

استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در شناسایی منابع مقاوم و حساس به گونه‌های زنگ در ارقام مختلف گندم

بهمن فاضلی نسب^{۱*} و محمدرضا نقوی^۲

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع

طبیعی، دانشگاه تهران

۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

تاریخ وصول: ۱۳۸۸/۱۲/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۱۳

چکیده

در این پژوهش جهت بررسی قابلیت نشانگر ریزماهواره در ارزیابی رابطه ژنتیکی و امکان تفکیک ۴ رقم گندم مقاوم و حساس به زنگ‌های قهوه‌ای، زرد و سیاه از ۳۴ جفت آغازگر استفاده شد. ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه نی و لی و روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA خوشه بندی و شباهت ژنتیکی نیز با استفاده از روش نی و لی محاسبه شد. میانگین شاخص چندشکلی برای آغازگرهای ریزماهواره ۰/۵۳ بدست آمد. ارقام طبسی و اینیاء دارای کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۱۱۷) و ارقام روشن و طبسی دارای بیشترین میزان شباهت ژنتیکی (۰/۵۲۷) و میانگین کل (۰/۲۵۵) بدست آمد. تعداد آلل تولید شده از ۱ تا ۷ متغیر و میانگین تعداد آلل در هر جایگاه ۳ و در مجموع ۱۰۱ آلل تکثیر شد. ارقام دو گروه حساس و مقاوم از همدیگر تفکیک شدند. نتایج حاصله نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره قادرند چندشکلی بسیار بالا و مطمئن ارائه دهند.

واژه‌های کلیدی: ریزماهواره، زنگ، شباهت ژنتیکی، مقاوم و حساس، گندم

مقدمه

سه نوع بیماری زنگ به نام‌های زنگ ساقه (سیاه)، زنگ برگ (قهوه‌ای) و زنگ خطی (زرد) که گندم را آلوده می‌کنند از نظر فیلوژنی (تکاملی) به دوره کربونفر در حدود ۲۵۰ میلیون سال قبل بر می‌گردند. جوش‌ها و لکه‌هایی که خشک و پودری هستند و به رنگ‌های سیاه، قهوه‌ای و زرد بوده و اندازه آن‌ها روی ارقام مختلف، در درجات حرارتی، رطوبتی و نژادی متفاوت می‌باشد. تمام اندام هوایی گیاه علائم بیماری را نشان داده و در بهار و تابستان مشخص‌تر و امکان دارد گیاه نشانه‌هایی بیش از یک زنگ را نشان دهد. خسارت‌های فراوانی را این بیماری در همه کشورها سبب شده است. اپیدمی زنگ قبل از گل‌دهی یا همزمان با آن اتفاق می‌افتد و آلودگی خوشه زیان فراوانی به بار می‌آورد. زیان زنگ‌ها علاوه بر کاهش محصول، ارزش علوفه را نیز تقلیل داده و گیاه را نسبت به شرایط نامساعد زمستان و ابتلا به سایر بیماری‌ها آسیب پذیر می‌سازد و از قدرت رشد گیاه و ریشه‌زایی آن می‌کاهد و گاهی می‌تواند برای دام‌ها نیز سمی باشد (۱۵، ۱۸، ۲۰ و ۲۴).

بیماری زنگ گندم روی کاهش عملکرد در ایران نقش ویژه‌ای داشته بطوری که در سال‌های زراعی ۱۳۷۱-۱۳۷۲، حدود ۳۰ درصد محصول کل کشور را از بین برده است (۱) اما در کل برخی منابع کاهش عملکرد گندم را از حدود ۱۰ درصد در شرایط عادی و تا حدود ۶۰ درصد تحت شرایط حاد ذکر کرده‌اند (۳).

بسیاری از نژادهای زنگ که در گذشته خسارت‌بار بوده‌اند امروزه به دلیل استفاده از ارقام مقاوم کنترل شده‌اند. در عین حال نژادهای جدیدی از عوامل بیماری‌زا که در اثر موتاسیون و یا نوترکیبی بوجود آمده و قدرت بیماری‌زایی بالایی روی محصول دارند، کار را مشکل‌تر کرده‌اند از این جهت شناسایی تنوع بین ارقام مقاوم و حساس به زنگ در سطح DNA از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد و از

آنجائیکه این روش از سرعت بالایی برخوردار است، سودمند و قابل توجه می‌باشد (۱ و ۳).

ریزماهوره‌ها توالی‌های تکراری ۶-۲ نوکلئوتیدی هستند که به تعداد فراوان و به صورت یکنواخت در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها و در نواحی رمزکننده و غیر رمزکننده DNA پراکنده‌اند (۱۱ و ۱۶). این جایگاه‌های ژنی از تنوع بسیار بالای آللی برخوردار هستند و بر طبق قوانین مندلی و به صورت هم‌باز به نتاج منتقل می‌شوند و سطوح بسیار بالای چندشکلی را در تعداد توالی تکرار شونده از خود نشان می‌دهند (۳۲ و ۳۳). فناوری ریزماهوره‌ها بر پایه تکثیر قطعه DNA تکرار شونده با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از نواحی مجاور توالی‌های تکراری با محتوای ۵۰ درصد GC، و از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس مشخص می‌شود و نتایج مربوط به آن در آزمایشگاه‌های مختلف جهان براحتی قابل تکرار است (۵، ۱۶، ۱۸ و ۳۲).

ریزماهوره‌ها در گیاهان جهت تهیه نقشه ژنتیکی گندم، بررسی چندشکلی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مهم زراعی بکار برده شده‌اند (۹، ۱۱، ۳۱ و ۳۲). تاکنون مطالعات زیادی توسط بریان و همکاران (۱۹۹۷)، بوهن و همکاران (۱۹۹۹)، پراساد و همکاران (۲۰۰۰)، ماکافری و همکاران (۲۰۰۳)، وی و همکاران (۲۰۰۵)، لندجوا و همکاران (۲۰۰۶) و سالم و همکاران (۲۰۰۸) در این ارتباط گزارش شده است.

هدف از این تحقیق استفاده از نشانگرهای ریزماهوره در شناسایی منابع مقاوم و حساس به گونه‌های زنگ در بین ارقام مختلف گندم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از ۴ رقم گندم به نام‌های تجن، اینیاء، طبسی و روشن استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱- نام و مشخصات ارقام مورد استفاده در این آزمایش*

ردیف	رقم	سطوح مقاومت به زنگها			تیپ رشد	میداء
		قهوه ای	سیاه	زرد		
۱	تجن	مقاوم	مقاوم	مقاوم	بهاره	مکزیک
۲	طیسی	حساس	حساس	حساس	بهاره	ایران (محلای طبس)
۳	روشن	حساس	حساس	حساس	بینابین	ایران (محلای اصفهان)
۴	اینپاء	مقاوم	مقاوم	مقاوم	بینابین	مکزیک

*برگرفته از شبکه اطلاع رسانی گندم ایران (www.iranwheat.ir)

استخراج و تکثیر DNA

استخراج DNA ژنومی بر مبنای روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد. از میان تعداد زیادی آغازگرهای ریزماهواره گندم که توسط رادر و همکاران (۱۹۹۸) گزارش شده بود، تعداد ۳۴ جفت آغازگر برای این تحقیق انتخاب شد (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر اساس دستورالعمل رادر و همکاران (۱۹۹۸) صورت گرفت. فرآورده‌های PCR به نسبت مساوی با رنگ فوراماید (۹۸ درصد) مخلوط و مقدار ۳-۵ میکرولیتر از آن برای ژل پلی‌اکریل‌امید واسرشته‌ساز استاندارد (شش درصد) (در دستگاه Bio Rad, Sequi-Gen GT) و بافر TBE (1x) مورد استفاده قرار گرفت. در ضمن عمل پیش‌ران با توان ثابت ۹۰ وات و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد (زمان تا رسیدن به دمای ۵۵) و عمل رانینگ با ثابت ۸۵ تا ۹۰ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با مدت زمانی خاص بسته به طول قطعه تکثیر شده توسط هر آغازگر انجام گردید و رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌امید با استفاده از روش نیترات نقره بر اساس دستورالعمل باسام و همکاران (۱۹۹۳) به این شرح که ابتدا ژل‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول حاوی اسیداستیک ۱۰ درصد جهت ثابت شدن باندها قرار گرفتند سپس دو بار پنج دقیقه ای با آب مقطر شستشو داده شدند. بعد از شستشو، ژل‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول حاوی ۰/۲ درصد نیترات نقره و ۰/۱۵ درصد فرم‌آلدئید قرار گرفتند و مجدداً به مدت ۵-۸ ثانیه با آب مقطر سرد شستشو داده شدند و نهایتاً جهت ظهور باندها ژل‌ها در محلول حاوی ۰/۱۵ درصد فرمالدئید، ۱۰ میکرولیتر

تیوسولفات سدیم به ازاء ۲۰ سی سی آب مقطر و ۰/۳ درصد گرم کربنات سدیم قرار داده شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوی نواری بصورت حضور (یک) و عدم حضور (صفر) برای هر نوار صورت گرفت. ماتریس تشابه از روش نی و لی (۱۹۷۹) محاسبه گردید. شاخص چندشکلی که میزان آن از صفر تا یک گزارش شده (۵) با استفاده از فرمول $DI = 1 - \sum (P_j)^2$ محاسبه گردید (Pj فراوانی آلل زام در تمام ژنوتیپ‌های مورد استفاده) (۷). تجزیه خوشه‌ای با ترسیم خوشه به روش UPGMA^۱ و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc 2.02 (۳۳) مبتنی بر ضریب تشابه نی و لی (۱۹۷۹) انجام گردید.

تجزیه به مولفه‌های اصلی همواره نمی‌تواند تعداد زیادی از متغیرهای اولیه را به تعداد کمتری از متغیرهای تبدیل شده کاهش دهد. در واقع اگر متغیرهای اولیه همبستگی نداشته باشند این تجزیه مطلقاً بی‌ارزش خواهد بود و بهترین نتایج زمانی عاید می‌شود که متغیرهای اولیه همبستگی بسیار شدید مثبت و منفی داشته باشند. اگر این حالت مطلوب رخ دهد، مولفه‌های اصلی مهم می‌توانند بعنوان معیارهایی جهت نشان دادن جنبه‌های متفاوتی از داده‌ها جالب توجه باشند (۴). با توجه به شباهت کروموزومی گندم، هم‌بارز بودن ریزماهواره‌ها و پیوستگی ژنی (آلی) تجزیه به مولفه‌های اصلی بر روی داده‌ها صورت گرفت.

نتایج و بحث

1- Diversity Index

2- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

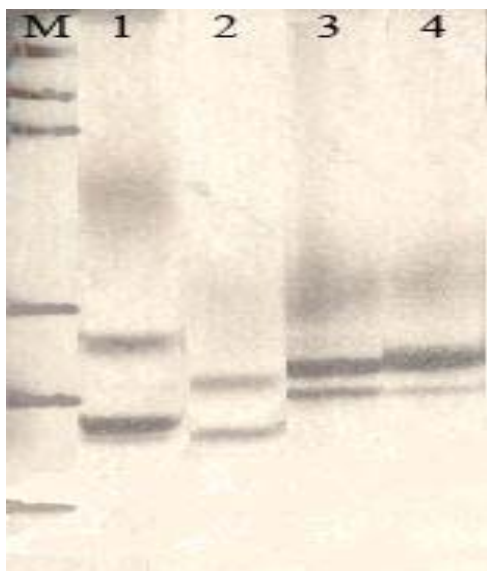
چندشکلی در ریزماهوره‌ها

وجود چندشکلی در ۳۴ جفت آغازگر ریزماهوره در ارقام مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۱۰۱ آلل تکثیر شد که آغازگرهای Xgwm413-6B، Xgwm120-2B و Xgwm443-5B با یک آلل کمترین تعداد و آغازگر Xgwm132-5B با ۷ آلل بیشترین تعداد را داشتند (شکل ۱). میانگین تعداد آلل در کل جایگاه‌ها برابر ۳ بود و با نتایجی که در مطالعات قبلی توسط سالم و همکاران (۲۰۰۸)، برای ریزماهوره در گندم تعداد آلل ۲ تا ۷ و میانگین ۳/۲، کومار و همکاران (۲۰۰۷)، از ۱ تا ۸ و میانگین ۳/۹ و احمد (۲۰۰۲)، از ۲ تا ۸ و میانگین ۳/۶ گزارش شده بود مشابهت داشت (جدول ۲). در عین حال، گزارش‌های متفاوتی از چندشکلی در ریزماهوره‌ها مثل ماکافری و همکاران (۲۰۰۳)، ۲ تا ۱۲ و میانگین ۵/۶، پرساد و همکاران (۲۰۰۰)، یک تا ۱۳ و میانگین ۷/۴، رادر و همکاران (۲۰۰۲) با متوسط ۱۰/۵، آگراما و توینسترا (۲۰۰۳)، با متوسط ۴/۵ وجود دارد.

شاخص چندشکلی

شاخص چندشکلی برای هر جایگاه ریزماهوره مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین میزان شاخص چندشکلی مربوط به آغازگر Xgwm132-6B و کمترین میزان آن مربوط به آغازگرهای Xgwm371-5B بود (جدول ۲). میانگین شاخص چندشکلی در این تحقیق ۰/۵۳ محاسبه شد. نتایج این تحقیق با گزارش‌های مشابه مانند بریان و همکاران (۱۹۹۷)، ماکافری و همکاران (۲۰۰۳)، آگراما و توینسترا (۲۰۰۳)، وی و همکاران (۲۰۰۵)، لندجوا و همکاران (۲۰۰۶)، کلوننج و همکاران (۲۰۰۶) و تامس و همکاران (۲۰۰۵) و سالم و همکاران (۲۰۰۸) با متوسط ۰/۵۴ مشابهت داشت. اما در کل مقادیر متفاوتی برای چندشکلی گزارش شده است مثلاً رادر و همکاران (۱۹۹۵) با مقدار ۰/۲۳ تا ۰/۷۹ و میانگین ۰/۷۱، پرساد و همکاران (۲۰۰۰) با میانگین ۰/۷۱، منیفستو و همکاران (۲۰۰۱) از ۰/۴ تا ۰/۸۴ و میانگین 0.72 ± 0.14 ، راسل و همکاران (۲۰۰۵) با میانگین ۰/۶۵، های و همکاران (۲۰۰۷) با میانگین ۰/۶۸ گزارش داده‌اند. از تمام نتایج بالا می‌توان

فهمید که شاخص چندشکلی نمی‌تواند عدد ثابتی داشته باشد و بستگی به عواملی مثل تعداد آلل تولیدی توسط هر جایگاه، محتوای $(GT)_n$ در نواحی تکرار شونده که همبستگی مثبتی با میزان اطلاعات چندشکلی دارد و تکرارهای دی نوکلئوتیدی که نسبت به تری و تترا و حتی هر چه این تکرارها بیشتر باشند چندشکلی بیشتری می‌توانند داشته باشند (۲۶ و ۳۲) و طول توالی تکرار که نیز همبستگی مثبتی با شاخص چندشکلی دارد (۱۰). تعداد ژنوتیپ و تعداد آغازگر ریزماهوره همبستگی مثبتی با میزان اطلاعات چندشکلی دارند (۳۰) بطوریکه رادر و همکاران (۱۹۹۵) میانگین میزان اطلاعات چندشکلی را در تحقیقی با استفاده از ۱۸ ژنوتیپ گندم و ۱۵ آغازگر، ۰/۵۳ بدست آوردند در حالی که میانگین مذکور با کاهش تعداد ژنوتیپ‌ها به ۶ عدد، ۰/۱۱ افزایش یافته و به ۰/۶۴ تبدیل گشت (۳۰). همبستگی بین تعداد آلل تولید شده و شاخص چندشکلی ۰/۸۲ محاسبه شد که بسیار معنی‌دار بود ($P < 0.01$). همچنین ضریب تبیین محاسبه شده ($R^2 = 0.68$) نشان داد که تعداد آلل تولید شده توسط هر آغازگر مسئول ۶۸٪ تغییرات در شاخص چندشکلی بوده است (جدول ۳، شکل ۲).



شکل ۱- الگوی نواری تکثیر شده بر اساس آغازگر Xgwm132 (اعداد شماره ارقام و M مارکر شاهد QX174 می‌باشد)

جدول ۲- نام، مکان، دمای اتصال، تعداد آلل و شاخص چندشکلی آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده در گندم

نام آغازگر	مکان آغازگر	دمای اتصال	تعداد آلل	DI	نام آغازگر	مکان آغازگر	دمای اتصال	تعداد آلل	DI
Xgwm153	1BL	۶۰	۲	۰.۲۷	Xgwm160	4AL	۶۰	۳	۰.۶۲
Xgwm274	7BL	۵۰	۳	۰.۶۲	Xgwm369	3AS	۶۰	۳	۰.۶۲
Xgwm340	3BL	۶۰	۲	۰.۵	Xgwm120	2BL	۶۰	۱	۰
Xgwm334	6AS	۵۰	۶	۰.۸۱	Xgwm264	1BS	۶۰	۵	۰.۷۱
Xgwm111	7DS	۵۵	۴	۰.۷۱	Xgwm495	4BL	۶۰	۳	۰.۶۲
Xgwm642	1DL	۶۰	۲	۰.۵	Xgwm44	7DC	۶۰	۳	۰.۶۲
Xgwm148	2BS	۶۰	۳	۰.۵۹	Xgwm469	7DS	۶۰	۴	۰.۷۵
Xgwm149	4BL	۵۵	۵	۰.۷۵	Xgwm130	7AS	۶۰	۲	۰.۵
Xgwm372	2AS	۶۰	۲	۰.۳۷	Xgwm437	7DL	۵۰	۴	۰.۷۲
Xgwm540	5BS	۵۵	۲	۰.۳۷	Xgwm132	6BS	۶۰	۷	۰.۸۴
Xgwm156	5AL	۶۰	۳	۰.۵۳	Xgwm389	3BS	۶۰	۳	۰.۶۲
Xgwm190	5DS	۶۰	۳	۰.۶۲	Xgwm613	6BS	۶۰	۱	۰
Xgwm383	3DL	۶۰	۳	۰.۳۷	Xgwm271	5DL	۶۰	۲	۰.۳۷
Xgwm133	6BS	۶۰	۳	۰.۶۶	Xgwm493	3BS	۶۰	۴	۰.۷۱
Xgwm325	6DS	۶۰	۳	۰.۶۲	Xgwm359	2AC	۵۵	۲	۰.۴۴
Xgwm357	1AL	۵۵	۳	۰.۶۲	Xgwm443	5BS	۵۵	۱	۰
Xgwm608	4DC	۶۰	۲	۰.۵	Xgwm508	6BS	۵۰	۲	۰.۵

جدول ۳- جدول تجزیه رگرسیون بین تعداد آلل تولید شده توسط هر آغازگر (متغیر مستقل) $y = hc'v$ آغازگرها شاخص چندشکلی

قرار می‌گیرد (۵، ۹، ۱۳، ۲۱ و ۲۶).

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
رگرسیون	۱	۱/۰.۳۴۶**
باقیمانده	۳۳	۰/۰.۱۵۳
کل	۳۴	

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مولفه‌های اصلی
نتایج حاصل از خوشه‌بندی ارقام مورد مطالعه، ژنوتیپ‌ها را در ۲ خوشه مجزا به شرح زیر قرار داد (شکل ۳).

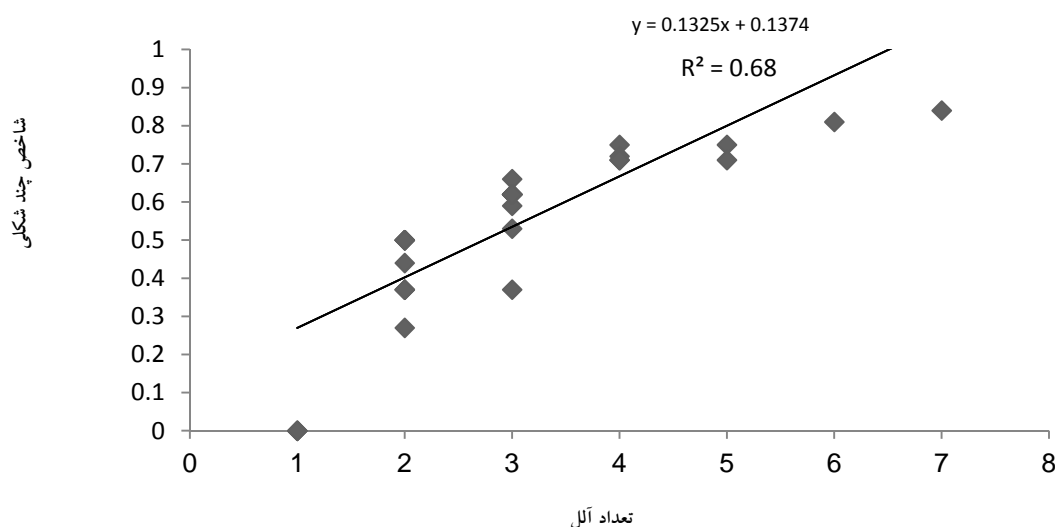
خوشه ۱: شامل ارقام اینیاء و تجن بودند که که جزو ارقام معرفی شده بوده و مقاومت بالایی به تمام زنگ‌ها نشان می‌دهند.

خوشه ۲: شامل ارقام ایرانی روشن و طوسی بودند که حساس به تمام زنگ‌ها هستند.

با توجه به شباهت کروموزومی بین ارقام گندم، هم‌بارز بودن ریزماهواره‌ها و پیوستگی ژنی (آلی) تجزیه به مولفه‌های اصلی بر روی داده‌ها صورت گرفت و نشان داد که مقادیر ویژه در روشن نی و لی برای سه مؤلفه اول ۸۸ درصد کل

ضرب تشابه

ضرب تشابه ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های مورد استفاده با توجه به کل آلل‌های مختلف و مشابه تکثیر شده بر اساس روش نی و لی محاسبه که بیشترین میزان تشابه (۰/۵۲۷) بین ارقام طوسی و روشن و کمترین میزان تشابه (۰/۱۱۷) بین ارقام اینیاء و طوسی مشاهده شد. همچنین میانگین کل ضرب تشابه بین ارقام ۰/۲۵۵ برآورد شد که با گزارش پراساد و همکاران (۲۰۰۰) و پلاشک و همکاران



شکل ۲- رابطه بین تعداد آلل تکثیر شده توسط هر آغازگر و شاخص چندشکلی در ارقام گندم مورد مطالعه

زنگ‌ها یا پیوستگی آن‌ها به عامل زنگ‌ها را دارد تا بتوان با زمان و هزینه کمتر به راحتی ارقام مقاوم و حساس را در زمان مورد نیاز از یکدیگر جدا نمود.

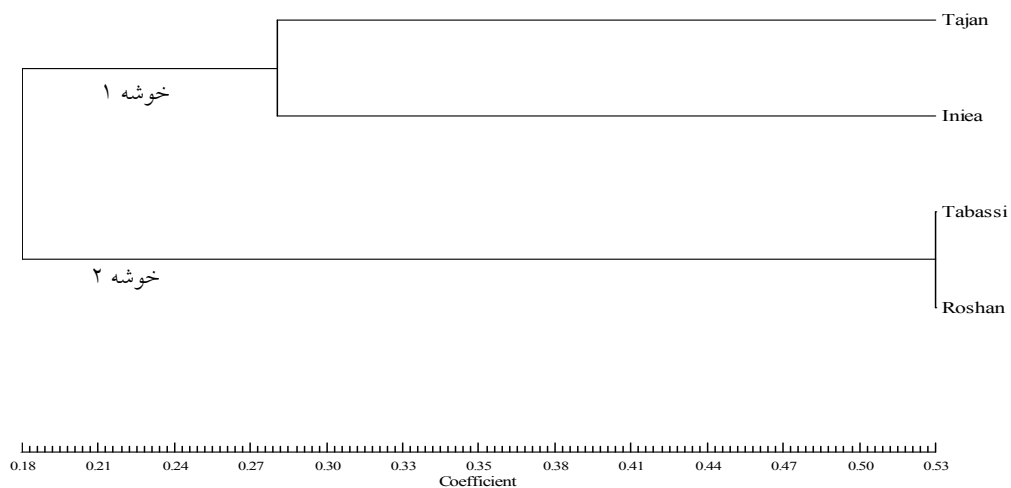
نتیجه‌گیری و پیشنهاد

با توجه به نقش بیماری زنگ گندم بر کاهش عملکرد گندم، اصلاح برای تولید ارقام مقاوم راهکاری مؤثر و کارا برای کاهش یا حذف کاربرد سموم شیمیایی قارچ کش و به حداقل رساندن خسارت عملکردی این بیماری می‌باشد. ارزیابی مقاومت به روش معمول (تلقیح گیاه با عامل بیماریزا) نیاز به نگهداری و بررسی کارآیی مایه تلقیح و یک دوره زمانی چند هفته ای پس از آلودگی جهت ظهور علائم، شرایط ویژه تلقیح، محیط کنترل شده و تسهیلات آلودگی دارد. در نتیجه یک سیستم ارزیابی سریع تر، کم هزینه تر و قابل اعتمادتر می‌تواند تا حد زیادی فرآیند انتخاب را تسهیل نماید. ایجاد نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت همان سیستم ارزیابی مطلوب است که هر مبنای چندژن را نیز امکان پذیر می‌نماید (۲ و ۱). با توجه به سریع‌تر بودن و هزینه‌های کمتر روش ارائه شده در این مقاله نسبت به روش‌های سنتی اصلاح (۳)، برای ایجاد مقاومت به زنگ‌ها و یا تشخیص پیوستگی آن‌ها با ژن‌های عامل زنگ‌ها نیازمند استفاده از نشانگرهای مولکولی در تحقیقات جامع‌تر می‌باشد.

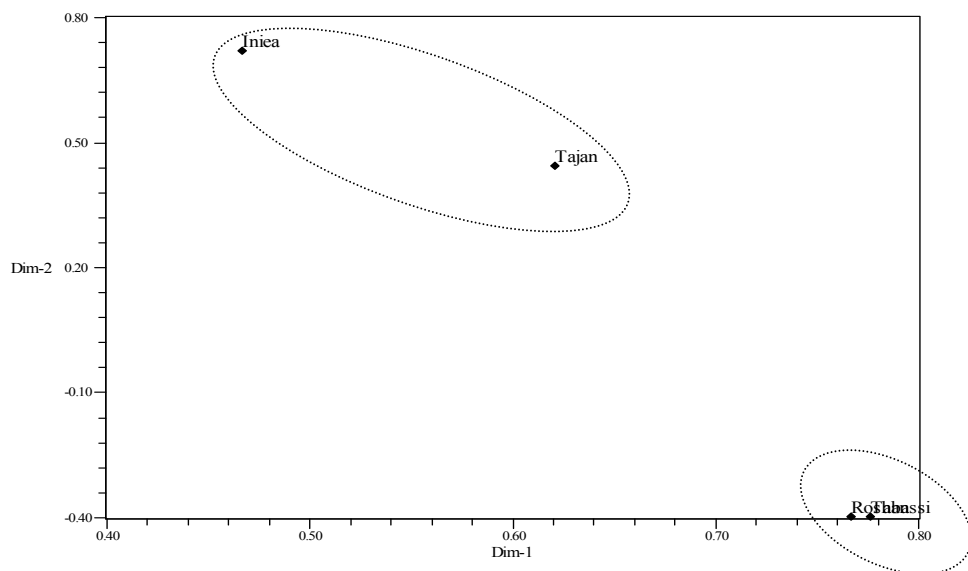
واریانس را توجیه کرد. از طرفی کاهش اطلاعات به دو یا سه مؤلفه اصلی توانست ارقام را مطابق با روش تجزیه خوشه‌ای از هم جدا کند و نشان‌دهنده‌ی این است که اکثر نشانگرها، اطلاعات نزدیکی را در رابطه با ساختار ژنتیکی یعنی پیوستگی با ژن‌های عامل مقاومت به زنگ‌ها در ارقام گندم ارائه داده‌اند (شکل ۴).

واضح است که ژن‌های زیادی بطور پیوسته بر روی یک کروموزوم قرار دارند و با علم به اینکه حدود ۸۰ درصد ژنوم گندم از نوع تکراری است (۱۰ و ۳۰) و این DNA تکراری (نوع ریزماهواره‌ی آن که مورد بحث این تحقیق است) به تعداد فراوان و به صورت یکنواخت در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها و در نواحی کد کننده و غیر کد کننده DNA پراکنده اند (۱۸) با این وجود این احتمال وجود دارد که توالی بعضی از ژن‌های مقاومت و حساسیت به انواع زنگ‌ها از نوع تکراری باشد و یا بعضی از ریزماهواره‌های مورد مطالعه در پیوسته با بعضی ژن‌های عامل مقاومت باشند هر چند ریزماهواره‌های زیادی مثل Xgwm455, Xgwm570, Xgwm37, Xgwm120, Xgwm44, Xgwm122, Xgwm443, Xgwm106 و در پیوسته با ژن‌های عامل مقاومت شناسایی شده‌اند (۱۹، ۲۴، ۳۷ و ۳۹).

در عین حال نتایج این تحقیق که منجر به جداسازی کامل ارقام حساس و مقاوم از همدیگر شده می‌تواند بیانگر مطالب بالا باشد که نیازمند مطالعه بیشتر در این زمینه و شناسایی ریزماهواره‌های عامل مقاومت یا حساسیت به



شکل ۳- گروه‌بندی ارقام گندم مورد مطالعه با استفاده از ضریب تشابه نی و لی به روش UPGMA



شکل ۴- نمایش پراکنندگی دو بعدی ارقام بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با توجه به ضریب تشابه نی و لی

منابع

- ۱- حلاجیان، م. ط.، م. کشاورزی، ع. باقری، ف. افشاری، ف. رودبارکلاری، م. خدارحمی. ۱۳۸۶. نشانمند کردن ژنهای مقاومت به زنگ زرد در گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و RGAP. پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.
- ۲- سلطانلو، ح.، س. س. رضانیور، ا. احمدیخواه، د. گودت، آ. لاروج. ۱۳۸۶. مطالعه روی بیان کمی ژن کیتیناز در مرحله بلوغ و گیاهچه‌ای نسبت به بیماریهای زنگ زرد و قهوه ای در ایزولاینهای گندم دارای مکان ژنی Lr34/Yr. دومین همایش ملی زیست شناسی سلولی و مولکولی جمهوری اسلامی ایران.
- ۳- صمصام‌پور، د.، و. پرابهو. ۱۳۸۶. گزینش به کمک مارکرهای مولکولی در ایجاد مقاومت ژنتیکی به زنگ قهوه ای در گندم. پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.
- ۴- مقدم، م.، ا. محمدی. ۱۳۸۸. آشنایی با روش‌های آماری چند متغیره. انتشارات پرپور.
- 5-Agrama, H. A., and M. R. Tuinstra. 2003. Phylogenetic diversity and relationship among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *African Biotech.*, 2(10): 334-340.
- 6-Ahmed, M. 2002. Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats. *Genome*, 45 (4): 646-651.
- 7-Anderson, J. A., G. A. Churchill, J. E. Autrique, S. D. Tanksley, and M. E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36: 181-186.
- 8-Bassam, B. J. and G. Catano-Anolles. 1993. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42: 181-187.
- 9-Bohn, M., H. Friedrich, A. E. Melchinger. 1999. Genetic Similarities among Winter Wheat Cultivars Determined on the Basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and Their Use for Predicting Progeny Variance. *Crop Sci.*, 39:228-237.
- 10-Bryan, G. J., A. J. Collins, P. Stephanson, A. Orry, J. B. Smith, and M. D. Gale. 1997. Isolation and characterisation of microsatellite from hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 557-563.
- 11-Chao, S., P. J. Sharp, A. J. Worland, E. J. Warham, R. M. D. Koebner, and M. D. Gale. 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, 78: 495-504.
- 12-Cook, R. J., and R. J. Veseth. 1991. *Wheat Health Management*, APS. Press., 152p
- 13-Costa, C. T. D., A. C. S. Albuquerque, A. D. N. Junior, F.C. Marcelino, and J.F. Pereira. 2007. Genetic diversity of Brazilian triticales evaluated with genomic wheat microsatellites. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 42(11):1577-1586
- 14-Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks. 1993. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol., Rep.* 1, 19.
- 15-Gill, B. S., H. C. Sharma, W. J. Raupp, L. E. Browder, H. J. Hatchett, T. L. Harvey, J. G. Moseman, and J. G. Waines. 1958. Evaluation of *Aegilops* Species for Resistance to Wheat Powdery Mildew, Wheat Leaf Rust, Hessian Fly, and Greenbug. *Plant Disease*, 69: 314-316.
- 16-Gupta, P. K., H. S. Balyan, K. J. Edwards, P. Isaac, V. Korzun, M. S. Roder, M. F. Gautier, A. S. Schlatter, J. Dubcovsky, and R.C. Delapena. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (ssr) loci in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 105: 413-422.
- 17-Hai, L., C. Wagner, and W. Friedt. 2007. Quantitative structure analysis of genetic diversity among spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) from different geographical regions. *Genetica*, 130: 213-225.
- 18-Halton, T. A. 2001. Plant genotyping by analysis of microsatellite In R. J. Henry (Ed). *Plant genotyping, The DNA fingerprinting of plant*. Pp: 15-29, CABI Publication, New York, USA.
- 19-Hiebert, C., J. Thomas, and B. McCallum. 2005. Locating the broad-spectrum wheat leaf rust resistance gene *Lr52* by a new cytogenetic method. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 1453-1457.
- 20-Knott, D. R. 1989. The wheat rusts-breeding for resistance. *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. Springer Verlag. pp. 201.
- 21-Kuleung, C., P. S. Baenziger, S. D. Kachman, and I. Dweikat. 2006. Evaluating the genetic diversity of triticale with wheat and rye SSR markers. *Crop Science*, 46:1692-1700.
- 22-Kumar, M., O. P. Luthra, N. R. Yadav, L. Chaudhary, N. Saini, R. Kumar, I. Sharma, and V. Chawla. 2007. Identification of micro satellite markers on chromosomes of bread wheat showing an association with karnal bunt resistance. *African Journal of Biotechnology*, 6 (14): 1617-1622
- 23-Landjeva, S., V. Korzun, and G. Ganeva. 2006. Evaluation of genetic diversity among bulgarian winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties during the period 1925-2003 using microsatellites. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1605-1614
- 24-Ma, H., R. P. Singh, and A. Mujeeb-Kazi. 1997. Resistance to stripe rust in durum wheats, A-genome diploids, and their amphiploids. *Euphytica*, 94: 279-286.
- 25-Manifesto, M. M., A. R. Schlatter, H. E. Hopp, E. Y. Suarez, and J. Dubcovski. 2001. Quantitative evaluation of genetic erosion in wheat using molecular markers. *Crop Sci.*, 41:682-690
- 26-Maccafferi, M. M. C., P. D. Sanguinetti, and R. Tuberosa. 2003. Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theor. Appl. Genet.*, 107:783-797.
- 27-Nei, M., W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci., USA*. 76: 5269-5273.
- 28-Plaschke, J., M. W. Ganai, and M. S. Roder. 1995. Detection of genetic diversity in closely

- related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.*, 91:1001-1007.
- 29-Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalsky. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
- 30-Prasad, M., R. K. Varsheny, J. K. Roy, H. S. Balyan, and P. K. Gupta. 2000. The use of microsatellite for detection DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 584-592.
- 31-Roder, M. S., J. Plaschke, S. U. Konig, A. Borner, and M. E. Sorrells. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.*, 246:327-333.
- 32-Roder, M. S., K. Victor, Z. K. Wendehake, J. Plaschke, M. H. Tixier, P. Leroy, and M. W. Ganal. 1998. A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics*, 149: 2007-2023.
- 33-Rohlf, F. J., 2002. NTSYS pc: numerical taxonomy system, version 2.1. Exeter publishing, Setauket, NY.
- 34-Roussel, V., L. Leisova, F. Exbrayat, Z. Stehno, and F. Balfourier. 2005. SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 162-170.
- 35-Salem, K. F. M., A. M. El-Zanaty, and R.M. Esmail. 2008. Assessing Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genetic Diversity Using Morphological Characters and Microsatellite Markers. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4 (5): 538-544.
- 36-Stephenson, P., G. Bryan., J. Kirby., A. Collins., K. Devos. C. Busso., M. Gale. 1998. Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map. *Theor Apple Genet*, 97: 946-949.
- 37-Sun, X., G. Bai. and B. F. Carver. 2009. Molecular markers for wheat leaf rust resistance gene Lr41. *Mol Breeding*, 23:311-321
- 38-Tams, S. H., A. E. Melchinger, and E. Bauer. 2005. Genetic similarity among European winter triticale elite germplasms assessed with AFLP and comparisons with SSR and pedigree data. *Plant Breeding*, 124: 154-160.
- 39-Xing, L., Y. Wen-xiang, L. Ya-ning, L. Da-qun, Y. Hong-fei, M. Qing-fang, and Z. Ting. 2006. A SSR Marker for Leaf Rust Resistance Gene Lr19 in Wheat. *Agricultural Sciences in China*, 5(2): 111-115
- 40-Wei, Y. M., Y. C. Hou, Z. H. Yan, W. Wu, Z. Q. Zhang, D.C. Liu, and Y.L. Zheng. 2005. Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces highly resistant to Fusarium head blight. *J. Appl. Genet*, 46(1):3-9

Identification of Rust resistance among wheat cultivars using SSRs markers

B. Fazeli-nasab^{1,*} and M. R. Naghavi²

1. Agriculture Biotechnology M.Sc. Crop protection department, University of Tehran

2. Professor of Crop protection department, University of Tehran

Received: 01/24/2010

Accepted: 01/03/2011

Abstract

The knowledge of genetic diversity is a must to reduce genetic vulnerability during plant breeding efforts. In the present study 34 pairs microsatellite markers were used for germplasm analysis, estimation of the genetic relationship with the method of Nei and Lee and diversity and studying the capability of microsatellite marker between 4 resistant and sensitive wheat genotypes. Cluster analysis was achieved using Nei and Lee similarity and UPGMA clustering method. The average of genetic diversity (DI) and genetic similarity was equal to 0.53 and 0.255, respectively. The highest levels of genetic similarity (0.527) for the genotypes were found in Roshan and Tabasi, and the lowest (0.117) was related to Tabasi and Ineia. The number of alleles per microsatellite marker varied from 1 to 7 (average of 3) and a total of 101 alleles were detected. The result showed that all of the genotype could be distinguished and clustered into two different groups (resistant and sensitive). The results suggest that microsatellite markers can be used as efficient tools for estimating genetic diversity and segregation in resistant and sensitive wheat cultivars.

Keywords: Wheat (*Triticum aestivum* L.), Rust, Resistant and Sensitive, Microsatellite, Genetic Similarity

* Corresponding author

E-mail: B.Fazeli@ilam.ac.ir