

بررسی تنوع ژنتیکی مقاومت به بیماری بلایت باکتریایی گندم (*Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*) با استفاده از نشانگر

مولکولی ISSR در ارقام گندم بومی ایران

سیده زهرا فاطمی فرد، اسد معصومی اصل* و رسول رضایی

ایران، یاسوج، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۲۱

چکیده

گندم نان مهمترین محصول جهان است که عملکرد آن تحت تأثیر چندین بیماری از جمله بیماری باکتریایی برگ قرار دارد. مناسب ترین روش برای مدیریت این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم است. نشانگرهای DNA در زمینه مقاومت به بیماریها در گروه بندی گیاه بسیار موثر هستند و در میان این نشانگرها، نشانگر ISSR توصیه می شود زیرا اطلاعات پیشین از توالی DNA لازم نیست و پیاده سازی آن آسان و سریع می باشد. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۲۷ ارقام بومی گندم بومی ایران با توجه به مقاومت در برابر بلایت باکتریایی با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت که ۱۷۰ باند قابل بررسی را تولید کرد که ۱۵۶ باند چندشکل است. بالاترین درصد نوارهای چندشکل متعلق به آغازگرهای F7juinkhliF8 و F10 و پایین ترین مقدار آن مربوط به آغازگر F9 بود. بالاترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) متعلق به آغازگرهای F5 و F10 و کمترین مقدار آن متعلق به آغازگر F7 بود. تجزیه خوشه ای این ارقام را به چهار گروه تقسیم کرد: ارقام قدس، امید و آتاک در گروه مقاوم و سایر ارقام در گروه حساس و بسیار حساس قرار گرفتند. چندشکلی بالای به دست آمده در این تحقیق می تواند به کارایی بالای نشانگر ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام گندم از نظر مقاومت در برابر بیماری های مختلف نسبت داده شود.

واژه های کلیدی: ژنوتیپ، تجزیه خوشه ای، چندشکلی، نشانگر مولکولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۴۳۳۲۲۴۸۴۰ ، پست الکترونیکی: Masoumiasl@yu.ac.ir

مقدمه

استان کرمان مشاهده شد (۲) و تاکنون از مزارع گندم استان های کهگیلویه و بویراحمد، فارس (۱)، سیستان و بلوچستان و گیلان (۲۲) نیز گزارش شده است. مناسب ترین روش مدیریت این بیماری استفاده از ارقام مقاوم است (۸).

در برنامه های اصلاحی، از نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزاری مناسب و مکمل روش های اصلاح کلاسیک استفاده می شود. این نشانگرها به علت پوشش وسیع ژنومی و همچنین سهولت آشکارسازی و تشخیص، کاربرد فراوانی داشته و استفاده از اطلاعات به دست آمده در مدیریت بهتر

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) از نظر تولید و سطح زیر کشت جهانی نسبت به دیگر غلات دانه ای رتبه اول را دارا می باشد (۱۵). بنابراین با توجه به وسعت سطح زیر کشت این گیاه و افزایش نیاز روزافزون به آن، نیازمند ارقام سازگار و پایدار از جهت عملکرد نسبت به تنش های زنده و غیر زنده می باشیم. براساس آمار منتشر شده، بیماری های گیاهی منجر به کاهش ۳۵ درصدی تولیدات گندم می شوند (۱۰). در صورت مناسب بودن شرایط محیطی، بیماری بلایت برگ می تواند سبب کاهش قابل ملاحظه محصول شود (۲۵، ۲ و ۲۳). این بیماری در ایران نخستین بار در

ژرم پلاسما موجود و استفاده بهینه از آن در برنامه به نژادی مفید می باشد. نشانگرهای مولکولی به ویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA با ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و با حذف اثرات ناشی از عوامل محیطی، توانسته اند بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیک را برطرف کنند (۱۸ و ۱۹). در تکنیک گزینش به کمک نشانگر، همبستگی بین نشانگرهای DNA و صفات مهم زراعی همچون مقاومت به عوامل بیماریزا، حشرات، نماتدها، تحمل به تنش های غیرزنده، پارامترهای کیفیت و صفات کمی مورد بررسی قرار می گیرد. در این روش نشانگرهایی که در مجاورت ژن هدف قرار دارند، شناسایی و انتخاب می شوند. به این ترتیب این روش به شناسایی گیاهان حامل ژن های هدف به طور هم زمان و بدون قرار دادن در معرض هجوم بیمارگر یا حشره در نسل های اولیه، کمک خواهد کرد (۳). در تحقیق دیگر بیان شد که شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن های کنترل کننده صفات، به عنوان روشی بسیار مفید جهت شناسایی ارقام مقاوم می باشد (۲۶).

نشانگرهای بین ریزماهورهای ژنومی یا ISSR، یک دسته از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر تکثیر قطعات کوتاه DNA، درون توالی های تکراری ساده می باشند. این قطعات، حتی در میان ژنوتیپ های بسیار نزدیک، چندشکلی بالایی نشان می دهند که ناشی از فقدان محدودیت های کارکردی در این مناطق ژنومی می باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی ۴۸ رقم گندم نان و ۵۱ رقم گندم دوروم در کشور پرتغال که با استفاده از ۱۸ آغازگر ISSR انجام شد، در مجموع ۹۶/۳ درصد چندشکلی برای ارقام گندم نان و ۹۸/۵ درصد چندشکلی برای ارقام گندم دوروم گزارش کردند (۱۴). این پژوهشگران اشاره کردند که ISSR بازتاب خوبی از تنوع ژنتیکی درون گونه ای، بین گونه ای و بین ارقام را نشان می دهد. فتحی و همکاران (۷) تنوع ژنتیکی ۴۰ گونه از توده *Aegilops triuncialis* جمع آوری شده از مناطق غربی ایران را با استفاده از آغازگر ISSR بررسی کردند که ۱۱۸ نوار چندشکل به دست آمد و از بین آنها آغازگر UBC₈₁₇

با ۱۶ نوار و آغازگرهای UBC₈₁₁ و UBC₈₂₃ با ۱۴ نوار بیشترین و آغازگر UBC₈₂₅ با ۴ نوار، کمترین تعداد نوار را تشکیل دادند. تجزیه خوشه ای، ۴۰ توده بررسی شده را در سه گروه طبقه بندی کرد که هر گروه به ترتیب شامل ۹، ۱۳ و ۱۸ توده بودند. استفاده از ۹ آغازگر ISSR برای شناسایی تنوع ژنتیکی مرتبط با بیماری فوزاریوم در گیاه نخود مشخص کرد از این آغازگرها در مجموع ۶۱ باند تولید شد که در این میان ۴۴ نوار چندشکل (۷۲/۱ درصد) ایجاد شد (۱۷). همچنین در پژوهش مسعودی و همکاران (۱۱) برای ارزیابی مقاومت به بیماری سفیدک پودری که با استفاده از نشانگرهای ISSR، iBPS و IRAP، بر روی ۱۱۵ ژنوتیپ گندم انجام گردید، بیشترین و کمترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر نوع ISSR و iBPS به ترتیب با ۱۰۰ و ۵۰ درصد بود و آلل PR50-60 بیشترین ارتباط را با صفات مورد ارزیابی در این پژوهش داشت.

هدف از این پژوهش، بررسی تنوع ژنوتیپ های گندم ایرانی از لحاظ مقاومت به بیماری بلایت باکتریایی می باشد. از آنجا که ایران از کشورهای غنی از ذخایر توارثی برخی محصولات مهم از جمله گندم است، ارزیابی اولیه و پیشرفته ذخایر ارزشمند گندم در ارتباط با اهداف اصلاحی این محصول که برطرف کننده مشکلات تولید است باید در اولویت قرار گیرد.

مواد و روشها

۲۷ رقم گندم بومی ایران از موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد که اسامی آنها در جدول ۱ آورده شده است. این ارقام در گلدان حاوی خاک جمع آوری و الک شده (خاک زراعی، کود حیوانی و ماسه شسته بود) در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه یاسوج و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت شدند. گیاهان از زمان کاشت تا زمان برداشت در شرایط کنترل شده نور، دما، کنترل آلودگی و رطوبت نگهداری شدند.

جدول ۱- ارقام گندم مورد مطالعه

۱- آزادی	۲- الموت	۳- الوند	۴- اترک	۵- امید	۶- اینباء	۷- بزوستایا
۸- بولانی	۹- تجن	۱۰- چمران	۱۱- داراب ۲	۱۲- روشن	۱۳- زرین	۱۴- سیلان
۱۵- سرخ تخم	۱۶- سرداری	۱۷- شعله	۱۸- طبسی	۱۹- فلات	۲۰- قدس	۲۱- کارچیا
۲۲- کویر	۲۳- گلستان	۲۴- ماهوتی	۲۵- مهدوی	۲۶- میهن	۲۷- نیک نژاد	

برای انجام محلول پاشی برگ، از سوسپانسیون اولیه باکتری که از گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج تهیه شد، کشت ۱۶ خطی انجام گردید و سپس از کشت مجدد اولیه، کشت ۲۴ ساعته انجام شد. از کشت ۲۴ ساعته کلونی باکتری درون ارلن حاوی آب مقطر یک بار تقطیر اتوکلاو شده منتقل و سوسپانسیون تهیه شد. سپس میزان جذب نوری سوسپانسیون باکتری در طول موج نوری ۶۰۰ قرائت گردید. اسپری پاشی دستی در مرحله ۵- ۴ برگ انجام شد (۲۴). گیاهان شاهد نیز با آب یک بار تقطیر اتوکلاو شده، اسپری پاشی برگ گردیدند. به منظور بررسی میزان آلودگی برگ بوسیله باکتری PSS، نمونه برداری در بازه های زمانی ۷، ۱۴ و ۱۸ روز پس از محلول پاشی برگ انجام گرفت. سپس از برگ های تلقیح شده عکس تهیه شده و سطح آلودگی با استفاده از نرم افزار IMAGE J محاسبه گردید. گروه بندی ارقام در ۶ گروه و طبق رده بندی (۱۹) انجام گرفت. بر طبق این رده بندی، صفر: یعنی فاقد هرگونه علامت قابل مشاهده. یک: یعنی کلروز بدون بافت مردگی. دو: یعنی بافت مردگی کمتر از ۱۰ درصد. سه: یعنی بافت مردگی بین ۱۱ تا ۳۰ درصد. چهار: یعنی بافت مردگی بین ۳۱ تا ۷۰ درصد. پنج: یعنی بافت مردگی بین ۷۱ تا ۱۰۰ درصد. و شش: یعنی گسترش بافت مردگی به ناحیه فراتر از ناحیه مایه زنی شده. نتایج بین صفر تا دو به عنوان واکنش مقاومت و بین ۲/۱ تا ۶ به عنوان واکنش حساسیت در نظر گرفته شد.

در مرحله ۶-۴ برگ و در بازه های زمانی ۱، ۳ و ۵ روز پس از مایه زنی، نمونه های برگ جمع آوری و استخراج DNA از برگ خشک شده گیاه، بدون نیاز به نیتروژن مایع

و SDS، با تغییراتی در روش اسفندانی بژچلونی (۱۳۹۶) انجام گردید. پس از تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر، واکنش PCR با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR (جدول ۲) انجام گردید. واکنش PCR با استفاده از PCR Master Mix (2X) شرکت آمپلی کون آماده مصرف (تهیه شده از شرکت سیناژن) به میزان ۱۰ میکرولیتر، ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده (۱۰) نانوگرم در میلی لیتر) و ۲ میکرولیتر از آغازگر (۱۰) میکرومول) و ۶/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام گردید. الگوی دمایی واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل یک چرخه واسرشت اولیه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی به مدت ۳۰ ثانیه و در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال آغازگر به الگو در دمای ۶۳/۶-۴۰/۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه (جدول ۲)، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و به مدت ۱/۳ دقیقه. و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۲/۵ درصد با ولتاژ ۱۰۰ با استفاده از دستگاه الکتروفورز از هم تفکیک شدند. قطعات DNA تکثیر شده به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) امتیازبندی و از ضریب تشابه جاکارد برای محاسبه تشابه بین هر یک از زوج های ژنوتیپی استفاده گردید. جهت به دست آوردن تعداد آلل مشاهده شده (N_a)، تعداد آلل موثر (N_e)، شاخص شانن (I)، میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) از نرم افزار GenAlex استفاده گردید. همچنین ترسیم درخت فیلوژنی و نمودار

PIC از نرم افزار آنالین PIC COLTIVATUR استفاده گردیده و MI از رابطه $MI = PIC \times EMR$ بدست آمد.

دو بعدی و سه بعدی با استفاده از نرم افزار NTSYS ver 2.02 انجام گردید. جهت تعیین گروه بندی ارقام، از آزمون T^2 هتلینگ در نرم افزار SAS استفاده گردید. برای محاسبه

جدول ۲- توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده

اسم آغازگر	توالی آغازگر (3' → 5')	دمای اتصال (درجه سانتیگراد)
F1	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	۶۳/۶
F2	ACA CAC ACA CAC ACA CCG	۵۶/۳
F3	CTC TCT CTC TCT CTC TG	۵۲/۴
F4	GAT AGA TAG ACA GAC A	۴۳/۲
F5	GGG TGG GGT G	۳۶
F6	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	۵۲/۶
F7	CTC TCT CTC TCT CTC TGC	۵۶/۳
F8	CTC TCT CTC TCT CTA	۴۳/۵
F9	CAG CAG CAG GC	۳۸
F10	GTG TGT GTG TGT CC	۴۳/۷
F11	CAC ACA CAC ACA AC	۴۰/۸
F12	CAC ACA CAC ACA GT	۴۰/۸

نتایج و بحث

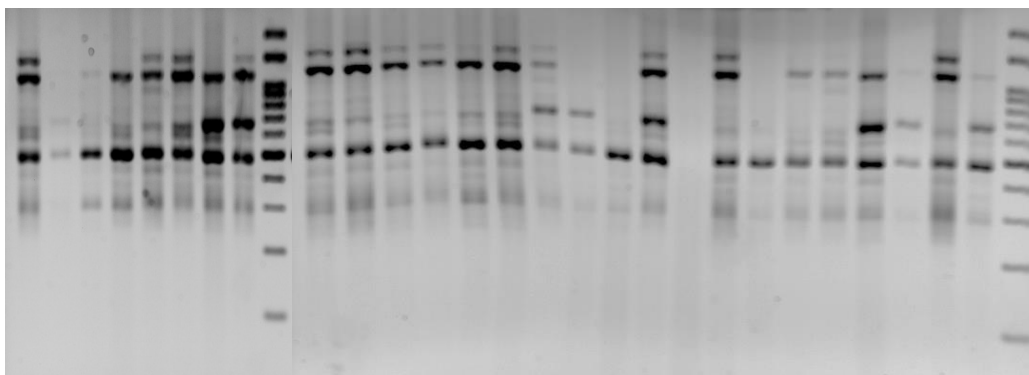
تجزیه و تحلیل درصد آلودگی برگی ارقام گندم در دومین زمان برداشت (۱۴ روز پس از محلول پاشی برگی)، نشان داد که ارقام امید، اترک و قدس جزو ارقام مقاوم (کمتر از ۱۰ درصد بافت مردگی) و سایر ارقام جزو ارقام حساس (بیشتر از ده درصد آلودگی در ناحیه مایه زنی شده) به بیماری بلایت باکتریایی قرار گرفتند. همچنین ارقام آزادی، چمران، داراب ۲، فلات و کویر حساسیت زیادی (۳۱ تا ۷۰ درصد آلودگی برگی) نسبت به این بیماری نشان دادند تا جایی که حساسیت آن‌ها از رقم گلستان (رقم حساس- شاهد) نیز بیشتر بود. همچنین رقم اترک مقاومت بیشتری نسبت به رقم امید (رقم مقاوم- شاهد) نشان داد.

در این پژوهش، بالاترین میزان چندشکلی مربوط به آغازگرهای F_{10} ، F_5 و F_6 بود (شکل ۱) و لذا از این آغازگرها برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسماهای ارقام دیگر

گندم در پژوهش‌های بعدی می‌توان بهره گرفت. کمترین میزان چندشکلی مربوط به آغازگر F_7 بود. این آغازگر توانایی خوبی برای جداسازی ژرم پلاسماها از خود نشان نداد در حالیکه دیگر آغازگرهای مطالعه شده در این تحقیق به شدت چندشکلی را نشان دادند (جدول ۳). مقدار چندشکلی برای نشانگرهای غالب حداکثر باید ۰/۳۷۵ باشد (۲۱). هر چه این عدد بزرگتر باشد و به مقدار ۰/۳۷۵ نزدیکتر باشد، بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در جمعیت تحت بررسی است. محتوای اطلاعات چندشکلی در اکثر آغازگرهای مورد استفاده عدد بزرگی بود که نشان دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این آغازگرها می‌باشد. شاخص نشانگری (MI) آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه بین ۶/۳۱۷ تا ۰/۱۶۶ متغیر بود. از MI به عنوان معیاری مناسب برای پیشگویی کارایی نشانگر در یک ژرم پلاسما استفاده می‌گردد. آغازگرهای F_5 و F_{12} در این مطالعه بالاترین مقدار شاخص نشانگری را به

خود اختصاص دادند (جدول ۳). از شاخص نشانگری به عنوان معیاری مناسب برای پیشگویی کارایی نشانگر در یک ژرم پلاسما استفاده می‌گردد. بنابراین آغازگرهایی که بالاترین مقدار شاخص نشانگری را به خود اختصاص دادند، می‌توانند برای مطالعه ژرم پلاسما گندم در سطح وسیع استفاده گردند.

1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 M



شکل ۱- الگوی بانندی مربوط به آغازگر F_6 ، شماره‌ها به ترتیب مربوط به ارقام: ۱- آزادی، ۲- الموت، ۳- الوند، ۴- اترک، ۵- امید، ۶- اینیاء، ۷- بزوستایا، ۸- بولانی، ۹- تجن، ۱۰- چمران، ۱۱- داراب ۲، ۱۲- روشن، ۱۳- زرین، ۱۴- سبلان، ۱۵- سرخ‌تخم، ۱۶- سرداری، ۱۷- شعله، ۱۸- طبسی، ۱۹- فلات، ۲۰- قدس، ۲۱- کارچیا، ۲۲- کویر، ۲۳- گلستان، ۲۴- ماهوتی، ۲۵- مهدوی، ۲۶- میهن و ۲۷- نیک‌نژاد و M: نشان دهنده نشانگر وزنی می‌باشد.

تعداد آل‌های مشاهده شده و تعداد واقعی آل‌هایی است که در جمعیت وجود دارند. کمترین مقدار به دست آمده برای Na متعلق به آغازگر F_9 و بیشترین مقدار آن مربوط به سایر آغازگرها (به جز F_9 و F_{12}) بود (جدول ۳). کاهش غنای آللی می‌تواند منجر به کاهش پتانسیل جمعیت برای سازگاری با تغییرات زیست محیطی آینده شود، زیرا این تنوع خام برای تکامل با انتخاب طبیعی است. بنابراین غنای آللی یک شاخص قوی برای پتانسیل تکاملی جمعیت است. همچنین غنای آلل، تعداد واقعی آل را در هتروزیگوسیت اندازه می‌گیرد، در حالی که تعداد آل موثر، تعداد آل‌هایی که انتظار می‌رود در جمعیت با همان هتروزیگوسیتی است. با توجه به عواقب بوم‌شناسی و تکاملی هتروزیگوسی در مقابل غنای آللی، هر دو اقدامات باید در تلاش‌های حفاظت و مدیریت با هدف حفظ تنوع ژنتیکی در نظر گرفته شود (به نقل از ۱۶).

آغازگر F_7 کمترین و آغازگرهای F_5 و F_6 بیشترین He را نشان دادند (جدول ۳). هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای کل جمعیت در تمام جایگاه‌ها به طور متوسط 0.37 بدست آمد که با سیستم گرده‌افشانی گندم تطابق دارد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، معیاری برای ارزیابی تنوع ژنی بوده و با تعداد آل موثر ارتباط مستقیم دارد (۱۶).

مقدار میانگین I در این تحقیق 0.55 بوده است که در این میان کمترین داده مربوط به آغازگر F_7 و حداکثر آن مربوط به آغازگر F_{10} بود. شاخص شانون در این مطالعه برای اکثر آغازگرهای انتخاب شده بالا بود. شاخص شانون (I) بیانگر میزان تنوع در هر آغازگر می‌باشد. حداقل و حداکثر آل موثر به دست آمده در این تحقیق، به ترتیب مربوط به آغازگرهای F_7 و F_{10} بود. تعداد آل‌های موثر (Ne)، بیانگر تعداد آل‌هایی است که برای دستیابی به هتروزیگوسیتی انتظار می‌رود. تعداد آل‌های متفاوت (Na)، بیان کننده

جدول ۳- مقادیر شاخص‌های نشانگری آغازگرهای مورد مطالعه

اسم آغازگر	تعداد نوار تکثیر شده	تعداد نوار چندشکل	درصد نوارهای چندشکل	PIC	MI	He	I	Ne	Na
F ₁	۱۱	۱۰	۹۰/۹	۰/۲۴۴	۲/۲۱۷	۰/۳۰۲	۰/۴۶۲	۱/۵۰۸	۲
F ₂	۱۷	۱۵	۸۸/۲۳	۰/۳۰۶	۴/۰۴۹	۰/۳۸۴	۰/۵۶۹	۱/۶۵۱	۲
F ₃	۱۳	۱۲	۹۲/۳۰	۰/۳۰۲	۳/۳۴۴	۰/۳۸۶	۰/۵۶۲	۱/۶۸۷	۲
F ₄	۱۷	۱۶	۹۴/۱۱	۰/۳۰۵	۴/۵۹۲	۰/۳۸۷	۰/۵۶۹	۱/۶۸۲	۲
F ₅	۲۰	۱۹	۹۵	۰/۳۵۰	۶/۳۱۷	۰/۴۵۶	۰/۶۴۷	۱/۸۵۳	۲
F ₆	۱۳	۱۲	۹۲/۳۰	۰/۳۲۳	۳/۵۷۷	۰/۴۱۵	۰/۶۰۰	۱/۷۵۱	۲
F ₇	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۱۶۶	۰/۱۶۶	۰/۱۹۸	۰/۳۲۵	۱/۳۰۳	۲
F ₈	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۱۵	۰/۱۸۹	۰/۴۰۷	۰/۵۸۷	۱/۷۵۴	۲
F ₉	۲۰	۱۶	۸۰	۰/۳۰۴	۳/۸۹۱	۰/۳۰۹	۰/۴۵۳	۱/۵۴۴	۱/۸
F ₁₀	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۳۶۲	۴/۳۴۴	۰/۴۷۵	۰/۶۶۸	۱/۹۱۰	۲
F ₁₁	۱۳	۱۱	۸۴/۶۱	۰/۳۱۵	۲/۹۳۱	۰/۴۰۱	۰/۵۸۶	۱/۷۱۳	۲
F ₁₂	۱۸	۱۷	۹۴/۴۴	۰/۳۳۱	۵/۳۱۴	۰/۴۰۲	۰/۵۷۹	۱/۷۳۲	۱/۹۴۴
میانگین	۱۳	۱۴/۱۶۶	۹۲/۶۵۷	۰/۳۰۱	۳/۴۱۰	۰/۳۷۶	۰/۵۵۰	۱/۶۷۴	۱/۹۷۸

صفری و همکاران (۵) در بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های چچم دائمی (*Lolium prene*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR گزارش کردند که این نشانگر توانسته چندشکلی مطلوبی را بین ژنوتیپ‌ها نشان دهد. طوریکه محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرها بین ۰/۲۵ تا ۰/۴۵ متغیر بود.

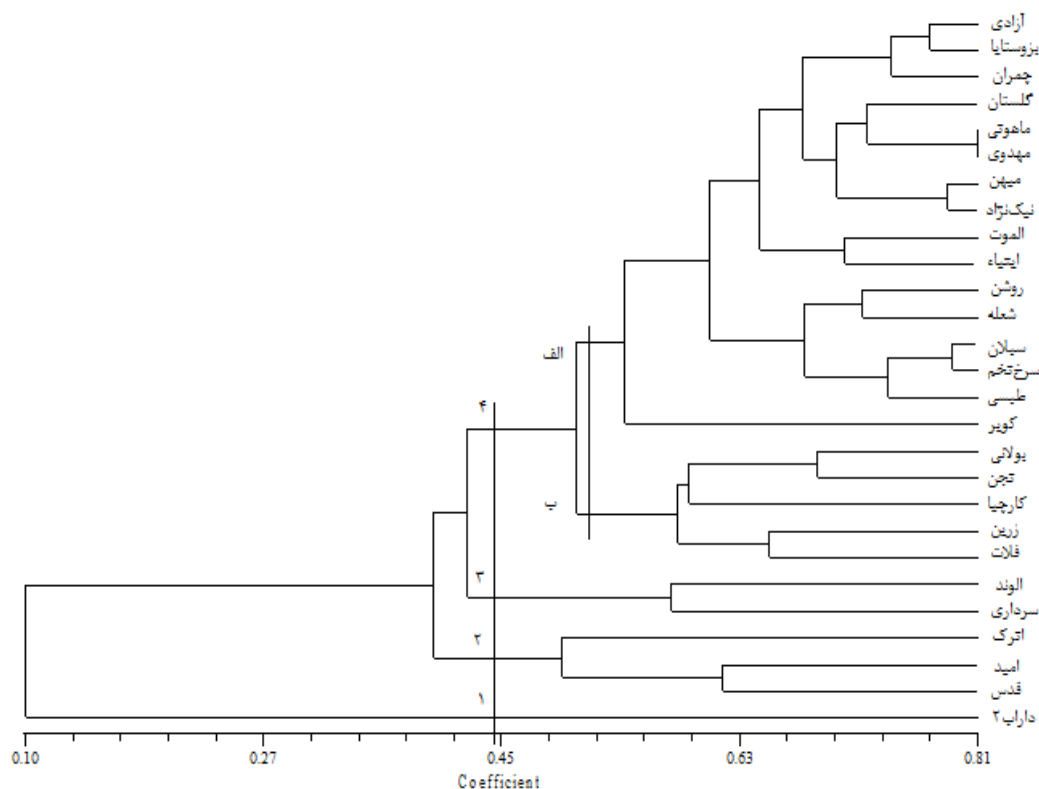
خط برش در دندروگرام شکل ۲ از محل فاصله ژنتیکی ۰/۴۱۱، بهترین گروه‌بندی را نشان داد که توسط آزمون T^2 هتلینگ و CCC تعیین گردید. بر این اساس، با رسم خط برش در محل تعیین شده بر روی نمودار، چهار گروه ایجاد گردید که شامل گروه‌های: (۱) داراب ۲، (۲) قدس، امید و اترک، (۳) سرداری و ارونند و (۴) شامل دو زیر گروه می‌باشد: الف) فلات، زرین، کارچیا، تاجن، بولانی و کویر و ب) طبسی، سرخ‌تخم، سبلان، شعله، روشن، اینیا، الموت، نیک‌نژاد، میهن، مهدوی، ماهوت، گلستان، چمران، بزوستانیا و آزادی می‌باشند. تجزیه خوشه‌ای یک روش آماری چند متغیره می‌باشد که هدف اولیه آن گروه‌بندی افراد براساس میزان تشابه می‌باشد، به طوریکه افراد مشابه از نظر صفات (نشانگرهای) مورد بررسی، در یک خوشه

واحد کنار هم قرار می‌گیرند. یکی از نکات مهم در ارزیابی دندروگرام ترسیم شده، بررسی اطمینان نقاط شاخه‌های مختلف داخل یک درخت می‌باشد. آزمون‌های آماری متفاوتی برای ارزیابی درخت ترسیم شده وجود دارد، اما این آزمون‌ها پیچیده هستند زیرا درخت ترسیم شده بیشتر ژنومتریکی است تا عددی. بنابراین صحت و دقت یک بخش از درخت ممکن است کمتر یا بیشتر از صحت بخش‌های دیگر باشد (۱۳).

بر اساس داده‌های علائم بیماری و همچنین گزارش‌های فلاحی‌چرخایی (۸) و تقوی و کشاورز (۱)، رقم امید به عنوان رقم مقاوم به بیماری بلایت و رقم گلستان به عنوان رقم حساس به بلایت در مجموعه ارقام انتخابی قرار دارند. بر این اساس، گروه اول که شامل رقم داراب ۲ بود، در برخی آغازگرها باند تشکیل نداد و در خوشه‌ای جداگانه قرار گرفت. لذا گروه اول و دوم شامل ارقام مقاوم، گروه سوم شامل ارقام نیمه حساس و گروه چهارم شامل ارقام حساس می‌باشند.

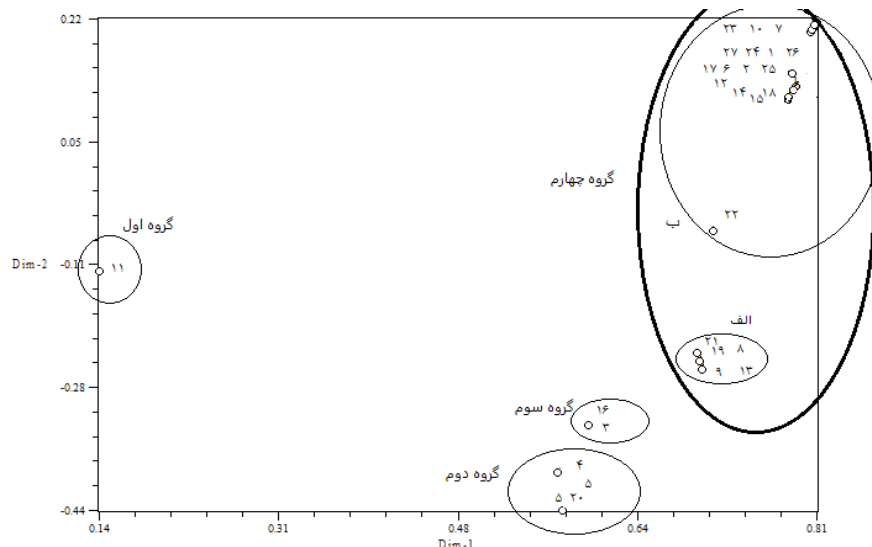
گروهی جدا، مابین ارقام مقاوم و حساس قرار گرفتند. بیشترین فاصله ژنتیکی میان ارقام داراب ۲ و قدس با رقم آزادی به دست آمد. ارقام ماهوتی و مهدوی دارای کمترین فاصله ژنتیکی نسبت به یکدیگر بودند. ارقام قدس و امید و اترک را که از نظر مولکولی و مورفولوژیکی به عنوان والد مقاوم تشخیص داده شده‌اند را در صورت مناسب بودن صفات موردنظر، در برنامه به‌نژادی به عنوان والد دهنده مقاومت در روش اصلاحی تلاقی برگشتی می‌توان استفاده کرد. همچنین در سایر برنامه‌های به‌نژادی، مانند استفاده از هتروزیس و مهندسی ژنتیک در جهت سازگاری بیشتر با شرایط کشور می‌توان از این ارقام مقاوم استفاده نمود. بیشترین فراوانی ارقام در گروه ۴ بود که این نشان دهنده تشابه ژنتیکی بسیار نزدیک این ارقام نسبت به یکدیگر می‌باشند. در ارقام حساس تفاوت اندکی بین گروه‌بندی مولکولی و مورفولوژیکی مشاهده گردید.

صحراگرد (۴) بررسی مقاومت ارقام تجاری گندم به *Pss* را در مرحله سه برگه ارزیابی و مشخص نمود که پس از ۴۰ روز (مرحله به ساقه رفتن) در ارقام گندم روشن، امید، قدس و گاسپارت و ارقام جو علائم بیماری کاهش یافت و فقط لکه بافت مرده کوچک باقی ماند. همچنین بر طبق گزارش تقوی و کشاورز (۱)، ارقام فلات، TR80، C 73-5 و اروند جهش‌یافته مصون و ارقام اروند، اترک، سرخ‌تخم، نیک‌نژاد، M-73-18 و Fr 319 به عنوان ارقام مقاوم گزارش شدند. در حالی که در پژوهش حاضر بر اساس داده‌های مولکولی و درصد آلودگی برگه محاسبه شده و نیز در پژوهش فلاحی چرخابی (۸) ارقام سرخ‌تخم و نیک‌نژاد به *Pss* حساس بودند. همچنین در پژوهش فلاحی چرخابی (۸) ارقام اترک، فلات، اروند نیز حساس معرفی شدند در حالیکه در این پژوهش رقم اترک در گروه ارقام مقاوم به بیماری قرار گرفت. همچنین ارقام سرداری و اروند در

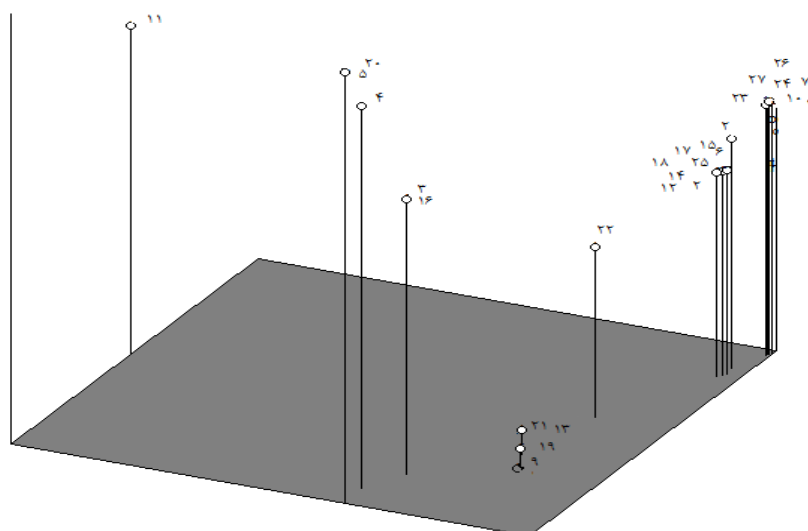


شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۷ ژنوتیپ گندم مورد مطالعه بر مبنای مشاهدات مولکولی

در تحقیق دانست. همچنین از آنجا که منابع ژنی می‌توانند فنوتیپ‌های مشابهی را برای ژن‌های متفاوت آشکار کنند، این نتایج دور از انتظار نیست. نمودارهای دو بعدی (شکل ۳) و سه بعدی (شکل ۴) پراکنش ارقام نیز تا حدودی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تایید کردند.



شکل ۳- نمودار دو بعدی مربوط به ۲۷ ژنوتیپ گندم مورد مطالعه: اسامی ارقام با اعداد جایگزین گردیده اند: ۱- آزادی، ۲- الموت، ۳- الوند، ۴- اترک، ۵- امید، ۶- اینیاء، ۷- بزوستانیا، ۸- بولانی، ۹- تجن، ۱۰- چمران، ۱۱- داراب ۲، ۱۲- روشن، ۱۳- زرین، ۱۴- سیلان، ۱۵- سرخ تخم، ۱۶- سرداری، ۱۷- شعله، ۱۸- طبسی، ۱۹- فلات، ۲۰- قدس، ۲۱- کارچیا، ۲۲- کویر، ۲۳- گلستان، ۲۴- ماهوتی، ۲۵- مهدوی، ۲۶- میهن و ۲۷- نیک‌نژاد.



شکل ۴- نمودار سه بعدی مربوط به ۲۷ ژنوتیپ گندم مورد مطالعه: اسامی ارقام با اعداد جایگزین گردیده اند: ۱- آزادی، ۲- الموت، ۳- الوند، ۴- اترک، ۵- امید، ۶- اینیاء، ۷- بزوستانیا، ۸- بولانی، ۹- تجن، ۱۰- چمران، ۱۱- داراب ۲، ۱۲- روشن، ۱۳- زرین، ۱۴- سیلان، ۱۵- سرخ تخم، ۱۶- سرداری، ۱۷- شعله، ۱۸- طبسی، ۱۹- فلات، ۲۰- قدس، ۲۱- کارچیا، ۲۲- کویر، ۲۳- گلستان، ۲۴- ماهوتی، ۲۵- مهدوی، ۲۶- میهن و ۲۷- نیک‌نژاد.

در داخل خزانه ژنی گندم استفاده کرد. در این پژوهش، ۱۲ آغازگر مورد استفاده ۱۷۰ مکان قابل ارزیابی تولید کردند که از این تعداد ۱۵۶ باند چندشکل ایجاد گردید. نتایج این پژوهش بیان کرد که یافتن مارکر ISSR مرتبط با ژن مقاومت به بلایت باکتریایی در گندم به اصلاح‌گران این گیاه کمک می‌نماید تا ژنوتیپ‌ها را با سرعت و کارایی بالا برای این ژن مورد غربالگری قرار دهند. همچنین این مارکر به تکمیل نقشه ژنتیکی گندم کمک می‌نماید و از میان آغازگرهای استفاده شده، آغازگرهای F_5 و F_{10} به دلیل نشان دادن He و PIC بالا مناسب‌ترین آغازگرها برای مطالعات بعدی تشخیص داده شدند.

تعداد زیاد مکان‌های تکثیر شده در این آزمایش نشان می‌دهد که تعداد کمی از آغازگرهای ISSR با میزان اطلاعات چندشکل بالا، می‌تواند تعداد زیادی نمونه و جمعیت‌های مختلف گندم را تفکیک کند. چندشکلی بالا در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای نشانگر ISSR، پراکندگی جغرافیایی و تعداد ژنوتیپ مورد بررسی نسبت داد. این میزان چندشکلی از یک طرف نشان دهنده کارایی کاربرد این نشانگرها در مطالعه ژرمپلاسم گندم ایرانی و از طرف دیگر نشان دهنده توزیع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی وسیع این گیاه در ایران می‌باشد. همچنین می‌توان از این ارقام و لاین‌ها جهت معرفی ژن‌های جدید

منابع

- ۱- تقوی، س. م. و کشاورز، ک. ۱۳۸۱. شناسایی عامل سوختگی برگ گندم و واکنش ارقام مختلف گندم نسبت به آن‌ها در استان فارس و استان کهگیلویه و بویراحمد. علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی). ۶: ۱۷۹-۱۷۱.
- ۲- رحیمیان، ح. ۱۳۶۸. وقوع سوختگی برگ باکتریایی در گندم. نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، مشهد، ایران. ص ۱۴۶.
- ۳- شفیع، ا.، ملکی زنجانی، ب.، کرمی، ث. و ایمانی خواه، ف. ۱۳۸۹. ردیابی ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای Lr_{32} در ارقام و لاین‌های گندم ایرانی با استفاده از آزمون تیپ آلودگی و نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن Lr_{32} . مجله پژوهش‌های تولید گیاهی. ۷(۳): ۳۷-۲۱.
- ۴- صحراگرد، ن. ۱۳۷۹. مقاومت گندم به بلایت برگی باکتریایی. مجموعه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. صفحه ۲۴۳.
- ۵- صفری، ه.، شیروانی، ه. و فریدونی ل. ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های چچم دائمی (*Lolium prene*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی و بیوشیمیایی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۰(۴): ۵۲۳-۵۳۳.
- ۶- عبدمیثانی، س. و شاه‌نجات بوشهری، ع. ا. ۱۳۷۷. اصلاح نباتات تکمیلی (جلد دوم). انتشارات دانشگاه تهران. ۳۵۲ صفحه.
- ۷- فتحی، ط.، سوهانی، م. م.، سمیع‌زاده لاهیجانی، ح. ا. و مهرابی، ع. ا. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های *Aegilops triuncialis* در مناطق غربی ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۵(۱): ۹۳-۸۵.
- ۸- فلاحی چرخابی، ن.، شمس‌بخش، م.، رحیمیان، ح.، خداگان، پ. و رستگار، م. ح. ۱۳۹۴. تعیین ویژگی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (Pss) عامل بیماری بلایت باکتریایی گندم در استان کرمان و ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های ایرانی گندم نسبت به آن. آفات و بیماری‌های گیاهی، ۸۳(۱): ۵۰-۳۹.
- ۹- قره‌یاضی، ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. مجموعه مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات. اصفهان. صفحات ۳۲۸-۳۳۰.
- ۱۰- کیا، ش. و ترابی، م. ۱۳۸۷. تاثیر آلودگی به سپتوریوز برگ (*Septoria tritici* Rob. Ex Desm.) در مراحل مختلف رشد بر عملکرد و اجزای عملکرد ارقام گندم در گرگان. به نژادی نهال و بذر. ۲۴(۲): ۲۳۷-۲۵۰.
- ۱۱- مسعودی، ح.، صبوری، ح.، طلیعی، ف. و آلت‌جعفر بای، ج. ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط برای صفات مورفوفنولوژیک و مقاومت به بیماری سفیدک پودری در ژرمپلاسم گندم با استفاده از نشانگرهای ISSR، IRAP، iPBS. زیست‌فناوری گیاهان زراعی. ۷(۱۸): ۵۶-۴۱.

- ۱۳- نقوی، م. ر.، قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. ۱۳۹۲. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۸ صفحه.
- ۱۴- Carvalho, A., Lima Brito, J., Macas, B. and Guedes-Pinto, H. (2009). Genetic diversity and variation among botanical varieties of old Portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. *Biochemistry Genetics*, 47: 276-294.
- ۱۵- FAO. 2009. Statistical database. Available online: [Http://www. FAO.org](http://www.FAO.org).
- ۱۶- Greenbaum, G., Templeton, A. R., Zarmi, Y. and Bar-David, S. 2014. Allelic Richness following Population Founding Events – A Stochastic Modeling Framework Incorporating Gene Flow and Genetic Drift. *PLOS ONE*, 1-23.
- ۱۷- Haji Allahverdipoor, K., Bahramnejad, B. and Amini, J. 2011. Selection of Molecular markers associated with resistance to Fusarium wilt disease in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using multivariate statistical techniques. *Australian Journal of crop science*, 5(13): 1801- 1809.
- ۱۸- Li, Q., Liu, Q.C., Zhai, H., Ma, D.F., Wang, X., Li, X.Q. and Wang, Y.P. 2008. Genetic diversity in main parents of sweet potato in china as revealed by ISSR Markers. *Acta Agronomica Sinicia*, 34 (6): 972-977.
- ۱۹- Mengoni, A., Gori, A. and Bazzicalupo, M. 2000. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breeding*, 119: 113-117.
- ۲۰- Milus, E. A. and Chalkley, D. B. 1994. Virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* on selected wheat genotypes. *Plant Disease*, 78: 612-615.
- ۲۱- Mirzaei, K. and Mirzaghaderi, G. 2015. Genetic diversity analysis of Iranian *Nigella sativa* L. landraces using SCoT markers and evaluation of adjusted polymorphism information content. *Plant Genetic Resources*, 15(1): 64-71.
- ۲۲- نظری، م. و عبدالشاهی، ر. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان (*Triticum aestivum* L.) از طریق صفات مورفوفیزیولوژیک و نشانگر مولکولی SSR. *بیوتکنولوژی کشاورزی*. ۶(۱): ۲۱۵-۲۳۱.
- ۲۳- Toben, H., Mavridis, A. and Rudolph, K. 1991. Zum Vorkommen der basalen Spelzenfäule und Weizen und Gerste, hervorgerufen durch *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, in West-Deutschland. *Zeitschrift für Pflanzkrankheiten und Pflanzenschutz*. 98: 225-235.
- ۲۴- Valencia Botin, A. J., Mendoza Onofre L. E., Silva Rojas, H. V., Valadez Moctezuma, E., Cordova Tellez, L. and Villase Nor Mir, H. E. 2011. Effect of *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* on yield and biomass distribution in wheat. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9: 1287-1297.
- ۲۵- Valencia Botin, A. J., Mendoza Onofre, L. E., Silva Rojas, H. V., Cordova, L., EspinosaVictoria, D., Valadez Moctezuma, E. and Villasenor Mir, H. E. 2007. Aggressiveness estimates and inoculation methods of pathogenic bacteria on seeds and seedlings of wheat 'Seri M82'. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30 (3): 255-259.
- ۲۶- Younis, R. A. A., Ismaeil O. M. and S.Soliman, S. 2008. Identification of Sex- specific DNA Markers for Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Using RAPD and ISSR Techniques. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4: 278-284.

Study of genetic diversity of wheat bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*) using ISSR molecule marker in Iranian native wheat cultivars

FatemiFard S.Z., Masoumiasl A. and Rezaei R.

Dept. of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Yasuj, Yasuj, I.R. of Iran

Abstract

Bread wheat is the most important crop in the world whose yield is affected by several diseases including bacterial leaf blight. The most appropriate method for managing this disease is using resistant cultivars. DNA markers are highly effective in plant grouping in terms of resistance to diseases, and among these markers, the ISSR marker is recommended because of the do not need for prior information from the DNA sequencing and its easy and fast implementation. In this research, genetic variation of 27 Iranian indigenous wheat cultivars with respect to resistance to bacterial blight was investigated using 12 ISSR primers, which produced 170 evaluable bands, of which 156 were polymorphic bands. The highest percentage of polymorphic bands was belonged to F7, F8 and F10 primers, and the lowest of it was related to F9 primer. The highest content of the polymorphism information content (PIC) was belonged to the F10 and F5 primers and the smallest value belonged to the F7 primer. Cluster analysis classified these cultivars into four groups: Ghods, Omid and Atrak cultivars in the cluster of resistant group and other cultivars in sensitive and very sensitive group. The high polymorphism obtained in this study can be attributed to the high efficiency of the ISSR marker in evaluating the genetic diversity of wheat cultivars in terms of resistance to various diseases.

Key words: genotype, cluster analysis, polymorphism, molecular marker