ژنتیک نوین
دوره چهارم، شماره۲، تابستان ۱۳۸۸
صفحه۴۸-۳۹

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP

ژیلا عثمانی[۱]، دکتر عادل سی و سه مرده[۲]

۱و۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه کردستان
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mail.com

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

اهمیت برآورد تنوع ژنتیکی به این دلیل است که کاهش تنوع ژنتیکی ممکن است موجب آسیب‌پذیری شدید محصولات زراعی در برابر تنش‌های محیطی، آفات و بیماری‌ها و در نتیجه کاهش عملکرد شود. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۷۳ اکوتیپ گندم سرداری توسط نشانگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت. سه جفت ترکیب آغازگر EcoRI:MseI به طور تقریبی ۲۴۳۱ نشانگر AFLP ایجاد نمود که ۱۵۸۲ مورد آن چندشکلی نشان داد (با میانگین درصد چندشکلی ۷۳/۹۲٪). جهت محاسبه تشابه ژنتیکی میان اکوتیپ‌ها از ضریب همبستگی جاکارد و روش گروه‌بندی UPGMA استفاده شد. اکوتیپ‌ها درسطح تشابه ۶۲ درصد در ۸ گروه قرار گرفتند. نتایج، تنوع ژنتیکی بالایی را میان اکوتیپ‌ها نشان داد، و می‌توان از این اکوتیپ‌ها جهت معرفی ژن‌های جدید در خزانه ژنی گندم نان استفاده نمود. همچنین به دلیل تنوع ژنتیکی بالای بدست آمده در بین این اکوتیپ‌ها، نتیجه گرفته شد که گندم سرداری احتمالاً یک رقم نیست بلکه توده‌ای از اکوتیپ‌ها می‌باشد و در پژوهش‌های آینده می‌توان اکوتیپ‌های برتر را شناسایی و جایگزین این توده از اکوتیپ‌ها نمود. همچنین نتایج نشان داد که تجزیه و تحلیل AFLP روشی مفید برای ارزیابی تنوع ژنتیکی میان اکوتیپ‌های گندم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

**نشانگر AFLP،
تنوع ژنتیکی،
گندم سرداری،
چندشکلی**

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.2.5.1]

مقدمه

گندم اولین غله و مهمترین گیاه زراعی دنیا است. طبق آمارهای مختلف بیش از ۷۰ درصد سطح زیر کشت محصولات زراعی در جهان به کشت غلات اختصاص دارد که از این مقدار، ۲۲ درصد آن به گندم اختصاص دارد (۲). گندم سرداری از بین توده‌های بومی ایران انتخاب و اصلاح شده است و رقمی است با میانگین ارتفاع بوته ۱۰۵ سانتی‌متر، نیمه زمستانه، دارای سنبله ریشک‌دار و بیضی شکل، رنگ دانه زرد، مقاوم به سرما، و حساس به سیاهک‌ها، متحمل به زنگ، کیفیت نانوایی خوب و در سال‌های مرطوب حساس به ورس می‌باشد. این رقم به ریزش مقاوم است و میزان عملکرد آن در شرایط مطلوب ۱/۵ تا ۲ تن است که در مناطق دیم و سرد کوهستانی کشور قابل کشت می‌باشد. از آنجائیکه با گذشت زمان تعداد بسیاری از ژن‌های مفید، از دست رفته است و ذخائر ژنتیکی با سرعت فزاینده‌ای کاهش یافته است و به سبب آن محصولات زراعی عمده، در معرض تهدید روزافزون شرایط محیطی نامناسب و تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار گرفته‌اند، امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان اجزاء مهم پروژه‌های اصلاح نباتات تلقی می‌گردند (۲). جهت به دست آوردن اطلاعات جامعی در مورد گندم سرداری، بررسی‌های مورفولوژیکی کافی نیست زیرا این بررسی‌ها متأثر از محیط هستند، و نمی‌تواند نماینده کامل ژنوم باشند. لذا به نظر می‌رسد استفاده از نشانگرهای DNA که چندشکلی را در سطح DNA آشکار می‌کنند، می‌تواند به عنوان روش‌های مکمل داده‌های مورفولوژیکی، روابط ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری را به طور کارآتر تعیین کند(۳). براساس تحقیقات انجام شده در مورد بازده یافتن چندشکلی در سیستم‌های نشانگری مختلف در گندم، تعداد باندهای چندشکل بدست آمده به ازای هر ترکیب کاوشگر-آنزیم با استفاده از نشانگر RFLP[۱]، دامنه‌ای از ۱/۲ در ۲۲۲ ژنوتیپ *T. aestivum* (۱۴) تا ۳/۳ در ۱۲۴ کولتیوار گندم معمولی (۲۲) داشته است و تجزیه و تحلیل STS-PCR[۲] ۴/۳ چندشکلی به ازای هر ترکیب آغازگر-آنزیم ایجاد نموده است (۸) همچنین توسط نشانگر RAPD[۳]، ۱/۸ چندشکلی میان ۱۵ کولتیوار گندم به ازای هر آغازگر تشخیص داده شد (۱۳)، بر اساس بررسی‌های انجام شده در مورد ژرم‌پلاسم‌های گندم اروپایی با استفاده از نشانگرهای SSR[۴]، به علت طبیعت مغلوب بودن و تعداد بالای الل‌های هر لوکوس مقدار چندشکلی بالاتر می‌باشد و از ۳/۵ (۷)، تا ۶/۲ گزارش شده است (۲۵). با استفاده از نشانگر ISSR[۵]، در بین ۳۰ گندم هگزاپلوئید، ۳/۷ چند شکلی به ازای هر آغازگر تشخیص داده شد (۲۱). اما در ۷۳ کولتیوار گندم معمولی ۱۵ چندشکلی به ازای هر ترکیب آغازگری در AFLP تشخیص داده شده است (۱۷). از بررسی‌های مولکولی انجام شده بر روی گندم سرداری، استفاده از نشانگر SSR جهت تعیین تنوع ژنتیکی و شناسایی ارتباط میان این نشانگرها با صفات فیزیولوژیکی مرتبط با آنها توسط پیرسیدی و همکاران (۲۰۰۶) می‌باشد، در این پژوهش از ۶۰ جفت ترکیب آغازگر استفاده شد و تنها ۴۵ باند چندشکل مشاهده گردید (۲۴). ریزماهواره‌ها (SSR) با استفاده از روشهای پیچیدهٔ زیست شناسی مولکولی و با هزینهٔ زیاد، توالی مجاور ریزماهواره‌ها تعیین می‌شود و سپس بر اساس توالی‌های احاطه کننده هر ریز ماهواره، آغازگرهای مناسب طراحی و ساخته می‌شوند در حالی که روش AFLP[۶]، نیازی به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر ندارد (۳ و ۲۸). تکنیک AFLP مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشد که توسط ووس و همکاران (۱۹۹۵)، ارائه گردید (۳۳). این تکنیک براساس تکثیر دستجات خاصی از قطعات برش یافته ژنومی با استفاده از PCR می‌باشد. تکرارپذیری بالا، امکان بررسی همزمان چندین مکان ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر، عدم حساسیت به غلظت DNA الگو، ظرفیت بررسی کل ژنوم برای نمایان ساختن چندشکلی، تولید تعداد زیاد نوار تکرارپذیر در مدت زمان کوتاه از مزایای این روش می‌باشد (۲۳، ۳۰ و ۳۳). تشخیص تنوع

[۱]- Restrictian Fragment Length Polymorphism

[۲]- Sequence – Tagged Sites

[۳]- Random Amplification Polymorphic DNA

[۴]- Simple Sequence Repeat

[۵]- Inter Simple Sequence Repeat

[۶]- Amplified Fragment Length Polymorphism

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.2.5.1]

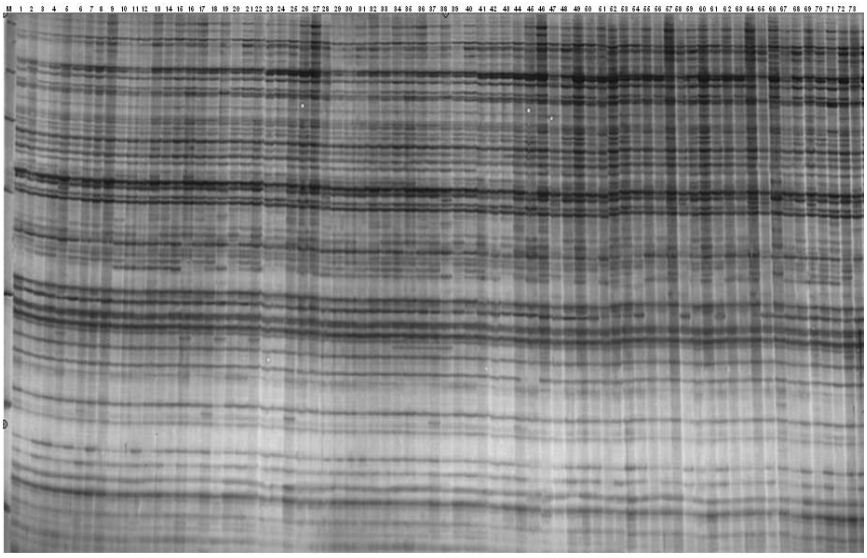
ژنتیکی و تعیین صفات زراعی گندم‌های هگزاپلوئید مصنوعی و والدینشان و ارزیابی ارتباط بین فواصل ژنتیکی در گندم با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و AFLP (۱۵ و ۳۲)، از گزارشات موجود در ارتباط با بازده یافتن تنوع ژنتیکی توسط نشانگر AFLP در گندم می‌باشد. در این پژوهش از نشانگر AFLP جهت بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری استفاده شده است.

مواد و روشها

۱-۲- مواد گیاهی: جمعیت مورد استفاده در این تحقیق شامل ۷۳ اکوتیپ گندم سرداری بود که بذر آنها از مؤسسه تحقیقات دیم مراغه تهیه شد. بذور در بهمن ماه سال ۱۳۸۵ ابتدا در گلدان کشت گردید و در اوائل اردیبهشت برگ‌های جوان هر لاین، جداگانه جهت استخراج DNA برداشت و پس از قرار دادن در کیسه‌های جداگانه و برچسب‌گذاری تا زمان استخراج، در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲-۲- استخراج DNA: استخراج DNA طبق روش تغییر یافته دلاپورتا و همکاران (۹) انجام گرفت. اندازه‌گیری غلظت DNA توسط ژل آگارز انجام شد. در این روش نمونه‌های DNA پس از مخلوط شدن با ۲-۱ میکرولیتر بافر بارگذاری، به صورت جداگانه در چاهک‌ها بارگذاری شدند و از مارکر مولکولی *Hind* III با وزن مولکولی مشخص به عنوان کنترل برای تخمین غلظت DNA استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۷۰ برای مدت ٤٠ دقیقه انجام شد و پس از آن رنگ آمیزی ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵-۵ دقیقه انجام شد و ژل پس از شستشو، در زیر نور ماوراء بنفش در دستگاه UV transluminator مشاهده گردید. غلظت نمونه‌های DNA با الگوی نواربندی نشانگر مقایسه و تعیین غلظت شد. در نهایت غلظت هر نمونه ۳۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر جهت انجام تجزیه AFLP تنظیم شد.

۳-۲- تجزیه و تحلیل AFLP: جهت انجام تکنیک AFLP در ابتدا DNA ژنومی (۳۰۰ نانوگرم) توسط آنزیم‌های محدودکنندهٔ *Mse*I و *Eco*RI برش داده شد. سپس قطعات DNA دورشته‌ای برش‌یافته به آداپتورها (۵ پیکومول از *Eco*RI و ۵۰ پیکومول از *Mse*I) متصل شدند. مرحلهٔ تکثیر مقدماتی توسط آغازگرهای *Eco*RI و *Mse*I بدون نوکلئوتید اضافی و تکثیر انتخابی توسط آغازگرها با سه نوکلئوتید انتخابی انجام شد. محصولات تکثیر انتخابی بر روی ژل اکریل‌آمید ٦ درصد واسرشته‌ساز بارگذاری و برای رنگ‌آمیزی ژل حاصل از روش نیترات نقره استفاده شد (۶). ژل حاصل از ترکیب آغازگری E-CAC / M-CAT در نگارهٔ ۱ ارائه شده است.



نگاره ۱- الگوی نواری آغازگر M-CAT/E-CAC به منظور بررسی نوارهای چندشکل بین اکوتیپ‌های گندم سرداری بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید توالی‌یاب و با استفاده از مارکر مولکولی 1kb ladder، در این ژل ۷۳ اکوتیپ به ترتیب شماره از چپ به راست قرار گرفته‌اند

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.2.5.1]

۴-۲- تجزیه وتحلیل داده‌ها: تشخیص باندها با استفاده از نرم‌افزارهای Croos Cheker و ویرایش دستی انجام شد. پس از تشکیل ماتریس تشابه، تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc Ver 2/02 (۲۳) و به روش تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت. سپس تجزیه تابع تشخیص[۷] وتجزیه مؤلفه‌های اصلی[۸] با استفاده از نرم‌افزار SAS Ver 8.2 (۲۹)، جهت تکمیل و تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای انجام شد. به منظور تعیین هتروزیگوستی نیز از نرم افزار Popgene Ver 1.31 [۹] (۳۴) و جهت تعیین شاخص تنوع شانون[۱۰] از نرم افزار MVSP Ver 3.13[۱۱] استفاده شد.

نتایج

۳-۱- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ژل: برای بررسی چندشکلی‌های DNA بین اکوتیپ‌های گندم سرداری، از ۱۱ جفت آغازگر *Eco*RI و *Mse*I با سه نوکلئوتید انتخابی استفاده شد. از بین این آغازگرها سه جفت آغازگر E+CAC/M+CAT، E+GCC/M+GCG و E+CGG/M+GGA باندهای تکثیری چندشکل در بین اکوتیپ‌های گندم سرداری تولید نمودند، سایر جفت آغازگرها یا هیچ گونه باندی تولید نکردند و یا این که محصولات تکثیر شده آنها وضوح و قابلیت تکرارپذیری کافی نداشتند لذا برای انجام آزمایشهای بعدی مورد توجه قرار نگرفتند و حذف گردیدند. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود از این سه جفت آغازگر مجموعاً ۲۴۳۱ قطعه (لوکوس) DNA بدست آمد که از بین آنها ۱۵۸۲ قطعه در بین تمام اکوتیپ‌ها چندشکل بود (۷۳/۹۲٪). تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف، متفاوت می‌باشد. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده مربوط به ترکیب آغازگر E+CGG/M+GGA بوده است و بیشترین درصد چندشکلی مربوط به ترکیب آغازگر E+CGG/M+GGA بوده است. اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگرها در محدوده ۸۰۰-۳۰۰ جفت باز تخمین زده شد. یکی از پارامترهای مهم در مقایسه و بررسی تنوع ژنتیکی، تنوع ژنی می‌باشد، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، میانگین تنوع ژنی ($\pm$ انحراف معیار) در بین اکوتیپ‌های گندم سرداری ۰/۱۷±۰/۲۳ می‌باشد و این مقدار در ترکیب آغازگری E-CAC / M-CAT برابر با ۰/۲۸ بود که بیشتر از دو ترکیب آغازگری دیگر است. همچنین شاخص نشانگری[۱۲] که به عنوان معیار کارایی نشانگر در تعیین چندشکلی استفاده می‌گردد نیز در این ترکیب آغازگری برابر با ۱۹۴/۳۲ و بیشتر از بقیه می‌باشد. میانگین شاخص تنوع شانون برای اکوتیپ‌های گندم سرداری ٤/٤٩٨ بود. اکوتیپ‌های ۳۳ و ٤٦ به ترتیب بیشترین و کمترین (٤/٦٣٥ و ٤/١٢٧) مقدار شاخص تنوع را داشتند.

۳-۲- نتایج تجزیه خوشه‌ای: تجزیه خوشه‌ای ارقام بر اساس داده‌های AFLP با استفاده از تست مانتل[۱۳] و ضرایب تشابه جاکارد[۱٤]، دایس[۱۵] و نی و لی[۱٦] به روش UPGMA مورد مقایسه قرار گرفت، ضریب تشابه جاکارد، ضریب کوفنتیک بالاتری داشت (۰/۹۸)، در نتیجه برای ادامه کار جهت گروه‌بندی اکوتیپ‌ها از این ضریب استفاده شد که نتایج در نگارهٔ ۲ ارائه شده است. اکوتیپ‌ها درسطح تشابه ٦٢ درصد به ۸ گروه تقسیم شده است. دامنه تشابه از ۰/۵۰ تا ۰/۸۹ بود. چون تشابه ژنتیکی با فاصله ژنتیکی دارای رابطه معکوس است، لذا دو اکوتیپ ١٦ و ۱۷ که بیشترین تشابه ژنتیکی را نشان دادند، دارای کمترین فاصله یا اختلاف ژنتیکی می‌باشند. همچنین دو اکوتیپ ۲۳ و ٢٤ کمترین شباهت را با سایر اکوتیپ‌ها نشان دادند زیرا در سطح تشابه ۵۰ درصد با سایر گروه‌ها مرتبط می‌گردند. بیشترین درصد اکوتیپ‌ها در کلاستر ۲ (۳۸/۳۵ درصد) و سپس در کلاستر ٤ (٣٦/٩٨ درصد) واقع شدند و کمترین آنها در کلاسترهای ۵، ٦ و ۸ (هر کدام ۲/۷۳ درصد) قرار داشتند.

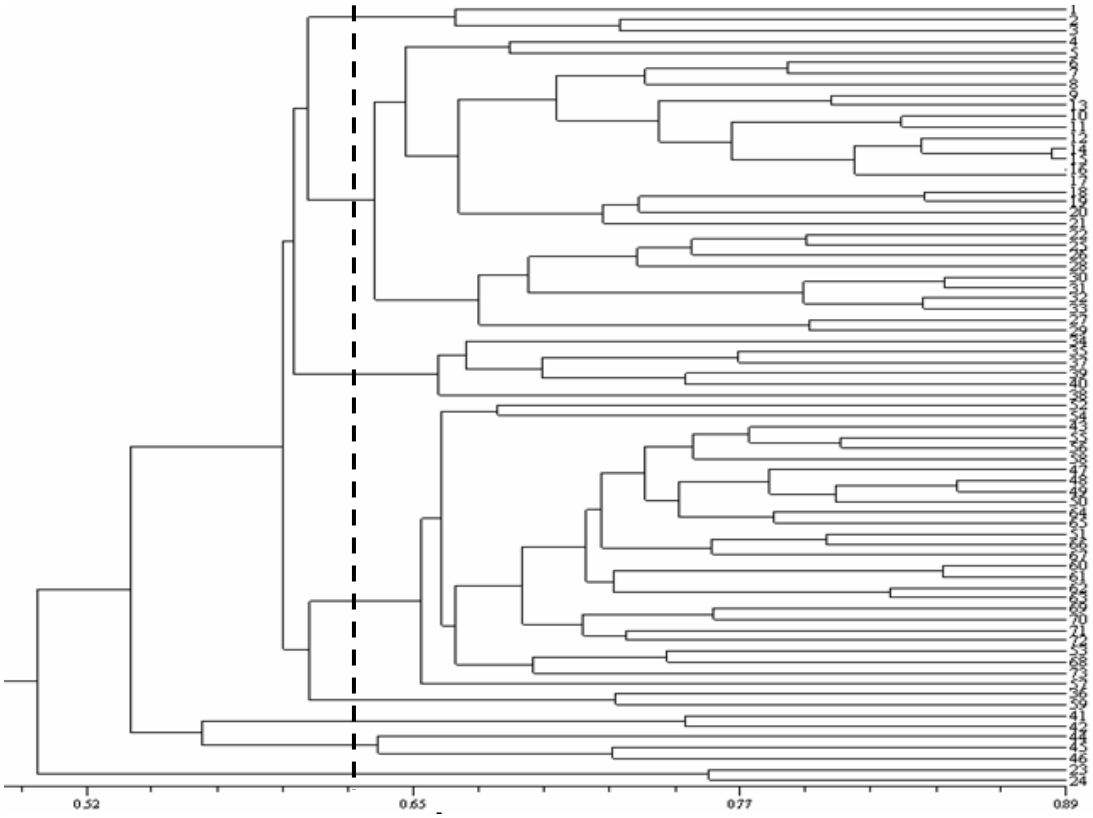
[۷]- Discrimination factor analysis
[۸]- Principle Component Analysis
[۹]-Population genetic analysis (1.31)
[۱۰]- Shonnon`s Information Index
[۱۱]- Multi Variate Satistical Package (3.13)
[۱۲]-Marker Index
[۱۳]- Mantel test
[۱٤]- Jaccard
[۱۵]-Dice
[۱٦]-Nei and lee

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.2.5.1]

جدول ۱- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل AFLP در اکوتیپ‌های گندم سرداری. توالی آداپتورها و پرایمرهای به کار برده در ردیف پـایین جدول نشان داده شده است.

	ترکیبات پرایمری		تعداد کل	تعداد باندهای	درصد باندهای	میانگین تنوع ژنی	شاخص
	***EcoR*I-**	***Mse*I-**	باندها	چندشکل	چندشکل	(انحراف معیار)	مارکری
۱	CAC	CAT	۷۷٦	٦۹٤	۸۹/٤۳	۰/۲۸ (۰/۱٦)	۱۹٤/۳۲
۲	GCC	GCG	۱۲۵۲	۵۲۳	٤۱/۷۷	۰/۱۵ (۰/۱۹)	۷۸/٤۵
۳	CGG	GGA	٤۰۳	۳٦۵	۹۰/۵۷	۰/۲۵ (۰/۱۵)	۹۱/۲۵
میانگین			۸۱۰/۳	۵۲۷/۳۳	۷۳/۹۲	۰/۲۳ (۰/۱۷)	۳٦٤/۰۲
کل			۲٤۳۱	۱۵۸۲	۲۲۱/۷۷		

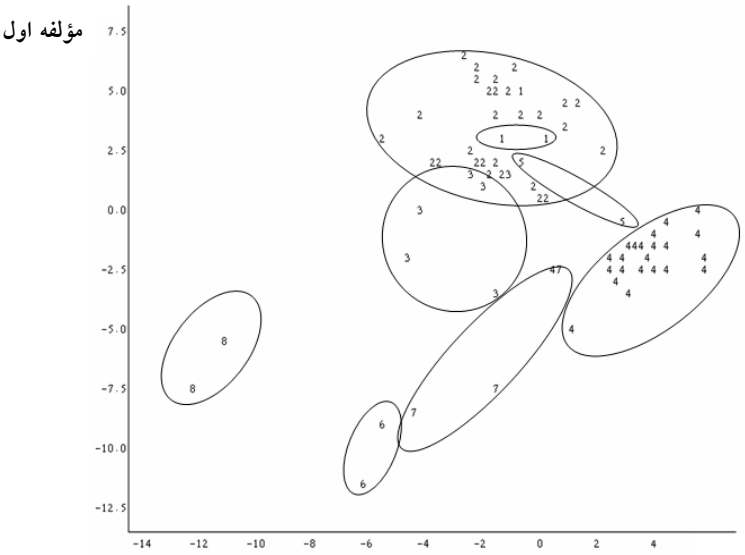
آداپتور ***EcoR*I**	اتصال	5' - CTC GTA GAC TGC GTA CC -3' 3' - CAT CTG ACG CAT GGT TAA-5'
آداپتور ***Mse*I**		5' -GAC GAT GAG TCC TGA G-3' 3' -TAC TCA GGA CTC AT-5'
پرایمر ***EcoR*I**	تکثیر مقدماتی	5'-GACTGCGTACCAATTC -3'
پرایمر ***Mse*I**		5'- GATGAGTCCTGAGTAA -3'



نگارهٔ ۲- دندروگرام حاصل از ترکیب داده‌های سه جفت آغازگر E-CAC / M-CAT، E-GCC / M-GCG و E-CGG / M-GGA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش دسته‌بندی UPGMA. خط چین در این نمودار خط برش را در سطح تشابه ۶۲ درصد نشان می‌دهد.

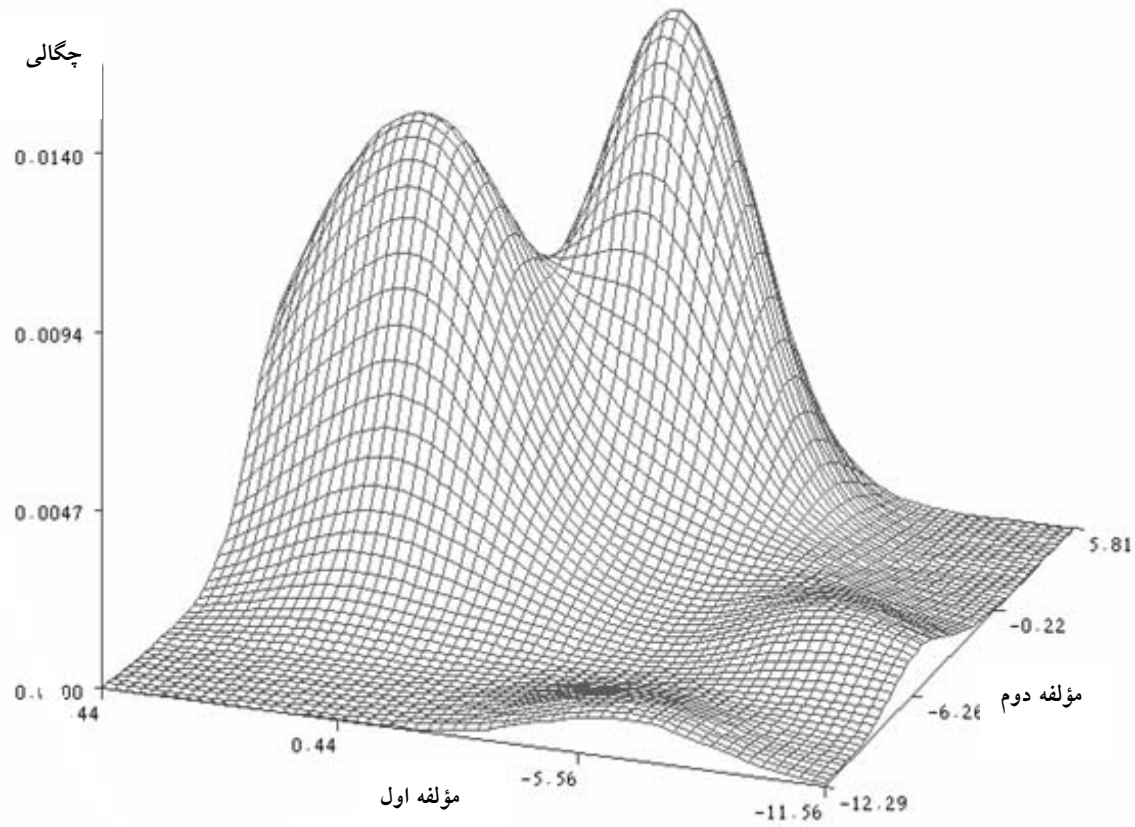
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.2.5.1]

۳-۳- نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی و تجزیه تابع تشخیص: در این مطالعه تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به منظور بررسی توزیع مناسب ژنومی نشانگرهای AFLP استفاده شده با استفاده از نرم‌افزارSAS ver 8.2 انجام شد. بردارهای مشخصه مربوط به ۴۱ ریشه مشخصه بزرگتر از یک مهمترین بردارهای متعامد بودند. ۴۱ مؤلفه اول جمعاً ۹۰/۳۸ درصد از کل تنوع ژنتیکی را توجیه نمودند. از این میان، دو مؤلفه اول بیشترین واریانس کل (۱۸٪) بین اکوتیپ‌ها را توجیه نمودند. در صورتی که نشانگرهای مولکولی از کروموزوم‌های مختلف انتخاب شده باشند همبستگی و پیوستگی بین آنها کم خواهد بود و مؤلفه‌های بیشتری برای توجیه تغییرات کل واریانس داده‌ها لازم است. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ۳ جفت نشانگر AFLP مورد استفاده دارای توزیع مناسب ژنومی بوده است. با توجه به اینکه دو مؤلفه اول و دوم حدود ۵۰ درصد از تغییرات بین گروه‌ها را توجیه نموده‌اند، رسم نمودار پراکنش و چگالی بر مبنای این دو مؤلفه می‌تواند تقسیم‌بندی قابل توجیه‌تری از توزیع واقعی داده‌ها ارائه نماید. نمودار پراکنش گروه‌ها بر مبنای مؤلفه اول و دوم در شکل ۳ نشان داده شده است. ۸ گروه حاصل از دسته‌بندی اکوتیپ‌ها بر اساس تجزیه خوشه‌ای، در شکل ۳ کاملاً قابل تشخیص می‌باشد که این مسئله مؤید قطع نمودار تجزیه خوشه‌ای از محل مناسب و دسته‌بندی صحیح اکوتیپ‌ها می‌باشد. همچنین قرار گرفتن اکوتیپ‌های هر کلاستر در کنار هم، نتایج تجزیه کلاستر را تأیید می‌کند. همچنین نمودار چگالی بر مبنای دو مؤلفه اول و دوم در شکل ۴ نشان داده شده است. دیده شد که در این نمودار اکوتیپ‌ها از دو دسته اصلی (سمت راست نمودار) تشکیل شده است که به ترتیب مؤید کلاستر دوم و اول حاصل از تجزیه خوشه‌ای می‌باشد که بیشترین اکوتیپ‌ها را در خود جای داده‌اند همچنین سایر کلاسترها که درصد کمتری از اکوتیپ‌ها را تشکیل داده بودند در نمودار قابل تفکیک هستند (سمت چپ نمودار) لذا نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای توجیه شد. همچنین تجزیه تابع تشخیص جهت تعیین فاصله بین کلاسترها و میزان خطای گروهبندی کلاسترهای بدست آمده از تجزیه خوشه‌ای، با استفاده از نرم‌افزار SAS Ver 8.2 انجام شد. نتایج حاصل از این تجزیه نشان داد که کلاستر پنجم از کلاستر هشتم بیشترین فاصله را دارا می‌باشد (۱/۱۵۸۰)، از آنجایی که هر چه فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها بیشتر باشد می‌توان به هتروزیس بیشتری دست یافت. در نتیجه از طریق تلاقی اکوتیپ‌های کلاستر پنجم و هشتم بیشترین هتروزیس حاصل می‌شود. کلاستر دوم و سوم کمترین فاصله را از یکدیگر داشتند (۰/۲۰۰۳۱). همچنین میزان خطای گروهبندی برای تمام کلاسترها بر اساس تجزیه تابع تشخیص نشان داد که درصد اشتباه گروهبندی در تمام کلاسترها صفر می‌باشد در نتیجه تمام کلاسترها ۱۰۰ درصد درست گروهبندی شده‌اند.



نگارهٔ ۳- تصویر سه بعدی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر مبنای دو مؤلفه اول و دوم در ۱۷۳اکوتیپ گندم سرداری

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.2.5.1]



نگارهٔ ۴- نمودار پراکنش گروه‌ها بر اساس تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر مبنای دو مؤلفه اول و دوم در ۱۷۳ اکوتیپ گندم سرداری

بحث

توزیع و فراوانی نشانگرهای AFLP در طول ژنوم یکنواخت نیست و همانند سایر غلات انتخاب ترکیب آغازگرها به طور مستقیم بر توزیع مکانی نشانگرهای AFLP تأثیر می‌گذارد. دلیل توزیع غیریکنواخت این نشانگر به مکانیسم‌های ایجاد چندشکلی در این نشانگر نسبت داده می‌شود، وقایعی مانند موتاسیون[۱۷]، حذف[۱۸] و اضافه شدن[۱۹] قطعات در ایجاد چند شکلی در این نشانگر دخیل می‌باشند (۱۱). عموماً نشانگرهای AFLP که با ترکیب‌های مختلف آنزیم‌های برشی حاصل شده‌اند، توزیع مناسب‌تری در طول ژنوم داشته‌اند (۱۱ و ۳۱). در این پژوهش از تعداد کمی ترکیب آغازگری (۳ ترکیب) جهت بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌ها استفاده شد، اگرچه استفاده از تعداد زیاد آغازگر در افزایش دقت گروه‌بندی ارقام مؤثر است، ولی در مواردی که بتوان با تعداد کمی آغازگر تنوع موجود بین ارقام یک گونه گیاهی را تشخیص داد، دیگر نیازی به استفاده از تعداد بیشتری از آغازگرها نیست. بطور مثال در یک تحقیق، تمایز ۱۱ ژنوتیپ لوبیا با استفاده از دو آغازگر تصادفی گزارش گردیده است (۱۸) که دلیل اصلی آن تنوع زیاد در بین نمونه‌های مورد آزمایش بود. ساسانوما و همکاران (۲۰۰۲)، تنوع ژنتیکی ارقام وحشی گندم را با استفاده از ٤ ترکیب پرایمری بدست آوردند (۳۰)، الیس و همکاران (۱۹۹۷)، نیز ثابت کردند که با به کارگیری شش ترکیب آغازگری، امکان توجیه ۸۰ درصد از روابط مورد انتظار در گیاه جو وجود دارد (۱۰). در این پژوهش به دلیل تعداد بالای باندهای چندشکل و مشاهده تنوع زیاد در بین ارقام مورد مطالعه ضرورتی برای افزایش تعداد آغازگرها تشخیص داده نشد. همچنین بدست

[۱۷]- Mutation
[۱۸]- Deletion
[۱۹]- Insertion

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.2.5.1]

آمدن تعداد بالای باندهای چندشکل در مقابل تعداد کم باندهای تک شکل (بدون چند شکلی)، نشان داد که تجزیه و تحلیل AFLP، پتانسیل بالایی برای یافتن تنوع ژنتیکی در میان اکوتیپ‌ها دارد. نتایج مشابهی در بررسی‌های گذشته بر روی گندم بدست آمده است، ویرا و همکاران (۲۰۰۷)، با استفاده از ۶ ترکیب آغازگر نشانگر AFLP، میانگین ۹۱/۲ درصد باند چندشکل را در میان ۱۹ ژنوتیپ گندم بدست آوردند (۳۲). آلمانزا پینزون و همکاران (۲۰۰۳)، تنوع ژنتیکی را میان نژادهای گندم نان بهاره بررسی نمودند و میانگین ۵۹ درصد باند چندشکل را گزارش کرده‌اند (۴). نتایج پژوهش ما نشان داد که روش AFLP یک ابزار سریع و قدرتمند است زیرا نیاز به حداقل کار اولیه دارد ولی تنوع ژنتیکی مناسبی را در جمعیت نمایان می‌نماید که دستیابی به آنها با روش‌های دیگر در همان زمان و با همان مقدار هزینه مشکل و یا غیر ممکن است. از روش AFLP از آن جهت به طور گسترده استفاده می‌شود که اطلاعات زیادی را فراهم می‌آورد. تکنیک AFLP بدلیل تکرارپذیری بالا و لوکوس‌های زیادی که در زمان کوتاه و در یک آزمون مورد سنجش قرار می‌گیرد، یک تکنیک مفید و قابل اعتماد می‌باشد، چرا که تکرارپذیری یکی از معیارهای مهم برای یک نشانگر خوب می‌باشد که می‌توان خوشه‌بندی صحیحی بر اساس داده‌های حاصل از آن برای ارقام متفاوت انجام داد (۱۹ و ۲۶). در تحقیقی که توسط جونز و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که تکنیک AFLP تکرار پذیری بالایی در بین هفت آزمایشگاه اروپایی داشته است، این آزمایشات تنها در یک باند با هم تفاوت داشتند (۱۲). ولی با این وجود نشانگرAFLP به عنوان یک نشانگر غالب محسوب می‌شود و در نتیجه نمی‌توان هتروزیگوت‌ها را از هموزیگوت‌ها تشخیص داد، ولی با استفاده از نرم‌افزارهای مخصوص می‌توان هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها را از هم تفکیک کرد (٦).

میزان چند شکلی نشانگر AFLP در گندم متفاوت ذکر شده است و در تحقیقات انجام شده بین ۱ تا ١٤ و متوسط ۷/۷ نوار چند شکل متغیر بوده است (١٦). اما نتایج بدست آمده از مقدار درصد پلی‌مورفیسم در این پژوهش نشان دهنده تنوع ژنتیکی بسیار زیاد میان این اکوتیپ‌ها می‌باشد (۷۳٪) در نتیجه می‌توان از این اکوتیپ‌ها جهت معرفی ژن‌های جدید در داخل خزانه ژنی گندم نان استفاده کرد. دامنه تشابه میان این اکوتیپ‌ها همانطور که در نتایج این تحقیق ارائه شد ۰/۵۰ تا ۰/۸۹ می‌باشد. نتایج مشابهی توسط پیرسیدی و همکاران (۲۰۰٦)، بدست آمد که با بررسی تنوع ژنتیکی ۳۵ کولتیوار گندم سرداری با استفاده از نشانگر SSR دامنه تشابه را ۰/۳٤ تا ۰/۸۸ گزارش کردند و این مسأله نشان‌دهنده تنوع بالای موجود در میان این نمونه‌ها می‌باشد (٢٤). با وجود اینکه در طول سه دهه اخیر گندم سرداری توسط اصلاح‌کنندگان بذور دیم به عنوان یک کولتیوار خالص معرفی شده است، اما نتایج بدست آمده از میزان تنوع در این تحقیق (پیرسیدی و همکاران)، و آنچه که در گزارشات ما ارائه شد تنوع بالا را میان اکوتیپ‌های گندم سرداری ثابت می‌کند که ممکن است در نتیجه شرایط تنش‌زای محیطی که این اکوتیپ‌ها در آنجا کشت شده‌اند بوجود آمده باشد. اثرات گسترده تنش بر ساختار ژنومی به طور مفصل در گزارشی توسط مادلونگ و کومال (۲۰۰۴) ارائه شده است (۲۰). تنوع ژنتیکی به دست آمده در این مطالعه دلیل غیرقابل‌انکاری برای اثبات وجود تنوع ژنتیکی فراوان در اکوتیپ‌های مختلف سرداری می‌باشد و نشان می‌دهد که این اکوتیپ‌ها از دیر باز در مناطق مختلف مورد کشت قرار می‌گرفته‌اند و متناسب با اقلیم محل کشت دچار تغییرات گردیده‌اند، در این میان مبادله بین مزارع و مراحل توسعه‌ای ارقام نوترکیب جدید هم می‌تواند نقش مهمی را ایفا نماید. احتمالاً انتخاب اعمال شده توسط کشاورزان، عمدتاً سبب انتخاب بخش بزرگی از ژنوم گیاه شده است و یا تغییر ژنتیکی کوچک در نواحی مرتبط با صفت مطلوبی شده باشند و در ایجاد تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها کمک نموده است. بررسی بیشتر و مطالعه دقیق بر روی این تغییرات و تنوع ژنتیکی مرتبط با آن می‌تواند در مطالعات تکامل مولکولی و برنامه‌های اصلاحی جهت بهبود ساختار ژنتیکی این اکوتیپ‌ها موثر باشد. در نهایت بررسی تنوع ژنتیکی حاضر می‌تواند همراه با داده‌های فیزیولوژیکی جهت طراحی برنامه‌های اصلاحی برای بهبود ساختار ژنتیکی و حفظ ذخایر ژنتیکی موجود گندم سرداری مورد استفاده قرار گیرد. اگر فرض شود که گندم سرداری یک رقم باشد، باید شباهت زیادی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.2.5.1]

از لحاظ ژنتیکی میان آنها مشاهده شود، اما تنوع بسیار زیاد میان توده‌های مورد بررسی نشان می‌دهد، برخلاف نظراتی که درباره این مجموعه از توده‌ها وجود دارد نمی‌توان سرداری را یک رقم دانست. داده‌های بدست آمده در مورد صفات فیزیولوژیک این اکوتیپ‌ها نیز تنوع زیادی نشان داده است و این مسأله را تأیید می‌کند (۲). لذا می‌توان نتیجه گرفت که سرداری یک توده از اکوتیپ‌ها می‌باشد که با شرایط جغرافیایی مناطق مختلف کشور سازگار شده است. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق توصیه می‌شود در بررسی‌های آینده با مطالعه بر روی این توده از اکوتیپ‌ها چه از لحاظ ژنتیکی و با شناسایی ژن‌های مقاوم در آن و چه از لحاظ مورفولویکی و فیزیولوژیکی، اکوتیپ‌های برتر شناسایی و معرفی شوند تا در آینده بتوان اکوتیپ‌های برتر را جایگزین این توده از اکوتیپ‌ها نمود و از این محصول باارزش و مهم که توانسته است ٦٥٪ از گندم دیم استان کردستان و ١٤٪ از گندم دیم کشور و همچنین ۵٪ از کل گندم کشور را تأمین کند به شیوه بهتر و مؤثرتری بهره جست. با توجه به اینکه در بیشتر موارد تنوع یا تفاوت مشاهده شده بین دو ژنوتیپ در سطح DNA از نظر فنوتیپی خنثی است، بنابراین تعیین فاصله ژنتیکی بین ارقام تنها بر اساس نشانگرهای DNA جهت گروه‌بندی هتروتیک مؤثر نخواهد بود و توصیه می‌شود که تعیین گروه‌های هتروتیک بر اساس داده‌های چندگانه یعنی مولکولی و موفولوژیکی باشد (۱۸). همچنین پیشنهاد می‌گردد ارقامی که فاصله ژنتیکی زیادی با هم دارند را در فرایند تلاقی بکار برد.

سپاسگزاری: از همکاری صمیمانه مهندس وهابی بابت ارایه نظرات علمی در طول اجرای طرح سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از آقای مهندس کریمی و خانم مهندس روشنگر و سایر دوستان گرامی که در به انجام رساندن این طرح یاری رساندند قدردانی می‌گردد.

منابع:

۱) سی و سه مرده، ع. ۱۳۸۶. بررسی صفات فیزیولوژیک اکوتیپ‌های گندم سرداری. گزارش نهایی طرح پژوهشی سازمان مدیریت و برنامه ریزی.

۲) کریمی، ه. ۱۳۷۱. گندم. مرکز نشر دانشگاهی تهران.

۳) قره‌یاضی، ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت. دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ص ص ۳۸۱-۳۲۸.

4) Almanza-Pinzon, M., Hairallah, M., Fox, P. and Walburton, M. 2003. Comparison of molecular markers and coefficients of parentage for the analysis of genetic diversity among spring bread wheat accessions. Euphytica, 130:77-86.

5) Bassam, B., Caetano-Anolles, J. and Greshoff, P. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gel. Anal, Biochem, 196: 80-83.

6) Breyne, P., Boerjan, W., Gerates, T., Van Monague, M. and Van Gysel, A. 1997. Applications of AFLP in plant breeding. Molecular biology and genetics. 129: 107-117.

7) Bryan, G., Collins, A., Stephenson, P., Orry, A., Smith, J. and Gale, M. 1997. Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. Theor, Appl, Genet, 94:557-563.

8) Burkhamer, R., Lanning, S., Martens, R., Martin, J. and Talbert, L. 1998. Predicting progeny variance from parental divergence in hard red spring wheat. Crop Sci, 38:243-248.

9) Dellaporta, S., Wood, L. and Hicks, J. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II, Plant, Mol, Biol, Rep, 4:19-21.

10) Ellis, R., Mcnicol, J., Baird, E., Booth, A. and Lawrence, P. 1997. The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. Mol Breeding, 3:359-369.

11) Greg, A. 1998. An AFLP based genome map of wheat (*Triticum aestivum*). Plant and Animal Genome VI Conference, San Diego, CA, January, PP: 18-22.

12) Jones, C., Edwards, K., Castaglione, S., Winfield, M., Sala, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevschi, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A. and Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by network of European laboratories. Mol Breed, 3:381-390.

13) Joshi, C. and Nguyen, H. 1993. Application of the random amplified polymorphic DNA technique for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats. Genome, 36: 602-609.

14) Kim, H. and Ward, R. 1997. Genetic diversity in Eastern US, soft winter wheat (*Triticum aestivum* L, em, Thell) based on RFLPs and coefficient of parentage. Theor Appl Genet, 94:472-479.

15) Lage, J., Warburton, M., Crossa, J., Skovmand, B. and Andersen, S. 2003. Assessment of genetic diversity in synthetic hexaploid wheats and their *Triticum dicoccum* and *Aegilops tauschii* parents using AFLPs and agronomic traits. Euphytica, 134:305-317.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.2.5.1]

16) Langridge, P., Lagudah, E., Holton, T., Apples, R., Sharp, P., Chalmers, K. 2001. Trends in genetic and genome analysis of wheat: a review. Aust, J, Agric, Res, 52:1043-1077.
17) Law, J., Donini, P., Koebner, R., Reeves, J. and Cooke, R. 1998. DNA profiling and plant variety registration, III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphism. Euphytica, 102: 335-342.
18) Li, M. and Midmore, D. 1999. Estimating the genetic relationship of chinese water chestnut (*Eleocharie dulcis*) cultivated in australia, using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). Journal of Horticulture Science and Biotechnology, 74:224-231.
19) Mace, E., Gebhardt, C. and Lester, R. 1999. AFLP analysis of genetic relationships in the tribe Datureae (solanaceae). Theor Appl Genet, 99:634-641.
20) Madlung, A. and Comal, L. 2004. The effect of stress on genome regulation and structure. Ann Bot, 94:481-495.
21) Nagaoka, T. and Ogihara, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor, Appl, Genet, 94:597-602.
22) Paull, J., Chalmers, K., Karacousis, A., Kretschmer, J., Mannings Langridge, P. 1998. Genetic diversity in Australian wheat varietes and breeding material based on RFLP data. Theor, Appl, Genet, 96:435-446.
23) Pejic, I., Ajmone-Marsan, P., Morgane, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G. and Motto. M., 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbreed lines detected by RFLP, RAPDs, SSRs, and AFLPs. Theor Appl, Genet, 97:1248-1255.
24) Pirseyedi, S., Mardi, M., Naghavi, M., Iran Doost, H., Sadeghzadeh, D., Mohammadi, S. and Ghareyazie, B. 2006. Evaluation of genetic diversity and Identification of informative markers for morphological characters in Sardari derivative wheat lines. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(13):2411-2418.
25) Plaschke, J., Ganal, M. and Röder, M. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor Appl Genet, 91:1001-1007.
26) Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalsky, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSRs (microsatellite) markers for germplasm analysis. Breed Mol, 2:225-238.
27) Rohlf, F. 1998. NTSYS- pc ver 2/02, Numerical taxonomy and Multivariate analysis Exeter software. setauket, Newyork.
28) Roy, J., Lakshmikumaran, M., Balyan, H. and Gupta, P. 2004. AFLP-based genetic diversity and its comparison with diversity based on SSR, SAMPL, and phenotypic traits in bread wheat. Biochemical Genetics, Vol, 42, Nos,1/2.
29) SAS institute. 2002. SAS user Guide Statics, Version 8/2 ed. SAS institute Inc, Cary, N, C.
30) Sasanuma, T., Chabane, K., Endo, T. and Valkoun, J. 2002. Genetic diversity of wheat wild relatives in the Near East detected by AFLP. Euphytica, 127:81-93.
31) Staub, J. and Serquen, C. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. Hort science, 31(5):729-740.
32) Vieira, E., de Carvalho, F., Bertan, I., Kopp, M., Zimmer, P., Benin, G., de Silva. J., Hartwig, I., Malone, G. and de Oliveira, A. 2007. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers, Genetics and Molecular Biology, 30(2):392-399.
33) Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Theovan, D., Hornes, M., Frijers, A., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res, 23:4407-4414.
Yeh, F., Yang, C. and Boyle, T. 1999. POPGENE: Microsoft Windows based freeware for population genetic analysis. Version 1/31, University of Alberta.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.2.5.1]