

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گندم اینکورن *T. urartu* و *T. boeoticum* نواحی غرب و شمال غرب ایران با استفاده از نشانگرهای SSR

مسعود شیری^۱، علی اشرف مهربابی^۲
فرج الله شهریاری^۳، عبدالرضا باقری^۴

چکیده

یکی از موثرترین اقدامات جهت اصلاح گیاهان زراعی بررسی ساختار ژنتیکی آنهاست. در این تحقیق تنوع ژنتیکی تعداد ۲۵ جمعیت گندم اینکورن از دو گونه تریتیکوم بوئتیکوم و تریتیکوم اورارتو جمع آوری شده از استان‌های غربی و شمال غربی ایران با استفاده از ۱۲ جفت نشانگر ریزوماهواره بررسی گردید. ۱۲ جفت آغازگر از ۲ تا ۱۴ آلل و در مجموع ۸۷ آلل در بین ۲۵ ژنوتیپ تکثیر کردند که متوسط تعداد آلل‌ها به ازای هر جفت آغازگر ۷/۲۵ بود و محتوای اطلاعات چند شکلی از ۰/۳۷ تا ۰/۹۲ و میانگین ۰/۷۲ به دست آمد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و با ضرایب تشابه دایس و جاکارد انجام گردید. بر اساس دندروگرام ترسیم شده ژنوتیپ‌های گونه تریتیکوم بوئتیکوم در استان لرستان و گونه تریتیکوم اورارتو در استان کرمانشاه بیشترین تنوع را داشتند. این مسئله موید این است که به احتمال فراوان استان لرستان خاستگاه اصلی گونه تریتیکوم بوئتیکوم و استان کرمانشاه خاستگاه اولیه گونه تریتیکوم اورارتو می‌باشد. به طور کلی جمعیت‌های مورد بررسی گندم اینکورن در استان‌های غربی تنوع بیشتری در مقایسه با جمعیت‌های مربوط به استان‌های شمال غربی نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: تریتیکوم اورارتو، تریتیکوم بوئتیکوم، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای

ریزوماهواره

مقدمه

موجود گندم به طور کامل برای اهداف اصلاحی گندم بکار گرفته شده است. پیشرفت در به‌نژادی گندم سه پیش نیاز اساسی دارد: نخست منابع جدید

تنوع ژنتیکی گندم مانند بسیاری از محصولات دیگر در طول دهه‌های گذشته روبه کاهش نهاده است. محققین معتقدند که اطلاعات و تنوع ارقام

آناتومی ژنوم گندم اینکورن تریتیکوم اورارتو (AA) به عنوان دهنده این ژنوم به گندم نان و ماکارونی به خوبی در ارقام زراعی آنها حفظ شده است. شناسایی و معرفی نشانگرهای ریزماهواره چند شکل در این گونه دیپلوئید که قابلیت انتقال به جمعیت‌های اصلاحی گندم نان هگزپلوئید را داشته باشند، از اهداف کاربردی این پژوهش است. یکی از کارآمدترین نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ریزماهواره هستند. توزیع مناسب در ژنوم، سهولت استفاده، طبیعت چندآلی و هم‌بارز بودن از مزایای این نشانگرها می‌باشد (۶). رادر و همکاران در سال ۱۹۹۸، اولین نقشه ژنتیکی ژنوم گندم را بر اساس نشانگرهای ریزماهواره ترسیم کردند. آنان با استفاده از ۲۷۹ مکان ژنی ریزماهواره این نقشه را تهیه نمودند (۹). احمد در سال ۲۰۰۲، از ۴۳ نشانگر ریزماهواره برای برآورد تنوع ژنتیکی در بین ۱۳ ژنوتیپ گندم از منشأهای متفاوت استفاده کرد (۵). تاکنون مطالعات زیادی در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی گندم با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره گزارش شده است (۱۱، ۸، ۱۲).

مواد و روش

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق ۲۵ جمعیت از گندم‌های وحشی اینکورن جمع‌آوری شده از دامنه‌های زاگرس بود. جمعیت‌های مورد بررسی از دو گونه تریتیکوم بوئتیکیوم و تریتیکیوم اورارتو بودند (جدول ۱).

به منظور تجزیه مولکولی، بذر ۲۵ ژنوتیپ در گلدان و در اتاقک رشد کشت شدند و DNA

تنوع ژنتیکی برای فراهم ساختن آلل‌های مطلوب جهت پیشرفت ژنتیکی، دوم فناوری‌هایی برای نوترکیبی این تنوع و تولید ژنوتیپ‌های جدید و سوم فناوری‌هایی برای شناسایی و گزینش فنوتیپ‌های مرتبط با مجموعه‌های ژنی تطابق‌یافته تولیدی، تعیین ژنوتیپ و غربال منابع ژنتیکی برای ژنهای مفید. در این مسیر اولین گام استفاده پایدار از ژرم‌پلاسم گندم کشور است (۱). بنابراین به‌نژادگران به دنبال یافتن منابع ژنی جدید بوده و معتقدند که ارقام بومی و خویشاوندان وحشی گندم که یک منبع بالقوه مفید و با ارزش تنوع ژنتیکی هستند می‌توانند بطور موفقیت آمیزی در اصلاح گندم به کار گرفته شوند (۷). یکی از نیازهای اولیه اصلاح گندم برآورد تنوع ژنتیکی خویشاوندان گندم برای شناسایی و اهداف اصلاحی می‌باشد. گندم‌های اینکورن اورارتو و بوئتیکیوم به عنوان دهنده ژنوم A به گندم‌های زراعی هگزپلوئید، تترپلوئید و دیپلوئید (مونوکوکوم) منابع ژنتیکی ارزشمندی برای اصلاح گندم‌های زراعی می‌باشند (۴). نواحی کوهستانی معتدل در دامنه دو رشته کوه زاگرس و البرز در استان‌های شمال غربی و غربی ایران نواحی پیدایش، پراکنش و تنوع گونه‌های گندم‌های دیپلوئید اینکورن محسوب می‌شود. علاقمندان این زمینه همواره مترصد آگاهی از وضعیت دقیق جمعیت‌های خودروی این گیاه در ایران بوده‌اند. در همین راستا مطالعه وضعیت و ساختار تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گندم‌های دیپلوئید اینکورن در دو گونه *Triticum urartu* و *Triticum boeoticum* هدف مهم دیگری است که در این تحقیق دنبال می‌شود.

محتوای اطلاعات چند شکلی بر اساس جایگاه ریز ماهواره محاسبه شد. ماتریس عدم تشابه و تجزیه خوشه ای بر اساس الگوریتم UPGMA و روش های جاکارد و دایس انجام شد. در تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزارهای XLstat, DARwin, Excel و Popgene بهره گرفته شد.

ژنومی به روش CTAB از برگ های سالم و جوان تک گیاهچه های دو هفته ای استخراج شد. تکثیر مکان های ریز ماهواره با استفاده از ۱۲ آغازگر انجام گردید. قطعات تکثیر شده با استفاده از ژل پلی اکریل آمید تفکیک و رنگ آمیزی ژل به روش نیرتات نقره انجام شد. امتیاز دهی باندها به صورت صفر (فقدان باند) و یک (وجود باند) صورت گرفت

جدول ۱. جمعیت های گندم اینکورن استفاده شده در این تحقیق

دیف	جنس	گونه	محل جمع آوری
۱	تریتیکوم	اورارتو	جاده نورآباد- خرم آباد- روستای سرناوه
۲	تریتیکوم	بوئتیوم	کرمانشاه- جاده روانسر- پلوه پلیس راه روانسر
۳	تریتیکوم	بوئتیوم	آذربایجان شرقی- اوایل راه هوراند- اهر
۴	تریتیکوم	بوئتیوم	کرمانشاه- جاده کرمانشاه - سنقر
۵	تریتیکوم	بوئتیوم	لرستان - سفید دشت (گل زرد)
۶	تریتیکوم	بوئتیوم	لرستان - جاده درود - خرم آباد- ۳۵ کیلومتر تا خرم آباد
۷	تریتیکوم	بوئتیوم	کرمانشاه - حسین آباد - بیستون
۸	تریتیکوم	بوئتیوم	لرستان - نورآباد دلفان
۹	تریتیکوم	بوئتیوم	کرمانشاه - دوراهی جوان رود
۱۰	تریتیکوم	بوئتیوم	کردستان - حومه سقر
۱۱	تریتیکوم	بوئتیوم	کرمانشاه - اوایل جاده روانسر به کامیاران
۱۲	تریتیکوم	اورارتو	کرمانشاه- جاده اسلام آباد- کزند - ۱ کیلومتر بعد از خسروآباد
۱۳	تریتیکوم	بوئتیوم	کرمانشاه- اسلام آباد- ۲ کیلومتر قبل از حسن آباد
۱۴	تریتیکوم	بوئتیوم	کردستان- مسیر قروه- به سنندج- ۱۵ کیلومتر بعد از دهگلان
۱۵	تریتیکوم	بوئتیوم	کردستان- قریه چناره- ۲۰ کیلومتر مانده به مریوان
۱۶	تریتیکوم	بوئتیوم	آذربایجان شرقی- ۱۰ کیلومتری جاده اهر- تبریز
۱۷	تریتیکوم	اورارتو	کرمانشاه- سنقر- اسدآباد- روستای ذوالفاس
۱۸	تریتیکوم	بوئتیوم	لرستان- ۳۰ کیلومتری خرماآباد- سپید دشت
۱۹	تریتیکوم	بوئتیوم	آذربایجان غربی- سلوانا- اوشنویه
۲۰	تریتیکوم	بوئتیوم	لرستان- ۳۰ کیلومتری جاده خرماآباد- درود
۲۱	تریتیکوم	بوئتیوم	آذربایجان شرقی- ۳۰ کیلومتری جاده اهر- کلیبر
۲۲	تریتیکوم	اورارتو	آذربایجان غربی- حومه نقده
۲۳	تریتیکوم	بوئتیوم	کرمانشاه- جاده سنقر
۲۴	تریتیکوم	بوئتیوم	کرمانشاه- سنقر- اسدآباد- روستای قره تپه
۲۵	تریتیکوم	اورارتو	کرمانشاه- حسین آباد - بیستون

نتایج و بحث

بیشتر لوکوس‌های تکثیر شده چند شکلی مناسب از خود نشان دادند. در نتیجه ی تکثیر ۱۲ مکان ریز ماهواره تعداد ۸۷ آلل شناسایی شد که تعداد آلل‌ها در هر مکان از ۲ تا ۱۴ آلل متغیر بود. میانگین تعداد آلل در کل لوکوس‌ها برابر ۷/۲۵ بود (جدول ۲) و با نتایج مطالعات قبلی مکان‌های ریز ماهواره در گندم مانند استودارت و همکاران (۲۰۰۵) که تعداد آلل را از ۳ تا ۲۹ و به طور متوسط ۱۰ آلل و مک کافری و همکاران (۲۰۰۳) تعداد آلل را از ۲ تا ۱۲ و میانگین ۵/۶ گزارش کرده بودند مطابقت داشت (۱۱ و ۱۳). محتوای اطلاعات چند شکلی از ۰/۳۷ تا ۰/۹۲ متغیر و میانگین آن ۰/۷۵ بود و با گزارش آگراما و همکاران (۲۰۰۳) از ۰/۲۳ تا ۰/۸۱ و با میانگین ۰/۶۲ و رادر و همکاران (۱۹۹۵) با مقدار ۰/۲۳ تا ۰/۷۹ و میانگین ۰/۷۱ مطابقت می نمود (۳ و ۹). ضریب عدم تشابه ژنوتیپ‌ها به روش دایس و جاکارد و با استفاده از نرم افزار Darwin محاسبه و تجزیه خوشه ای با الگوریتم UPGMA انجام شد (اشکال ۱ و ۲).

برای محاسبه قدرت تفکیک (D) نشانگر ریز ماهواره از نرم افزار popgene استفاده گردید. با استفاده از این نرم‌افزار جمعیت‌های گونه اورارتو به عنوان یک گروه و جمعیت‌های گونه بوئیکوم به عنوان گروه دوم از لحاظ پروفیل ژنومی حاصل از ۸۷ نوار امتیازدهی شده در بین این مواد آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت و قدرت تفکیک نشانگر ریز ماهواره ۰/۹۵ و احتمال همسانی (PI) ۰/۰۵۱ تعیین گردید که این موضوع نشان‌دهنده کارایی بالای نشانگر ریز ماهواره در شناسایی ارقام می‌باشد.

به منظور ارزیابی اطلاعات حاصل از لوکوس‌های ریز ماهواره بررسی شده اطلاعات حاصل از نوارهای نمره‌بندی شده این ۱۲ نشانگر ریز ماهواره چند شکل با روش تجزیه به مختصات اصلی مورد بررسی تکمیلی قرار گرفت. نتایج این تجزیه آماری (جدول ۳) نشان می‌دهد که محورهای اصلی اول و دوم به ترتیب ۱۸/۲۹ و ۱۶/۷ درصد از اطلاعات را در بر داشتند. در مجموع ۶ محور قادر به تبیین دو سوم از اطلاعات نشانگرها بود. این نتایج بیانگر توزیع مناسب مکان‌های ریز ماهواره انتخاب شده در میان ژنوم افراد بررسی شده است. البته در انتخاب آغازگرها این موضوع از قبل مد نظر بود و تلاش شد آغازگرهای مورد استفاده مربوط به نشانگرهایی از ۷ کروموزوم ژنوم A گندم معمولی باشد. ترسیم بای پلات با دو محور مختصات اصلی اول و دوم که در مجموع ۳۴/۹۹ درصد اطلاعات باندهای نمره دهی شده را دربرداشت نشان داد که ژنوتیپ‌ها به خوبی از هم تمیز داده شده است. دو گونه بوئیکوم و اورارتو متمایز از هم در صفحه بای پلات قرار گرفتند (شکل ۳).

جمعیت‌های مورد بررسی گندم اینکورن در استان‌های غربی (لرستان، کرمانشاه و کردستان) تنوع بیشتری در مقایسه با جمعیت‌های مربوط به استان‌های شمال غربی (آذربایجان شرقی و غربی) نشان دادند. گونه تریتیکوم بوئیکوم بیشترین تنوع ژنتیکی را در استان لرستان نشان می‌دهد به طوری که در گروه‌بندی ۲۰ ژنوتیپ گونه مذکور که سه گروه را تشکیل می‌دهند در هر سه گروه نمونه‌های این استان

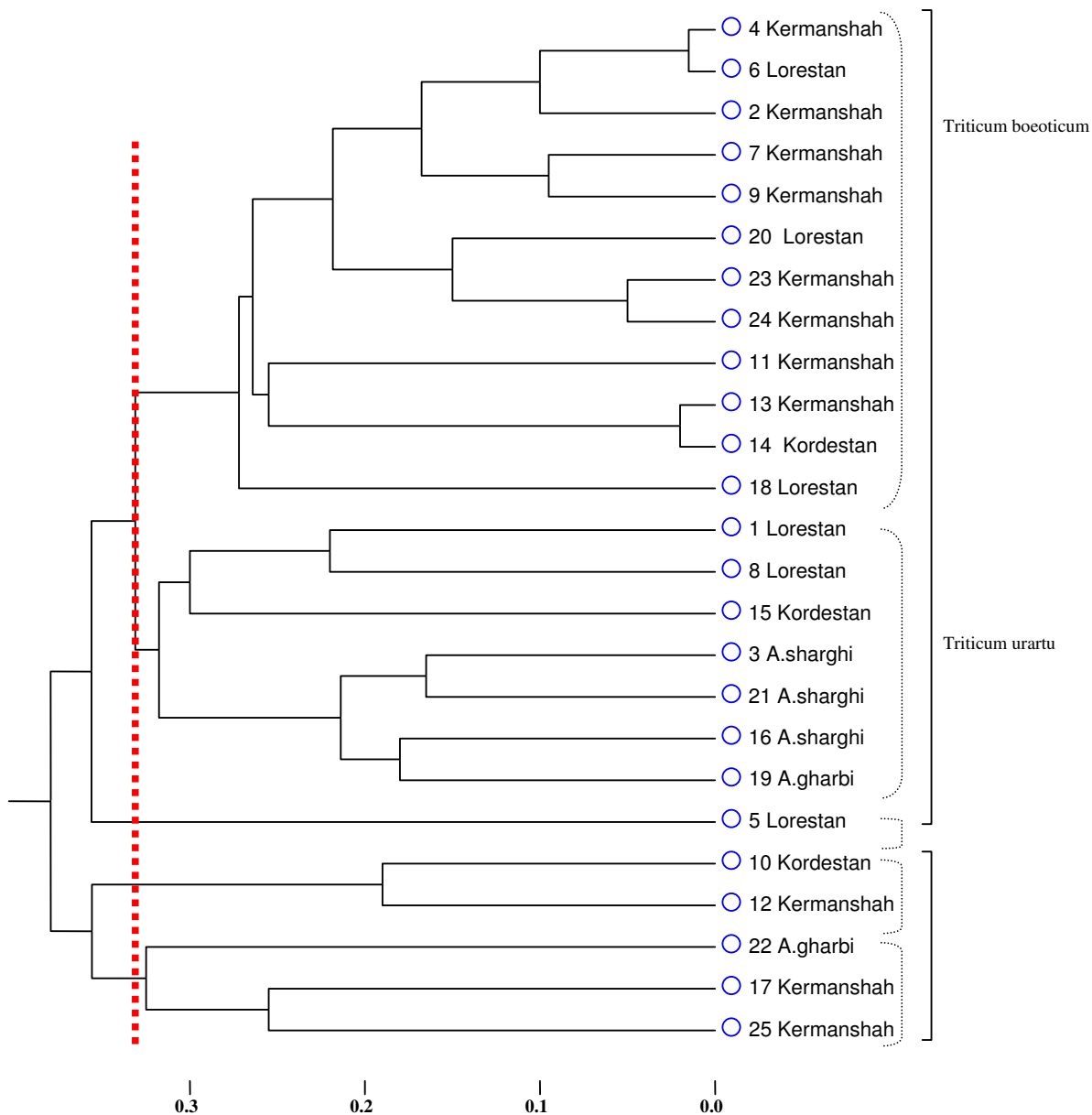
و تنوع زیاد بین آنها باشد. به طور کلی با توجه به تنوع فوق‌العاده گونه‌های گندم اینکورن در استان‌های غربی، توجه ویژه به ژرم پلاسم آن در این مناطق ضروری به نظر می‌رسد. طراحی برنامه‌های اصلاحی جهت بهره‌گیری از این تنوع ژنتیکی لازم و با شناسایی دقیق این جمعیت‌ها برای بسیاری از ژن‌های مطلوب امکان‌پذیر است. از آنجا که گونه تریتیکوم اورارتو دهنده ژنوم A گندم *Triticum aestivum* و *Triticum durum* محسوب می‌شود توجه ویژه به ژرم پلاسم این گونه در این مناطق، مخصوصاً استان کرمانشاه اهمیت دارد (۲).

وجود دارند (اشکال ۱ و ۲). در خصوص گونه تریتیکوم اورارتو نیز استان کرمانشاه بیشترین تنوع را دارد.

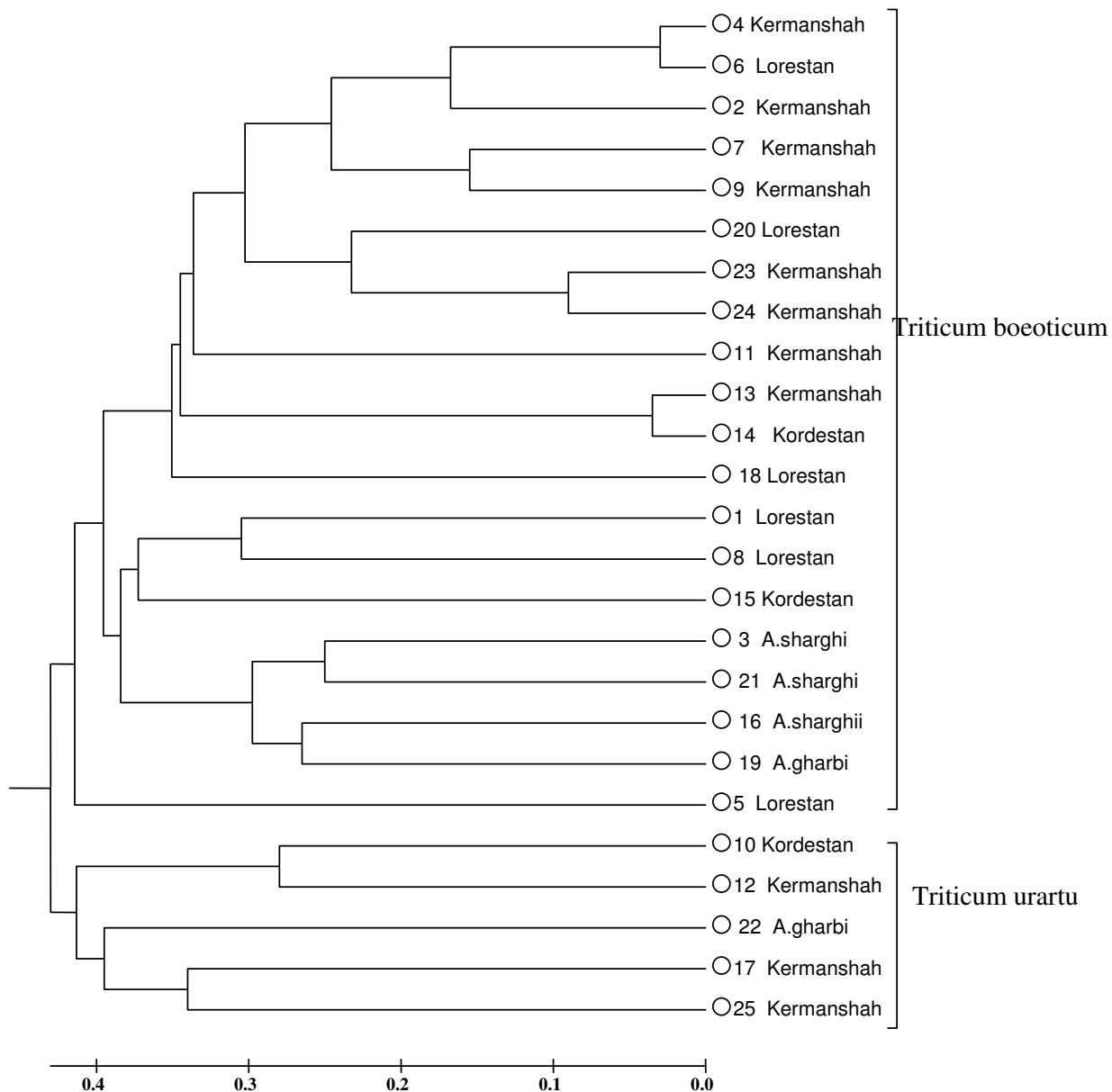
نتایج این تحقیق نشان‌دهنده کارایی بالای نشانگر ریزماهواره در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های گندم اینکورن می‌باشد تعداد اندک نشانگر ریزماهواره به خوبی گونه‌های مذکور را از یکدیگر تفکیک نموده و اختلافات درون گونه‌ای را نمایان کرده است که یکی از دلایل آن پراکنش مناسب نشانگر ریزماهواره در ژنوم A می‌باشد دلیل دیگر شاید مربوط به ماهیت وحشی گونه‌های مورد بررسی

جدول ۲. خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی و شناسایی مکانهای ژنی و محتوای چند شکلی ۲۵ جمعیت از دو گونه گندم اینکورن

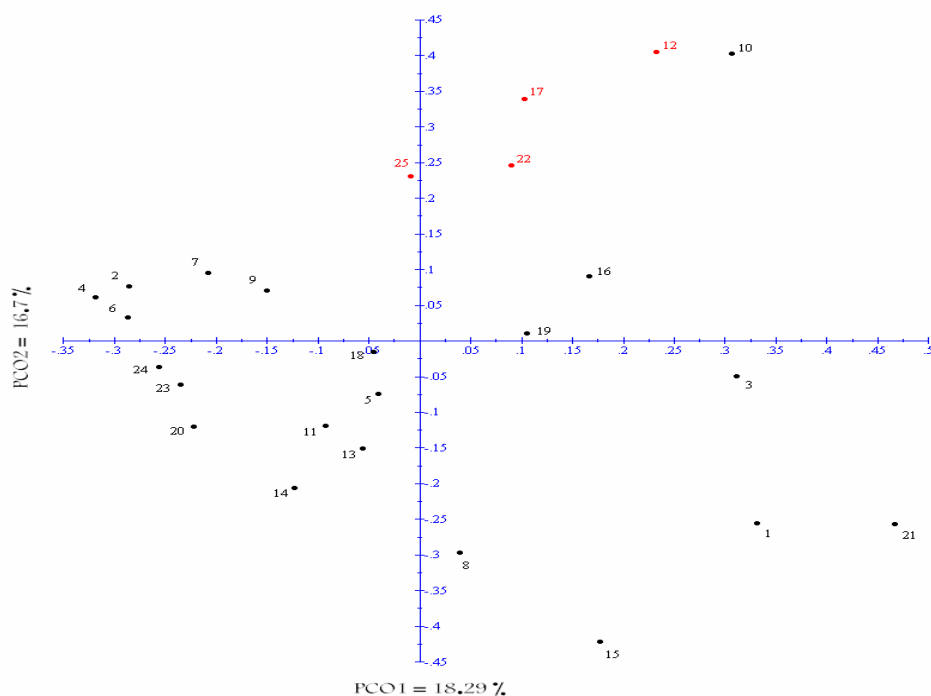
نام لوکوس	تعداد آلل	دمای اتصال پرایمر	محتوای چند شکلی
Xgwm130-7A	۷	۶۰	۰/۸۳
Xgwm156-5A	۱۱	۶۰	۰/۹۰
Xgwm160-4A	۲	۶۰	۰/۳۷
Xgwm334-6A	۶	۵۰	۰/۸۱
Xgwm357-1A	۳	۵۵	۰/۵۹
Xgwm369-3A	۱۴	۶۰	۰/۹۲
Xgwm372-2A	۹	۶۰	۰/۸۷
Xgwm5-3A	۲	۵۰	۰/۳۷
Xgwm99-1A	۷	۶۰	۰/۸۳
Xgwm164-1A	۵	۵۵	۰/۷۶
Xgwm570-6A	۱۴	۶۰	۰/۹۲
Xgwm410-5A	۷	۵۵	۰/۸۳



شکل ۱. گروه بندی ۲۵ ژنوتیپ گندم اینکورن (دو گونه تریبتیکوم بوئیکوم و تریبتیکوم اورارتو) با استفاده از دندروگرام تهیه شده با ۸۷ باند نمره‌دهی شده از ۱۲ مکان نشانگرهای ریز ماهواره (الگوریتم UPGMA روی ماتریس عدم تشابه دایس



شکل ۲. گروهبندی ۲۵ ژنوتیپ گندم اینکورن (دو گونه تریبتیکوم بوئتییکوم و تریبتیکوم اورارتو) با استفاده از دندروگرام تهیه شده با ۸۷ باند نمره‌دهی شده از ۱۲ مکان نشانگرهای ریزماهواره (الگوریتم UPGMA روی ماتریس عدم تشابه جاکارد



شکل ۳. تجزیه به مختصات اصلی و ترسیم بای پلات ۲۵ ژنوتیب مورد بررسی با استفاده از اطلاعات دو محور مختصات اصلی اول و دوم.

جدول ۳. نتایج تجزیه به مختصات اصلی: (توزیع اطلاعات در میان محورها بیانگر توزیع مناسب ۱۲ نشانگر بررسی شده در ژنوم افراد مورد بررسی می‌باشد).

مختصات	مقدار ویژه	سهام واریانس	سهام تجمعی
۱	۰/۰۴۸	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹
۲	۰/۰۴۴	۱۶/۷۰	۳۴/۹۹
۳	۰/۰۳۰	۱۱/۵۲	۴۶/۵۱
۴	۰/۰۲۷	۱۰/۱۸	۵۶/۶۹
۵	۰/۰۲۰	۷/۶۲	۶۴/۳۱
۶	۰/۰۱۸	۶/۹۶	۷۱/۲۷
۷	۰/۰۱۴	۵/۴۹	۷۶/۷۶
۸	۰/۰۱۴	۵/۲۵	۸۲/۰۱
۹	۰/۰۰۷	۲/۵۹	۸۴/۶۰
۱۰	۰/۰۰۵	۱/۹۰	۸۶/۵۰

- from hexaploid bread Wheat. *Theor. Appl. Genet.* 94: 557-563 (1997).
7. Chahal G.S. and Gosal S.S. Principles and procedures of plant breeding: Biotechnological and conventional approaches. Alpha Science International Ltd (2002).
8. Christiansen M. J., Andersen S.B. and Ortiz R. Diversity changes in an intensively bread wheat germplasm during the 20th century. *Molecular Breeding*. 9: 1-11 (2002).
9. Roder M.S., Plaschke J., König S. U., Börner A., Sorrells M. E., Tanksley S. D., Ganal M. W. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246:327-333 (1995).
10. Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P. and Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149: 2007-2023 (1998).
11. Maccaferri M., Sanguineti M.C., Donini P. and Tuberosa R. Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 107(5): 783-797 (2003).
- منابع**
۱. کافی، م.، احمدنژاد، الف. احمدنژاد و جامی الاحمدی، م.، گندم: اکولوژی، فیزیولوژی و برآورد عملکرد. (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد (۱۳۸۴).
- ۲- مهربانی، علی اشرف. بررسی تنوع ژنتیکی گندم‌های وحشی ایران با استفاده از روش آرایه‌های تنوع DNA. پایان نامه دکتری، دانشگاه تهران (۱۳۸۶).
3. Agrama H. and Tuinstra M. R. Phylogenetic diversity and relationship among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *African Journal of Biotechnology*. 2(10): 334-340 (2003).
4. Ahmad M. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 101:892-896 (2000).
5. Ahmad M. Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats. *Genome*. 45: 646-651 (2002).
6. Bryan G. J., Collins A. J., Stephenson P., Orry A. and Smith J. B. Isolation and characterization of microsatellite

12. Somma S., Cenci M.G. and Blanco A. Detection of QTL for carotenoid pigment content in Durum wheat. Proceedings of the XLVIII Italian Society of Agricultural Genetics Italy. (2004).
13. Stodart B.J., Machay M. and Raman H. AFLP and SSR analysis of genetic diversity among landraces of bread wheat (*Triticum aestivum* L em. Thell) different geographic regions. Australian Journal of Agricultural Research, 56: 691-697 (2005).