زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

کاربرد نشانگر ISSR جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای چاودار

الهام رضایی میرقائد*، رسول امیریان، ایمان آرضی

1- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، اصفهان، اصفهان ، ایران

2- بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

3- بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

***نویسنده مسئول**: rezaeimirghayed@gmail.com

تلفن: 09167905852

دریافت:1399/3/11 پذیرش:1400/3/22

چکیده:

چاودار یکی از گیاهان زراعی مهم ایران با نام علمی *Secale* متعلق به خانواده گندمیان می‌باشد. بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه در برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی، امری حیاتی بوده و اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های موجود برای انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش تنوع ژنتیکی 39 جمعیت چاودار از مناطق مختلف ایران، آمریکا و شوروی با استفاده از 28 نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که 8 آغازگر ISSR 48 باند تولید کردند که شامل 18 باند چند شکل (37/5 درصد چند شکلی) بود. میانگین میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) 0/15 و شاخص نشانگر (MI) در آغازگرهای ISSR معادل 2/7 عدد بود. بیشترین مقدار PIC (0/3) مربوط به آغازگر 5+6 و بیشترین MI (0/96) مربوط به آغازگر 1+6 بود. پس از مشاهده محصول‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمر بر روی ژل آگارز و امتیازدهی باندهای DNA، تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار NTSYS انجام شد. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد جمعیت‌های چاودار را به 9 گروه تقسیم کرد که نتایج گروه‌بندی آن با گروه‌بندی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مطابقت داشت. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع درون گونه‌ای بیشتر از تنوع بین گونه‌ای بود. میانگین تنوع ژنی نی (h) 0/350 و میانگین شاخص شانون (I) در گونه‌های چاودار 0/523 بود که بیانگر تنوع خوب درون گونه‌ها می‌باشد. نتایج نشان داد که نشانگر ISSR ابزار مفیدی در تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای چاودار است.

کلید واژگان: چاودار، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR، چندشکلی، تجزیه واریانس مولکولی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-07-14]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.6.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

یازده رقم تریتیکاله را به دو گروه تقسیم کردند که الگوی چندشکلی تولید شده به وسیله ISSR درجه متفاوتی از روابط ژنتیکی میان ارقام مورد مطالعه این پژوهش را نشان داد. ارزش شباهت بین ارقام از بازده 0/58 تا 0/89 درصد بود [8]. گزارش کردند که ISSR به‌عنوان روشی چند-شکلی مؤثر و قابل تکثیر می‌تواند برای ارزیابی تفاوت-های درون گونه‌ای و بین گونه‌ای جمعیت مؤثر باشد. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) از روش ISSR دارای میانگین 0/7 بود [9]. محققان تکنیک‌های ISSR و IRAPرا به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی میان گونه‌های جنس چاودار مورد بررسی قرار دادند. آنها توزیع کروموزومی AAC تکرار توالی ساده با روش FISH را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که منحصر به فردترین توزیع کروموزومی در رقم *S. sylvestre* بوده است [10]. هدف از اجرای این پژوهش ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی چندشکلی ژنتیکی بین جمعیت‌های چاودار و ارزیابی تنوع بین و درون گونه‌ای این گیاه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش 39 جمعیت چاودار از مناطق مختلف کشور به همراه دو جمعیت از کشورهای آمریکا و شوروی از شرکت پاکان بذر اصفهان و مؤسسه بانک بذر کشور جمع‌آوری شد (جدول 1). بذور گیاهان مورد استفاده در محیط گلخانه و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت گردید.

جدول 1- نام گونه‌های چاودار و محل جمع‌آوری آنها

شماره	گونه‌ها	محل جمع‌آوری	شماره	گونه‌ها	محل جمع‌آوری
1	*S. montanum*	کرج -تهران	21	Unknown	سمیرم -اصفهان
2	*S. montanum*	زنجان	22	*S. cereale*	قهدریجان -اصفهان
3	*S. montanum*	دماوند	23	Unknown	کرج
4	*S. montanum*	کردستان	24	*S. montanum*	خلخال -اردبیل
5	*S. montanum*	سمنان	25	*S. montanum*	تهران
6	*S. cereale*	سمیرم -اصفهان	26	*S. sermont*	ملایر -همدان
7	*S. montanum*	سمیرم -اصفهان	27	Unknown	شوروی
8	*S. sermont*	اراک	28	*S. montanum*	نجف آباد -اصفهان
9	*S. cereale*	فریدونشهر -اصفهان	29	*S .montanum*	زنجانرود -زنجان
10	*S. cereale*	چادگان -اصفهان	30	*S. montanum*	کاشان -اصفهان
11	*S. montanum*	بهیز -اصفهان	31	*S. montanum*	کرج -البرز
12	*S. cereal*	سمنان	32	*S. montanum*	کرج -تهران
13	*S. cereale*	فریدن -اصفهان	33	*S. montanum*	زنجان
14	Unknown	ارومیه -آذربایجان غربی	34	*S. montanum*	خراسان شمالی
15	Unknown	کرج	35	*S. cereale*	فریدن -اصفهان
16	*S. montanum*	پارک جهان نما تهران	36	*S. montanum*	فریدونشهر -اصفهان
17	*S. montanum*	کرج -البرز	37	*S. sermont*	آمریکا
18	*S. cereale*	فریدونشهر -اصفهان	38	Unknown	آمریکا
19	*S. cereale*	چهارمحال بختیاری	39	Unknown	آمریکا
20	*S. cereale*	داران -اصفهان	-	-	-

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-07-14]

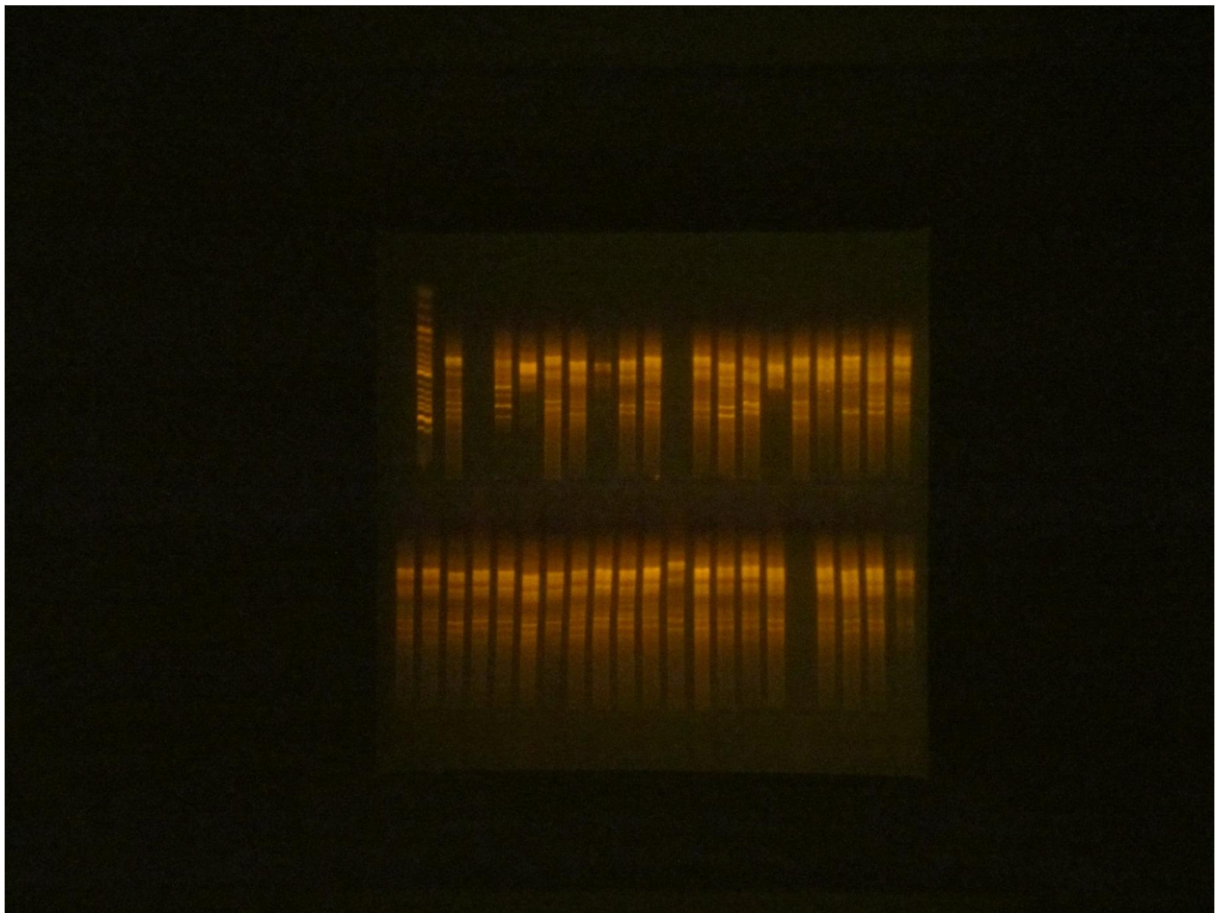
[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.6.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

گونه‌ای به روش نی، ضریب تمایز ژنی (G_{ST}) بوسیله فرمول $G_{ST}= D_{ST} / H_T$ محاسبه شد که در آن H_T تنوع ژنی کل (H_S+D_{ST})، H_S تنوع ژنی درون جمعیت و D_{ST} تنوع بین جمعیتی (H_S-H_T) است. جریان ژنی (N_m) نیز با فرمول مربوطه محاسبه گردید [16].

نتایج و بحث

در این پژوهش تمامی باندهای حاصل از نشانگر ISSR در فاصله 50 تا 1500 جفت باز امتیازدهی شدند. هشت آغازگر ISSR در مجموع 18 باند چندشکل تولید کردند که تقریباً 37/50 درصد از کل 48 باند تولید شده را شامل گردید (شکل 1). در این مطالعه متوسط تعداد کل باندها به ازای هر آغازگر 6 عدد و به ازای هر ژنوتیپ 1/23 عدد بود. همچنین متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر و هر ژنوتیپ به ترتیب 2/25 و 0/46 عدد بود. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر آغازگر محاسبه شد.



شکل 1- الگوی باندی حاصل از ISSR-PCR مربوط به آغازگر Primer 1+6 در 39 ژنوتیپ چاودار

به‌منظور بررسی قدرت تفکیک نشانگرها در نمایش چندشکلی در یک جمعیت محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر نشانگر محاسبه شد. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود. تعداد PIC براساس تعداد آلل شناسایی شده و نحوه پراکنش آنها در جمعیت محاسبه می‌شود. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-07-14]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.6.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

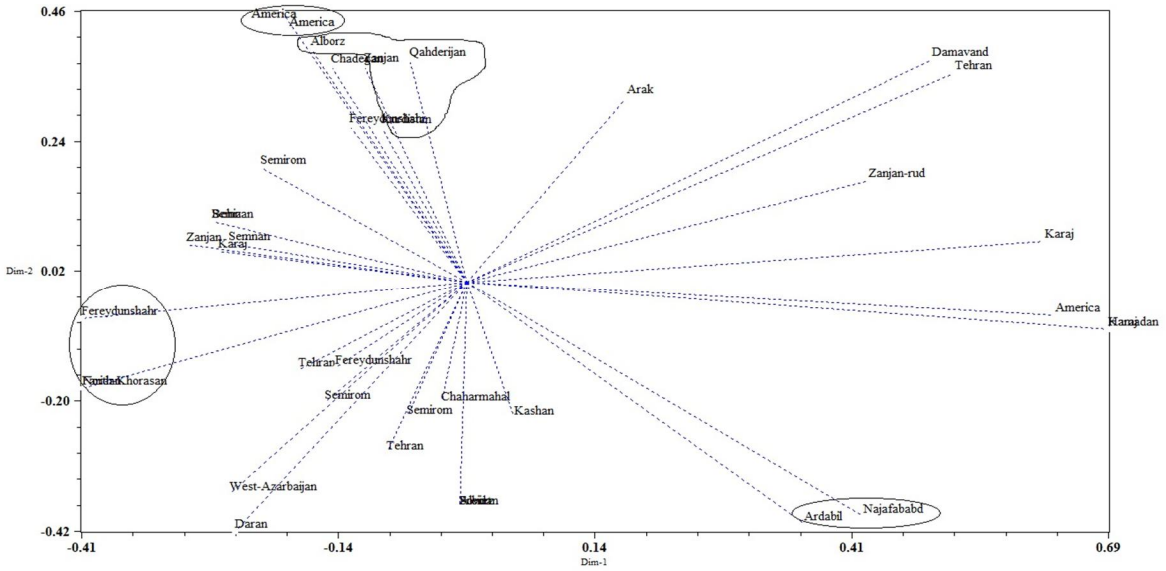
گروه‌بندی آغازگرهای ISSR ژنوتیپ‌های چاودار در ضریب تشابه 60 درصد به 9 گروه اصلی تقسیم شد. در گروه اول دندروگرام دو نمونه سرمونت اراک و سرمونت همدان و مونتانوم‌های کرج (تهران)، دماوند- تهران و یک نمونه مونتانوم زنجان‌رود و یک نمونه ناشناس از کشور آمریکا قرار داشت. در ضریب تشابه 62 درصد به دو زیر گروه تقسیم شدند که در زیرگروه اول بیشترین شباهت (100 درصد تشابه) بین سرمونت همدان و یک نمونه ناشناس از کرج دیده شد. به علت شباهت 100 درصدی آنها احتمال دارد نمونه ناشناس از گونه سرمونت چاودار باشد زیرا در صفات مورفولوژیکی طول سنبله و طول برگ پرچمی شباهت نزدیکی داشتند. در زیر گروه دوم نمونه سرمونت اراک در کنار نمونه‌های مونتانوم تهران، دماوند و زنجان‌رود قرار گرفته بود. علت این نحوه قرارگیری را می‌توان به نزدیکی مناطق و مشابهت اقلیمی این مناطق نسبت داد. به همین دلیل، گونه سرمونت هیبرید حاصل از دو گونه سرال و مونتانوم است. در گروه دوم فقط دو نمونه از گروه مونتانوم از نجف‌آباد و اردبیل با ضریب تشابه 78 درصد در کنار هم قرار گرفتند. هر چند این مناطق از نظر جغرافیایی از هم دور هستند اما مشابهت اقلیمی و یکسان بودن نوع گونه علت مجاورت آنها بوده است. در گروه سوم، سه نمونه مونتانوم از کردستان، زنجان، کرج (البرز) در کنار نمونه سرال از اصفهان (قهدریجان) قرار گرفته بود که نمونه مونتانوم زنجان با ضریب تشابه 71 درصد دورتر از بقیه نمونه‌ها در این گروه قرار گرفته بود. در گروه چهارم دندروگرام دو نمونه چاودار از کشور آمریکا با 100 درصد تشابه در کنار هم قرار گرفته بودند که گونه یکی از آنها سرمونت بود. بنابراین می‌توان گفت که به احتمال زیاد گونه دیگر نیز سرمونت بوده است. در گروه پنجم نمونه‌های سرال سمنان، سرال اصفهان، مونتانوم اصفهان با یک نمونه ناشناس از کرج قرار داشتند. در این گروه نمونه سرال چادگان با ضریب تشابه 63 درصد دورتر از بقیه قرار داشت. در این گروه دو نمونه سرال سمنان و مونتانوم اصفهان (بهیز) 100 درصد شباهت نشان دادند. در گروه ششم نمونه چاودار از کشور شوروی در کنار نمونه‌هایی از سرال چهارمحال بختیاری، مونتانوم کرج (البرز)، مونتانوم کاشان، مونتانوم پارک جهان‌نما و سرال اصفهان (فریدن) قرار گرفته بود. بین نمونه شوروی، سرال اصفهان (فریدن) و مونتانوم کرج (البرز) 100 درصد شباهت دیده شد. در گروه هفتم در ضریب تشابه 70 درصد به دو زیر گروه تقسیم شد که در زیر گروه اول نمونه سرال فریدونشهر و یک نمونه ناشناس از سمیرم قرار داشتند. در زیر گروه دوم مونتانوم زنجان با ضریب تشابه 70 درصد دورتر از بقیه قرار گرفته بود. این نمونه ناشناس با نمونه سرال فریدونشهر 90 درصد شباهت نشان داد بنابراین به احتمال زیاد این گونه نیز سرال می‌باشد که در تعدادی از صفات مورفولوژیکی مانند دارا بودن کرک در نوک پوشینه و دارا بودن کرک و مو در زیر سطح برگ مشابه بودند. در گروه هشتم دندروگرام 98 درصد شباهت بین مونتانوم خراسان شمالی و سرال فریدن اصفهان دیده شد که در کنار آنها گونه مونتانوم از فریدونشهر نیز قرار داشت. قرار گرفتن گونه مونتانوم و سرال با شباهت زیاد می‌تواند به‌علت مشابهت اقلیمی این مناطق باشد. نمونه سرال فریدونشهر با 77 درصد تشابه دورتر از بقیه نمونه‌ها قرار گرفته بود. در گروه نهم فقط یک نمونه از آذربایجان غربی با نام گونه نامشخص بود که داده‌های ماتریس تشابه نشان داد که این نمونه با نمونه سرال اصفهان (فریدن) با 62 درصد شباهت، بیشترین شباهت را داشت و با نمونه آمریکا با 10 درصد تشابه، کمترین شباهت را داشت. بنابراین به احتمال زیاد این نمونه می‌تواند از گونه سرال چاودار باشد (شکل 2).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-07-14]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.6.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

نتایج آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشانگرهای ISSR نشان داد که سه مؤلفه اصلی 51/80 درصد از تغییرات کل را توجیه کردند که سهم مؤلفه اول فقط 21/66 درصد بود. مؤلفه دوم و سوم نیز به ترتیب 17/34 درصد و 13/80 درصد از تغییرات کل را توجیه کردند. از آن‌جا که سه مؤلفه اول بیش از 50 درصد از کل تغییرات را توجیه نمودند، بنابراین هر چند این مقدار از نظر آماری خوب است اما از نظر ژنتیکی نشان‌دهنده عدم توزیع مناسب نشانگرها در ژنوم جمعیت‌های به کار رفته و یا شباهت زیاد توالی‌ها می‌باشد. در این پژوهش نتایج گروه‌بندی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مطابقت چندانی با نحوه گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای نداشت (شکل 3).



شکل 3- نمودار داده‌های تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای 39 جمعیت چاودار با نشانگر ISSR

در این مطالعه هر گونه چاودار به‌عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شد. این نمونه‌ها نیز به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شدند و با استفاده از نرم‌افزارهای GenAlex و PopGene به ترسیم دندروگرام فاصله ژنتیکی نی و روش تجزیه مختصات اصلی پرداخته شد. میزان تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ها با آغازگرهای ISSR با نرم‌افزار GenAlex محاسبه شد. نتایج حاصل از این تجزیه نشان داد که تنوع درون گونه‌ها بیشتر از تنوع بین گونه‌ها بوده است. به‌طوری‌که 97 درصد تنوع مربوط به درون گونه‌ها و 3 درصد از تنوع کل مربوط به تنوع بین گونه‌ها بوده است (جدول 3).

جدول 3- آنالیز AMOVA برای اندازه‌گیری تنوع درون و بین گونه‌ای با نشانگر ISSR با نرم‌افزار GenAlex

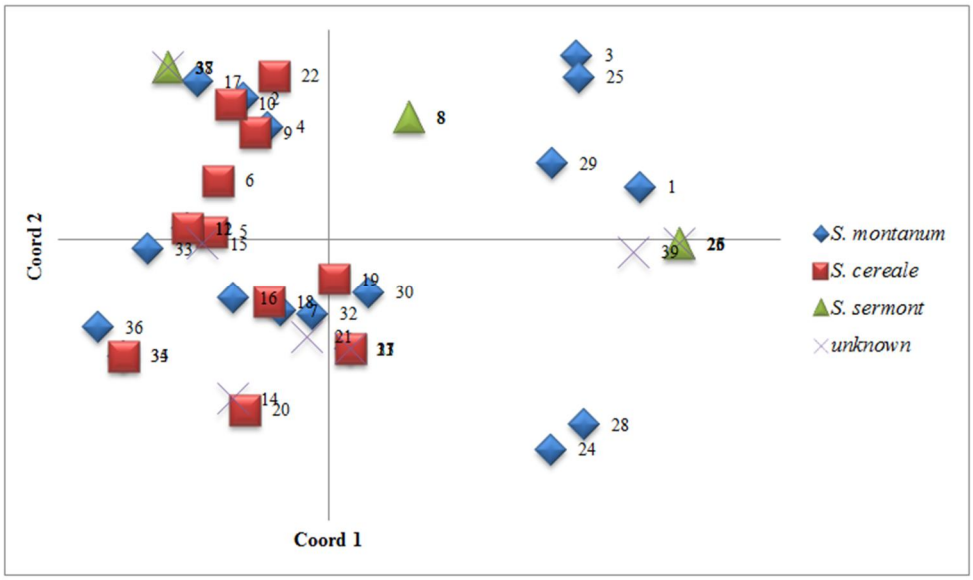
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	اجزای واریانس	درصد واریانس
بین گونه‌ها	3	4/022	0/088**	%3
درون گونه‌ها	35	3/254	3/254**	%97

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

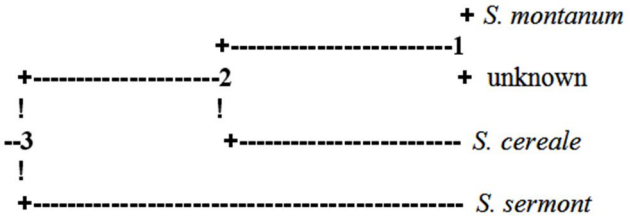
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-07-14]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.6.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ



شکل 4- نمودار توزیع 4 گونه چاودار با آزمون تجزیه مختصات اصلی با نرم‌افزار GenAlex



شکل 5- دندروگرام نااریب جمعیت‌های چاودار با استفاده از فاصله ژنتیکی نی به روش UPGMA

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه می‌تواند نقطه عطفی برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت ژرم‌پلاسم ارقام و جمعیت‌های چاودار باشد. آغازگرهای Primer 1+6 و Primer 5+6 با برخورداری از بیشترین PIC به عنوان بهترین آغازگرها جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در این تحقیق معرفی شدند که این امر نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز جمعیت‌های چاودار مورد مطالعه است. این آغازگرهای در مطالعات آینده نیز می‌توانند بسیار مفید واقع شوند. مشاهده شده است، فاصله ژنتیکی مشاهده شده می‌تواند برای کارهای اصلاحی بعدی و انجام تلاقی بین ژنوتیپ‌ها، به منظور بالا بردن کیفیت و کمیت عملکرد که هدف نهایی در اصلاح نباتات می‌باشد، به کار رود. گروه‌بندی‌های ایجاد شده برای جمعیت‌ها می‌تواند در برنامه‌های توسعه ارقام مناسب جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه به کار روند.

منابع

[1] Mazaheri, D. (1999) *Mixture agronomy*. Tehran: Publishing Center of Tehran University

[2] NourMohammadi, G., Siadat, S. A., and Kashani, A. (1999) *Cereals agronomy*. Ahvaz: Publishing Center of Chamran University

[3] Hamid, R., Siahpoosh, M., Mamaghani, R., and Siahpoosh, A. (2014) Evaluation the genetic diversity of 10 Milk thistle (*Silybum marianum* L.) ecotypes using morphological, phenological and phytochemical traits

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-07-14]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.6.6]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Using of ISSR Marker in Assessment of Genetic Diversity Inter and Intra Specific of Rye

Rezaei Mirghayed E.[*1] MSc, Amirian R.[2] PhD, Arezi I.[3] MSc

1- Biotechnology Department, Agriculture Faculty, University of Payam Noor, Isfahan, Isfahan, Iran
2- Department of genomics, Branch of Central Region (Isfahan), Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Extension and Education Organization of Iran (AREEO), Isfahan, Iran
3- Department of genomics, Branch of Central Region (Isfahan), Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Extension and Education Organization of Iran (AREEO), Isfahan, Iran

*Corresponding Author: rezaeimirghayed@gmail.com

Received: 2020/5/31 Accepted: 2021/6/16

Abstract:
Rye is one of Iran's most important crops, known as Secale, belonging to the Poaceae. Evaluation of Rye genetic diversity is essential for breeding programs and preservation of genetic resources. Genetic diversity level in Rye genotypes is very important for selection of parents in breeding programs. In this research, genetic diversity of 39 families of rye populations from different regions of Iran, the USA, and the Soviet Union was evaluated with the 28 ISSR markers. The results showed that 8 ISSR initiators produced 48 bands which included 18 polymorphic bands (37.5% polymorphism). The mean of polymorphic information content (PIC) and marker index value (MI) for ISSR primers was 0.15 and 7.2 respectively. The highest PIC (3.0) was related to primer 5+6 and the highest MI (0.96) reached for primer 1+6. After observing polymerase chain reaction products on an agarose gel and scoring DNA bands, the analysis was performed with NTSYS software. The cluster analysis dendrogram of UPGMA and Jaccard's similarity coefficient divided the rye populations into 9 groups, the results were compiled with grouping by principal component analysis. The results of analysis of Molecular Variance indicated an in-species variation more than inter-species variation. The mean Nei's genetic variation (h) was 350 and the mean of Shannon index (I) in rye species was 523, which indicates a relatively good variety within species. The results showed that the ISSR marker was a useful tool in determining genetic variation of inter and intra specific of rye.

Keywords: Rye, Genetic Diversity, ISSR Marker, Polymorphism, Analysis of Molecular Variance

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-07-14]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.6.6]