPGMA، Single Linkage و Complete Linkage محاسبه و ضریب تشابه دایس با الگوریتم UPGMA به عنوان بهترین شاخص برای گروه‌بندی و تفسیر نتایج حاصل از آن انتخاب گردید. ضرایب تشابه ژنتیکی دایس برای ۲۲ رقم مورد بررسی با توجه به کل آلل‌های تولید شده محاسبه و از ۰/۳۱۶ تا ۰/۹۶۶ متغیر بود. کمترین میزان شباهت ژنتیکی بین دو رقم آزادی و مروارید (۰/۳۱۶) و بیشترین میزان شباهت ژنتیکی بین دو رقم شهریار و مغان (۰/۹۶۶) مشاهده گردید. پلاشکی و همکاران (۲۱) نیز میانگین میزان تشابه برای ریزماهواره گندم را ۰/۳۱ و پراساد و همکاران (۲۳) میانگین ۰/۲۳ را گزارش نمودند. از آن جایی که تشابه و فاصله ژنتیکی با یکدیگر رابطه معکوس دارند، می‌توان گفت دو رقم آزادی و مروارید بیشترین و دو رقم شهریار و مغان ۲ کمترین فاصله ژنتیکی را دارند. به همین دلیل می‌توان از ارقامی که فاصله ژنتیکی زیادی با یکدیگر دارند در برنامه‌های تلاقی استفاده نمود (۲۶).

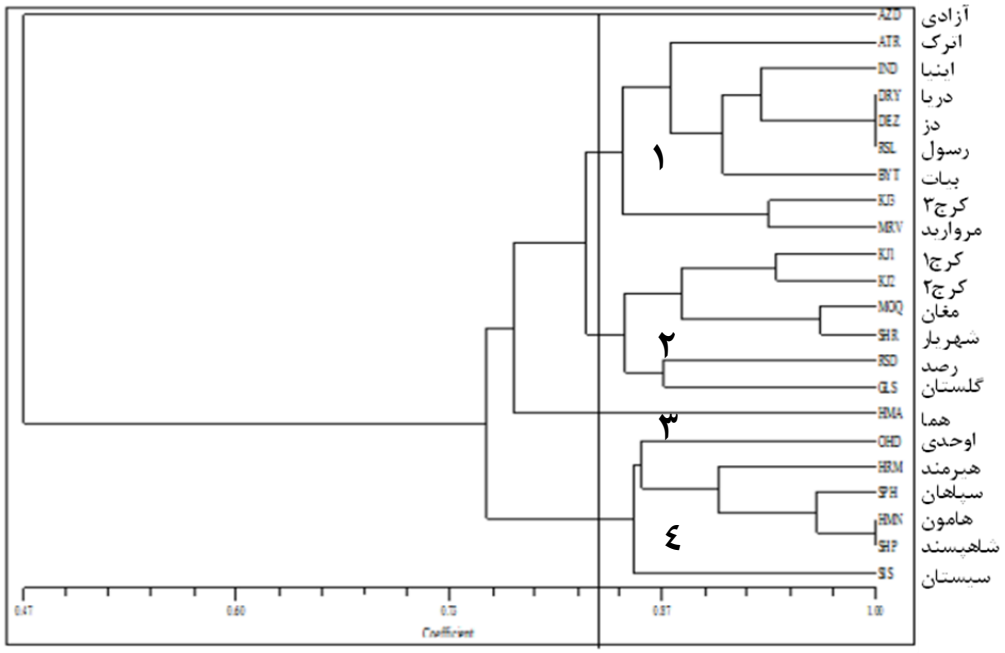
جدول ۴- اطلاعات مربوط به ۱۱ نشانگر چندشکل ریزماهواره در ارقام گندم نان مورد بررسی

Table 4. Information of 11 polymorphic microsatellite markers in bread wheat cultivars

نشانگر ریزماهواره	شماره کروموزوم	تعداد آلل	فراوانی آلل رایج	PIC	تنوع ژنی
Xgwm4	A4	۲	۰/۳۲	۰/۸۷	۰/۸۹
Xgwm6	B4	۲	۰/۴۸	۰/۰۹	۰/۰۹
Xgwm60	A7	۳	۰/۲۱	۰/۹۱	۰/۹۳
Xgwm68	B7	۲	۰/۴۳	۰/۲۳	۰/۲۴
Xgwm11	D7	۲	۰/۴۵	۰/۷۳	۰/۷۵
Xgwm165	B4	۲	۰/۲۳	۰/۵۰	۰/۵۱
Xgwm273	B1	۳	۰/۲۹	۰/۹۰	۰/۹۲
Xgwm304	A5	۲	۰/۴۶	۰/۶۰	۰/۶۱
Xgwm334	A6	۲	۰/۴۱	۰/۳۰	۰/۳۰
Xgwm410	B2	۲	۰/۴۸	۰/۵۶	۰/۵۷
Xgwm518	B6	۲	۰/۴۵	۰/۶۳	۰/۶۵
میانگین		۲/۲	۰/۳۸	۰/۵۷	۰/۵۹

همچنین هدف از انجام تجزیه خوشه‌ای، انتساب ارقام به گروه‌ها است، به طوری که ارقام دارای شباهت و خویشاوندی بیشتر در یک گروه قرار بگیرند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای نشان داد که برخی از ارقام به واسطه داشتن شباهت بیشتر از نظر جایگاه ژنی ریزماهواره‌ها در یک گروه قرار گرفته‌اند. به طوری که قرار گرفتن این ارقام در یک گروه، می‌تواند بیانگر تشابه شجره‌ای از نظر جایگاه‌های ریزماهواره باشد. با در نظر گرفتن خط برش در دندروگرام ترسیم شده (شکل ۲)، ارقام در چهار گروه مختلف قرار می‌گیرند که این چهار گروه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. در گروه اول ارقام آزادی، اترک، اینیا، دریا، دز، رسول، بیات، کرج ۳ و مروارید؛ در گروه دوم ارقام کرج ۱، کرج ۲، مغان، شهریار، رصد و گلستان؛ در گروه سوم رقم هما و در گروه چهارم ارقام اوحدی، هیرمند، سپاهان، هامون، شاهپسند و سیستان قرار

دارند. بر اساس اطلاعات شجره‌ای اکثر ارقام گروه ۱ از مواد اصلاحی با منشاء مکزیک و سیمیت بدست آمده‌اند. در گروه دوم نیز تعداد زیادی از ارقام از تلاقی با ارقام مختلف کرج بدست آمده اند و از این نظر با هم شجره نسبتا یکسانی دارند. به عنوان مثال در شجره رقم شهریار به تلاقی ژنوتیپ ها با رقم کرج ۲ اشاره شده است. قرار گرفتن رقم هما در گروه جداگانه نیز بیانگر اختلاف زیاد این رقم با بقیه ارقام از نظر جایگاه ریزماهواره می‌باشد. در بررسی شجره این رقم مشخص گردید که از بین توده گندم سرداری انتخاب شده و رقم سرداری در بین والدین سایر ارقام وجود ندارد و به همین دلیل رقم هما در یک گروه مجزا قرار می‌گیرد. ارقام موجود در گروه چهار نیز از ژنوتیپ‌هایی با منشا سیستان در ایران تشکیل شده‌اند. علاوه بر بررسی شجره می‌توان گروه‌های تشکیل شده را از نظر مناطق نیز بررسی نمود. در گروه اول اکثر ارقام به سواحل دریای مازندران و مناطق معتدل تعلق دارند. در گروه دوم نیز بیشتر ارقام به مناطق سرد، معتدل و سواحل دریای مازندران تعلق دارند. در گروه سوم نیز ارقام مناطق جنوبی قرار دارند و رقم هما نیز که مناسب مناطق سرد و خشک می‌باشد بین گروه دوم و چهارم قرار گرفته است (۵). به منظور تایید گروه‌بندی انجام شده، آزمون T2 کاذب هوتلینگ انجام شد و ۲۲ رقم مورد بررسی در ۴ گروه متفاوت قرار گرفتند. همچنین صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش تابع تشخیص نیز مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت تعداد ۴ گروه تایید گردید. در پژوهشی که توسط اعلمی و کرمی (۱) انجام شد، صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای لاین‌های برنج مورد بررسی به وسیله تجزیه تابع تشخیص و تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر تایید گردید. نتایج تجزیه خوشه‌ای بیانگر این است که ارقام مختلف گندم نان مورد استفاده در این پژوهش از نظر جایگاه ژنی ریزماهواره‌ها از تنوع خوبی برخوردار می‌باشند. در پژوهشی که توسط خرمی پور و همکاران (۱۳) بر روی تنوع ژنتیکی ۱۰ رقم سورگوم انجام شد، از ۱۰ آغازگر ریزماهواره استفاده نمودند و ارقام را در ۴ گروه دسته‌بندی کردند. در این پژوهش بیان گردید افرادی که در یک گروه قرار می‌گیرند از نظر ژنتیکی مشابه بوده و افرادی که در دو طرف دندروگرام قرار می‌گیرند دارای اختلاف بیشتری از نظر ژنتیکی خواهند بود و از طرف دیگر امکان تلاقی بین ارقام با بیشترین تفاوت ژنتیکی، امکان ایجاد هتروزیس و تفکیک متجاوز بیشتر و یا امکان انتقال صفات نادر را خواهند داشت (۱۳). به همین دلیل می‌توان ارقام آزادی و سیستان را که بیشترین فاصله ژنتیکی را با هم دارند با اهداف اصلاحی خاص با یکدیگر تلاقی داد.



شکل ۲- گروه‌بندی ارقام گندم نان بر مبنای ضریب تشابه دایس به روش UPGMA با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره
Figure 2. Grouping bread wheat cultivars based on UPGMA method using microsatellite markers

تجزیه به مختصات اصلی

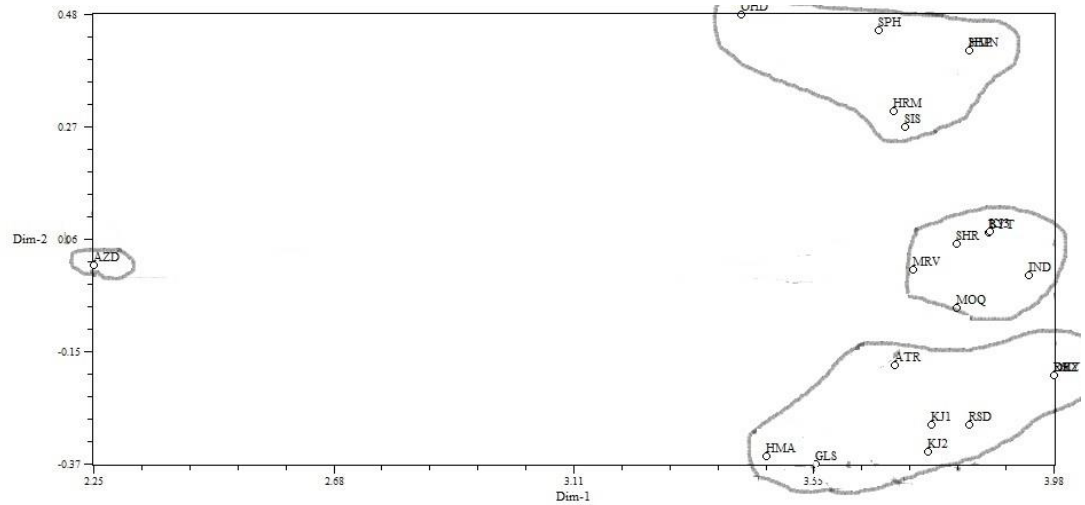
نتایج بررسی تنوع ژنتیکی براساس نشانگرهای مولکولی می‌تواند با استفاده از تجزیه به مختصات اصلی و به صورت چند بعدی نشان داده شود (۱۱). نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی در شکل ۳ آورده شده است. در تجزیه به مختصات اصلی در مجموع ۵ مولفه بدست آمد که ۹۳/۷۳ درصد از کل تغییرات را توجیه می‌کنند. مولفه‌های اول و دوم به ترتیب ۷۹/۲ و ۵/۸۸ درصد از تغییرات را در بر می‌گیرند و بیشترین نقش را در توجیه تغییرات دارند. به همین دلیل نمودار دو بعدی براساس این دو مولفه رسم گردید و در مجموع نمودار دو بعدی رسم شده ۸۵/۰۸ درصد از تغییرات را توجیه می‌نماید. در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از

نشانگرهای مولکولی، بایستی نشانگرهای انتخابی توزیع یکنواختی در سطح ژنوم داشته باشند و بتوانند بیشترین سطح ژنوم را پوشش دهند. در صورتی که نشانگرها از قسمت های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند، همبستگی بین آن ها کاهش خواهد یافت و تعداد بیشتری از مولفه‌ها برای توجیه تغییرات کل استفاده خواهد شد (۱۱). به همین دلیل مناسب‌تر است در مطالعات بعدی از تعداد بیشتری نشانگر که توزیع مناسبی در سطح ژنوم دارند استفاده شود. همچنین با توجه به این که ۳ مؤلفه اول در مجموع ۸۹/۳ درصد از تغییرات را توجیه می‌نمایند، گروه‌بندی انجام شده با استفاده از نمودار دو بعدی، روشی مفید است و کمترین خطا را دارد. زمانی که ۳ مؤلفه اول قادر به توجیه بیش از ۲۵ درصد تغییرات بین ژنوتیپ‌ها باشند، گروه‌بندی انجام شده با استفاده از نمودار دو بعدی روشی مناسب برای گروه‌بندی ارقام است (۱۹).

پژوهش حاضر نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی، نشانگرهای مناسبی برای گروه‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم می‌باشند. تلاقی ارقام با حداکثر فاصله ژنتیکی، می‌تواند جمعیت‌هایی را با تنوع بیشتر ایجاد نماید. همچنین نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی که به منظور ایجاد جمعیت‌های متنوع‌تر برای صفات اجرا می‌شود، استفاده گردد. لازم به ذکر است که به منظور ارزیابی دقیق و جامع تنوع ژنتیکی در رقم‌های مورد بررسی، انتخاب و استفاده از تعداد بیشتری آغازگر ریزماهواره با پراکنش کروموزومی بالا می‌تواند موثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاری‌های مؤثر بخش تحقیقات غلات مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج اعلام می‌دارد.



شکل ۳- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مبتنی بر ضریب تشابه دایس در ارقام گندم نان

Figure 3. Two-dimensional plot derived from principal coordinates based on the Dyce similarity coefficient in bread wheat cultivars

منابع

1. Aalami, A. and N. Karami. 2017. The study of genetic diversity in Iranian rice cultivars using ISSR, IRAP and REMAP markers. Journal of Crop Breeding, 8(20): 41-51 (In Persian).
2. Agrama, H.A.A. and M.A.R. Tunistra. 2003. Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. African Journal of Biotechnology, 2(10): 334-340.
3. Asadi, A.A. and S. Rashidi Monfared. 2014. Characterization of EST-SSR markers in durum wheat EST library and functional analysis of SSR-containing EST fragments. Molecular Genetics and Genomics, 289(4): 625-640.
4. Asghari, S. and R.G. Mirfakhraii. 2011. Study on genetic variation in some wheat cultivars using microsatellite markers and physiological traits under late spring stress. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 120 pp (In Persian).
5. Bahraei, S. 2003. Bread wheat quality evaluation based on the high molecular weight Glutenin subunits. Agrobreed, 5(3): 204-215 (In Persian).
6. Bryan, G.J., A.J. Collins, P. Stephenson, A. Orry, J.B. Smith and M.D. Gale. 1997. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. Theoretical and Applied Genetics, 94(5): 557-563.
7. Christiansen, M.J., S.B. Andersen and R. Ortiz. 2002. Diversity changes in an intensively bred wheat germplasm during the 20th century. Molecular Breeding, 9(1): 1-11.
8. Gupta, P.K. and R.K. Varshney. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica, 113(3): 163-185.

9. Gupta, P.K., R.K. Varshney, P.C. Sharma and B. Ramesh. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant Breeding, 118(5): 369-390.
10. Gupta, P., H. Balyan, K. Edwards, P. Isaac, V. Korzun, M. Röder, M.F. Gautier, P. Joudrier, A. Schlatter, J. Dubcovsky, R. De la Pena, M. Khairallah, G. Penner, M. Hayden, P. Sharp, B. Keller, R. Wang, J. Hardouin, P. Jack and P. Leroy. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. Theoretical and Applied Genetics, 105: 413-422.
11. Hedayati Marzoni, H. and H. Samizadeh Lahiji. 2016. Genetic diversity assessment of lines and varieties in winter rapeseed (*Brassica napus* L.) using RAPD and SSR molecular markers. Journal of Crop Breeding, 8(17): 139-131 (In Persian).
12. Hokanson, S.C., A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a malus × domestica borkh core subset collection. Theoretical and Applied Genetics, 97: 671-683.
13. Khoramipor, S., M. Dehdari and R. Amiri Fahliani. 2017. Study of genetic diversity in sorghum (*Sorghum Bicolar* L.) genotypes using microsatellite markers. Journal of Crop Breeding, 8(20): 116-123 (In Persian).
14. Liu, J., L. Liu, N. Hou, A. Zhang and C. Liu. 2007. Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. Euphytica, 155: 249-258.
15. Maccaferri, M., M.C. Sanguineti, P. Donini and R. Tuberosa. 2003. Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. Theoretical and Applied Genetics, 107(5): 783-797.
16. Manifesto, M.M., A.R. Schlatter, H.E. Hopp, E.Y. Suárez and J. Dubcovsky. 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. Crop Science, 41(3): 682-690.
17. Maroof, M.A.S., R.M. Biyashev, G.P. Yang, Q. Zhang and R.W. Allard. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(12): 5466-5470.
18. Mohammadi, M., R.G. Mirfakhraii and A. Abbasi. 2013. Genetic diversity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) as revealed by microsatellite markers and association analysis of physiological traits related to spring cold stress. Genetic Novin, 3: 279-288 (In Persian).
19. Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43(4): 1235-1248.
20. Perry, D.J. 2004. Identification of Canadian durum wheat varieties using a single PCR. Theoretical and Applied Genetics, 109(1): 55-61.
21. Plaschke, J., M.W. Ganal and M.S. Röder. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics, 91: 1001-1007.
22. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2(3): 225-238.
23. Prasad, M., R.K. Varshney, J.K. Roy, H.S. Balyan and P.K. Gupta. 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theoretical and Applied Genetic, 100(3-4): 584-592.
24. Röder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy and M.W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics, 149(4): 2007-2023.
25. Röder, M.S., J. Plaschke, S.U. König, A. Börner, M.E. Sorrells, S.D. Tanksley and M.W. Ganal. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Molecular and General Genetics, 246(3): 327-333.
26. Saremi Rad, B., M. Shokrpor, O. Sofalian, A. Pormuhammad and E. Esfandiari. 2016. Evaluation of genetic diversity of wheat genotypes by AFLP markers. Journal of Crop Breeding, 7(16): 89-96 (In Persian).
27. Wei, L., C. Bian, Y. Wei, A. Liu, G. Chen, Z. Pu and Y. Zheng. 2013. Evaluation of genetic diversity of Sichuan common wheat landraces in China by SSR markers. Journal of Integrative Agriculture, 12(9): 1501-1511.
28. Wu, K.S. and S.D. Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Molecular Genetics and Genomics, 241: 225-235.
29. Zargani, M., G.A. Ranjbar and Sh. Ebrahim Nejad. 2015. Molecular assessment of genetic diversity among bread wheat (*Triticum aestivum* L.) doubled haploid lines using SSR markers. Journal of Crop Breeding, 7(15): 88-95 (In Persian).

Assessment of Genetic Diversity of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars using Microsatellite Markers

Nasrin Ghasemi[1], Reza Gholi Mirfakhraii[2] and Ali Reza Abbasi[3]

1- M.Sc.in Plant Breeding, Graduated from Tarbiat Modares University
2- Assistant Professor, Department of Plant Breeding, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, (Corresponding Authors: abdhoorz@modares.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Biotechnology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

Received: May 30, 2017 Accepted: September 3, 2017

Abstract

Determining the level of genetic diversity and relationships among genotypes is foundation for identifying the appropriate parents in different breeding objects. In present study, the genetic diversity of 22 wheat cultivars were tested using 22 pairs of SSR primers. Out of 24 detected alleles, 11 were able to show desirable polymorphism. In average 2.18 alleles per locus were generated, in which differed from 2 to 3 alleles in each locus. The average of 0.573 polymorphism information content were achieved that Xgwm60 for having high content of polymorphism, was the most appropriate marker for studying genetic diversity in this study. Similarity coefficient was formed with Dice similarity matrix and genotypes were classified into 4 groups. Principal component analysis confirms most of genetic diversity feature derived from cluster analysis. Results of current study showed the vast range of genetic diversity among wheat cultivars that illustrating their possible use in breeding programs.

Keywords: Cluster analysis, Genetic diversity, Microsatellite markers, Wheat