

Analysis of genetic variation in 'Sardari' wheat derivative lines using microsatellite markers

سید مصطفی پیرسیدی^۱، داود صادق زاده اهری^۲، محسن مردی^۳، هاشم پورایراندوست^۴،
سید ابوالقاسم محمدی^۵ و بهزاد قره یاضی^۶

پروسی تنوع ژنتیکی لاین های مشتق شده از گندم

سرداری با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. مجله علوم زراعی ایران، جلد هفتم، شماره ۳، صفحه: ۲۶۸-۲۷۷.

زمستانه متمایل به بینابین و سازگاری خوب به شرایط محیطی مناطق مرتفع و سردسیر دیم بوده و در این شرایط نیز عملکرد آن پایدار است (خدابنده، ۱۳۷۱؛ سعیدی، ۱۳۷۸). نتایج سالانه آزمایش های به نژادی در ایستگاه های تحقیقات کشاورزی دیم کشور (اردبیل، مراغه، ارومیه، قاملو، شیروان و سرارود) نشان دهنده سازگاری و پایداری بالای عملکرد گندم سرداری است.

گندم سرداری طی سال های اولیه شروع تحقیقات در زمینه اصلاح گندم از توده های بومی غرب کشور انتخاب و معرفی شده است. سنبله گندم سرداری ریش دار، دارای تراکم متوسط و استوانه ای شکل بوده و در برابر ریزش مقاوم است. ارتفاع بوته آن متوسط و نسبتاً زودرس است. گندم سرداری دارای عادت رشد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۳/۸/۳

۱- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی- کرج (مکاتبه کننده)

۲- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم- مراغه

۳ و ۴- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی- کرج

۵- عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۶- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی- کرج

علیرغم معرفی ارقام جدید گندم دیم در مناطق سردسیر (آذر، ۲)، سطح وسیعی از گندم‌زارهای دیم مناطق سردسیر (قریب به ۲ میلیون هکتار) به کشت رقم سرداری اختصاص دارد (صادق زاده و همکاران، ۱۳۸۳). طی سال زراعی ۷۳-۱۳۷۲ گزارش‌هایی مبنی بر رد برخی مزارع پرورشی گندم سرداری (پرورش ۱، ۲، ۳) در مناطق مختلف کشور از جمله استان‌های زنجان و کردستان به دلیل وجود اختلاط به مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور ارسال شد. براساس این گزارش‌ها در بذرهای استحصالی از مزارع مذکور از نظر رنگ دانه و شکل دانه تنوع مشاهده می‌گردید. همچنین در برخی ایستگاه‌ها تیپ رشد کاملاً زمستانه و در بعضی دیگر بینابین گزارش گردید. کتاتا و همکاران (۲۰۰۱) با ارزیابی ۱۰۰ لاین مشتق شده از گندم سرداری برای مقاومت به زنگ‌زد (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) در دو مکان و دو سال گزارش کردند که علیرغم حساس بودن جمعیت‌های مادری گندم سرداری به زنگ زرد، تعدادی از لاین‌های مشتق شده دارای مقاومت به این بیماری بودند. صادق زاده و همکاران (۱۳۸۳) با ارزیابی صفات زراعی و مورفوفیزیولوژیکی ۱۰۶ لاین مشتق شده از گندم سرداری در دو سال گزارش کردند که تنوع بسیار زیادی در بین لاین‌های مشتق شده از نظر عملکرد، مقاومت به زنگ زرد، زودرسی نسبی، حساسیت به ورس، درصد پروتئین دانه، وزن هزاردانه، تعداد دانه در سنبله، تعداد سنبلچه در سنبله و ارتفاع وجود دارد. ایشان وجود تنوع ژنتیکی در درون گندم سرداری را مهم‌ترین عامل سازگاری و پایداری آن در مناطق سردسیر دیم کشور بیان کرده و استفاده از روش‌های مولکولی را به منظور بررسی‌های تکمیلی پیشنهاد کردند.

تا کنون بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های مشتق شده از گندم سرداری مبتنی بر ارزیابی صفات زراعی و مورفوفیزیولوژیکی در مزرعه و یا شرایط محیطی کنترل شده بوده است (صادق‌زاده و همکاران، ۱۳۸۳؛ کتاتا

و همکاران، ۲۰۰۱). در حال حاضر نشانگرهای مولکولی این امکان را فراهم می‌سازند که بررسی تنوع ژنتیکی مستقیماً در سطح DNA (ژنوتیپ) انجام گیرد. بنابراین نشانگرهای مولکولی می‌توانند به عنوان ابزاری تکمیلی برای تأیید و یا عدم تأیید فرضیه وجود تنوع ژنتیکی در میان لاین‌های مشتق شده از گندم سرداری مورد استفاده قرار گیرند. یکی از کارآمدترین نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ریزماهواره (Microsatellite markers) هستند. توزیع مناسب در ژنوم، سهولت استفاده طبیعت چنداللی و هم بارز بودن از مزایای این نشانگرها است (Bryan et al., 1997). رودر و همکاران (Roder et al., 1998) ۲۷۹ نشانگر اختصاصی ریزماهواره و استفنسون و همکاران (Stephenson et al., 1998) ۵۳ نشانگر ریزماهواره دیگر را در ژنوم گندم شناسایی و مکان‌یابی کردند. تا کنون مطالعات زیادی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی گزارش شده است (Stodart et al., 2005; Naghavi et al., 2004; Maccaferri et al., 2003; Soleimani et al., 2002; Ahmad, 2002; Kudryavtsev et al., 2004). هدف این مطالعه تأیید و یا عدم تأیید وجود تنوع ژنتیکی در میان ۳۵ لاین مشتق شده از گندم سرداری با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بود.

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق ۳۵ لاین مشتق شده از گندم سرداری انتخابی از مزارع بذر پرورشی ایستگاه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه (پرورش ۳) و مزارع کشاورزان منطقه بود. لاین‌های مشتق شده در سال زراعی ۷۵-۱۳۷۴ به صورت مجزا و روش سنبله به ردیف کشت شدند و در سال زراعی ۷۶-۱۳۷۵ در قالب طرح آماری لاتیس با دو تکرار به همراه سایر ارقام و لاین‌های پیشرفته گندم از نظر خصوصیات زراعی و مورفوفیزیولوژیکی توسط

صادق‌زاده و همکاران (۱۳۸۳) و کنتا و همکاران ۲۰۰۱ مورد بررسی قرار گرفتند و وجود تنوع ژنتیکی مورفولوژیکی در بین آن‌ها به اثبات رسید.

به منظور تجزیه مولکولی، ۳۵ لاین مشتق شده در گلخانه کشت شدند و دی.ان.ای ژنومی به روش دلاپورتا از برگ‌های سالم و جوان آن‌ها استخراج شد (Dellaporta *et al.*, 1983). تجزیه مولکولی با استفاده از ۶۰ نشانگر ریزماهواره طبق روش رودر و همکاران انجام شد (Roder *et al.*, 1995). قطعات تکثیر شده با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد واسرشته ساز تفکیک و رنگ آمیزی ژل به روش نترات نقره انجام شد (Sambrook *et al.*, 1989).

داده‌های مولکولی براساس وجود باند “یک” و عدم آن “صفر” برای هرنشانگر حاصل شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به منظور بررسی توزیع مناسب ژنومی نشانگرهای مولکولی استفاده شده انجام شد. محتوای اطلاعات چند شکلی یا PIC (Polymorphic information content) براساس جایگاه ریزماهواره با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$ (p_i فراوانی الیل i ام در یک مکان ریزماهواره) محاسبه شد. ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای براساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام شد. از تجزیه تابع تشخیص برای تعیین تعداد مطلوب کلاسترها استفاده شد. تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای NTSYSpc-2.02e، SPSS و JMP انجام شد.

نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد که ۲۱ مولفه اصلی حدود ۹۴ درصد از واریانس داده‌های مولکولی را توجیه کرده‌اند (جدول ۱). در صورتی که نشانگرهای مولکولی از روموزوم‌های مختلف انتخاب شده باشند همبستگی یا پیوستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و مولفه‌های اصلی بیشتری برای توجیه تغییرات کل واریانس داده‌ها لازم است. نتایج تجزیه به

مولفه‌های اصلی نشان داد که ۴۵ نشانگر ریزماهواره استفاده شده دارای توزیع مناسب ژنومی بوده‌اند.

از مجموع ۶۰ نشانگر ریزماهواره مورد استفاده، ۴۵ نشانگر در بین لاین مشتق شده گندم سرداری چندشکلی نشان دادند. در مجموع در ۴۵ جایگاه ریزماهواره، ۱۰۴ الیل مشاهده شد که تعداد الیل‌ها در هر جایگاه از ۲ تا ۶ متغیر بود. محتوای اطلاعات چندشکلی از ۰/۱۰۷ (نشانگر 335 GWM) تا ۰/۸۲۷ (نشانگر 156 GWM) متغیر بود (جدول ۲). در مجموع میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرهای ریزماهواره کروموزوم‌های 7A، 2B و 1D نسبت به سایر کروموزوم‌ها بیشتر بود (جدول ۳) بررسی اتالوگ ژن‌های شناخته شده گندم نشان داد که مکان کروموزومی تعدادی از

ژن‌های کنترل‌کننده عملکرد و اجزاء آن بر روی کروموزوم‌های 7A و 2B مکان‌یابی شده‌اند (Annual Wheat Newsletter, 2004). صادق‌زاده و همکاران (۱۳۸۳) با بررسی خصوصیات مورفولوژی، تنوع بسیار زیادی را از نظر عملکرد و اجزاء آن در میان لاین‌های مشتق شده این تحقیق مشاهده کردند. با توجه به نتایج اشاره شده به نظر می‌رسد احتمالاً بیشترین تفاوت‌های ساختاری ژنومی (در مکان‌های ژنی بررسی شده در این تحقیق) در میان لاین‌های مشتق شده گندم سرداری مربوط به کروموزوم‌های 7A، 2B و 1D باشد.

تجزیه‌های خوشه‌ای و تابع تشخیص، ۳۵ لاین مشتق شده از گندم سرداری را به ۵ گروه تقسیم کرد (شکل‌های ۱ و ۲). قرار گرفتن‌های لاین مشتق شده در گروه‌هایی با فاصله‌های ژنتیکی متفاوت، وجود تفاوت و تنوع ژنتیکی را در میان آن‌ها نشان می‌دهد. بحرایی (۱۳۷۹) با استفاده از نشانگرهای پروتئینی وجود ناخالصی ژنتیکی را در تعدادی از ارقام دوروم تأیید کرد. ناخالصی باقیمانده در رقم خالص شده اولیه، دگرگشتی هر چند محدود، جهش‌های ژنتیکی و اختلاط مکانیکی احتمالاً می‌تواند دلایل عمده مشاهده

لاین ۱۴ (یک accession نگهداری شده در بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) مورد بررسی قرار دادند. استفاده همزمان از نتایج تجزیه‌های مورفولوژیک و مولکولی لاین‌های مشتق شده گندم سرداری می‌تواند در انتخاب والدین مناسب برای برنامه‌های تحقیقاتی با اهداف مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

کلیه هزینه‌های این تحقیق از محل اعتبارات طرح "بررسی تنوع ژنتیکی گندم سرداری با استفاده نشانگرهای مولکولی" تامین شده است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

تنوع ژنتیکی در بین لاین‌های مشتق شده گندم سرداری باشند (صادق‌زاده و همکاران، ۱۳۸۳). کتاتا و همکاران (۲۰۰۱) پیشنهاد کردند که تنوع ژنتیکی در لاین‌های مشتق شده گندم سرداری باید حفظ شود تا امکان استفاده از این منابع ژنتیکی در برنامه‌های تحقیقاتی اصلاح گندم میسر شود. در سال‌های اخیر لاین آذر ۲ و لاین‌های امیدبخش دیم Fenkang/Sefid و Ogosta/Sefid از تلاقی‌های گندم سرداری به دست آمده‌اند و هم‌اکنون لاین‌های مشتق شده از گندم سرداری در برنامه‌های تحقیقاتی در لبنان و ترکیه (CIMMYT/ICARDA/Turkey) به نام مورفوتیپ سرداری مورد استفاده قرار گرفته‌اند مصطفوی و همکاران (۱۳۸۳) نحوه توارث عملکرد و اجزاء آن را در نسل‌های در حال تفرق حاصل از تلاقی گندم سرداری و

جدول ۱- تجزیه مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نشانگرهای SSR در ۳۵ لاین مشتق شده از گندم سرداری

Table 1. Principle components analysis using SSR markers in 35 'Sardari' wheat derivative lines

مؤلفه اصلی Principle components	درصد واریانس Variance (%)	درصد واریانس تجمعی Cumulative variance (%)
1	15.271	15.271
2	11.758	27.029
3	9.469	36.497
4	8.457	44.954
5	5.951	50.905
6	5.148	56.053
7	4.902	60.955
8	4.478	65.434
9	4.185	69.619
10	3.795	73.414
11	2.816	76.230
12	2.713	78.943
13	2.474	81.417
14	2.252	83.668
15	2.110	85.778
16	1.788	87.566
17	1.658	89.224
18	1.351	90.575
19	1.307	91.881
20	1.073	92.955
21	1.003	93.958

جدول ۲- محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نشانگرهای SSR در ۳۵ لاین مشتق شده از گندم سرداری

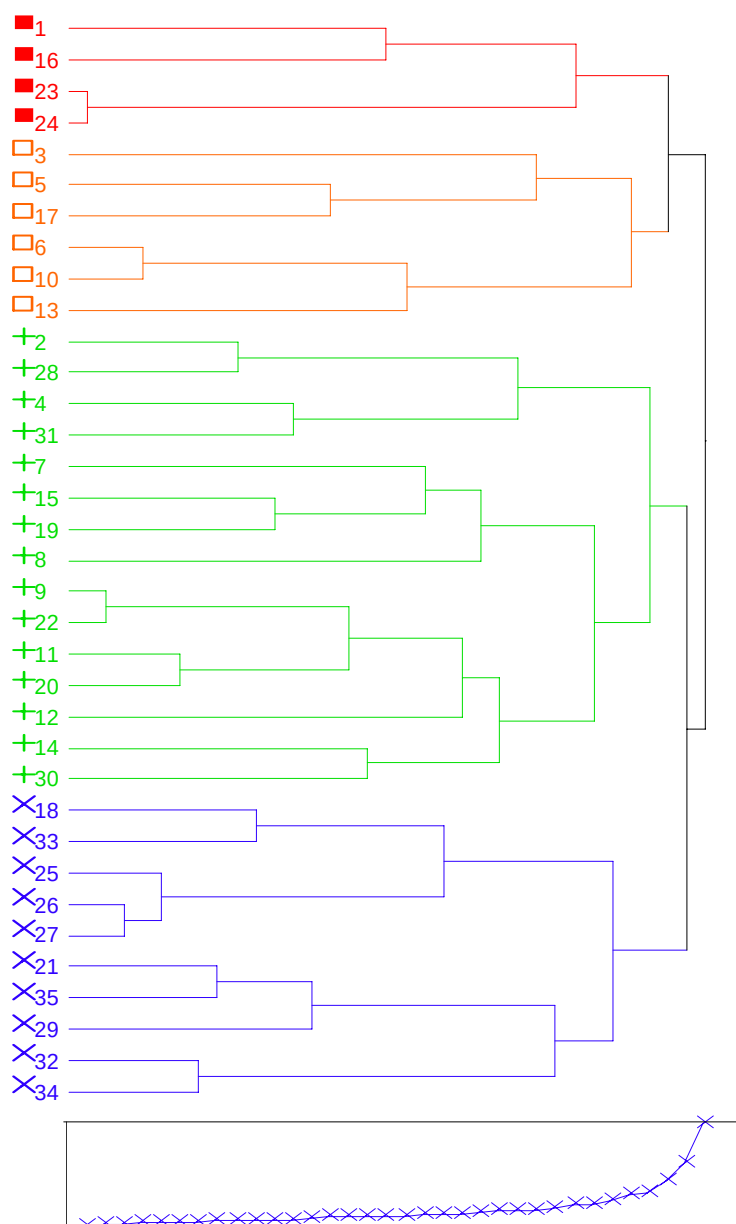
Table 2. Polymorphic information content of SSR markers in 35 'Sardari' wheat derivative lines

نشانگر Marker	روموزوم Chromosome	توالی‌های تکرار Motifs	تعداد ال‌های چند شکل No of polymorphic alleles	محتوای اطلاعات چند شکلی PIC
GWM44	7D	(GA)28	2	0.358
GWM55	6D.2B	(TC)3 (T)3 (CT)17	5	0.772
GWM111	7D	(CT)32 (GT)17	2	0.472
GWM114	3D	(GA)53	4	0.475
GWM120	2B	(CT)11 (CA)18	2	0.499
GWM132	6B	(GA)24 (GAA)6	2	0.395
GWM133	6B	(CT)39	2	0.290
GWM148	2B	(CA)22	2	0.382
GWM149	4B	(GA)23	3	0.608
GWM153	1B	(GA)18	2	0.320
GWM155	3A	(CT)19	2	0.156
GWM156	5A	(GT)14	3	0.827
GWM160	4A	(GA)21	2	0.408
GWM164	1A	(CT)16	2	0.284
GWM190	5D	(CT)22	2	0.358
GWM194	4D	(CT)32	2	0.495
GWM247	3B	(GA)24	2	0.395
GWM249	2D	(GA)11 (GGA)8	2	0.352
GWM259	1B	(GA)17	2	0.265
GWM314	3D	(CT)25	2	0.224
GWM334	6A	(GA)19	3	0.644
GWM335	5B	(GA)14 (GCGT)3	2	0.107
GWM337	1D	(CT)5 (CACT)6 (CA)4	3	0.592
GWM340	3B	(GA)26	3	0.522
GWM357	1A	(GA)18	2	0.466
GWM359	2A	(CT)20 (CTT)13	2	0.472
GWM369	3A	(CT)11(T)2 (CT)21	2	0.244
GWM372	2A	(GA)51	2	0.480
GWM389	3B	(CT)14 (GT)16	2	0.432
GWM397	4A	(CT)21	2	0.498
GWM437	7D	(CT)24	2	0.320
GWM448	2A	(GA)29	2	0.489
GWM459	6A	(GA)28	2	0.197
GWM469	6D	(CT)19 (CA)10	2	0.472
GWM471	7A	(CA)34	3	0.663
GWM493	3B	(CA)43	5	0.766
GWM497	1A,2A,3D	(GT)29	2	0.491
GWM540	5B	(CT)3 (CC)(CT)16	4	0.743
GWM565	5D	(CA)10	2	0.244
GWM575	7B	(CA)14 (TA)6	2	0.426
GWM611	7B	(GA)32	2	0.502
GWM613	6B	(CT)23	2	0.475
GWM626	6B	(CT)5 (GT)13	2	0.485
GWM635	7A	(CA)10 (GA)14	2	0.611
GWM642	1D	(GT)14	2	0.415

جدول ۳- میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نشانگرهای SSR در هر کروموزوم

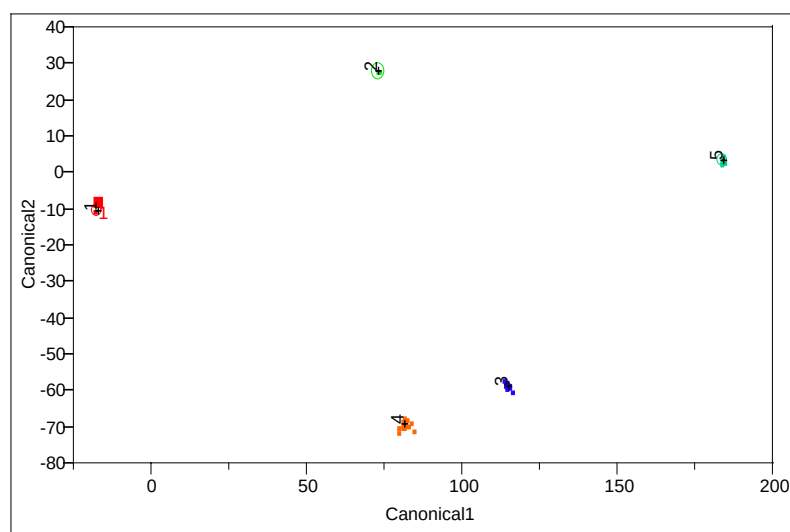
Table 3. Means of polymorphic information contents (PIC) for SSR markers located on each chromosome

کروموزوم Chromosome	محتوای اطلاعات چند شکلی PIC
1A	0.432
2A	0.483
3A	0.200
4A	0.450
5A	0.276
6A	0.421
7A	0.637
میانگین ژنوم A	0.411
1B	0.293
2B	0.551
3B	0.529
4B	0.304
5B	0.425
6B	0.411
7B	0.464
میانگین ژنوم B	0.425
1D	0.504
2D	0.176
3D	0.397
4D	0.248
5D	0.292
6D	0.415
7D	0.336
میانگین ژنوم D	0.338



شکل ۱- گروه‌بندی ۳۵ لاین مشتق شده از گندم سرداری با استفاده از نشانگرهای SSR

Fig. 1. Grouping of 35 'Sardari' wheat derivative lines using SSR markers



شکل ۲- تجزیه تابع تشخیص برای تعیین تعداد مطلوب گروه‌ها در تجزیه خوشه‌ای ۳۵ لاین مشتق شده از گندم سرداری با استفاده از نشانگرهای SSR

Fig. 2. Discriminant analysis for determining optimal number of groups in cluster analysis of 35 'Sardari' wheat derivative lines using SSR markers

References

- . بررسی گندم‌های دوروم از نظر خواص کیفی آرد و خلوص ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای پروتئین‌های ذخیره بذر. مجله نهال و بذر جلد ۱۶ شماره ۲ صفحه ۱۹۲.
- . عمل ژن برای بعضی از صفات کمی در تلاقی گندم سرداری با لاین شماره ۱۴. مجله علوم زراعی ایران جلد ۶ شماره ۲ صفحه ۱۵۹.
- . ارزیابی تنوع ژنتیکی صفات و خصوصیات زراعی در گندم سرداری. مجله علوم کشاورزی جلد ۲ صفحه ۲۷.
- . غلات، انتشارات دانشگاه تهران ۵۳۷ صفحه.
- . استراتژی و کاربرد روش‌های به نژادی گندم در بخش تحقیقات غلات، گذشته، حال و آینده. مقالات کلیدی پنجمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، نشر آموزش کشاورزی صفحه ۸۳.

Ahmad, M. 2002. Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats. *Genome* 45: 646-651.

Kudryavtsev, A. M., S. P. Martynov, M. Broggio and M. Buiatti. 2004. Evaluation of polymorphism at Microsatellite loci of spring Durum wheat (*Triticum durum* Desf) Varieties and the use of SSR- Based Analysis in phylogenetic studies. *Russian Journal of Genetics* 40 (10): 1102-1110.

Ketata, H., Sadeghzadeh, D., Jarrah, M., Roustai, M., Yahyaoui, A. H., and H. Hassanpour-Hosni. 2001. Landrace variability for reaction to yellow rust. First Regional Yellow Rust Conference for Central and West Asia and North Africa. 8-14 May, SPII, Karaj, Iran.

Anonymous, 1998. Exploiting genetic variability in wheat landraces in Iran. Annual Report, ICAROA P 36-38.

- Anonymous, 2004.** VI. Catalogue of genes symbols for wheat. Annual wheat News letter.
- Bryan, G. J., A. J. Collins, P. Stephenson, A. Orry and J. B. Smith. 1997.** Isolation and characterization of microsatellite from hexaploid bread Wheat. Theor. Appl. Genet. 94: 557-563.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983.** A plant DNA miniprep: Version II. Plant. Mol. Bio. Rep. 1: 19-2.
- Maccaferri, M., M. C. Sanguinetti, P. Donini and R. Tuberosa. 2003.** Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. Theor. Appl. Genet. 104: 518-525.
- Roder, M. S., J. Plaschke, S. U. König, A. Börner and M. E. Sorrelles. 1995.** Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol. Gen. Genet. 246: 327-333.
- Roder, M. S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plöck, M. H. Tixier, P. Lerou and M. W. Ganal. 1998.** A microsatellite map of wheat. Genetics 144: 2007-2023.
- Sambrook, J., B. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Soleimani, M., B. R. Baum and D. A. Jounson. 2002.** AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat. Theor. Appl. Genet. 104: 350-357.
- Stephenson, P., G. Brayan, J. Kirby, A. Collins, K. M. Doves, C. Busso and M. D. Gale. 1998.** Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map. Theor. Appl. Genet. 97: 946-949.
- Stodart, B. J., M. Mackay and H. Raman. 2005.** AFLP and SSR analysis of genetic diversity among landraces of bread wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) from different geographic region. Aust. J. Agri. Res. 56: 691-697.

Analysis of genetic Variation in ‘Sardari’ derivative wheat lines using microsatellite markers

Pirseyedi¹, S. M., M. Mardi², D. Sadeghzadeh-Ahari³, H. Poor Iran Doost⁴,
S. A. Mohammadi⁵, B. Ghareyazie⁶

ABSTRACT

In this investigation, genetic diversity of 35 ‘Sardari’ derivative wheat lines was studied using 60 microsatellite markers. Molecular analyses results showed the numbers of observed alleles and polymorphic information contents of each locus varied from 2 to 6 and 0.11 to 0.83, respectively. Cluster and discriminant analyses results separated the lines into 5 groups with different genetic distances. The results of this study confirmed remarkable genetic diversity among Sardari derivative wheat lines. The utilization of morphological and molecular analyses can be used for appropriate parental selection in breeding and seed increasing programs.

Key words: Sardari wheat, genetic diversity, microsatellite markers.

Received: September, 2004

1- Faculty member, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj-Iran. (Corresponding author)

2- Faculty member, Dryland Agricultural Research Institute, Maraghe, Iran.

3, 4- Faculty members, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran.

5- Assist Prof, Tabriz University, Iran.

6- Faculty member, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran.