

گروه بندی ارقام گندم نان با استفاده از داده های مورفولوژیکی و مارکر مولکولی RAPD

مرتضویان ***^۱، سیدمحمد مهدی^۱، رامشینی^۱، حسینی^۱، نقوی^۲، محمدرضا
۱ دانشجویان دکتری اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
۲ استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

چکیده

بمنظور گروه بندی ارقام گندم نان و بررسی تطابق نتایج حاصل از داده های مورفولوژیکی و مارکر RAPD، آزمایشی بر روی ۱۳ ژنوتیپ گندم نان صورت گرفت. داده های مورفولوژیکی بر اساس ۱۶ صفت مرتبط با عملکرد از نتایج حاصل از آزمایش مزرعه ای حاصل از ۱۰ بوته تصادفی بدست آمد. در آزمایش RAPD با استفاده از ۱۷ پرایمر تصادفی ۴۵ نشانگر چندشکل بدست آمد. تجزیه های آماری چند متغیره مولفه های اصلی و مختصات اصلی و نیز تجزیه کلاستر بر مبنای روش دورترین همسایه ها برای هر یک از دو آزمایش انجام شد و مقایسه دو کلاستر بر اساس ضریب کوفنتیک، عدم همبستگی بین دو سری داده های مورفولوژیکی و مولکولی را نشان داد که علت آن را می توان تکثیر تصادفی نواحی هتروکروماتینی ژنوم در بررسی های مولکولی دانست.

کلمات کلیدی: گندم، RAPD، صفات مورفولوژیکی، تجزیه به مولفه های اصلی، تجزیه به مختصات اصلی.

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum*) گیاهی است که به مقدار زیاد و در مساحت وسیعی از زمینهای کشاورزی دنیا کشت می شود. این گیاه از نظر تولید و سطح زیر کشت مهمترین محصول کشاورزی ایران است (۱). کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه های مورد نظر در برنامه های اصلاحی، امکان سازمان دهی ژرم پلاسم و نمونه گیری مؤثر از ژنوتیپ ها را فراهم می سازد. (۳) نخستین ارزیابی های تنوع بر اساس نتایج مورفولوژی و ارزیابی صفات زراعی بوده است که هنوز هم عمدتاً بدلیل سادگی آنها و البته بسته به هدف محقق و میزان دقت مورد نظر برای وی مورد استفاده قرار می گیرند. نشانگرهای مورفولوژیکی در واقع نتیجه جهش های قابل رویت در شکل ظاهری موجود بوده و در صورتی می توانند به عنوان نشانگر مورد استفاده قرار گیرند که بیان آنها در طیف وسیعی از محیط های مختلف قابل تکرار باشد. بهرحال، به دلیل کم بودن تعداد، وابستگی به تغییرات محیطی و مرحله رشدی گیاه و نیز وجود اثرات غالبیت، اپی ستازی و نظایر آن در اینگونه مارکرها استفاده از آنها محدود می باشد بعلاوه اینکه پیشرفت های شکرگرف اخیر در زمینه زیست شناسی مولکولی، امکانات بدست آوردن اطلاعات بیشتر و دقیق تر تنوع را فراهم آورده است. (۲، ۳) در اصلاح نباتات دوری و نزدیکی مواد اصلاحی از همدیگر از معیارهای انتخاب والدین برای تلاقی و ایجاد تنوع لازم جهت انتخاب بهترین ارقام است. هدف تجزیه کلاستر بدست آوردن گروه های حتی الامکان یکنواخت است. با تجزیه نشانگری و در نهایت ترسیم دندروگرام موقعیت ژنتیکی ارقام نسبت به هم مشخص شده و انتخاب والدین برای آمیزش های بعدی جهت شروع برنامه های اصلاحی با اطمینان بیشتری همراه است (۴). تکنیک RAPD یکی از تکنیک های است که به طور گسترده در بررسی های ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد. زیرا قادر است با استفاده از مقادیر کم DNA اختلاف موجود بین گیاهان را در سطح DNA شناسایی کند و نیاز به اطلاعات قبلی در مورد ژنوم ندارد. به دلیل اینکه در RAPD از آغازگرهای تصادفی استفاده می شود و دمای اتصال آغازگر نیز پائین است آغازگر به جایگاه اختصاصی متصل نمی شود و بنا به تعریف غیر اختصاصی نامیده می شود (۴).

مواد و روش ها

در این مطالعه ۱۳ رقم زراعی ایران یعنی سرداری، شاین، تجن، بولانی، طیبسی، الوند، بزوستایا، 518، فلات، روشن، قدس، گلستان، آذر ۲ مورد بررسی قرار گرفت. کاشت در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام شد و یادداشت برداری ۱۶ صفت مختلف مرتبط با عملکرد گندم از ۱۰ بوته تصادفی در مراحل مختلف رشد صورت گرفت. استخراج DNA بر اساس روش تصحیح شده مینی پرپ انجام شد. آزمایش مولکولی با استفاده از ۱۷ پرایمر ده نوکلئوتیدی از سری پرایمرهای UBC و در حجم واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. در نهایت، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل ۶٪ اکرلامید تفکیک شد. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام شده و باندهای حاصل اسکوئربندی گردید. برای تجزیه داده ها ابتدا ماتریس صفر و یک تشکیل شد. ماتریس داده ها که در آن ردیف ها نماینده ژنوتیپ ها و ستونها نماینده نشانگرها بودند در نرم افزار NTSYS pc-2.02e مورد تجزیه و تحلیلی قرار گرفت. در این

تحقیق از روش ضریب تشابه نی و لی (Nei and Li) یا Dice ($S_{ij} = \frac{2a}{2a+b+c}$) که در آن تشابه بین دو فرد i و j

است، برای محاسبه ضرایب تشابه استفاده شد. بعد از تجزیه خوشه ای ماتریس کوفنتیک بدست آمد. بدلیل کیفی بودن داده های مارکری از روش تجزیه به مختصات اصلی (PCO). برای ترسیم بای پلات استفاده شد. تجزیه کلاستر صفات مورفولوژیکی نیز پس از تشکیل ماتریس همبستگی بین ارقام بر اساس روش دورترین همسایه ها انجام شد. از روش تجزیه به مولفه های اصلی برای ترسیم بای پلات مولفه های نخست بمنظور بررسی مورفولوژیکی ارقام استفاده شد. جهت مشخص شدن رابطه میزان همبستگی بین دندروگرام های حاصل از داده های مارکری و مورفولوژیکی با همدیگر از آزمون مانتل استفاده شد (۵).

نتایج و بحث

تجزیه کلاستر بر اساس روش دورترین همسایه ها انجام شد (شکل های ۳ و ۴). این روش چنانچه ارقام از نظر ژنتیکی خیلی به هم نزدیک باشند از بقیه روش ها کارایی بالاتری در تفکیک ارقام دارد. دو مولفه نخست تجزیه به مختصات اصلی ۴۷ درصد تغییرات را توجیه نمود. تجزیه به مولفه های اصلی بر روی داده های مورفولوژیکی نیز انجام گرفت (جدول ۱ و ۲).

بر اساس نتایج بدست آمده سه مولفه اول در مجموع ۷۴ درصد تغییرات را توجیه نمودند. مولفه اول که تقریباً ۳۴ درصد از تغییرات را توجیه می‌کرد دارای ضرایب بزرگی برای صفات طول خوشه، وزن خوشه، تعداد دانه در خوشه و عملکرد کل خوشه بود. عبارتی می‌توان این مولفه را خصوصیات مرتبط با خوشه نامید که نشان دهنده وجود تغییرات تکرارپذیر از نظر این صفات می‌باشد. مولفه دوم بیشتر تحت تأثیر صفاتی نظیر تعداد سنبلچه در خوشه و تراکم سنبلچه بود. بای پلات مربوط به تجزیه به مولفه های اصلی و تجزیه به مختصات اصلی رسم شد و مقایسه این دو مشابهت کمی را نشان داد (شکل های ۱ و ۲). برای کلاسترهای حاصل از داده های مورفولوژیکی و مولکولی ماتریس های کوفنتیکی توسط نرم افزار NTSYS محاسبه شد. سپس بمنظور مقایسه دو کلاستر، دو ماتریس کوفنتیک با آزمون ماننل مقایسه شدند. نتایج مقایسه تشابه دو کلاستر بر اساس ماتریس های کوفنتیک دو روش صفات مورفولوژیکی و مارکر مولکولی همبستگی معنی داری نشان نداد ($r=0/02$). یکی از دلایل احتمالی عدم همخوانی دو کلاستر را می‌توان ماهیت نشانگر RAPD یعنی تصادفی بودن آن دانست زیرا ممکن است تکثیر از مناطق هتروکروماتینی انجام شده باشد که در اینصورت باندهای حاصله نمی‌توانند نماینده ژنهایی باشند که بیان آن‌ها صفت کمی را باعث شده است.

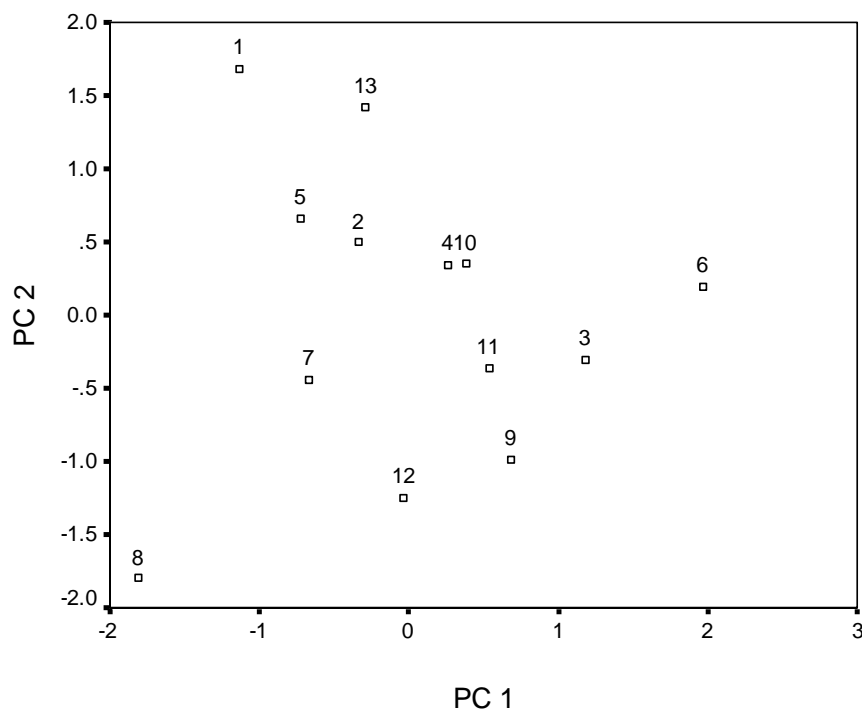
جدول ۱- ضرایب بردارهای ویژه برای سه مولفه اول صفات مورفولوژیکی بر اساس تجزیه به مولفه های اصلی

Vector	خصوصیات خوشه	تراکم سنبلچه	
تعداد پنجه	1.1005	0.5731	1.1688
ارتفاع بوته	-1.1706	1.3061	0.4615
طول پدانکل	0.1618	1.1353	0.7468
تعداد گره	-1.0732	-0.3728	0.0118
طول خوشه	2.0717	-0.0680	-0.2473
تعداد سنبلچه در خوشه	0.8147	-1.4501	-0.4730
تراکم سنبلچه	-0.4985	-1.7146	-0.3088
طول ریشک	0.6771	0.3088	1.0707
وزن خوشه	2.2527	-0.1553	-0.2220
وزن تمام خوشه ها	2.1797	0.1546	0.3472
تعداد دانه در خوشه	1.7768	-0.8622	0.2933
عملکرد خوشه	-0.4279	1.0191	-0.3354
عملکرد تمام خوشه ها	2.2077	0.1613	0.2418
وزن ۳۰۰ دانه	0.5966	1.3428	-1.0095
طول دانه	0.5888	1.3519	-0.9279
عرض دانه	1.0680	0.5624	-1.0694

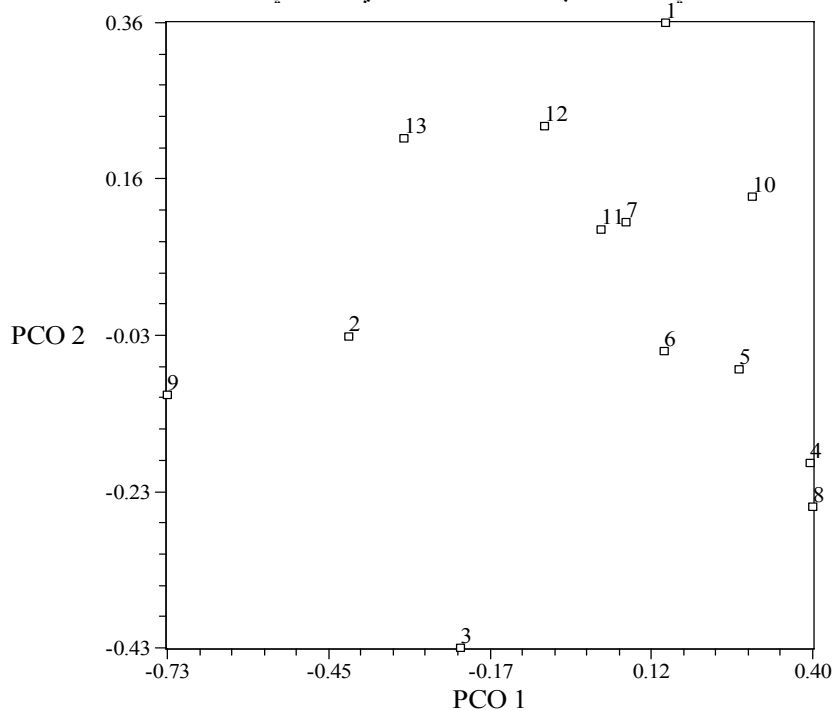
جدول ۲- مقادیر ویژه صفات مورفولوژیکی بر اساس تجزیه به مولفه های اصلی

مقدار	درصد	درصد تجمعی
مولفه های اصلی		
PC1	5.41	33.83
PC2	3.80	23.72
PC3	2.67	16.67
PC4	1.29	8.07
PC5	1.02	6.38
PC6	0.87	5.46
PC7	0.47	2.91
PC8	0.18	1.15
PC9	0.16	0.98
PC10	0.09	0.54
PC11	0.04	0.24
PC12	0.01	0.05
PC13	0.00	0.00
PC14	0.00	0.00
PC15	0.00	0.00
PC16	0.00	0.00

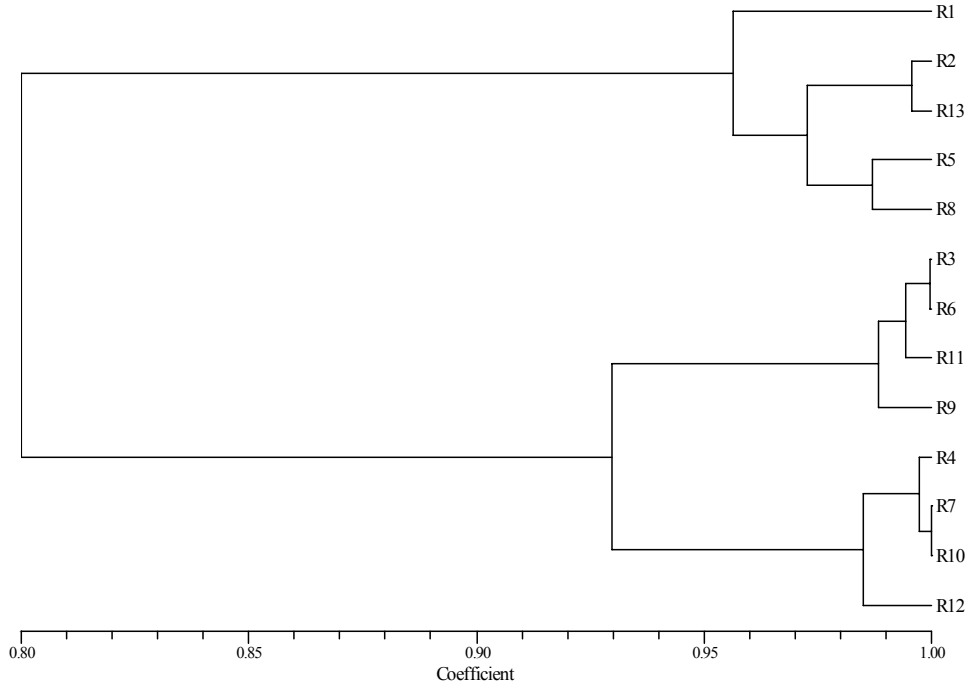
شکل ۱- بای پلات دو مولفه اصلی اول ژنوتیپ ها بر اساس صفات مورفولوژیک



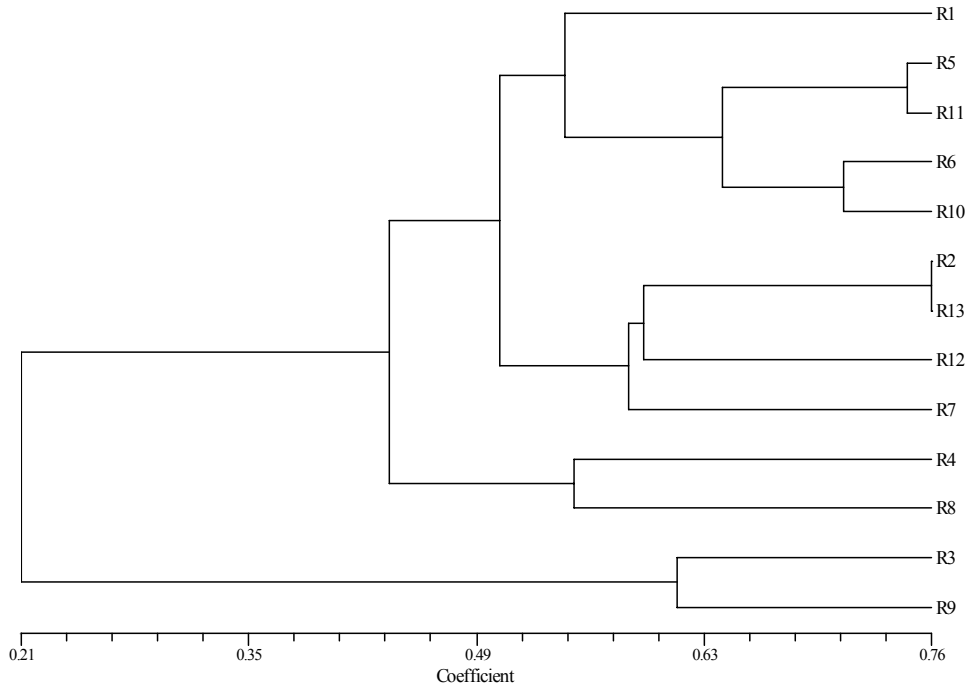
شکل ۲- بای پلات دو مولفه اصلی اول ژنوتیپ ها بر اساس داده های مولکولی



شکل ۳- دندروگرام ژنوتیپ ها بر اساس صفات مورفولوژی بر مبنای روش دورترین همسایه ها



شکل ۴- دندروگرام ژنوتیپ ها بر اساس نشانگر RAPD بر مبنای روش دورترین همسایه ها



منابع

- ۱- عبدالمهدی مندولکاتی، ب. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی ارقام ولاین های گندم با روش RAPD-PCR. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی تهران.
- ۲- قره‌بیاضی، ب. (۱۳۷۵) کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. مجموعه مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه ۳۲۸-۳۳۰.
۳. عبدمیثانی، س. و ع. ا. شاه نجات بوشهری (۱۳۷۷) اصلاح نباتات تکمیلی (جلد دوم). مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۳۵۲ صفحه
4. Garcia, M. G., M. Ontivero, J. C. Diaz Rici & A. Castagnaro (2002) Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina. *Plant Breeding*. 121: 76-80.
5. Powel, W., M. Morgant, C. Andre, M. hanfey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (micro satellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 2:225-238.
6. Simioniuc, D., R. Uptmoor, W. Friedt & F. Ordon (2002) Genetic diversity and relationship among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breeding*. 121:429-435.

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop