مجله علمی-پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات
جلد ۱۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹٦، صفحات ۲۵-۱۵

ISSN NO: 2008-8485

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی در گندم دوروم با استفاده از مارکرهای مولکولی SSR

Evaluation genetic diversity to resistant genotypes of drought stress in durum wheat with using SSR molecular markers

سید سعید نوری نیا*[1] و شهاب سادات[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۰۲/۲٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۰۵/۱۰

چکیده

به‌منظور بررسی گزینش به کمک مارکرها و همچنین شاخص تحمل به تنش خشکی (STI)، ۲۰ رقم گندم دوروم با استفاده از طرح اسپلیت پلات به‌صورت کاملاً تصادفی کشت و اجزاء عملکرد محاسبه شد. در سطح مولکولی از ۲۰ جفت آغازگر (SSR) جهت بررسی تنوع ژنتیکی بین ارقام و تعیین ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی استفاده گردید. پس از استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت آن، PCR به روش Touch down صورت گرفت. در مجموع ۵۸ آلل از ۲۰ لوکوس شناسایی گردید. بیش‌ترین آلل متعلق به Xgwm601 و Xbarc108 با چهار آلل و کم‌ترین آن با دو آلل متعلق به مارکرهای Xgwm413، Xgdm132، Xwmc48، Xbarc40، Xbarc121 و Xgwm375 بود. میانگین آلل تولید شده برای هر لوکوس در این تحقیق ۲/۹ آلل است. امتیازبندی و طول قطعات تولید شده با استفاده از نرم‌افزار UVDOC مشخص گردید. ماتریس تشابه، تجزیه کلاستر به روش UPGMA و نیز رسم دندروگرام همگی با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام گرفت. معیار آماری ضریب همبستگی کوفنتیک نیز محاسبه و عدد ۸٦٪ به دست آمد. دندروگرام، نشان‌دهنده دو کلاستر در یک کلاستر ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۲، ۱۵، ۱٦، ۲۰، ۱۳، ۳، ٤، ۱۹، ۸، ۱۲، ۷، ۹، ۵ و ۱٤ و در کلاستر دیگر ژنوتیپ‌های ٦، ۱۸، ۱۰، ۱۷ و ۱۱ قرار دارند. ژنوتیپ‌های ۵ و ۱٤ از شاخص تحمل به تنش بالاتری نسبت به سایر ارقام برخوردارند. نتایج نشان داد خصوصیت چند آللی یک پدیده کاملاً متداول و معمول در مارکرهای SSR می‌باشد که بیانگر پیوستگی صفات یا تأثیر ژن‌های چند اثره می‌تواند باشد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، گندم دوروم، تنش خشکی، مارکرهای SSR، گزینش به کمک مارکرها.

۱- کارشناس محقق مرکز تحقیقات و منابع طبیعی استان خوزستان

۲-استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز

*- مکاتبه کننده E- mail: saeed.noorini@gmail.com

مجله علمی - پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

www.iaph.kiau.ac.ir

مقدمه

عمده صفات مهم اقتصادی برای گیاهان نظیر عملکرد و یا تحمل به تنش‌های غیر زیستی پلی‌ژنیک بوده لذا ارزیابی این صفات در مزرعه به‌شدت تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد (Al– Khatib and paaulsen, 2002). شناسایی ارقامی که متحمل به تنش‌های خشکی، شوری، گرما و یا سرما هستند، منوط به پیاده نمودن طرح‌های آماری به‌صورت تجزیه مرکب برای چند سال و یا چند مکان است تا بتوان اثر عوامل محیطی را به فرض خنثی نمودن یکدیگر در این مدت صفر و یا ناچیز تلقی کرد. متأسفانه این آزمایش‌ها بسیار زمان‌بر بوده و زحمت و دقت فراوانی را در مزرعه می‌طلبد، از طرفی انتخاب فنوتیپی برای صفات ذکر شده (تنظیم اسمزی، پایداری غشاء، تعرق کوتیکولی کاهش یافته، هدایت روزنه‌ای بهبود یافته، موبیلیتی ذخیره‌ای ساقه) بسیار مشکل است. لذا تسریع پیشرفت ژنتیکی برای افزایش تحمل به تنش خشکی با استفاده از انتخاب برای این صفات ثانویه در برنامه‌های اصلاحی با محدودیت همراه بوده است. اما این محدودیت‌ها می‌تواند با استفاده از تکنولوژی مارکرهای مولکولی برداشته، و منجر به انتخاب غیرمستقیم برای صفات ثانویه با استفاده از استراتژی گزینش به کمک مارکرها گردد (Ahmad, 2004). علاوه بر آن، مارکرهای مولکولی را می‌توان برای یک صفت خاص در مراحل ابتدایی رشد مورد استفاده قرار داد. بنابراین به‌راحتی می‌توان با اطمینان بسیار بالایی اقدام به غربالگری ارقام متحمل از حساس برای یک تنش غیر زیستی خاص در مدت زمانی بسیار کوتاه‌تر و با دقت بسیار بالاتر (به علت عدم تأثیرپذیری از محیط) نمود (Blumenthal and Wrigley, 2001). در یک مطالعه، ۸۹ لاین گندم زمستانه از رومانی و ۱۳ رقم و لاین گندم زمستانه از کشور بلغارستان با دو مارکر SSR مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنالیزهای انجام گرفته، ۳۱ لاین گندم هموزیگوس و دو لاین گندم هتروزیگوس را با پروفایل الکتروفورزی که مشابه با پروفایل ارقام متحمل به خشکی بود نشان داد. تکثیر DNA با مارکر barc108 ۲۸ هموزیگوس و ۲ هتروزیگوس را نشان داد (Liu p and Zhu, 2004).

مطالعات خشکی یکی از برنامه‌ای اصلی در بیولوژی گیاهی و بیولوژی مولکولی است (Bustos and Rubio, 2003). پیشرفت‌های بسیار زیادی در ارتباط با مکانیزم‌های افزایش تحمل به تنش خشکی و اصلاح مولکولی گندم صورت گرفته است و با استفاده از روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات، متخصصین به‌نژادی گیاهی بهبود ژنتیکی قابل توجهی را در سازگاری به خشکی با انتخاب ژنوتیپ‌هایی با پایداری عملکرد در شرایط تنش خشکی به دست آورده‌اند (Garavandi and farshadfar, 2010). از میان صفات ثانویه که در افزایش تحمل به تنش خشکی در گیاه گندم نقش دارند، می‌توان به تنظیم اسمزی، پایداری غشاء سلولی، تعرق کوتیکولی کاهش‌یافته، هدایت روزنه‌ای بهبودیافته، انتقال مجدد ذخیره‌ای ساقه و غیره اشاره کرد (Dellaporta and Wood, 2004). گزارش‌های متعددی مبنی بر حضور آلل‌های اختصاصی در بعضی از مکان‌های ژنی وجود دارد که با ژنوتیپ‌های مختلفی از گندم که به تنش‌های خشکی سازگاری بیشتری دارند (Chen and Payne, 2010). در یک پژوهش، تنوع آللی برای پیوستگی با تنوع فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفت، ارتباط آللی معنی‌داری با تاریخ گل‌دهی و ارتفاع ساقه، با یک مکان ژنی SSR یافت شد، که با ژن‌های فتوپریود و ورنالیزاسیون و نیز ژن‌های پاکوتاهی مرتبط بود (Chen and Payne, 2010). همچنین ارتباط آللی معنی‌داری برای تاریخ گلدهی بر روی کروموزوم شماره ۶ یافت شد. این منطقه (کروموزوم شماره ۶ و آلل‌های کنترل‌کننده صفات مربوط به گلدهی که نواحی مربوط به ژن‌های مقاومت فتوپریود و ورنالیزاسیون هستند که پیش‌تر اشاره گردید) به نظر می‌رسد که در تنظیم زمان گل‌دهی مؤثر است (Ellis and Spielmeyer, 2011). محققین در جنوب یوگسلاوی، لوکوس یک صفت کمی بزرگ‌اثر را از نظر مقاومت به Scab روی بازوی کوتاه کروموزوم 3B در گندم نان اعتبارسنجی نموده و لاین‌های همسان ایزوژنیک را برای این QTL با استفاده از انتخاب به کمک نشانگرها جداسازی کردند (Gibson and Paulsen, 2000). در نهایت گزارش نمودند که انتخاب به کمک مارکرهای SSR برای این QTL زمانی که با انتخاب فنوتیپی همراه

www.jabb.kiau.ac.ir

گردیده است بسیار مؤثرتر از زمانی است که انتخاب تنها بر اساس فنوتیپ در نسل‌های اولیه صورت گرفته است و در نهایت نتیجه گرفتند که انتخاب به کمک مارکر برای QTLهای اصلی در مرحله گیاهچه‌ای به همراه انتخاب فنوتیپی بعد از گل‌دهی به‌طور مؤثری توانسته است لاین‌های مقاوم به Scab را شناسایی کند (Garcia and Paulsen, 2012). احمد (2004)، با انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی، توانست آلل‌های گلوتنین با وزن مولکولی زیاد که در ارتباط با کیفیت نان بودند، توسط نشانگرهای DNA تولید شده از PCR به وجود آورد. نتایج این مطالعه نشان داد که انتخاب به کمک نشانگر می‌تواند به افزایش دوام و مقاومت خمیر نان کمک نماید (Ahmad, 2004).

هدف در این تحقیق معرفی مارکرهایی که بتوانند به‌طور مؤثری اقدام به غربالگری ژنوتیپ‌های مختلف گندم دوروم به تنش خشکی نمایند همچنین معرفی Marker Assisted Selection به‌عنوان روشی مطمئن در غربال‌گری تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گندم دوروم به تنش خشکی در کنار آزمایش‌های مزرعه‌ای به‌عنوان یک روشی هدفمند جهت پیشبرد آزمایش‌های مختلف بود.

مواد و روش‌ها

ابتدا بیست رقم مختلف گندم دوروم از مرکز تحقیقات و منابع طبیعی صفی‌آباد دزفول تهیه گردید و در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز کشت گردیدند، طرح مورد استفاده اسپلیت پلات در قالب کاملاً تصادفی و تیمارهای مورد بررسی، ۲۰ رقم گندم دورم بودند. این ۲۰ رقم در گلدان‌های کوچک پلاستیکی به‌طور مجزا کشت شدند. تا رسیدن گیاه به مرحله دوبرگی نمونه‌ها برداشته شد، و تا شروع کار به فریزر ۸۰- منتقل گردیدند. سپس ۱۵۰ میلی‌گرم برگ (گیاهان ۱۸-۱۲ روزه) را در هاون چینی ریخته و به مقدار لازم به آن نیتروژن مایع اضافه گردید، سپس برگ را کوبیده و خرد نموده تا به‌صورت پودر شده در آمد. برگ پودر شده را در یک میکروتیوب دو میلی‌لیتری ریخته، سپس ۵۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج به هر نمونه پودر شده اضافه گردید. پودر برگ را با بافر استخراج مخلوط (ورتکس) کرده تا به‌صورت یک محلول سبزرنگ همگن درآمد، آن‌گاه به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در این مدت نمونه‌ها هر ۵ دقیقه یک‌بار بیرون آورده شده و چند بار سروته گردیدند. قبل از انجام مرحله فوق باید بافر استخراج را در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه قرار داد تا (SDS) موجود در آن خوب حل شود. زیرا (SDS) در دمای پایین رسوب می‌کند و نمی‌تواند کارایی لازم را داشته باشد. بعد از خنک شدن نمونه‌ها، ۲۰۰ میکرو لیتر استات پتاسیم ۵ مولار به هر تیوپ اضافه کرده و بعد از چندین بار سروته کردن (۲-۱ دقیقه)، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. استات پتاسیم در دمای چهار درجه سانتی‌گراد بهتر عمل می‌کند و باعث از بین رفتن اثر (SDS) و جدا شدن آن از DNA می‌شود، زیرا باقیمانده (SDS) در محیط باعث شکستن DNA و ممانعت از عمل PCR می‌شود. به هر نمونه ۵۰۰ میکرو لیتر محلول فنل: کلروفورم: ایزوآمیل الکل به ترتیب با نسبت‌های ۱:۲۴:۲۵ اضافه و تیوپ‌ها سروته شدند تا یک محلول یکنواخت تشکیل شود، سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰rpm در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند، فاز رویی (Supernatant) به یک تیوپ جدید ۱/۵ میلی‌لیتری با استفاده تیپ دهانه گشاد (Cut tip) منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد یا دو حجم اتانول مطلق همراه با ۰/۱ حجم استات سدیم ۳ مولار (pH=۵/۲) اضافه گردید، سپس نمونه‌ها به آرامی سروته شدند. کلاف سفیدرنگ DNA در این مرحله قابل مشاهده است. در این مرحله سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. به آرامی فاز رویی را دور ریخته و رسوب DNA با ۳۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ درصد سه مرتبه شستشو داده شد، سپس نمونه‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و زیر هود قرار داده شد، تا رسوب DNA خشک گردد. خشک‌کردن در شرایط خلأ و به مدت طولانی باعث خرد شدن DNA ژنومی می‌شود به هر میکروتیوپ ۳۰۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل افزوده شد و جهت حل شدن کامل رسوب به مدت یک‌شب در دمای اتاق نگهداری شدند. به هر نمونه ۲ میکرو لیتر آنزیم (mg/ml ۱۰) RNase A اضافه و با پیپت کردن بهم زده شد، سپس در دمای

www.japb.kiau.ac.ir

۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت قرار داده شد و در نهایت نمونه‌ها به یخچال چهار درجه سانتی‌گراد تا انجام واکنش PCR منتقل و نگهداری شدند پس از انجام استخراج DNA، کیفیت و کمیت DNA استخراجی تعیین شد. یک نمونه DNA با خلوص بالا دارای نسبتی معادل ۲-۱/۸ می‌باشد. نسبت عددی حاصل برای نمونه‌های DNA استخراجی در این تحقیق بین ۱/۸ تا ۱/۹۷ متغیر بود که نشان می‌دهد کیفیت آن‌ها برای انجام آزمایش‌های PCR مطلوب بوده است (Dellaporta and Wood, 2004).برای تعین غلظت DNA از فرمول زیر استفاده می‌شود:

غلظت DNA برحسب نانوگرم در میکرو لیتر = $A_{260} \times DF \times 50$

Df ضریب رقت است و با توجه به میزان دفعاتی که محلول پایه رقیق شده است تعیین می‌گردد. عدد ۵۰ نیز به این دلیل در این فرمول نوشته شده که OD=1 برابر با تقریباً ۵۰ نانوگرم بر میکرو لیتر DNA دو رشته‌ای است. جهت تعیین کیفیت DNA و این‌که مشخص گردد DNA سالم بوده و شکستگی ندارد، از روش الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد با بافر TAE (1X) استفاده گردید. جهت رنگ‌آمیزی از اتیدیوم بروماید با غلظت ($۱۰mg.ml^{-1}$) ۲/۵ میکرولیتر برداشته و پس از رسیدن دمای ژل آگارز به ۴۰ تا ۵۰ درجه، به آن اضافه گردید. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده با ۱/۵ میکرولیتر بافر بارگذاری و مخلوط در کنار مارکر 1Kb در چاهک‌های ژل آگارز لود شد. لکتروفورز با ولتاژ ۵ ولت بر سانتی‌متر انجام شد. زمانی که رنگ برموفنول بلو، ۶۰ تا ۷۰ درصد ژل را طی کرده بود، دستگاه خاموش و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن عکس ژل‌ها تهیه گردید. پس از تعیین کمیت و کیفیت نمونه‌ها از آن‌ها محلول‌های کاری با غلظت $ng.\mu l^{-1}$ ۱۰ تهیه و در چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و نمونه‌های DNA اصلی به (۲۰°C-) منتقل شدند. در این تحقیق از ۲۰ جفت آغازگر اختصاصی گندم که بر پایه مطالعات قبلی معرفی گردیده بودند استفاده گردید. اساس انتخاب آغازگرها بیشتر بر مبنای پیوستگی با مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی است که مرتبط با افزایش تحمل به تنش خشکی بودند (Golabadi and Arzani, 2011).

جدول ۱- توالی آغازگرهای SSR برای ارزیابی ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم از نظر تحمل به تنش خشکی

Table 1. SSR primer sequence for assessment of 20 durum wheat genotypes to stress for drought stress tolerance.

Markers	Reverse	Forward
Xwmc420	5' TTACTTTTGCTGAGAAAACCCT 3'	5' ATCGTCAACAAAATCTGAAGTG 3'
Xwmc89	5' TTGCCTCCCAAGACGAAATAAC 3'	5' ATGTCCACGTGCTAGGGAGGTA 3'
Xgwm601	5' TTAAGTTGCTGCCAATGTTCC 3'	5' ATCGAGGACGACATGAAGGT 3'
Xwmc48	5' ACGTGCTAGGGAGGTATCTTGC 3'	5' GAGGGTTCTGAAATGTTTTGCC 3'
Xwmc603	5' CGCCTCTCTCGTAAGCCTCAAC 3'	5' ACAAACGGTGACAATGCAAGGA 3'
Xbarc108	5' GCGAAATGATTGGCGTTACACCTGTTG 3'	5' GCGGGTCGTTTCCTGGAAATTCATCTAA 3'
Xgwm413	5' GATCGTCTCGTCCTTGGCA 3'	5' TGCTTGTCTAGATTGCTTGGG 3'
Xgwm617	5' CTCCGATGGATTACTCGCAC 3'	5' GATCTTGGCGCTGAGAGAGA 3
Xbarc40	5' GCGGCATTGACAAGACCATAGC 3'	5' GCCGCCTACCACAGAGTTGCAGCT 3'
Xgdm132	5' ACCGCTCGGAGAAAATCC 3'	5' AGGGGGGCAGAGGTAGG3'
Xbarc121	5' CCGGTGTCTTTCCTAACGCTATG 3'	5' ACTGATCAGCAATGTCAACTGAA 3'
Xbarc133	5' AGCGCTCGAAAAGTCAG 3'	5' GGCAGGTCCAACTCCAG 3'
Xgwm493	5' GGAACATCATTTCTGGACTTTG 3'	5' TTCCCATAACTAAAACCGCG 3'
Xwmc361	5' ATTCTCGCACTGAAAACAGGGG 3'	5' AATGAAGATGCAAATCGACGGC 3'
Xgwm375	5' GGGATGTCTGTTCCATCTTAGC 3'	5' ATTGGCGACTCTAGCATATACG 3'
Xbarc20	5' GCGATGTCGGTTTTCAGCCTTTT 3'	5' GCGATCCACACTTTGCCTCTTTTACA 3'
Xcfd23	5' GCAAGGAAGAGTGTTCAGCC 3'	5' TAGCAGTAGCAGCAGCAGGA 3'
Lr34	5' CTCCTCTTTATATCGCGTCCC 3'	5' AGCTCTGCTTCACGAGGAAG 3'
Xgwm212	5' TGCAGTTAACTTGTTGAAAGGA 3'	5' AAGCAACATTTGCTGCAATG 3'
X gwm293	5' TCGCCATCACTCGTTCAAG 3'	5' TACTGGTTCACATTGGTGCG 3'

www.jcb.kiau.ac.ir

جدول ۲- اجزاء واکنش و حجم مورد استفاده در واکنش PCR

Table 2. Reaction component and amount of them

اجزا واکنش	حجم مورد استفاده
آغازگر رفت (10µM)	1.25 µl
آغازگر برگشت (10µM)	1.25 µl
بافر PCR (10X)	2 µl
کلرید منیزیم (50mM)	0.75 µl
مخلوط نوکلئوتیدی (10mM)	0.5 µl
تک‌پلی‌مراز (5U/µl)	0.25 µl
DNA ژنومی (10ng)	**3** µl
آب مقطر استریل	11 µl

برای اطمینان یافتن از حذف باندهای غیراختصاصی، از برنامه دمایی Touch Down استفاده گردید که شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل حرارتی بود.

در میان موادی که به‌عنوان زمینه برای الکتروفورز به‌کار می‌روند، پلی‌اکریلامید بیش‌ترین کارایی را برای بررسی نمونه‌های DNA و پروتئین دارد، زیرا وضوح و شفافیت باندها، تشخیص و قابل تفکیک شدن آن‌ها در این محیط بسیار بالا است و به‌راحتی سنجش‌های کمی روی آن انجام می‌شود (Kamali and Duveiller, 2008).

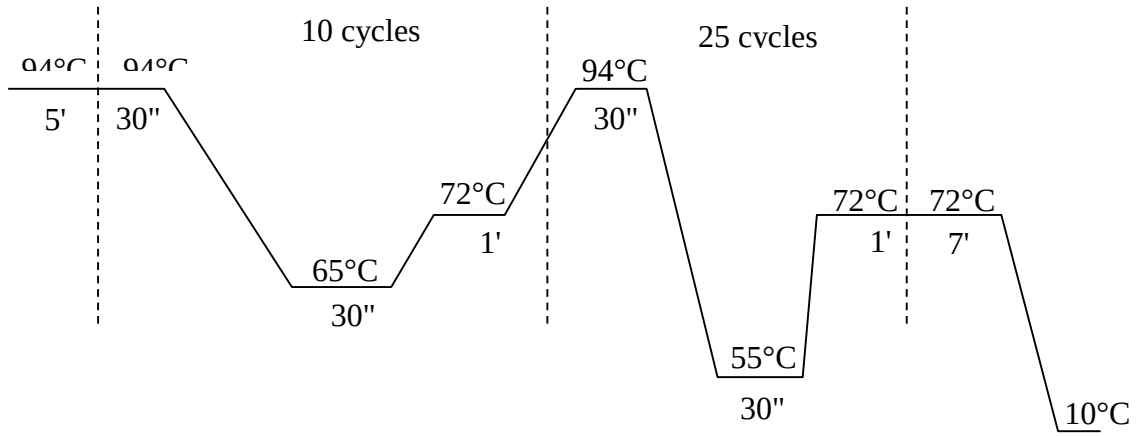
نتایج و بحث

امتیازبندی و طول قطعات تولید شده با استفاده از نرم‌افزار UVDOC مشخص گردید. باندها به‌صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازبندی شدند. این امتیازبندی نشان‌دهنده اطلاعات به‌صورت کیفی است. ماتریس تشابه، تجزیه کلاستر به روش UPGMA و نیز رسم دندروگرام همگی با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام گرفت. همچنین معیار آماری ضریب همبستگی کوفنتیک نیز محاسبه شد که از طریق آن میزان شباهت بین ماتریس حاصل از دندروگرام (ماتریس کوفنتیک) با ماتریس تشابه سنجیده می‌شود. مدل MXCOMP برای محاسبه همبستگی کوفنتیک استفاده و ماتریس تشابه توسط UPGMA با استفاده از مدل کلاستری SAHN آنالیز و نهایتاً دندروگرام ترسیم شد.

در این مطالعه، در مجموع ۵۸ آلل از ۲۰ لوکوس مورد بررسی در این تحقیق شناسایی گردید. بیش‌ترین آلل شناسایی شده متعلق به Xgwm601 و Xbarc108 با ۴ آلل و کم‌ترین آن با دو آلل متعلق به مارکرهای Xgwm413، Xgdm132، Xwmc48، rc40، Xbarc121 و Xgwm375 بودند.

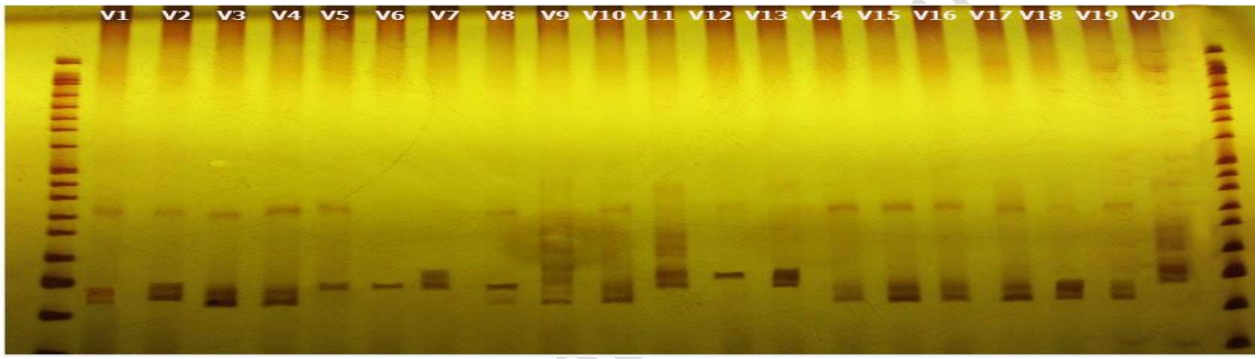
این مسئله باید اشاره گردد که خصوصیت چند آللی یک پدیده کاملاً متداول و معمول در مارکرهای SSR می‌باشد، و این مارکرها قادرند برای یک لوکوس تنوع آللی از خود نشان دهند. میانگین آلل تولید شده برای هر لوکوس در این تحقیق ۲/۹ آلل بوده است. گزارش‌های متعددی در ارتباط با دستیابی به تعداد آلل‌های متفاوت در استفاده از مارکرهای SSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام مختلف گندم نان وجود دارد. جانستون و فولر (2001) میانگین ۱۰ آلل را برای هر لوکوس در بعضی از اکسشن‌های وحشی گندم گزارش نمودند (Johnston and Fowler, 2001). این در حالی است که جفریس و همکاران میانگین ۵/۲ آلل (Jefferies SP *et al.*, 2002)، و لاگودا و همکاران میانگین ۳/۲ آلل را برای هر لوکوس گزارش داده‌اند (lagudah *et al.*, 2006). در مجموع تنوع آللی زیادی برای مارکرهای مورد استفاده در این تحقیق مشاهده نگردید. یکی از دلایل این مسئله احتمالاً آن است که در ژنوتیپ‌های انتخاب‌شده، تنوع آللی زیادی برای ژن‌های افزایش تحمل به تنش خشکی وجود ندارد. ازآنجایی‌که نتایج مزرعه نشانگر آن است که اکثریت ژنوتیپ‌های استفاده شده در این تحقیق به تنش خشکی انتهای فصل حساسیت دارند، لذا تنوع آللی اندک، دور از انتظار نخواهد بود. همچنین به این نکته باید اشاره گردد که گندم دوروم با برخورداری از ۴ دسته ۷ کروموزومی به‌طور یقین تعداد آلل کم‌تری نسبت به گندم‌های هگزا پلویید که از ۶ دسته ۷ کروموزومی تشکیل شده‌اند نشان می‌دهد که با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی کامل دارد. شکل زیر نتایج حاصل از بارگیری DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز هشت‌دهم درصد را نشان می‌دهد.

www.jabb.kiau.ac.ir



شکل ۱- پروفیل حرارتی چرخه‌های PCR در روش Touch Down برای یک جفت پرایمر با دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد

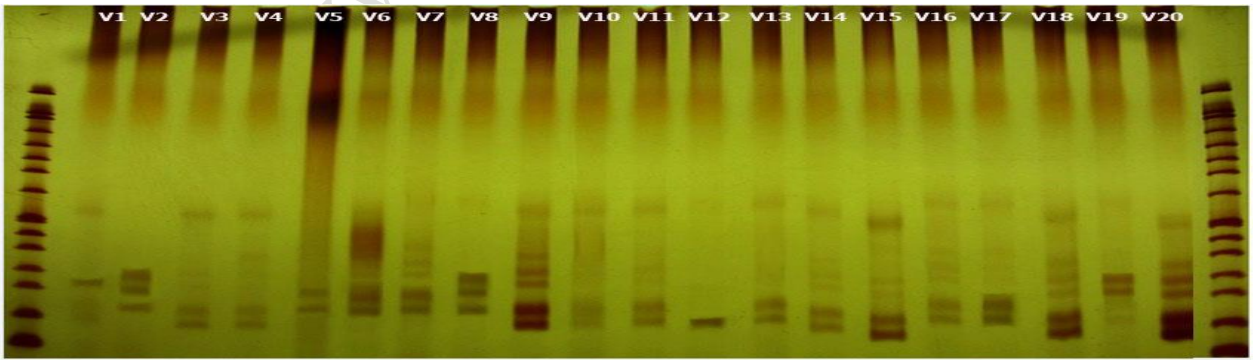
Fig 1. Heat profile of PCR rotations in Touch Down method for one pair primers with annealing temperature 55° C



شکل ۲- نتایج حاصل از ژل پلی‌آکریلامید برای ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم برای مارکر Xbarc108 در دو سوی ژل، لدر ۵۰bp قرار گرفته است.

Fig 2. Result of polyacrylamide gel for 20 genotypes durum wheat for Xbarc108 marker, in two side of gel, to be comforted ladder 50 bp

در هر رقم و با استفاده از هر مارکر به‌طور تصادفی و مجزا تعدادی باند شارپ ظاهر گردید و محدوده این باندها از ۵۰ تا ۲۴۰ معین شد که با شمارش تعداد باند شارپ در محدوده معینی از ژل و شمارش آن‌ها آنالیزهای آماری، مولکولی انجام گرفت.



شکل ۳- نتایج حاصل از ژل پلی‌آکریلامید برای ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم برای مارکر Xgwm601 در دو سوی ژل، لدر ۵۰bp قرار گرفته است.

Fig 3. Result of polyacrylamide gel for 20 genotypes durum wheat for Xgwm601 marker, in two side of gel, to be comforted ladder 50 bp

در هر رقم و با استفاده از هر مارکر به‌طور تصادفی و مجزا تعدادی باند شارپ ظاهر گردید و محدوده این باندها از ۵۰ تا ۲۴۰ معین شد که با شمارش تعداد باند شارپ در محدوده معینی از ژل و شمارش آن‌ها آنالیزهای آماری، مولکولی انجام گرفت.

جدول ۳- مارکرهای مورد استفاده، تعداد آلل‌های تولید شده در هر لوکوس و اندازه قطعات تکثیر شده برای ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم

Table 3. Markers used, number of allele production in each locus and measure segments of increasing for 20 genotypes of durum wheat

نام مارکر	تعداد آلل	اندازه قطعات(bp)
Xwmc420	3	200-430
Xwmc89	3	80-180
Xgwm601	4	160-240
Xwmc48	2	125-175
Xwmc603	3	140-260
Xbarc108	4	120-350
Xgwm413	2	160-250
Xgwm617	3	50-300
Xbarc40	2	60-110
Xgdm132	2	40-80
Xbarc121	2	100-450
Xbarc133	3	125-450
Xgwm493	4	100-300
Xwmc361	3	220-475
Xgwm375	2	125-175
Xbarc20	3	150-250
Xcfd23	3	150-300
Lr34	3	80-250
Xgwm212	4	75-320
X gwm293	3	350-500

نتایج حاصل از تجزیه کلاستر به روش UPGMA در جدول ۴ ارائه شده است. در این جدول ضرایب شباهت ژنتیکی افراد و کلاسترها نسبت به یکدیگر همراه با ترتیب کلاسترها به خوبی فواصل ژنتیکی افراد را مشخص می‌سازد.

دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به روش UPGMA در شکل ۴ نشان داده شده است. معیار آماری ضریب همبستگی کوفنتیک نیز محاسبه و عدد ۰/۸۶ به دست آمد که نشان‌دهنده همبستگی قابل قبول ماتریس حاصل از دندروگرام (ماتریس کوفنتیک) با ماتریس تشابه بود.

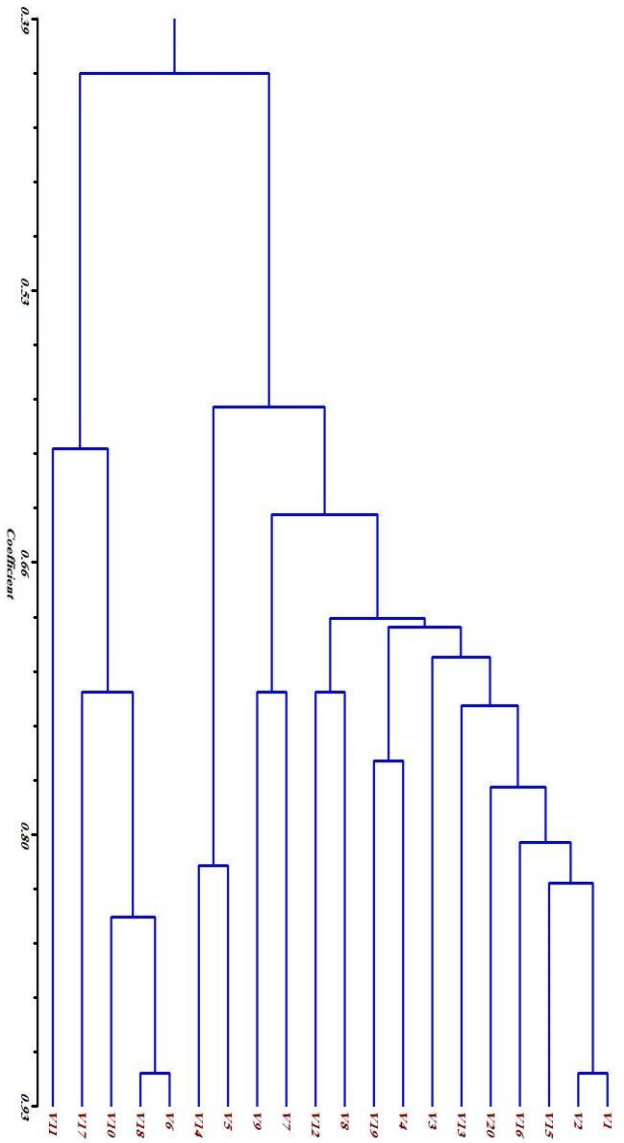
دندروگرام، نشان‌دهنده ۲ کلاستر کاملاً مجزا یکی در برگیرنده ۱۵ ژنوتیپ، و دیگری ۵ ژنوتیپ گندم دوروم می‌باشد. این دو کلاستر در فاصله ژنتیکی ۰/۴۱۶ نسبت به هم قرار دارند. در یک کلاستر، ژنوتیپ‌های شماره Xwmc240، Xwmc89، Xgwm375، Xbarc20، Xgwm293، Xgwm493، Xgwm601، Xwmc48، Xgwm212، Xgwm617، Xbarc133، Xgwm413، Xbarc40، Xwmc603 و Xwmc361 قرار گرفته‌اند. در کلاستر دیگر نیز ژنوتیپ‌های Xbarc108، Lr34، Xgdm132، Xcfd23 و Xbarc121 قرار دارند. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های مزرعه پس از محاسبه شاخص تحمل به تنش تحت شرایط آبیاری نرمال و قطع آبیاری، پیش‌تر نشان داد که ژنوتیپ‌های Xbarc108، Lr34، Xgdm132، Xcfd23 و Xbarc121 از شاخص تحمل به تنش بالا و معنی‌داری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برخوردارند. لکن دو ژنوتیپ دیگر به شماره‌های Xwmc603 و Xwmc361 که از شاخص تحمل به تنش بالاتری نسبت به سایر ارقام برخوردار بودند که در کلاستر ژنوتیپ‌های حساس قرار گرفته‌اند.

جدول ۴- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر داده‌های مولکولی به روش UPGMA برای ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم

Table 4. Result of Cluster analysis molecular data with UPGMA method for 20 genotypes of durum wheat

ROWS/COLS	POINTER	LEVEL1
V1	1	9.1379310
V2	2	8.1896550
V3	16	7.9885056
V4	16	7.7155170
V5	20	7.3103450
V6	13	7.0689655
V7	3	6.9211824
V8	4	7.5862070
V9	19	6.8773946
V10	8	7.2416790
V11	12	6.3636365
V12	7	7.2413790
V13	9	5.8289125
V14	5	8.1034480
V15	14	4.1678160
V16	6	9.1379310
V17	18	8.3620685
V18	10	7.2413793
V19	17	6.0344827
V20	11	----------

www.jpb.kiau.ac.ir



شکل ۴- دندروگرام مولکولی حاصل از تجزیه کلاستر برای ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم به روش UPGMA

Fig 4. Molecular dendrogram result of Cluster analysis for 20 genotypes durum wheat with UPGMA method.

اگرچه نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مارکرهای مورد استفاده می‌توانند به طرز قابل قبولی غربال‌گری ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی را از نوع حساس انجام دهند، اما این مسئله را نباید از نظر دور داشت که ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این آزمایش تا پیش‌ازاین در هیچ آزمایش زراعی برای بررسی تحمل به تنش خشکی مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. به‌طور حتم انجام یک آزمایش زراعی برای یک سال و در یک منطقه نمی‌تواند پتانسیل واقعی ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی را برای تحمل به تنش خشکی نشان دهد. زیرا محیط و نوسانات اقلیمی منطقه، در هر سال نسبت به سال دیگر متفاوت بوده و می‌تواند به‌شدت بر بروز فنوتیپی صفات پلی‌ژنیک اثرگذار باشد. همچنین به این نکته باید اشاره کرد که با توجه به محدودیت در هزینه‌ها در این پژوهش بیشتر بر روی کروموزوم‌هایی تمرکز گردید که از QTLهای شناخته شده‌تری برای افزایش تحمل به تنش خشکی برخوردار بوده‌اند. اما با اشباع نقشه‌های لینکاژی در آینده، مارکرهای بیشتری را که مناطق بیشتری از ژنوم را پوشش دهند نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گرفته تا دقت MAS برای غربال‌گری ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی افزایش یابد (Marc and Roslyn, 2000). لذا توصیه می‌گردد در مطالعات بعدی از مارکرهای بیشتری استفاده نموده تا مناطق بیشتری از ژنوم را پوشش دهند به این ترتیب می‌توان دقت این تکنیک را در غربال‌گری مؤثر افزایش داد. به‌علاوه توصیه می‌گردد در انتخاب مارکرها برای MAS، اولویت انتخاب، با مارکرهایی باشد که از دو سوی کروموزوم با ژن مورد نظر پیوسته باشند (Flanking markers). معمولاً یک جفت مارکری که از دو سو به QTL مورد علاقه، به‌صورت تنگاتنگی پیوسته باشند، بسیار مطمئن‌تر از انتخاب برای یک تک مارکر می‌باشد. دلیل این مسئله آن است که شانس وقوع نوترکیبی بین دو مارکر با یک QTL بسیار کمتر از وقوع نوترکیبی بین یک مارکر و یک QTL است (Mohammadi *et al*, 2006; Mohan, M *et al*, 2003; Mclauchlan A *et al*, 2001).

سپاسگزاری

از همکار ارجمندم جناب دکتر شهاب سادات کمال تشکر را دارم همچنین از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز سپاسگزارم که با امکانات بی‌نظیر مولکولی راهی سخت را آسان نمود.

www.sabp.ir

References

فهرست منابع

Ahmad, M. 2004. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers, Theor Appl Genet, 101:892–896.

Al–Khatib, K., and G. M. Paulsen. 2002. Photosynthesis and productivity during high–temperature stress of wheat genotypes from major world regions. Crop Sci., 30: 1127–32.

Bustos, A., D. Rubio., C. Soler., P. Garcia., and N. Jouve. 2003. .Marker assisted selection to improve HMW-glutenins in wheat, Euphytica, 119: 69–73.

Blumenthal, C., C. W. Wrigley., I. L. Batey., and E. W. R. Barlow. 2001. The heat-shock response relevant to molecular and structural changes in wheat yield and quality. Aust. J. Plant Physiol. 21: 901–909.

Chen, C., W. A. Payne., R. W. Smiley., and M. A. Stoltz. 2010. Yield and water-use efficiency of eight wheat cultivars planted on seven dates in northeastern Oregon. Agronomy Journal, 95: 836-843.

Dellaporta, S.L., J. Wood., and J. B. Hicks. 2004. A plant DNA mini preparation: version II. Plant Mol. Biol. Rep., 1: 19.

Ellis, M. H., W. Spielmeyer., K. R. Gale., G. J. Rebetzke., and R. A. Richards. 2011. ‘‘Perfect’’ markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes. Theor. Appl Genet 105:1038–1042 Endo TR, Gill BS (1996) The deletion stocks of common wheat. J Hered, 87:295–307.

Garavandi, M., M. Farshadfar., and D. Kahrizi. 2010. Evaluation of drought tolerance in bread wheat advanced genotypes in field and laboratory conditions. Seed and Plant Improvment J., 26, 233-252.

Garcia del Moral, L. F., Y. Rharrabti., D. Villegas., and C. Royo. 2012. Evaluation of grain yield and its components in durum wheat under Mediterranean conditions: An ontogenic approach. Agron. J., 95, 266-274.

Gibson, L. R., and G. M. Paulsen. 2000. Yield components of wheat grown under high temperature stress during reproductive growth. Crop Sci., 39: 1841–1846.

Golabadi, M., A. Arzani., and S. A. M. Mirmohamadi maibody. 2011. Assessment of drought tolerance in segregation population in durum wheat. Afric. J. Agric. Res, 1, 162-171. (in Persian).

Jalal-Kamali, M. R., and E. Duveiller. 2008. Wheat Production and Research in Iran: A Success Story. P. 54-58. In M. P., Reynolds, J., Pietragalla, and H. J. Braun (eds.). Proceeding of the international symposium on wheat yield potential: Challenges to international wheat breeding. CIMMYT. D.F. Mexico. 2008. (in Persian).

Johnston, A. M., and D. E. Fowler. 2001. Response of no-till winter wheat to nitrogen fertilization and drought stress. Can. J. Plant Sci, 72, 1075-1089.

Jefferies, S. P., M. A. Pallotta., J. G. Paull., A. Karakousis., J. M. Kretschmer., S. Manning., A. K. M. R. Islam., P. Langridge., and K. J. Chalmers. 2002. Mapping and validation of chromosome regions conferring boron toxicity tolerance in wheat (*Triticum aestevum*). Theor Appl Genet 101:767–777.

Lagudah E. S., H. McFadden., R. P. Singh., J. Huerta-Espino., H. S. Bariana., and W. Spielmeyer. 2006. Molecular genetic characterization of the Lr34/Yr18 slow rusting resistance gene region in wheat. Theor Appl Genet 114:21–30.

Liu, P., J. Zhu., and Y. Lu. 2004. Marker assisted selection in segregating generations of self-fertilizing crops. Theor Appl Genet 109:370–376.Mago R, Bariana HS, Dundas IS, Spielmeyer W, Lawrence GL, Prior AJ, Ellis JG (2005) Development of PCR.

Marc, E. N., M. G. Roslyn., and M. J. Dalling. 2000. Effect of post-anthesis drought on cell division and starch accumulation in developing wheat grains. Ann. Bot. 55, 433-444.

www.ippi.ac.ir

Mohammadi, A., A. Majidi., R. Bihamta., and H. Heidari Sharifabad. 2006. Evaluation of drought stress on agro - morphological characteristics in some wheat cultivars. Pajouhesh & Sazandegi. 73: 184-192. (in Persian).

Mohan, M., S. Nair., A. Bhagwat., T. G. Krishna., M. Yano., C. R. Bhatia., and T. Sasaki. 2003. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Mol Breed, 3: 87–103.

Mclauchlan, A., F. C. Ogbonnaya., B. Hollingsworth., M. Carter., K. R. Gale., R. J. Henry., T. A. Holten., M. K. Morell., L. R. Rampling., P. J. Sharp., M. R. Shariflou., M. G. K. Jones., and R. Appels. 2001. Development of PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs. Aust. J. Agric. Res., 52:1409–14.

www.iapb.kiau.ac.ir

ISSN NO: 2008-8485

Journal of Agronomy and Plant Breeding
Vol 13. No. 3, 2017

Evaluation genetic diversity to resistant genotypes of drought stress in durum wheat with using SSR molecular markers

S. S. Noorinia*[1], Sh. Sadat[2]

Received date: 14 May 2017 Accepted date: 01 Aug 2017

Abstract

To evaluated of efficiency of selection by markers (MAS). 20 genotypes durum wheat was conducted as a split plot design in randomized complete block are planted and yield components calculated. Also in molecular level of 20 pair starter (SSR) to study genetic diversity between varieties and determine genotypes tolerant to drought stress was used. After extraction of DNA and appointment that quantity and quality polymerase chain reaction took place in the touch down method. In total 58 allele of the 20 locus was detected. The largest allele detected belonged to the Xgwm610, and Xbarc108 with 4 allele and the lowest with 2 allele was reserved markers Xgwm413, Xgdm132, Xwmc48, Xbarc40, Xbarc121, Xgwm375. Average allele produced for each locus in this research is 2/9. Rating and length of the parts produced using the software UVDOC was specified. Similarity matrix, the cluster analysis in UPMMA method and draw dendrogram using NTSYS software took. Standard correlation coefficient of cophentic calculated and the number of 0/86 was obtained. Dendrogram represent 2 cluster of quite distinct. In one cluster the number of genotypes 1, 2, 15, 16, 20, 13, 3, 4, 19, 8, 12, 7, 9, 5, 14 and in another cluster the number of 6, 18, 10, 17, 11 are placed. Genotypes of 5 and 14 of higher stress tolerance index than other varieties. The result showed multiple allele trait a phenomenon quite usual and common in markers (SSR) continuity of trait or could be effect of the multiple genes.

Keyword: Genetic diversity, Durum wheat, Drought stress, SSR markers, Marker assisted selection.

www.iapb.iaurai.ac.ir

1- Expert research of Khuzestan agriculture and natural resources center, Khuzestan, iran
2- Assistant professor university azad of ahvaz, Khuzestan, iran
*- Corresponding author: saeed.noorini@gmail.com

Iranian Journal of Agronomy & Plant Breeding Islamic Azad University, Karaj Branch