

بررسی تنوع ژنتیکی برخی لاین‌های جو زراعی با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP

Evaluation of genetic diversity of some cultivated barley (*Hordeum vulgare L.*) lines by AFLP markers

افسانه شیری^۱، سیده‌ساناز رمضانپور^{*}^۱، حسن سلطانلو^۱، مهدی کلاته‌عربی^۲، شعبان کیا^۲

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیاران، مرکز تحقیقات کشاورزی گلستان

Shiri A¹, Ramezanpour SS^{*1}, Soltanloo H¹, Kalateh Arabi M², Kia Sh²

1.1. Graduated Student, Associate Professors, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Assistant Professor, Faculty Staff of Golestan Agricultural Research Station, Gorgan, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

چکیده

جو یکی از غلات مهم در جهان است که به عنوان غذا مورد استفاده بشر و حیوانات قرار می‌گیرد. کاهش تنوع ژنتیکی در این گیاه موجب آسیب‌پذیری شدید در برابر تنش‌های محیطی، آفات و بیماری‌ها و در نتیجه کاهش عملکرد شده است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۶۴ لاین زراعی جو در یک طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP بررسی شد. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی و تعیین تنوع ژنتیکی موجود در لاین‌های مورد بررسی جو از نظر مولکولی و استفاده از اطلاعات حاصل در انتخاب والدین برای انجام تلاقی و تولید جمعیت‌های مناسب در نسل‌های بعدی بود. با استفاده از ۸ ترکیب آغازگری AFLP تعداد ۷۴۹ باند حاصل شد که ۹۳ باند چندشکل بودند. بیشترین و کمترین باند چندشکل به ترتیب، با استفاده از ترکیبات آغازگری E-M-CTA (۱۶ باند) و E-ACA /M-CTC (۷ باند) حاصل شد. از آنجا که بیشترین میزان PIC مربوط به ترکیب آغازگری E-ACA / M-CAA (۰/۴۱) بود، بنابراین می‌توان از آن برای تمایز بین ژنوتیپ‌های جو با خویشاوندی بسیار نزدیک استفاده کرد. تجزیه خوشه‌ای صفات مولکولی بر اساس ضریب تشابه جاکارا، لاین‌های مورد مطالعه را به ۷ گروه تقسیم کرد. تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) نیز نتایج تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد. لاین ۴۱ و رقم بومی صحرا کمترین تشابه ژنتیکی را نشان داده و دارای بیشترین فاصله یا اختلاف ژنتیکی بودند. بنابراین در برنامه‌های اصلاحی می‌توان از این دو لاین برای انجام تلاقی و تولید نتاج دارای تنوع ژنتیکی بالا استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه به مختصات اصلی
تجزیه خوشه‌ای
جو زراعی
نشانگر مولکولی AFLP

مقدمه

هر ساله میلیون‌ها هکتار از اراضی زراعی در جهان به کشت گیاهان خانواده گندمیان اختصاص داده می‌شود که در این بین جو با اختصاص حدود ۱۱ درصد از سطح زیر کشت غله دنیا و همچنین با ۱۲ درصد تولید پس از گندم، برنج، ذرت، چهارمین غله با اهمیت جهان محسوب می‌شود (Patpour 1998). جو به علت تنوع ژنتیکی بالا یکی از گیاهانی است که در شرایط کاملاً متفاوت آب و هوایی رشد کرده و دارای ارقامی می‌باشد که نسبت به شرایط مختلف سازگاری دارند (Ebrahimi et al. 2011). یکی از پی‌آمدی‌های اجتناب‌ناپذیر کشاورزی مدرن که مبتنی بر استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت قابل قبول است، کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی بوده است. اگرچه تخمین این کاهش تنوع ژنتیکی مشکل و یا غیرممکن است، اما در این که تعداد بسیاری از ژن‌های مفید از دست رفته و ذخایر ژنتیکی با سرعت فرایندهای کاهش یافته‌اند و محصولات زراعی عمدۀ در معرض تهدید روز افزون شرایط محیطی نامناسب و تشکیلاتی و غیرزیستی قرار گرفته‌اند، تردیدی وجود ندارد. بنابراین امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان اجزای مهم پروژه‌های اصلاح نباتات تلقی می‌شوند (Arzani 1999). روش AFLP مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که توسط Vos et al. (1995) ارایه شد. این روش براساس تکثیر دستجات خاصی از قطعات برش یافته ژنومی با استفاده از PCR می‌باشد. از مزایای این روش تکرارپذیری بالا، امکان بررسی همزمان چندین مکان ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر، غیرحساس بودن الگو، ظرفیت بررسی کل ژنوم برای نمایان کردن چندشکلی و تولید تعداد زیاد نوار تکرارپذیر در مدت زمان کوتاه می‌باشد (Vos et al. 1995; Pejic et al. 1998; Sasanuma et al. 2002).

نمونه‌های AFLP در طول ژنوم یکنواخت نیست و همانند سایر نشانگرهای AFLP ترکیب آغازگرها به طور مستقیم روی توزیع مکانی نشانگرهای AFLP تاثیر می‌گذارد. دلیل توزیع غیریکنواخت این نشانگر به مکانیسم‌های ایجاد چندشکلی در این نشانگر نسبت داده می‌شود، وقایعی مانند جهش، حذف و اضافه شدن قطعات در

ایجاد چندشکلی در این نشانگر دخیل هستند (Greg 1998). اکثر این وقایع به طور تصادفی در طول ژنوم به وقوع می‌پیوندد و بنابراین به نظر می‌رسد که مکان‌های نشانگر AFLP نیز به صورت تصادفی در طول ژنوم قرار گرفته باشند (Franco et al. 2001). عموماً نشانگرهای AFLP که با ترکیب‌های مختلف آنزیم‌های برشی حاصل شده‌اند توزیع مناسب‌تری در طول ژنوم داشته‌اند. همچنین تجمع نشانگرها به خصوص AFLP در نواحی Staub and Serguen (1996؛ Franco et al. 2001؛ Langridge et al. 2001؛ Jones et al. 1997؛ Paul et al. 1997) در نواحی سانترومی نیز گزارش شده است (Staub and Serguen 1996؛ Franco et al. 2001). تجمع نشانگرهای AFLP و RFLP در این مناطق باشد (Langridge et al. 2001). در نواحی سانترومی شاید به دلیل کاهش یا ممانعت از نوترکیبی در این عقیده در مورد سایر نقشه‌های ژنتیکی منتشر شده در سایر غلات نیز صادق است (Franco et al. 2001). AFLP به دلیل تکرارپذیری بالا، کمترین وابستگی به شرایط محیطی و تولید تعداد زیادی باند در یک آزمون، یک روش مفید و قابل اعتماد می‌باشد. زیرا تکرارپذیری یک روش ساده برای ارزیابی کیفیت نشانگر محسوب می‌شود که در نتیجه می‌توان خوشبندی صحیحی بر اساس داده‌های حاصل از آن برای ارقام متفاوت انجام داد (Jones et al. 1997؛ Paul et al. 1997). در تحقیقی که توسط Sayed-Tabatabaei and Shahnejat-Bushehri (2001) صورت گرفت، مشخص شد که روش AFLP (1997) از تنوع ژنتیکی ارگان گندم با استفاده از نشانگر AFLP از ۱۶ جفت آغازگر انتخابی استفاده کردند. در مجموع ۱۹۹۸ نوار به دست آمد که در محدوده تقریبی ۳۷ الی ۱۱۴ جفت بازی واقع شدند. نتایج نشان داد که ارقام تحت بررسی از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار نبوده و گسترش پایه ژنتیکی واریته‌ها نیاز جدی است. در پژوهشی دیگر تنوع ژنتیکی ژنتوتیپ‌های فسکیوی بلند نیز با استفاده از نشانگر AFLP بررسی شد. گروه‌بندی ژنتوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه خوش‌های براساس ضربیت تشابه جاکارد در نرم‌افزار NTSYS انجام شد و براین اساس ژنتوتیپ‌ها به پنج گروه تقسیم‌بندی شدند (Khayam-Nekouei et al. 2001). Rahaii (2002) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط

نمونه‌برداری، استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت آن جهت استخراج DNA از برگ جوان استفاده شد. تعداد ۵ بذر از هر لاین داخل گلدان‌های پلاستیکی کشت شد. سپس گلدان‌ها در داخل سینی‌های لبریز از آب قرار داده شدند تا آب از پایین به بالا نشست پیدا کند و یک لامپ w 100 جهت تامین نور روی گلدان‌ها تعییه شد. پس از دو هفته زمانی که گیاهچه‌ها به مرحله ۲-۳ برگی رسیدند، برگ‌ها جدا شده و در داخل فویل‌های آلومینیومی قرار گرفت. پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع، نمونه‌ها در دمای -۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA براساس روش (1994) Saghai-Maroof et al. انجام شد. به منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از دو روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آکارز استفاده شد.

آزمایش چندشکلی طولی قطعات تکثیر شده (AFLP)

DNA طبق روش (1995) Vos et al. انجام شد. در ابتدا استخراجی به طور همزمان با دو آنزیم برشی EcoRI و MseI که مکان برشی آن‌ها به ترتیب از شش و چهار باز تشکیل شده و انتهای چسبنده تولید می‌کنند، مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. سپس به دو انتهای چسبنای این قطعات بریده شده، سازگارسازهای^۱ EcoRI و MseI با توالی مشخص متصل شده و به این ترتیب به هر دو انتهای آزاد قطعات، بیست نوکلئوتید شناخته شده و همگانی اضافه شد. تکثیر پیش انتخابی PCR (اولیه)^۲ توسط آغازگرهای EcoRI و MseI با یک نوکلئوتید اضافی انجام شد. در این مرحله آغازگرهای مورد استفاده با یک نوکلئوتید اضافی در انتهای^۳ الگوهای DNA مناسب برای مرحله تکثیر انتخابی فراهم می‌کنند. به منظور انجام PCR اولیه،^۴ میکرولیتر DNA رقیق شده از مرحله قبل (به نسبت ۱:۱۰) به عنوان الگو^۵ ۲/۵ میکرولیتر بافر X ۱۰ تکثیر^۶، دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات^۷ با غلظت ۶۰۰ میکرومول، کلرید-منزیم^۸ با غلظت ۴ میلی‌مول، آغازگر MseI دارای یک نوکلئوتید انتخابی C با غلظت ۱۰ میکرومول، آغازگر EcoRI دارای یک نوکلئوتید

ژنتیکی بین ارقام کلزا از ۲۰ آغازگر انتخابی AFLP استفاده کرد که در کل ۲۱۴۵ باند مشاهده شد و از این تعداد ۱۰۵۸ باند چندشکل بود. در این تحقیق تشابه ژنتیکی بین ارقام کلزا، با استفاده از ضریب جاکارد تعیین شد. دامنه تعییر تشابه ژنتیکی بین ۰/۳۸ تا ۰/۸۴ و میانگین ۰/۶۱ بود. نتایج تجزیه خوشه‌ای آنها نشان داد که ارقام کلزا در چهار گروه قرار گرفتند. محققین نشان دادند که می‌توان از روش AFLP به عنوان ابزاری کارا و مؤثر در تعیین روابط ژنتیکی ارقام کلزا استفاده کرد. در پژوهشی دیگر تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری توسط نشانگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت. جهت محاسبه تشابه ژنتیکی میان اکوتیپ‌ها از ضریب همبستگی جاکارد و روش گروه‌بندی UPGMA استفاده شد. اکوتیپ‌ها در سطح تشابه ۶۲ درصد در ۸ گروه قرار گرفتند. نتایج، تنوع ژنتیکی بالایی را میان اکوتیپ‌ها نشان داد. همچنین تنوع ژنتیکی بالا نشان داد که گندم سرداری احتمالاً یک رقم نیست بلکه توده‌ای از اکوتیپ‌ها می‌باشد و تجزیه و تحلیل AFLP روشی مفید برای ارزیابی تنوع ژنتیکی Osmani and siosemarde (2009). این تحقیق به منظور تعیین تنوع ژنتیکی بین ۶۴ لاین زراعی جو و شناسایی لاین‌های دارای فاصله ژنتیکی برای انجام تلاقی و تولید نتاج دارای تنوع ژنتیکی بالا در برنامه‌های اصلاحی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی و شرایط کشت
این تحقیق در سال ۱۳۸۹ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی عراقی محله گرگان اجرا شد. آزمایش با ۶۴ لاین شامل ۲۸ لاین از مناطق معتدل و ۳۵ لاین از مناطق ایکاردا به همراه رقم بومی صحراء در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد، مشخصات لاین‌ها و شجره آنها برای لاین‌های منطقه ایکاردا و معتدل به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ آمده است. در هر تکرار آزمایش، هریک از ژنتیپ‌های مورد بررسی در دو خط یک متری و به فاصله ۳۰ سانتی‌متر از یکدیگر (روی یک پشته) و به میزان ۶ گرم بذر در شرایط مزرعه‌ای و زیر سیستم آبیاری جوی و پشته کشت شدند.

¹ Adaptor

² Pre amplification

³ 10X PCR buffer

⁴ dNTPs

⁵ MgCl₂

جدول ۱- شماره و شجره لاین‌های منطقه ایکاردا در بررسی تنوع ژنتیکی استفاده از نشانگر AFLP

شماره	منطقه ایکاردا	شماره	شجره	منطقه ایکاردا	شماره
Carina/Moroc9-75	۵۳/۱۱۰	۱۸	Rihane.03	*۱۰/۱۱۰	۱
Tipper//WI2291/WI2269	۶۲/۱۱۰	۱۹	CWB117-9-7/3/Roho//Alger/Ceres362-1-1	۱۲/۱۱۰	۲
Mo.B1337/WI2291//Moroc9-75	۶۴/۱۱۰	۲۰	(CWB117-77-9-7//Alpha/Durra(TH	۱۴/۱۱۰	۳
Zanbaka	۶۶/۱۱۰	۲۱	(CWB117-77-9-7//Alpha/Durra(TH	۱۵/۱۱۰	۴
Mtn-01	۶۷/۱۱۰	۲۲	Tadmor	۲۰/۱۱۰	۵
ER.BL-1A-7	۶۸/۱۱۰	۲۳	Angora/4/Roho//Alger/Ceres362-1-1/3/Alpha/Durra	۲۱/۱۱۰	۶
ER.BL-8-5	۶۹/۱۱۰	۲۴	Pamir-009/Sonata	۲۲/۱۱۰	۷
Arta	۷۰/۱۱۰	۲۵	A109-SA-706-79//4341N/Ot/3/Roho//Alger/Ceres362-1-1/4/Antares/ky63-1294//Ligneel31	۲۴/۱۱۰	۸
ER.BL-42-9	۷۷/۱۱۰	۲۶	CWB117-77-9-7//Hml-02/ArabiAbiad*2/6/Cl07117-9/DeirAlla106//Bda/3/Arar/5/11012	۲۷/۱۱۰	۹
Tokak	۸۰/۱۱۰	۲۷	BKFMaguelone1604/Ligneel640//Grivita/3/80-5014/F3BulkHip//Alger/Ceres362-1-1	۲۸/۱۱۰	۱۰
Tadmor//ER/Apm	۸۱/۱۱۰	۲۸	Cl6944	۳۰/۱۱۰	۱۱
Moroc9-75//WI2291/Cl01387/3/H.spont.41-1	۹۵/۱۱۰	۲۹	Viringa'S//WI2291/WI2269/3/H.spont.38-3/Akrash-01	۳۳/۱۱۰	۱۲
Schooner/Sara	۹۷/۱۱۰	۳۰	Roho//Alger/Ceres362-1-1/3/Alpha/Durra/4/Alpha/Gumhuriyet//Sonate	۳۵/۱۱۰	۱۳
ChiCm/An57//Albert/3/Alger/Ceres362-1-1/4/Arta	۱۰۲/۱۱۰	۳۱	Mari/Aths*2	۳۶/۱۱۰	۱۴
ChiCm/An57//Albert/3/Alger/Ceres362-1-1/4/Arta	۱۰۳/۱۱۰	۳۲	WI2291	۴۰/۱۱۰	۱۵
Soufara-02/3/RM1508/Por//WI2269/4/Hml-02/ArabiAbiad//ER/Apm	۱۰۴/۱۱۰	۳۳	Sara/4/H.spont.96-3/3/Roho//Alger/Ceres362-1-1	۴۲/۱۱۰	۱۶
Soufara-02/3/RM1508/Por//WI2269/4/Hml-02/ArabiAbiad//ER/Apm	۱۰۵/۱۱۰	۳۴	Ligneel527//Ligneel527/NK1272	۴۶/۱۱۰	۱۷
ArabiAbiad//Arar//H.spont.41-5/Tadmor	۱۰۶/۱۱۰	۳۵			

* ۳۵ لاین مورد بررسی در این تحقیق از بین ۱۱۰ لاین ایکاردا انتخاب شدند و بنابراین این اعداد بیانگر شماره لاین‌ها هستند، لاین ۱۰ از بین ۱۱۰ لاین ایکاردا

رنگ‌های فلورسنت هگز^۲ و تمرا^۳ دارای بازهای انتخابی با غلظت ۴۰۰ نانومول، ۰/۵ واحد آنزیم تگ DNA پلیمراز (شرکت Fermentase) با یکدیگر مخلوط شد و حجم نهایی به ۱۲/۵ میکرولیتر رسید. برای انجام PCR از برنامه تاج‌دان^۴ استفاده شد که در هر چرخه مقدار دمای اتصال آغازگر کاهش می‌یابد. در طی ۱۰ چرخه اول، در هر چرخه یک درجه سانتی‌گراد از دمای اتصال کاهش یافت (جدول ۴).

محصولات تکثیر انتخابی بر روی ژل پلی‌اکریلامید و اسراشت پنج درصد بارگذاری شد. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات DNA، امتیازدهی باندها به صورت (۱) و (صفر) به ترتیب برای حضور و

² HEX

³ TAMRA

⁴ Touch down

انتخابی A با غلظت ۸۰۰ نانومول، یک واحد آنزیم تگ DNA پلی‌مراز^۱ (شرکت Fermentase) با یکدیگر مخلوط شد و حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید. در نهایت به منظور انجام PCR از برنامه حرارتی جدول ۳ استفاده شد.

پس از PCR اولیه تکثیر انتخابی (PCR ثانویه) توسط آغازگرها با سه نوکلئوتید انتخابی انجام شد. به منظور انجام PCR ثانویه دو میکرولیتر از فرآورده‌های PCR مرحله قبل (رقیق شده به نسبت ۱:۶) به عنوان الگو، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر X^{۱۰} تکثیر، دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات با غلظت ۶۰۰ میکرومول، کلرید منیزیم با غلظت ۴ میلی‌مول، هشت آغازگر MseI دارای بازهای انتخابی با غلظت ۸۰۰ نانومول، یک آغازگر EcoRI (متنه‌ی به

¹ Tag DNA polymerase

جدول-۲- شماره و شجره لاین‌های مناطق معتدل در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر AFLP

شماره	منطقه معتدل	شجره	شماره	منطقه معتدل
S:510/3/Arinar/Aths//DS 2982	۱۹۰/۳۵۲	۵۰	YEA389.3/YEA475.4//Productive	۱۴/۳۵۲
Zabol	۲۱۶/۳۵۲	۵۱	Kavir/Arinar//Ashar/3/Lignee 527/Chn-01//Gustoe/4/Rhn-/08/3/Deir Alla 106//Dl71	۱۸/۳۵۲
Rhn-03*2/M83-194 Ras*32	۲۵۸/۳۵۲	۵۲	Alanda-01/3/Arar/Lignee527//Arar/PI386540	۲۹/۳۵۲
Arbayan/NK1272/4/Arar/3/Mari/Aths*2//M-Att-73-337-1	۲۶۵/۳۵۲	۵۳	Alanda-01/7/M126/CM67//As/Pro/3/Alanda/6/UC76252/Arig8/5/Hml /4/Lth/3/Nopal/Pro/11012-2	۳۲/۳۵۲
	۲۶۷/۳۵۲	۵۴	Bereke-54/Alanda	۳۳/۳۵۲
CHAMICO/TOCTE//CONGONA	۲۶۹/۳۵۲	۵۵	Bereke-54/Alanda	۳۴/۳۵۲
PETUNIA 1	۲۸۷/۳۵۲	۵۶	Zarjau/80-5151//DZ-40-66/3/Meteor	۳۷/۳۵۲
ATACO/BERMEJO//HIGO/3/CLN-B/80.5138//GLORIA-BAR/COPAL/4/CHEVRON-BAR/5/MNS3/6/PINON	۲۸۹/۳۵۲	۵۷	PRATO/3/Roubur/WA2136-68//K-281/Skorokhod	۳۹/۳۵۲
PENCO/CHEVRON-BAR/3/SLLO/ROBUST//QUINA/5/ATACO/BERMEJO//HIGO/3/CLN-B/80.5138//GLORIA-BAR/COPAL/4/CHEVRON-BAR	۲۹۱/۳۵۲	۵۸	Express/Saida	۷۷/۳۵۲
CHAMICO/TOCTE//CONGONA	۳۱۲/۳۵۲	۵۹	Express/Saida	۷۵/۳۵۲
HIGO/LINO//TOCTE/FALCON-././/BAR/3/CHAMICO/TOCTE	۳۱۶/۳۵۲	۶۰	Rhn//Bc/Coho/3/DeirAlla106//Api/EB89-8-2-15-4/4/Fassa-01	۱۱۶/۳۵۲
Alanda//Lignee527/Arar/3/BF891M-616/4/BF891M-592	۳۳۱/۳۵۲	۶۱	Kmk//Rbr/Wa2196-68/3/EBC(A)/4/Beecher	۱۴۴/۳۵۲
CHAMICO/TOCTE//CONGONA/3/CHENG DU ...105/5/ATACO	۳۳۶/۳۵۲	۶۲	Sawson /3/Zaphar*2//As46/Aths*2	۱۴۹/۳۵۲
...HIGO/LINO//TOCTE/FALCON-BAR/3/CHAMI	۳۳۸/۳۵۲	۶۳	ICNB-105960/Torkman	۱۶۶/۳۵۲
صحراء	۶۴			

* ۲۸ لاین مورد بررسی در این تحقیق از بین ۳۵۲ لاین مناطق معتدله انتخاب شدند و بنابراین این اعداد بیانگر شماره لاین‌ها هستند، لاین ۱۴ از بین ۳۵۲ لاین ایکاردا

آید) و ماتریس فاصله یا تشابه (بر اساس آن خوشبندی صورت می‌گیرد)، همبستگی کوفتیک محاسبه شد. از نرمافزار GenALEX V.6.2 برای محاسبه تجزیه به مختصات اصلی استفاده شد.

جدول-۳- برنامه حرارتی برای انجام PCR در مرحله تکثیر پیش انتخابی در روش AFLP

چرخه	زمان	دما (درجه سانتی گراد)
۹۴	۳۰	
۶۰	۶۰	چرخه ۲۰
۷۲	۱۲۰	
۷۲	۳۰۰	۱ چرخه
۴		نامحدود

عدم حضور باند انجام شد. باندهای مبهم و از دست رفته نیز به صورت نقطه (.) مشخص شد. سپس داده‌ها به نرمافزار NTSYS pc 2.02e تجزیه و تحلیل منتقل شدند. پس از این مرحله ماتریس UPGMA با استفاده از ضربی تشابه جاکارد ترسیم شد. برای تعیین همبستگی بین ماتریس خروجی (ماتریسی که بر اساس دندروگرام به دست می-

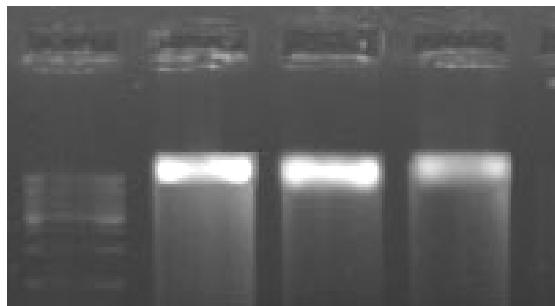
نتایج و بحث

نتایج الگوی DNA بر روی ژل آگارز نشان داد که DNAهای استخراجی از کمیت و کیفیت خوبی برخوردار بودند و شکستگی نداشتند، غلظت نمونه‌ها نیز بین ۳۱/۵ تا ۷۶۴/۵ نانوگرم بر میکرولیتر متغیر بود. به منظور ورود مقادیر یکسان DNA الگو برای واکنش‌های AFLP غلظت نمونه‌های DNA استخراجی به ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر تقلیل یافت (شکل ۱). برای بررسی چندشکلی DNA بین لاین‌های جو زراعی از ۸ جفت ترکیب آغازگری استفاده شد (جدول ۵). در مجموع ۷۴۹ باند قابل امتیازدهی که اندازه آنها در محدوده ۱۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز بود، ایجاد شد که تعداد ۹۳ باند چند شکل بودند.

^۱ Similarity matrix

جدول ۴- برنامه PCR تاچدان برای انجام PCR ثانویه در روش AFLP

ملاحظات	زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی گراد)	چرخه
	۹۴	۱۲۰	۱ چرخه
در هر چرخه دمای اتصال یک درجه سانتی گراد کاهش می‌یابد	۶۳	۳۰	۱۰ چرخه
	۷۲	۱۲۰	
	۹۴	۳۰	
	۵۴	۳۰	۲۳ چرخه
	۷۲	۳۰	
	۴	نامحدود	



شکل ۱- استخراج شده سه نمونه از ژنتوتیپ‌های جو زراعی با روش CTAB چاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست شامل نشانگر اندازه ۱۰۰ bp مربوط به رقم صحراء، لاین ۱۸ و لاین ۵۰ جدول ۲.

نمونه با ترکیبات آغازگری E-ACA/M-CTT جهت تجزیه AFLP نشان می‌دهد.

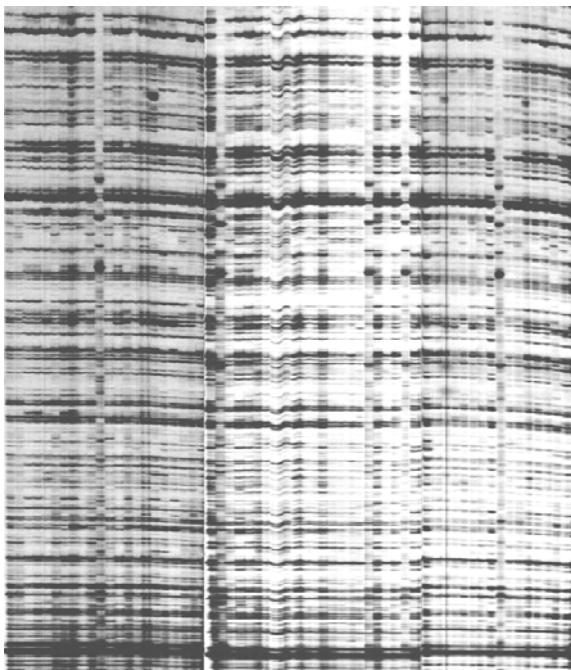
جدول ۵- جفت ترکیبات آغازگری مورد استفاده در آزمایش AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۴ لاین جو زراعی

EcoRI	MseI	باز انتخابی
E-ACA	M-CTG	
E-ACA	M-CAG	
E-ACA	M-CTA	
E-ACA	M-CTT	
E-ACA	M-CAA	
E-ACA	M-CTC	
E-ACA	M-CAC	
E-ACA	M-CAT	

محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از ۰/۴۱ تا ۰/۲۸ متغیر بود (جدول ۷). بالاترین مقدار PIC مربوط به جفت آغازگر M- E-ACA/CAA با ۰/۴۱ بود. بنابراین می‌توان از آن برای تمایز بین ژنتوتیپ‌های جو با خویشاوندی بسیار نزدیک استفاده کرد. کمترین مقدار PIC مربوط به جفت آغازگر E-ACA/M-CTA با

توانایی ۸ جفت آغازگرها مختلف در آشکارسازی چند شکلی بین لاین‌ها متفاوت بود (جدول ۶). بیشترین تعداد باند مربوط به ترکیب آغازگری E-ACA/M-CTT با ۱۱۲ باند و کمترین تعداد باند مربوط به ترکیب آغازگری E-ACA/M-CAT با ۷۹ باند بود. همچنین بیشترین باند چندشکل مربوط به ترکیب آغازگری M- E-ACA/CTA با ۱۶ باند و کمترین باند چند شکل مربوط به آغازگر E-ACA/M-CTC با ۷ باند بود. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر E-ACA/M-CAG با ۱۷/۲۸ درصد و کمترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر E-ACA/M-CTC با ۸/۱۳ درصد حاصل شد. بر طبق نتایج بدست آمده هیچ گونه ارتباط مستقیمی بین تعداد کل نوارها با مقدار چندشکلی مشاهده شده وجود نداشت. برای مثال ترکیب آغازگری E-ACA/M-CTT با تعداد باند ۱۱۲ نسبت به ترکیب آغازگری E-ACA/M-CAG با تعداد باند ۸۱ درصد چندشکلی پایین‌تری نشان داد. میانگین تعداد باندهای چند شکل ۱۱/۶۲ بود. شکل ۲ الگوی باندی AFLP ۶۴

تجزیه خوشیهای با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.02e، براساس الگوریتم‌های UPGMA، CLINK و SLINK، همچنین ضرایب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده به عنوان معیار مقایسه انجام شد. گروه‌بندی بر اساس ضریب جاکارد و روش UPGMA با ضریب کوفتیک $0/89$ نسبت به روش‌های دیگر ضریب بالاتری را به خود اختصاص داد. دنдрوگرام حاصل از تجزیه خوشیهای جمعیت مورد نظر را به ۷ گروه مجزا تقسیک کرد (شکل ۳). خط برش با توجه به میانگین ضرایب تشابه $0/46$ تعیین شد. همانطور که در جدول ۸ ارائه شده و با توجه به شکل ۳، گروه اول، دوم و پنجم هریک دارای تنها یک ژنوتیپ هستند، گروه چهارم با دو ژنوتیپ و گروه سوم با سه ژنوتیپ در ردی بعدی قرار دارند و پس از آنها نیز گروه هفتم با ۲۰ ژنوتیپ قرار گرفته است. گروه ششم با ۳۶ ژنوتیپ بیشترین تعداد ژنوتیپ را به خود اختصاص داده بود.



شکل ۲- الگوی نواری جفت آغازگر E-ACA/M-CTT به منظور بررسی نوارهای چندشکل بین لاین‌های جو زراعی روی ژل پلی‌اکریل آمید، در این ژل ۶۴ ژنوتیپ به ترتیب شماره (طبق جدول ۱ و ۲) از چپ به راست قرار گرفتند.

ماتریس تشابه با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.02e، براساس ضریب جاکارد محاسبه شد. ضریب تشابه ژنتیکی بین $0/0/9538$ تا $0/1129$ متغیر بود. براساس نتایج بدست آمده بیشترین تشابه

$0/28$ بود. میانگین PIC برای تمام جفت آغازگرهای مورد استفاده $0/37$ بود. Lombard et al. (2002) در مطالعات اینبرد لاین‌های خالص ذرت با استفاده از نشانگرهای AFLP، مقدار PIC برای آغازگرهای مختلف مورد استفاده را بین $0/25$ - $0/31$ گزارش کردند. همچنین Mardi et al. (2011) در بررسی تنوع ژنتیکی PIC گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای AFLP، مقدار میانگین PIC را برابر با $0/0/3$ اعلام کرد. میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چند شکلی زیاد وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است و بیانگر قدرت Ribeiro-carvalho et al. (2004).

جدول ۶- مشخصات آغازگرها و اطلاعات چند شکلی به دست آمده در آزمایش AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۴ لاین جو زراعی

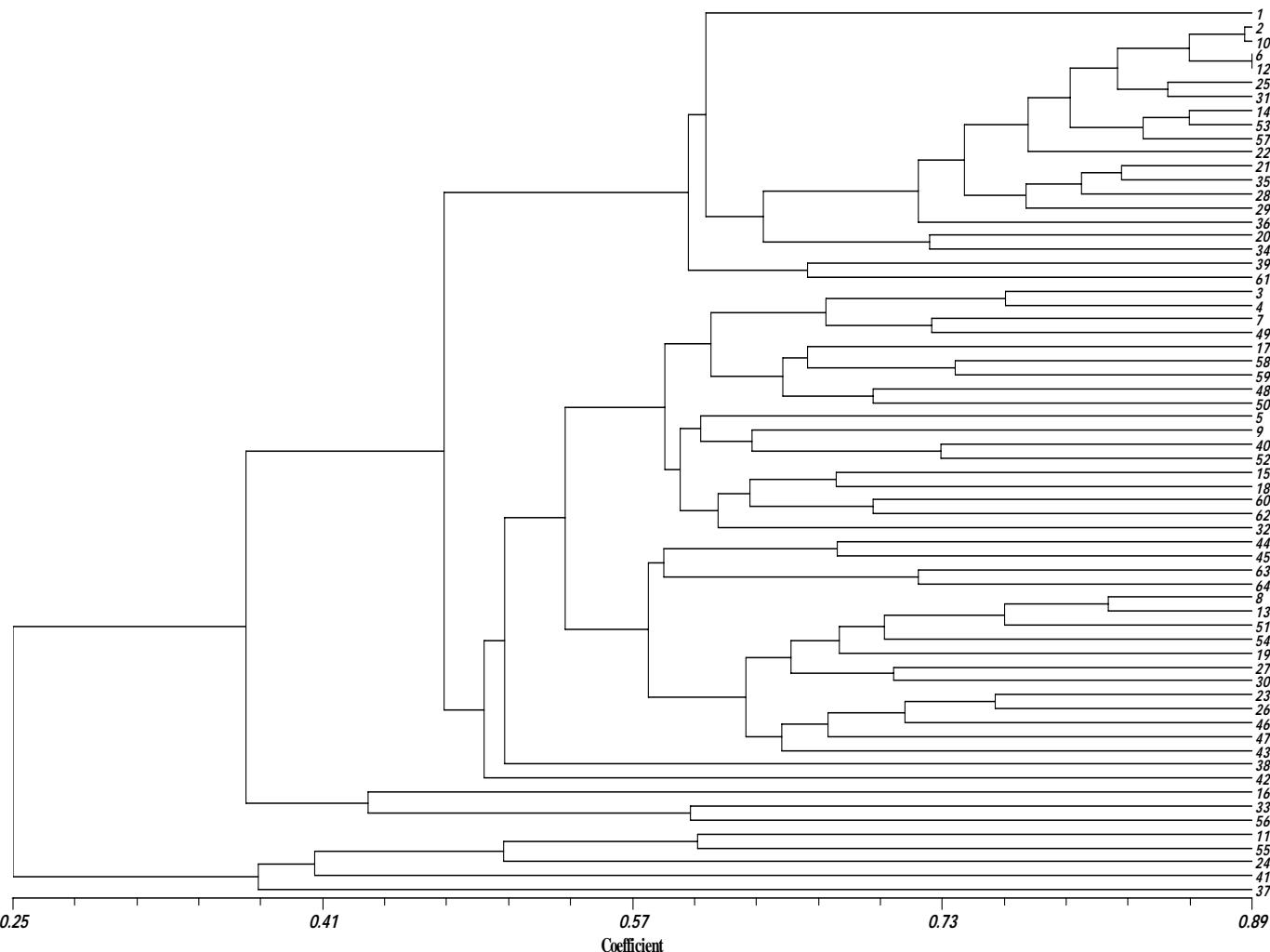
جفت آغازگر	تعداد	تعداد باند	درصد
اختصاصی	باند	چندشکل	چندشکل
E-ACA/M-CAG	۸۱	۱۴	۱۷/۲۸
E-ACA/M-CTA	۱۱۰	۱۶	۱۴/۵۴
E-ACA/M-CTT	۱۱۲	۱۳	۱۱/۶
E-ACA/M-CAA	۱۰۲	۱۱	۱۰/۷۸
E-ACA/M-CAC	۹۲	۱۰	۱۰/۸۶
E-ACA/M-CAT	۷۹	۱۰	۱۲/۶۵
E-ACA/M-CTG	۸۷	۱۲	۱۳/۷۹
E-ACA/M-CTC	۸۶	۷	۸/۱۳
میانگین	۹۳/۶۲	۱۱/۶۲	۱۲/۴۵

جدول ۷- میزان PIC نشانگرهای AFLP مورد مطالعه در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۴ لاین جو زراعی

جفت آغازگر اختصاصی	PIC
M-CAG/E-ACA	۰/۳۹
M-CTA/E-ACA	۰/۲۸
M-CTT/E-ACA	۰/۴۰
M-CAA/E-ACA	۰/۴۱
M-CAC/E-ACA	۰/۲۹
M-CAT/E-ACA	۰/۴۰
M-CTG/E-ACA	۰/۳۹
M-CTC/E-ACA	۰/۴۰
میانگین	۰/۳۷

جدول ۸- تعداد ژنوتیپ‌های جو قرار گرفته در هر گروه بر اساس نشانگرها مورد مطالعه

۱ گروه	۲ گروه	۳ گروه	۴ گروه	۵ گروه	۶ گروه	۷ گروه
۳۷	۴۱	۱۱-۲۴-۵۵	۳۳-۵۶	۱۶	-۱۷-۱۵-۱۳-۹-۸-۷-۵-۴-۳	-۱۲-۱۰-۶-۲-۱
					-۳۲-۳۰-۲۷-۲۶-۲۳-۱۹-۱۸	-۲۲-۲۱-۲۰-۱۴
					-۴۶-۴۵-۴۴-۴۳-۴۲-۴۰-۳۸	-۳۱-۲۹-۲۸-۲۵
					-۵۴-۵۲-۵۱-۵۰-۴۹-۴۸-۴۷	-۳۹-۳۶-۳۵-۳۴
					۶۴-۶۳-۶۲-۶۰-۵۹-۵۸	۶۱-۵۷-۵۳



شکل ۳- دندرограм تجزیه خوشاهی ۶۴ لاین جو زراعی بر اساس ضریب جاکارد و روش UPGMA با استفاده از ۸ ترکیب آغازگری AFLP

۰/۷۴ حاصل شد (Mashayekhi et al. 2010). همچنین در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری با بهره‌گیری از نشانگر AFLP دامنه تشابه بین این اکوتیپ‌ها از ۰/۸۹ تا ۰/۵۰ متغیر بود (Osmani and Siosemarde 2009).

ژنتیکی بین دو لاین ۶ و ۱۲ (۰/۸۸۷۱) از لاین‌های مناطق ایکاردا در گروه هفتم و کمترین تشابه ژنتیکی بین لاین ۴۱ از مناطق معتدل‌های در گروه دوم و رقم بومی صحرا در گروه ششم (۰/۰۴۶۲) مشاهده شد. در بررسی تنوع ژنتیکی بلوط ایرانی در غرب کشور با نشانگر مولکولی AFLP ضریب تشابه ژنتیکی بین ۰/۳۲ تا

گروههای اول، دوم، سوم و چهارم به صورت ژنتیپ‌های انفرادی واقع شده‌اند، متعلق به لاین‌های مناطق معتدله هستند. در گروه هفتم از ۲۰ ژنتیپ موجود، ۱۵ ژنتیپ مربوط به لاین‌های منطقه ایکاردا هستند و تنها ۵ ژنتیپ از لاین‌های مناطق معتدله در این گروه قرار گرفته است. رقم بومی صحرا نیز در گروه هفتم واقع شده است، در این گروه ۱۶ ژنتیپ متعلق به لاین‌های ایکاردا و ۱۹ ژنتیپ از لاین‌های مناطق معتدله هستند. با توجه به شجره لاین‌های مورد بررسی اغلب ژنتیپ‌هایی که در یک گروه واقع شده‌اند، دارای حداقل یک ژنتیپ مشترک در شجره خود هستند. از آنجا که تشابه ژنتیکی با فاصله ژنتیکی رابطه معکوس دارد، لذا لاین ۴۱ و رقم بومی صحرا که کمترین تشابه ژنتیکی را نشان دادند دارای بیشترین فاصله یا اختلاف ژنتیکی هستند. بنابراین در برنامه‌های اصلاحی می‌توان از این دو لاین برای انجام تلاقی و تولید نتاج دارای تنوع ژنتیکی بالا استفاده کرد. بیشترین میزان PIC مربوط به ترکیب آغازگری E-ACA/M-CAA (۰/۴۱) بود. بنابراین می‌توان از آن برای تمایز بین ژنتیپ‌هایی با خویشاوندی بسیار نزدیک استفاده کرد. روش AFLP به دلیل تکرار پذیری بالا و تعداد زیادی باند در یک آزمون، یک تکنیک مفید و قابل اعتماد می‌باشد زیرا تکرار پذیری، یک روش ساده برای ارزیابی کیفیت نشانگر محسوب می‌شود که در نتیجه می‌توان خویشاوندی صحیحی بر اساس داده‌های حاصل از آن برای ارقام متفاوت انجام داد.

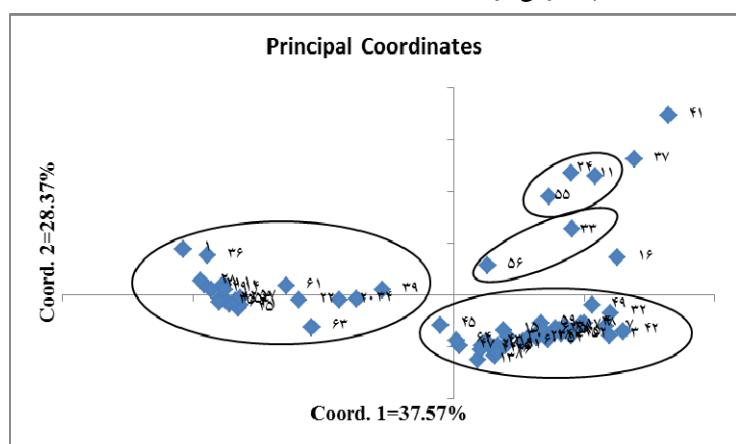
منابع

Arzani A (1999) Plant Breeding (translation) Isfahan University of Technology Press, Isfahan, Iran (in Farsi). Ebrahimi A, Naghavi MR, Sabokdast M (2011) Evaluation and Comparision of ChloroPhyll Content, Carotenoid, Protein and Enzyme in Different Barley Species of Iran. Iranian Journal of Crop Science 41: 57-65.

Franco J, Crossa J, Ribaut JM, Bertran J, Warburton ML, Khairallah M (2001) A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. Theoretical and Applied Genetics 103:944-952. Greg AP (1998) An AFLP based genome map of wheat (*Triticum aestivum*). Plant and Animal Genome VI Conference. San Diego., CA.

Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, 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

در این مطالعه تجزیه به مختصات اصلی بهمنظور بررسی توزیع مناسب ژئومی نشانگرهای AFLP، با استفاده از نرمافزار GenALEX V.6.2 انجام گرفت. تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ماتریس تشابه به دست آمده از ضریب جاکارد انجام شد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی، نتایج تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد. (Messmer et al. 1992) پیشنهاد کردند که تجزیه به مختصات اصلی به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی خواهد شد. هفت گروه حاصل از دسته‌بندی لاین‌ها بر اساس تجزیه خوشه‌ای، در شکل ۴ کاملاً قابل تشخیص می‌باشد که این مسئله موید قطع نمودار تجزیه خوشه‌ای از محل مناسب و دسته‌بندی صحیح اکوتیپ‌ها می‌باشد. اولین مولفه اصلی بیشترین تغییرات داده‌های اولیه (۳۷/۵۷ درصد) را در بردارد و داده‌ها همبستگی بالایی با یکدیگر نشان داده و دومین مولفه اصلی بیشترین تغییرات باقیمانده (۲۸/۳۷ درصد) را بعد از اولین مولفه اصلی توجیه می‌کند. در مجموع سه مولفه اول ۷۷/۸۶ درصد تغییرات واریانس را توجیه کردند. نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که ۸ جفت نشانگر AFLP مورد استفاده دارای توزیع مناسب ژئومی بوده است.



شکل ۴- تجزیه به مختصات اصلی بر اساس مولفه اول و دوم بر روی ژنتیپ جو زراعی با استفاده از ۸ ترکیب آغازگری

تنوع ژنتیکی جو به عنوان یکی از مهم‌ترین غلات جهان به جهت اقتصادی با نشانگر مولکولی AFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی حاکی از وجود تنوع بالا در بین لاین‌های زراعی جو به ویژه لاین‌های مناطق معتدله بود. اغلب ژنتیپ‌هایی که در

- J, Linacero R, Vazquez A, Karp A (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381-390.
- Khayam-Nekouei M, Jahantighi R, Solouki M, Mohammadi R, Emamjomeh AA (2001) Study on genetic diversity of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) genotypes using AFLP marker. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 16 (Special issue 1-b): 351-360. (in Farsi).
- Langridge P, Lagudah ES, Holton TA, Apples R, Sharp PJ, Chalmers K (2001) Trends in genetic and genome analysis of wheat: a review. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1043-1077.
- Lombard V, Baril CP, Duberuil P, Blouet F, Zhang D (2000) Potential use of AFLP markers for distinction of rapeseed cultivars. Geves, La Miniere, F-78285 Guyancourt Cedex, France.
- Mardi M, Naghavi MR, Pirseyedi SM, Kazemi Alamooti M, Rashidi Monfared S, Ahkami AH, Omidbakhsh MA, Alavi NS, Salehi Shanjani P, Katsiotis A (2011) Comparative Assessment of SSAP, AFLP and SSR Markers for Evaluation of Genetic Diversity of Durum Wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Journal Agriculturl Science and Technology* 13: 905-920.
- Mashayekhi Sh, Shiran B, Jahanbazi H, Houshmand S, Soltani A, Sorkheh K (2010) Study of Genetic Variation of *Quercus brantii* in Chaharmahal va Bakhtiari Province using AFLP Molecular Markers, *Journal of Forest and Wood Products* 3: 77-90. (in Farsi).
- Messmer MM, Melchinger AA, Boppenmair J, Hermann RG, Brunklaus-Jung E (1992) RFLP analysis of early-maturing European maize germplasm. I. Genetic diversity among flint and dent inbreds. *Theoretical and Applied Genetics* 83:1003- 1012.
- Osmani J, Siosemarde A (2009) Evaluation of genetic diversity in Sardary wheat ecotypes by AFLP molecular markers. *Modern Genetics Journal* 4: 39-48. (in Farsi)
- Patpour M (1998) study on resistance of some barley cultivars to powdery mildew and determination of Peroxidase activity in to susceptible and resistant cultivars, MSc thesis, University of Tehran, Iran. (in Farsi).
- Paul S, Wachira FN, Powell W, Waugh R (1997) Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 255-263.
- Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morganet M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M (1998) Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLP, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1248-1255.
- Rahaee M (2002) Genetic diversity assessment of canola using AFLP and RAPD markers. MSc thesis, University of Tehran, Iran. (in Farsi).
- Ribeiro-carvalho C, Guedes-pinto H, Igredas G (2004) High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace Barbela. *Annals of Botany* 94: 699-705
- Saghai-Marof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Exrraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosom locations, and population dynamics. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 91: 5466-5470.
- Sasanuma T, Chabane K, Endo TR, Valkoun J (2002) Genetic diversity of wheat wild relatives in the Near East detected by AFLP. *Euphytica* 127: 81-93.
- Sayed-Tabatabaei BE, Shahnejat-Bushehri AA (2001) Evaluation of genetic variation among wheat cultivars using AFLP markers. *Journal of Agricultural Sciences* 32: 607-614 (in Farsi).
- Staub JE, Serquen C (1996) Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Horticultural Science* 31: 729-740.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijens M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 21: 4407-4414.