به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ۲ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۱۲۹-۱۳۸

مطالعهٔ تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم با استفاده از نشانگرهای RAPD

علی‌رضا پورمحمد[۱]*، مجید شکرپور[۲] و عزت‌اله اسفندیاری[۳]

۱. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه مراغه
۲. استادیار گروه باغبانی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه مراغه

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۸/۲۱

چکیده

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ گندم، آزمایشی با نشانگرهای RAPD در آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۱ اجرا شد. ۱۰ آغازگر از ۷۰ آغازگر ارزیابی‌شده، الگوهای نواربندی مناسب تولید کردند. این آغازگرها درمجموع ۷۳ نوار چندشکل با میانگین ۷/۳ نوار به‌ازای هر آغازگر تولید کردند. تعداد نوار به‌ازای هر آغازگر از ۵ نوار برای آغازگر ۵۵ تا ۱۱ نوار برای آغازگر ۵۹ متغیر بود. تعداد کل نوارهای چندشکل حاصل در ژنوتیپ‌های بررسی‌شدهٔ گندم از ۷ نوار تا ۵۷ نوار متغیر بود، به‌طوری‌که میانگین تعداد نوار از ۰/۷ نوار در 'آزادی' تا ۵/۷ نوار در 'قدس' متفاوت بود. براساس شاخص تنوع ژنی نی، تنوع چشمگیری بین ژنوتیپ‌های گندم مطالعه‌شده وجود داشت. از بین آغازگرهای بررسی‌شده، آغازگر ۳۰ با توالی CCGGCCTTAG بیشترین (۰/۴۰۸) و آغازگر ۱۸ کمترین (۰/۲۲۶) تنوع را نشان دادند. در تجزیهٔ خوشه‌ای ارقام براساس فاصلهٔ ژنتیکی نی و به روش UPGMA ۴ گروه متمایز، قابل تشخیص بودند. در این گروه‌بندی، ارقام خارجی در گروه دوم و جدا از سایر ارقام قرار گرفتند. بنابراین، RAPD در جداسازی ارقام خارجی از داخلی موفق‌تر عمل کرد. در تجزیه به مختصات اصلی، ۳ مؤلفهٔ اصلی اول ۶۱/۷۱ درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه کردند. کم‌بودن تغییرات توجیه‌شده توسط ۳ مؤلفهٔ اول، می‌تواند ناشی از پراکنش خوب نشانگرهای بررسی‌شده و نمونه‌برداری مناسب آن‌ها از کل ژنوم باشد.

کلیدواژه‌ها: آغازگر تصادفی، تجزیهٔ خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی، تنوع ژنتیکی، چندشکلی.

* نویسنده مسئول Email: pourmohammad@ymail.com

مقدمه

ارزیابی تنوع ژنتیکی قبل از شروع پژوهش‌های اصلاحی یا مطالعات ژنتیکی امری ضروری است. بنابراین، اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی و بهره‌برداری صحیح و دقیق و حفاظت از منابع ژنتیکی در پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی و مطالعهٔ روند تکامل گیاهان زراعی در جهت تبیین اصول صحیح برنامه‌ریزی‌های به‌نژادی اهمیت زیادی دارد (۲۸).

تکنیک‌های مبتنی بر نشانگرهای DNA قادر به شناسایی چندشکلی مربوط به تفاوت در توالی‌های DNA است. این روش‌ها مکمل روش‌های کلاسیک ارزیابی تنوع هستند. مزیت عمدهٔ آن‌ها این است که تنوع را در سطح DNA بررسی می‌کنند و مستقل از شرایط محیطی هستند. همچنین این تکنیک‌ها می‌توانند در تمام مراحل رشد با مقدار مواد گیاهی کم و با استفاده از هر قسمت گیاه انجام شوند (۲۰). از بین روش‌های مولکولی استفاده‌شده برای شناسایی تنوع ژنتیکی در سطح DNA، می‌توان به چندشکلی قطعات تصادفی تکثیرشده (RAPD[1]) اشاره کرد. این روش برخلاف محدودیت‌هایش، به‌دلیل سرعت و سادگی اجرا، به‌طور وسیعی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، برآورد تشابهات، فواصل ژنتیکی و گروه‌بندی جوامع در گونه‌های گیاهی زیادی استفاده شده است (۴، ۵، ۷، ۸، ۱۳ و ۲۶).

کاربرد نشانگرهای مولکولی و شناسایی توالی‌های نوکلئوتیدی چندشکل پراکنده در ژنوم، امکان جدیدی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی درون و بین گونه‌ای فراهم کرده است (۹). انتخاب روش‌های تجزیه، به اهداف آزمایش، جمعیت بررسی‌شده، منابع و در دسترس بودن امکانات زیربنایی تکنولوژی، آمادهٔ بهره‌برداری بودن آن‌ها و همچنین به زمان مورد نیاز بستگی دارد (۶ و ۱۵).

درجهٔ انشعاب ژنتیکی در ۷ ژنوتیپ گندم، شامل ۶ ژنوتیپ خارجی و یک واریتهٔ محلی، به روش RAPD برآورد شده است (۱۰). درمجموع ۱۱۲ قطعه DNA توسط ۱۵ آغازگر تصادفی با متوسط حدود ۷/۴ قطعه از هر آغازگر تولید شد. در بین ۱۱۲ قطعه، ۵۰ قطعهٔ چندشکلی را نشان دادند. درنهایت، RAPD می‌تواند برای توصیف صفات اختصاصی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گندم مفید باشد.

توانایی نشانگرهای مبتنی بر PCR برای تعیین نقشهٔ پیوستگی ژنی در گندم *Einkorn* بررسی شده است. از مقایسهٔ چندشکلی مربوط به گندم *Einkorn*، *T. monococcum* و *T.bocoticum*، ۴۹ باند چندشکل از ۳۳ آغازگر ISSR و ۳۶ باند چندشکل از ۲۵ آغازگر RAPD به‌دست آمد که برای تهیهٔ نقشه در ۶۶ فرد در جمعیت F_2 نشان داده شد (۱۱). کاربرد نشانگرهای RAPD، AFLP و SSR برای آزمون روابط ژنتیکی در ۳۶ جمعیت *Triticum boeoticum* به‌دست‌آمده از غرب ایران ارزیابی شده است (۱۶). درمجموع به‌ترتیب ۲۲۴ (۱۳۵ چندشکل)، ۹۷۹ (۴۲۹ چندشکل) و ۲۴۶ (۱۴۵ چندشکل) نوار/ آلل، با استفاده از ۱۴ آغازگر RAPD، ۱۷ آغازگر AFLP و ۱۷ نشانگر SSR نمایان شد. اطلاعات چندشکلی شامل ارزش بالایی برای SSR (۰/۸۱) و ارزش پایینی برای نشانگرهای RAPD (۰/۴۵) و AFLP (۰/۵۶) هستند و منعکس‌کنندهٔ توانایی بالای SSRها برای شناسایی چندشکلی‌هاست، ضریب همبستگی درجهٔ شباهت در هر ۳ نشانگر اندازه‌گیری شده معنادار بود. تجزیهٔ خوشه‌ای به روش UPGMA، ۳۶ جمعیت *T.boeoticum* را براساس شباهت قطعات RAPD به ۳ گروه مهم و اصلی و به ۲ گروه عمده براساس نشانگرهای SSR و AFLP و شباهت‌های ژنتیکی

1. Random Amplified Polymorphic DNA

SSR، AFLP و RAPD تقسیم کرد. طبق این بررسی، سطح خوبی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های استان‌های کرمانشاه و لرستان مشاهده و *T.boeoticum* سطح وسیعی از اکوسیستم‌های کشاورزی را در غرب ایران اشغال کرده است. تنوع ژنتیکی ۷ واریتهٔ گندم (*T. aestivum*) را با استفاده از صفات مورفولوژیکی و آلل‌های ۴۸ توالی تکراری ساده (SSR) بررسی شد (۲۵). ژنوتیپ‌ها از نظر صفات مورفولوژیک و نشانگر SSR با هم متفاوت بودند و برای طبقه‌بندی می‌توان از این دو نشانگر استفاده کرد. ۱۲ ژنوتیپ گندم اصلاح‌شده از میان برنامه‌های دورگ‌گیری برای بررسی تنوع ژنتیکی به وسیلهٔ نشانگرهای RAPD انتخاب شده‌اند. درمجموع ۱۰۲ مکان ژنی توسط ۱۴ آغازگر تکثیر شد که بیش از ۹۱ مکان (۸۹/۲ درصد) پلی‌مورف بودند و تنها ۱۱ مکان (۱۰/۸ درصد) مونومورف بودند (۲۴). تنوع ژنتیکی ۱۱ رقم گندم نان و دوروم را با استفاده از تجزیهٔ RAPD بررسی کرد (۴). به‌طورکلی، ۷۰ تا ۷۵ قطعه DNA توسط ۱۰ آغازگر تصادفی تکثیر شد. ۴۰ درصد در گندم نان و ۳۵/۷ درصد در گندم دوروم چندشکل بودند.

هدف پژوهش حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی ۴۸ رقم گندم با استفاده از نشانگرهای RAPD به‌منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، از بذور یکنواخت ۴۸ رقم گندم به‌منزلهٔ مادهٔ گیاهی استفاده شد (جدول۱). استخراج DNA به روش CTAB (۲۳) انجام گرفت. برای تعیین کمّیت و کیفیت DNA استخراج‌شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. پس از تعیین کمّیت و کیفیت، DNAهای استخراج‌شده با غلظتی برابر ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. ترکیب واکنش PCR شامل آب دو بار تقطیر استریل، بافر PCR با غلظت ۱X، کلرید منیزیم با غلظت ۳ میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۲۰۰ میکرومول، آغازگر با غلظت ۰/۴ میکرومول، DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم و آنزیم تک‌پلی‌مراز یک واحد، در میکروتیوپ‌های ۰/۲ سی‌سی صورت گرفت (۱۰). چرخه‌های حرارتی PCR به‌صورت مرحلهٔ اول: واسرشته‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، مرحلهٔ دوم: شامل ۴۰ چرخه (واسرشته‌سازی به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد، بسط رشته DNA توسط تک‌پلی‌مراز به‌مدت ۲ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد) و مرحلهٔ سوم: بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد بود (۱۱). برای تکثیر DNA ژنومی از ۷۰ آغازگر تصادفی تهیه‌شده از شرکت Metabion آلمان استفاده شد. نام و توالی این آغازگرها در جدول۲ آورده شده است. فرآورده‌های تکثیرشده توسط PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد جداسازی و به روش رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکارسازی شدند. برای انجام الکترفورز، به هر نمونه ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه شد و از هر نمونه به مقدار ۲۳ میکرولیتر در ژل بارگذاری شد. عمل الکتروفورز با ولتاژ ۱۵۰، به‌مدت ۳ ساعت انجام گرفت. بعد از الکتروفورز، از دستگاه ژل داک ساخت شرکت Uvitec برای مشاهده و عکس‌برداری از نوارها استفاده شد. الگوهای نواری حاصل به صورت صفر و یک (نبود یا وجود نوار) امتیازدهی شدند. برای مشخص‌شدن اندازهٔ قطعات تکثیرشده از نشانگر وزن مولکولی با اندازهٔ قطعات ۲۱۲۲۶-۵۶۴ جفت باز (Size Marker–SM- 191) از شرکت Fermentas استفاده شد.

جدول۱. اسامی ۴۸ رقم گندم استفاده‌شده در آزمایش برای برآورد تنوع ژنتیکی

شماره	رقم	شماره	رقم	شماره	رقم
۱	زاگرس	۲۰	بک‌کراس روشن	۳۶	آزادی
۲	هیرمند	۲۱	روشن	۳۷	داراب۲
۳	کرج۳	۲۲	سیستان	۳۸	اروند
۴	چمران	۲۳	بهار	۳۹	شیرودی
۵	کرج۱	۲۴	زرین	۴۰	آریا
۶	نیک‌مژاد	۲۵	مهدوی	۴۱	سپاهان
۷	آرتا	۲۶	طبسی	۴۲	یاواروس
۸	شعله	۲۷	بم	۴۳	الوند
۹	کرخه	۲۸	فلات	۴۴	پیشتاز
۱۰	بیات	۲۹	شهریار	۴۵	مارون
۱۱	گلستان	۳۰	کراس شاهی	۴۶	وری‌ناک
۱۲	سوریه۳۷۱	۳۱	امید	۴۷	آذر۲
۱۳	مصر۴۴۹	۳۲	طوس	۴۸	دریا
۱۴	مصر۵۵۷	۳۳	سبلان		
۱۸	قدس	۳۴	تجن		
۱۹	شاه‌پسند	۳۵	کرج۲		

جدول۲. توالی آغازگرهای ده‌تایی تصادفی RAPD استفاده‌شده برای بررسی تنوع مولکولی ارقام گندم

شمارهٔ آغازگر	توالی آغازگر	شمارهٔ آغازگر	توالی آغازگر
Oligo –۱	CCT GGG CTT C	Oligo –۳۶	CCC CCC TTA G
Oligo –۲	CCT GGG CTT G	Oligo –۳۷	CCG GGG TTT T
Oligo –۳	CCT GGG CTT A	Oligo –۳۸	CCG GGG AAA A
Oligo –۴	CCT GGG CTG G	Oligo –۳۹	TTA ACC GGG C
Oligo –۵	CCT GGG TTC C	Oligo –۴۰	TTA CCT GGG C
Oligo –۶	CCT GGG CCT A	Oligo –۴۱	TTA ACC GGG G
Oligo –۷	CCT GGG GGT T	Oligo –۴۲	TTA ACC CGG C
Oligo –۸	CCT GGC GGT A	Oligo –۴۳	AAA ACC GGG C
Oligo –۹	CCT GCG CTT A	Oligo –۴۴	TTA CCC CGG C
Oligo –۱۰	GGG GGG ATT A	Oligo –۴۵	TTA ACC CCG G
Oligo –۱۱	CCC CCC TTT A	Oligo –۴۶	TTA AGG GGG C
Oligo –۱۲	CCT GGG TCC A	Oligo –۴۷	TTC CCC AAG C
Oligo –۱۳	CCT GGG TGG A	Oligo –۴۸	TTA ACG GGG A

ادامه جدول۲. توالی آغازگرهای ده‌تایی تصادفی RAPD استفاده‌شده برای بررسی تنوع مولکولی ارقام گندم

شمارهٔ آغازگر	توالی آغازگر	شمارهٔ آغازگر	توالی آغازگر
Oligo –۱۴	CCT GGG TTT C	Oligo –۴۹	TTC CCC GAG C
Oligo –۱۵	CCT GGG TTT G	Oligo –۵۰	TTC CCC GCG C
Oligo –۱۶	GGT GGC GGG A	Oligo –۵۱	CTA CCC GTG C
Oligo –۱۷	CCT GGG CCT C	Oligo –۵۲	TTC CCG GAG C
Oligo –۱۸	GGG CCG TTT A	Oligo –۵۳	CTC CCT GAG C
Oligo –۱۹	GCC CGG TTT A	Oligo –۵۴	GTC CCA GAG C
Oligo –۲۰	TCC GGG TTT G	Oligo –۵۵	TCC CTC GTG C
Oligo –۲۱	ACC GGG TTT C	Oligo –۵۶	TGC CCC GAG C
Oligo –۲۲	CCC TTG GGG G	Oligo –۵۷	TCC CCC GAG G
Oligo –۲۳	CCC GCC TTC C	Oligo –۵۸	TTC CCG GAG C
Oligo –۲۴	ACA GGG GTG A	Oligo –۵۹	TTC CGG GTG C
Oligo –۲۵	ACA GGG CTC A	Oligo –۶۰	TTG GCC GAG C
Oligo –۲۶	TTT GGG CCC A	Oligo –۶۱	TTC CCC GAC C
Oligo –۲۷	TTT GGG GGG A	Oligo –۶۲	TTC CCC GTC G
Oligo –۲۸	CCG G CC TTA A	Oligo –۶۳	TTC CCC GCC C
Oligo –۲۹	CCG GCC TTA C	Oligo –۶۴	GAG GGC GGG A
Oligo –۳۰	CCG GCC TTA G	Oligo –۶۵	AGG GGC GGG A
Oligo –۳۱	CCG GCC TTC C	Oligo –۶۶	GAG GGC GTGA
Oligo –۳۲	GGG GCC TTA A	Oligo –۶۷	GAG GGC GAG C
Oligo –۳۳	CCG GCT GGA A	Oligo –۶۸	GAG CTC GCG A
Oligo –۳۴	CCG GCC CCA A	Oligo –۶۹	GAG GGC AAG A
Oligo –۳۵	CCG GGG TTA A	Oligo –۷۰	GGC ACG CGA

تعداد کل نوارهای چندشکل، تعداد نوارها در هر رقم، تنوع ژنتیکی کل و درجهٔ تمایز ژنی بین آن‌ها با استفاده از شاخص تنوع ژنی نی (۱۸) برآورد شد. فاصلهٔ ژنتیکی بین ارقام براساس ضریب نی (۱۷) محاسبه و برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها تجزیهٔ خوشه‌ای به روش UPGMA رسم شد.

$$D = \frac{-\ln\left[\Sigma X_i Y_j\right]}{\sqrt{\Sigma X_i Y_j}} \quad (۱)$$

در این رابطه، X_i و Y_j فراوانی آللی در ارقام است.

به‌منظور تعیین کارایی روش تجزیهٔ خوشه‌ای، از ضریب همبستگی کوفنتیک استفاده شد. برای تشخیص

دقیق‌تر روابط ژنتیکی بین ارقام، تجزیه به مختصات اصلی براساس فاصلهٔ ژنتیکی نی صورت گرفت. برای محاسبات آماری از نرم‌افزارهای SPSS و NTSYS pc2.2 استفاده شد.

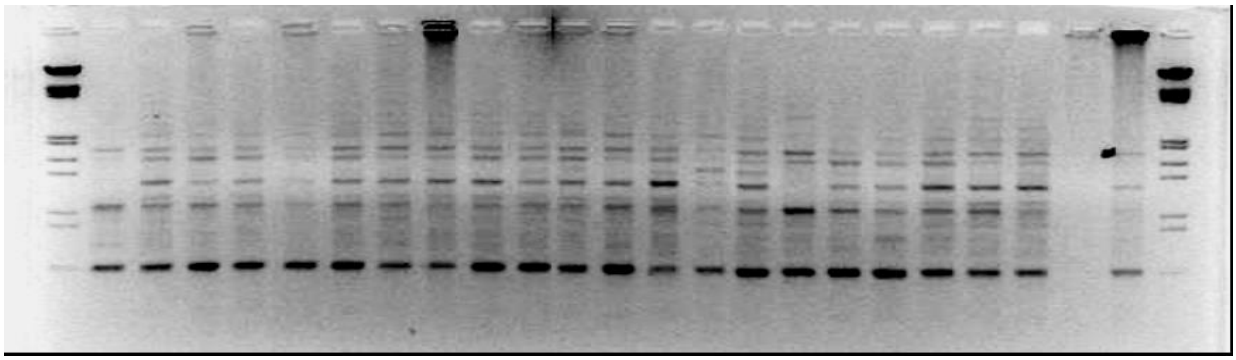
نتایج و بحث

۱۰ آغازگر از ۷۰ آغازگر ارزیابی‌شده RAPD با الگوهای نواربندی مناسب برای بررسی ارقام گندم استفاده شدند. شکل۱ به‌منزلهٔ نمونهٔ الگوی نواربندی برخی ارقام گندم با استفاده از آغازگر، شمارهٔ ۲۰ را نشان می‌دهد. براساس شاخص تنوع ژنی نی (۱۸) تنوع ژنتیکی بین ارقام گندم براساس هر یک از ۱۰ آغازگر از صفر تا ۰/۵ برآورد شد. تنوع قابل ملاحظه‌ای بین ارقام گندم مطالعه‌شده وجود دارد، به‌طوری‌که میانگین تنوع ژنتیکی براساس شاخص نی (۱۷) و شانون (نقل از ۱۲) به‌ترتیب ۰/۲۹۷۹ و ۰/۴۵ برآورد شد.

از بین آغازگرهای بررسی‌شده آغازگر ۳۰ بیشترین (۰/۴۰۸) و آغازگر ۱۸ کمترین (۰/۲۲۶) تنوع را نشان دادند (جدول۲). در کل، تعداد مکان‌های ژنی چندشکل ۷۳ و درصد چندشکلی ۹۳/۵۹ درصد به‌دست آمد (جدول۳). شکل۱ به‌ازای هر آغازگر از ۵ نوار برای آغازگر ۵۵ تا ۱۱ نوار برای آغازگر ۵۹ متغیر بود. تعداد کل نوارهای چندشکل آغازگرهای چندشکل درمجموع ۷۳ نوار چندشکل با میانگین ۷/۳ نوار به‌ازای هر آغازگر تولید کردند. تعداد نوار حاصل از ۱۰ آغازگر استفاده‌شده در درون ارقام بررسی‌شدهٔ گندم از ۷ نوار تا ۵۷ نوار متغیر بود، به‌طوری‌که میانگین تعداد نوار از ۰/۷ نوار در رقم 'آزادی' تا ۵/۷ نوار در رقم 'قدس' متفاوت بود. به‌عنوان نمونه، الگوی نواربندی برخی ارقام گندم با استفاده از آغازگر شمارهٔ ۲۰ را نشان می‌دهد.

در مطالعهٔ تنوع ژنتیکی بین ۹۶ رقم گندم با ۵۰ آغازگر تصادفی RAPD ۸۲ درصد آغازگرها و ۷۸ درصد قطعات تکثیریافته چندشکل بودند (۲۸). تعداد قطعات چندشکل در هر آغازگر از ۱ تا ۱۳ با متوسط ۴/۸۲ متغیر بود. واریته‌ها به‌طور روشنی از همدیگر با الگوهای RAPD تشخیص داده شدند. در مطالعهٔ تنوع ژنتیکی لاین‌های گندم با ۳۲ آغازگر تصادفی، ۱۰ آغازگر نوارهای واضح، چندشکل تکرارپذیر تولید کردند (۱).

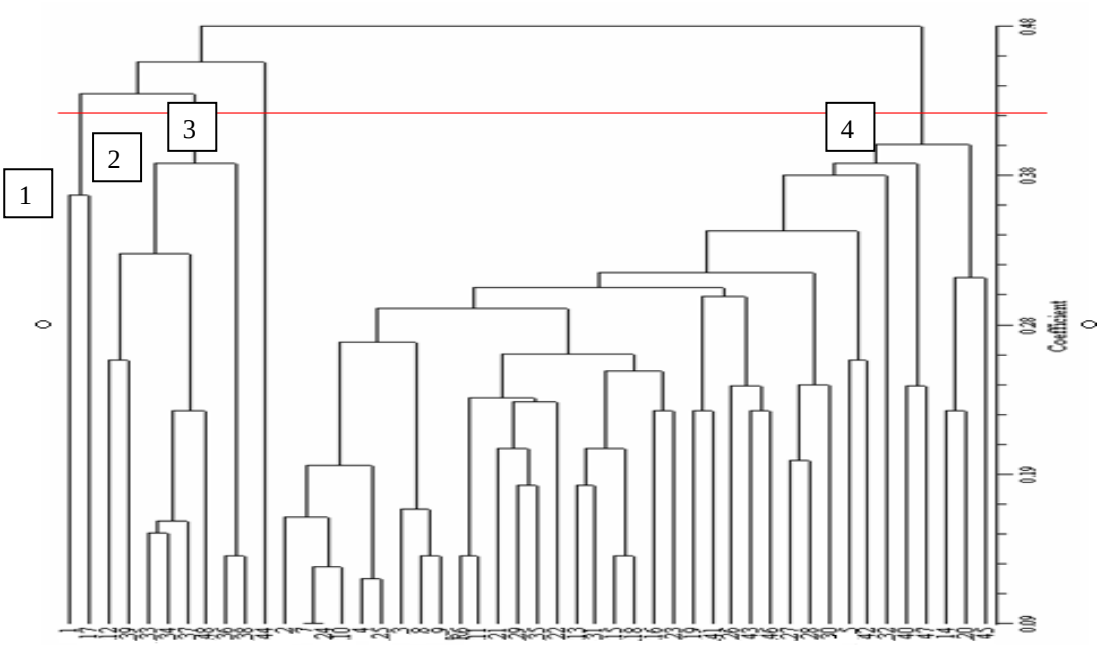
ژنوتیپ‌های دریا و هیرمند کمترین فاصلهٔ ژنتیکی (۰/۰۹۴) و ژنوتیپ‌های 'کرخه' و 'مصر۴۴۹'بیشترین فاصلهٔ ژنتیکی (۰/۸۱۴) را نسبت به یکدیگر نشان دادند. میانگین فاصلهٔ ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها ۰/۳۹۶ به‌دست آمد.



شکل۱. الگوی نواربندی برخی ارقام گندم با استفاده از آغازگر شمارهٔ ۲۰ روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

جدول۳. میزان تنوع ژنتیکی بین ارقام مطالعه‌شده به‌ازای هر نشانگر

آغازگر	شاخص شانون	شاخص تنوع نی
Oligo-۱۸	۰/۳۶۵	۰/۲۲۶
Oligo-۲۳	۰/۴۰۷	۰/۲۶۲
Oligo-۳۰	۰/۵۹۶	۰/۴۰۸
Oligo-۵	۰/۵۶۶	۰/۳۹۱
Oligo-۲۰	۰/۵۸۳	۰/۳۹۶
Oligo-۵۴	۰/۴۹۶	۰/۳۲۸
Oligo-۶۵	۰/۴۴۹	۰/۲۸۷
Oligo-۶۴	۰/۳۴۸	۰/۲۲۲
Oligo-۴	۰/۴۴۴	۰/۲۸۹
Oligo-۵۵	۰/۴۳۳	۰/۲۷۷
میانگین	۰/۴۶۹	۰/۳۰۹

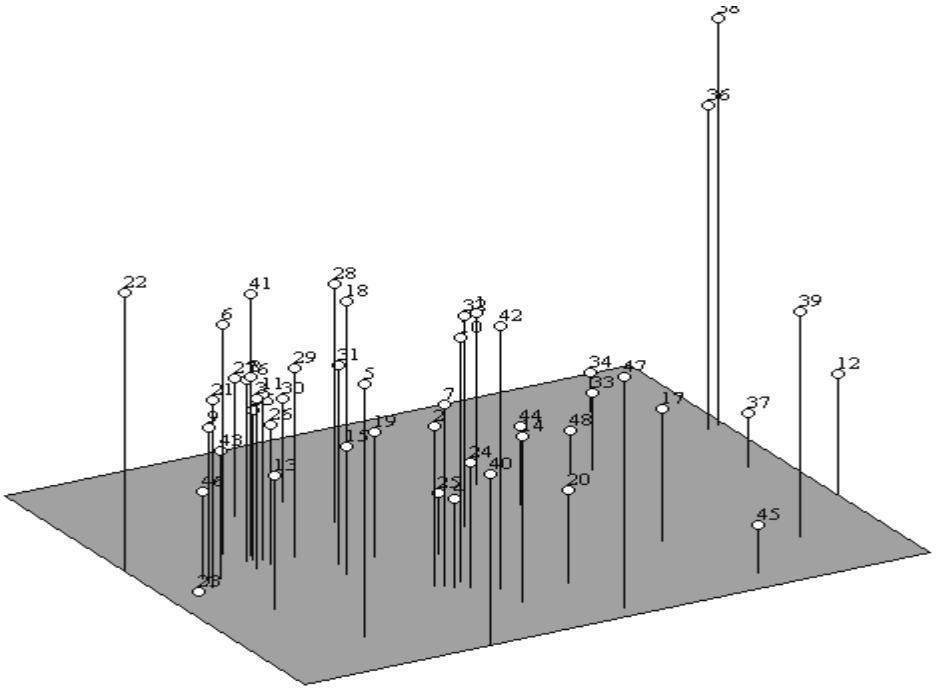


شکل۲. گروه‌بندی ارقام گندم براساس داده‌های RAPD با استفاده از روش UPGMA و فاصلهٔ ژنتیکی نی (۱۹۷۲)

در این بررسی، تجزیهٔ خوشه‌ای براساس فاصلهٔ ژنتیکی نی و به روش UPGMA انجام گرفت (شکل۲). در نمودار درختی به‌دست‌آمده ۴ گروه متمایز قابل تشخیص بودند. در گروه اول، ارقام 'گلستان' و 'تجن' قرار گرفتند. گروه دوم شامل ارقام 'آزادی'، 'کرج۱'، 'بیات'، 'ترکیه۵۰۶'، 'سوریه۳۷۱'، 'مصر۵۵۷'، و 'مصر۴۴۹' بود. رقم 'آذر۲' در

گروه سوم و سایر ارقام در گروه چهارم قرار گرفتند. در این گروه‌بندی، ارقام خارجی در گروه دوم و جدا از سایر ارقام قرار گرفتند. بنابراین،RAPD در جداسازی ارقام خارجی از داخلی نسبت به ارقام حساس و مقاوم به شوری موفق‌تر عمل کرد. گروه چهارم که بزرگ‌ترین گروه بود و بیشتر ارقام داخلی در آن جای گرفتند، شباهت ژنتیکی زیادی دارند.

با توجه به درصد بالای خودباروری و پیچیدگی‌های ژنوم در گندم انتظار می‌رفت که تغییرات بین ارقام و خصوصاً لاین‌های بررسی‌شده پایین باشد. تمامی ارقامی که در زیرگروه‌های مشابه قرار گرفتند، تنوع ژنتیکی بالایی ندارند و گسترش پایهٔ ژنتیکی واریته‌ها نیاز اساسی و جدی است. شواهد موجود نشان‌دهندهٔ فرسایش ژنتیکی ارقام گندم بود که این امر ناشی از این است که طی چند دههٔ گذشته و به‌ویژه پس از انقلاب سبز تا کنون، از میان تعداد زیاد ارقام زراعی اصلاح‌شده در کشور، تنها تعداد محدودی به‌منزلهٔ رقم اصلی کشت می‌شوند. به‌طور مثال، ۸۴ درصد سطح زیرکشت گندم در کشور تنها مربوط به ۱۰ واریته است و دو رقم 'فلات' و 'قدس' به‌تنهایی ۲۹ درصد سطح زیر کشت گندم را به‌خود اختصاص می‌دهند (۳). ازآنجاکه ایران یکی از مراکز تنوع گندم به‌شمار می‌رود جست‌وجو در جهت یافتن ژرم‌پلاسم‌های متنوع‌تر یک نیاز اساسی و جدی است. با اینکه در اغلب موارد انتخاب والدین برای تهیهٔ یک لاین خالص یا یک رقم هیبرید براساس عملکرد والدین و میزان تکمیل‌شوندگی صفات مهم زراعی صورت می‌گیرد، ولی اطلاع از تنوع ژنتیکی والدین برای نیل به تفکیک‌های متجاوز در نتاج امری ضروری به‌شمار می‌رود. یکی از پیامدهای اجتناب‌ناپذیر کشاورزی نوین که مبتنی بر استفاده از ارقام اصلاح‌شده با بیشترین عملکرد و کیفیت قابل قبول است، کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی است. در حال حاضر نگرانی اصلی، کاهش سریع تنوع ژنتیکی ارقام زراعی در سراسر جهان است.



شکل۳. نمایش سه‌بعدی ارقام گندم براساس سه مؤلفهٔ هماهنگ اول، دوم و سوم

باریک‌بودن دامنهٔ تنوع ژنتیکی، ما را متوجه خطر بزرگ‌تری می‌کند و آن آسیب‌پذیری ژنتیکی گندم در کشور است، زیرا در صورت بروز کوچک‌ترین خطری نظیر اپیدمی‌شدن یک بیماری، تمامی ارقام کشت‌شده از بین می‌رود و ضررهای جبران‌ناپذیری به دنبال خواهد داشت. از طرف دیگر، نبود تنوع کافی در والدین استفاده‌شده برای تشکیل جمعیت‌ها از طریق هیبریداسیون، ممکن است به کاهش تنوع ژنتیکی برای صفات کمی مثل عملکرد و درنتیجه بهبود صفت مشکل یا غیرممکن منجر شود (۳).

به‌منظور تعیین روابط ژنتیکی بین ارقام و نیز گروه‌بندی آن‌ها تجزیه به مختصات اصلی نیز به‌عنوان روشی مکمل برای تجزیهٔ خوشه‌ای انجام گرفت. ۳ مؤلفهٔ اصلی اول درمجموع ۶۱/۷۱ درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه کردند. مؤلفهٔ اول ۳۴/۶۲ درصد از تنوع کل را تبیین کرد. این مقدار برای مؤلفهٔ دوم و سوم به‌ترتیب ۱۳/۷۲ و۱۳/۳۶ درصد بود (شکل۳). کم‌بودن تغییرات توجیه‌شده توسط ۳ مؤلفهٔ اول، می‌تواند ناشی از پراکنش خوب نشانگرهای بررسی‌شده و نمونه‌برداری مناسب آن‌ها از کل ژنوم باشد (۲). گروه‌بندی اکوتیپ‌های مطالعه‌شده با استفاده از ۳ مؤلفهٔ هماهنگ اصلی در شکل۲ مشاهده می‌شود. این گروه‌بندی‌ها، نتایج تجزیهٔ خوشه‌ای را به‌دلیل کم‌بودن مجموع ۳ مؤلفهٔ اول به‌طور کامل تأیید نکرد.

منابع

۱. سیاه‌سر ب، اله‌دو م و شاهسوند حسنی ح (۱۳۸۹) «بررسی لاین‌های تریتیکاله و گندم با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR». علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۱ (۳): ۵۵۵–۵۶۸.

۲. محمدی س ا (۱۳۸۱) روش‌های آماری در ژنتیک. مجموعه مقالات ششمین کنفرانس بین‌المللی آمار ایران: ۳۷۱_ ۳۹۴.

۳. نصیری م، کوچکی ع و مظاهری د (۱۳۸۴) «تنوع گونه‌های زراعی در ایران». بیابان. ۱۰(۱): ۳۳_ ۵۰.

4. Abdul-Razzak Tahir N (2008) Assessment of genetic diversity among wheat varieties in sulaimanyah using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Gordan Journal of Biological Sciences. 1: 159-164.

5. Bardeen JM and Havey MJ (1995) Romly amplified polymorphic DNA in bulb onion its use to assess inbred integrity. Journal of American Society Horticultural Sciences. 120: 752-758.

6. Bernardo R (1993) Estimation of coefficient of coanestry using molecular markers in maize. Theoretical and Applied Genetics. 85: 1055-1062.

7. Friesen N and Klaas M (1998) Origin of some minor vegetatively propagated *Allium* crops studied with RAPD GISH. Genetic Resources Crop Evolution. 45: 511-523.

8. Fu YB, Peterson G, Dideerichsen A and Richards KW (2002) RAPD analysis of genetic relationship of seven flax species in the genus *Linum* L. Genetic Resources Crop Evolution. 49: 253-259.

9. Gostimsky SA, Kokaeva ZG and Konovalov FA (2005) Studying plant genome variation using molecular markers. Russian Journal of Genetics. 41: 378–88.

10. Iqbal A, Khan AS, Khan IA, Awan FS, Ahmad A and Khan AA (2007) Study of genetic divergence among wheat genotypes through random amplified polymorphic DNA. Genetic Molecular Resource. 6: 476-481.

11. Kojima T, Nagaoka T, Noda K and Ogihara Y (1998) Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in *Einkorn* wheat in relation to that RFLP markers. Theoretical Applied Genetics. 96: 37-45.

12. Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. Evolution Biology. 6: 381-398.

13. Mackill DJ (1995) Classifying Japonica rice cultivars with RAPD markers. Crop Science. 35: 889-894.

14. Mateescu RG, Zhang Z, Tsai K, Phavaphutanon NI, Lust G, Quaas R, Murphy K, Acland G and Todhunter R (2005) Analysis of allele fidelity polymorphic information content, and density of microsatellites in a genome-wide screening for hip dysplasia in a crossbreed pedigree. Journal of Heredity. 96: 847-853.

15. Messer M, Melchinger A, Herrmann R and Boppnmaier J (1993). Relationshipe among early European maize inbreds: II. Comparison of pedigree and RFLP data. Crop Science. 33: 944-950.

16. Naghavi MR, Malaki M, Alizadeh H, Pirseiedi M and Mardi M (2009) An assessment of genetic diversity in wild diploid wheat *Triticum boeoticum* from West of Iran Using RAPD, AFLP and SSR markers. Journal of Agricultural Science and Technology. 11: 585-598.

17. Nei M (1972) Genetic distance between populations. The American Naturalist. 106: 283-292.

18. Nei M (1973) Analysis of genetic diversity in subdivided populations. Proceeding Natural Academic Science. 70: 3321-3323.

19. Ouborg NJ, Piquot Y and Van Groenedael JM (1999) Population genetics, molecular markers the study of dispersal in plant. Ecology. 87: 551-568.

20. Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S and Refalsk A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding. 2: 225-238.

21. Rao NK (2004) Plant genetic resources: Advancing conservation use through biotechnology. African Journal of Biotechnology. 3: 136-145.

22. Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan HS and Gupta PK (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Current Science. 90: 683-694.

23. Saghai–Maroof MA, Soliman K, Jorgensen RA and Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacerlength polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceeding of the National Academy of Sceinces. 81: 8014-8018.

24. Sajida B, Umar D, Imtiaz A, Katri A and Naqvi MH (2009) Study of genetic diversity in wheat (*Triticum aestivum* L.) using random amplified polymorphic DNA markers. Pakistan Journal of Botany. 41: 1023-1027.

25. Salem KF, El-Zanaty A and Esmail R (2008) Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using morphological characters and microsatallite markers. World Journal of Agricultural Sciences. 4: 538-544.

26. Thompson JA and Nelson RL (1998) Coe set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. Crop Science. 38: 1356-1362.

27. Thomas G, Mohapatra T, Rao AR and Sharma RP (2006) Distinguishing Indian commercial wheat varieties using RAPD based DNA fingerprints. Indian Journal of Biotechnology. 5: 200-206.

28. Zheleva D, Todorovska E, Christov N, Ivanov P, Ivanov I and Todorov I (2007) Assessing the genetic variation of bulgarian bread wheat varieties by biochemical and moleculars. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 12: 311-321.