

تنوع ژنتیکی برخی جوهای زراعی و وحشی از لحاظ واکنش به بیماری سفیدک پودری با استفاده از

نشانگرهای RAPD و ISSR

معصومه احمدی¹، آرش فاضلی²، علی آرمینیان^{2*}

تاریخ دریافت: 94/7/29 تاریخ پذیرش: 95/1/27

چکیده

در این مطالعه تنوع ژنتیکی 34 ژنوتیپ زراعی و وحشی جو به همراه رقم حساس افضل از لحاظ حساسیت و مقاومت به بیماری سفیدک پودری در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه ایلام ارزیابی گردید. مایه زنی با قارچ عامل بیماری در مرحله تورم سنبله صورت گرفت. DNA ژنومی نمونه‌های برگ‌ی بر اساس روش دوپیل و همکاران استخراج گردید. با استفاده از 16 آغازگر ISSR و شش آغازگر RAPD به ترتیب 125 و 32 باند تشکیل شد که در مجموع 99/27 و 100% باندها از چندشکلی برخوردار بودند. میانگین هتروژنی مورد انتظار، مشاهده شده و همچنین میانگین شاخص شانون به ترتیب در نشانگرهای ISSR: 0/32، 0/25 و 0/35 و RAPD: 0/28، 0/31 و 0/42 محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، 34 ژنوتیپ مورد مطالعه را در 5 گروه قرار داد که به ترتیب گروه‌های 1 و 2 ژنوتیپ‌های مقاوم نیمه‌مقاوم، گروه 3 ژنوتیپ‌های حساس و گروه 4 و 5 ژنوتیپ‌های نیمه‌حساس تا حساس را شامل شدند. به طور کلی، نتایج نشان داد که با استفاده از مارکرهایی همچون RAPD و ISSR می‌توان ژنوتیپ‌های حساس را از مقاوم تفکیک نمود که در برنامه‌های اصلاحی کمک شایانی به محققین می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: مقاومت به بیماری، آلل موثر، ISSR، RAPD.

¹ - دانش آموخته کارشناسی، اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

² - استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

* - نویسنده مسئول مقاله: a.arminian@ilam.ac.ir

مقدمه

سفیدک پودری از جمله بیماری‌های مهم جو سالها است که در نقاط مختلف کشور کم و بیش شیوع داشته و در حال حاضر از عوامل محدودکننده این محصول به شمار می‌رود. این بیماری به خصوص در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب شایع بوده و عامل آن قارچ *Blumeria graminis f.sp. hordei* یک آسکومیست هتروتال از راسته Erysiphales است (Hiura, 1962 به نقل از Patpour et al., 2006). این بیماری در ایران برای اولین بار در سال 1326 توسط اسفندیاری گزارش شده و امروزه در تمام مناطق کشور کم‌وبیش شیوع دارد.

روشهای مختلفی برای برآورد تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به استفاده از صفات ریخت شناسی، زراعی، سیتولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی اشاره نمود. نشانگرهای مبتنی بر DNA ابزاری قوی در تهیه نقشه‌های ژنتیکی، مکان‌یابی ژن‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما گیاهی می‌باشند (Khush, 1999). نشانگرهای بین ریزماهواره ژنومی¹ (ISSR)، یک دسته از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر تکثیر قطعات کوتاه DNA، درون توالی‌های تکراری ساده می‌باشند. این قطعات درونی، چندشکلی بالایی، حتی در میان ژنوتیپ‌های بسیار نزدیک نشان می‌دهند که ناشی از فقدان محدودیت‌های کارکردی در این مناطق ژنومی می‌باشد (Younis, 2008). آگاهی از فاصله ژنتیکی بین افراد و جمعیت‌ها و روابط خویشاوندی بین آنها امکان تهیه جمعیت‌های مناسب برای ترسیم نقشه ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها را فراهم می‌کند (Psraklu et al., 2013). از سال 1970 که مطالعه ژنتیکی مقاومت به بیماری سفیدک پودری شروع شده است، تا سال 1988 بیش از 100 ژن مقاوم به این بیماری گزارش شده است که از نظریه ژن برای ژن فلور پیروی می‌کنند (Jørgensen, 1988). مطالعات انجام شده روی مقاومت جوهای زمستانه به سفیدک پودری نشان داده است که ارقام حساس 20% و ارقام نیمه مقاوم 10% کاهش عملکرد دارند (Kuznetsova and Kalyadina, 1978). بهترین روش مهار این بیماری استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. ارزیابی مقاومت ارقام جو به بیماری سفیدک پودری از سالها پیش در آمریکا آغاز شده (Mains and Dietz, 1930) و وارد اولین کسی بود که بررسی مقاومت جوهای موجود در مجموعه جهانی جو آمریکا را نسبت به بیماری فوق‌الذکر آغاز کرد (Ward, 1953, 1957). زینثیلا و همکاران (2012) با استفاده از آغازگر RAPD و ISSR از بین 113 جایگاه RAPD و 153 جایگاه ISSR تولید شده، تنها 53/8-85/7% قطعات چندشکلی نشان دادند. در تحقیق اوواسینا و همکاران² (2002) با استفاده از 40 آغازگر RAPD در گندم، 60-70% آغازگرها چندشکل بودند. مک‌درمود و همکاران³ (1994) با استفاده از 10 آغازگر RAPD در 58 ژنوتیپ جو 119 آلل تولید نمودند که 79 آلل چند شکل بوده و محتوای چند شکلی از 0/34 تا 0/45 متغیر بود. هو و همکاران⁴ (2005) نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی 46 ژنوتیپ جو از نشانگرهای ISSR و RAPD استفاده کردند. میانگین میزان اطلاعات چند شکلی برای نشانگر ISSR و RAPD به ترتیب 0/574 و 0/631 بود. در تجزیه RAPD، 84 تا از 109 نوار چندشکل بودند و در تجزیه ISSR از مجموع 107 نشانگرشناسایی شده، 105 نشانگر چند شکلی نشان دادند.

¹ Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

² Ovesna et al.

³ McDermott et al.

⁴ Hou et al.

هدف از این تحقیق، مطالعه میزان تنوع ژنتیکی ارقام زراعی و وحشی جو نسبت به بیماری سفیدک پودری با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD بود تا بتوان از نتایج حاصل جهت پیدا نمودن ارقام مقاوم و استفاده از آنها به عنوان والدین جهت تلاقی در برنامه‌های اصلاح برای ایجاد گیاهان مقاوم به سفیدک پودری استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

جهت بررسی مقاومت جو نسبت به بیماری سفیدک پودری، 34 ژنوتیپ شامل 21 ژنوتیپ زراعی دریافتی از ارقام مرکز تحقیقات نهال و بذر کرج و 13 ژنوتیپ از ارقام وحشی جمع‌آوری شده از سطح استان ایلام همراه با رقم حساس افضل به بیماری سفیدک پودری انتخاب گردید (جدول 1). بذرهایی جو در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه ایلام در گلدانهایی با قطر دهانه 20 سانتیمتر کشت گردید. جهت بهاره سازی، تعداد 24 عدد از بذر هر رقم در ظرف پتری در دمای 4 درجه سلسیوس به مدت 1 ماه نگهداری شدند. تعداد هشت بذر از هر رقم در گلدانهایی با قطر دهانه 20 سانتیمتر و تا 3-4 سانتیمتری از لبه‌ی فوقانی گلدان و در عمق 3-4 سانتیمتری کاشته که بعداً تنک و به پنج بوته کاهش یافتند.

جهت تهیه زادمایه آلودگی اسپور قارچ با استفاده از کاردک از روی برگ‌های رقم حساس افضل که به صورت طبیعی در مزرعه دانشگاه ایلام آلوده شده بود، جدا و در در یک ارلن حاوی 250 میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شده و با استفاده از همزن کاملاً مخلوط شدند. سپس محلول را از صافی فلزی عبور داده تا توده میسلیمی قارچ و دیگر مواد زاید مانند بقایای برگ جو از آن جدا شود. اسپورهای قارچ با استفاده از لام گلبول‌شمار به تعداد 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر به روش کما (1996) تنظیم و سپس به حجم مورد نیاز رسانیده شد.

در مرحله تورم سنبله اسپورپاشی انجام و شرایط بهینه جهت رشد قارچ شامل رطوبت 75% و دمای 20 تا 22 درجه سلسیوس فراهم و میزان آلودگی و سطح پیشرفت بیماری گیاهان در 5 نوبت به فواصل 2 روز با روش پایلارد و همکاران¹ (2000a و 2000b) در مقیاس 9-1 که بیان‌کننده شدت یا پیشرفت نسبی بیماری از برگ‌های پایین به طرف سنبله است انجام گردید. بدین ترتیب با این روش عدد 1 برای عدم وجود علائم بیماری و عدد 9 برای بیشترین تراکم علائم بود. سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری نیز براساس فرمول (1) (مولدوان² و همکاران، 2005) محاسبه گردید که در آن n دفعات ارزیابی، y مقدار بیماری و t زمان (بر حسب روز) بود.

$$DPC = \sum_{i=1}^{n-1} \{(y_i + y_{i+1}) / 2\} (t_{i+1} - t_i) \quad \text{فرمول (1)}$$

¹ Paillard et al.

² Moldovan et al.

جدول 1- مشخصات ژنوتیپ‌های زراعی و وحشی جو و عکس العمل فنوتیپی آنها در مقابل بیماری سفیدک پودری.

ردیف	نام علمی گیاه	نام رقم	فنوتیپ	ردیف	نام علمی گیاه	نام رقم	فنوتیپ
1	<i>H. vulgare</i>	کویر 57	R	18	<i>H. bulbosum</i>	4	S
2	<i>H. vulgare</i>	ترکمن 59	MR	19	<i>H. bulbosum</i>	7	S
3	<i>H. vulgare</i>	فجر 30	MR	20	<i>H. spanteneum</i>	850	S
4	<i>H. vulgare</i>	جنوب 51	MR	21	<i>H. spanteneum</i>	1260	S
5	<i>H. vulgare</i>	ارس 55	R	22	<i>H. spanteneum</i>	978	SS
6	<i>H. vulgare</i>	صحرا 50	R	23	<i>H. vulgare</i>	836	SS
7	<i>H. vulgare</i>	یوسف	MR	24	<i>H. vulgare</i>	1275	S
8	<i>H. vulgare</i>	بهمن 43	R	25	<i>H. spanteneum</i>	837	SS
9	<i>H. vulgare</i>	نیمروز	R	26	<i>H. spanteneum</i>	2	S
10	<i>H. vulgare</i>	دشت 58	R	27	<i>H. bulbosum</i>	8	S
11	<i>H. vulgare</i>	بهرخ	MR	28	<i>H. spanteneum</i>	1226	S
12	<i>H. vulgare</i>	ریحان 03	MR	29	<i>H. spanteneum</i>	1667	SS
13	<i>H. vulgare</i>	ریحان	MR	30	<i>H. spanteneum</i>	5	SS
14	<i>H. vulgare</i>	زهک	MR	31	<i>H. spanteneum</i>	813	S
15	<i>H. vulgare</i>	نیک 46	R	32	<i>H. vulgare</i>	806	S
16	<i>H. vulgare</i>	ریحان 48	S	33	<i>H. vulgare</i>	کارون 57	S
17	<i>H. vulgare</i>	ماکویی 42	S	34	<i>H. vulgare</i>	افضل	S

S- حساس، SS- نیمه حساس، MR- نیمه مقاوم و R- مقاوم

استخراج DNA ژنومی

از ژنوتیپ‌های جو کشت شده در گلخانه در مرحله دو تا سه برگگی نمونه‌های برگگی تازه جمع آوری و DNA ژنومی به روش CTAB¹ بر اساس روش دوپیل و همکاران² (1987) استخراج گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز 0/8% تعیین و به میزان 50 نانوگرم در میکرولیتر برای انجام واکنش PCR رقیق سازی شد. تعداد 16 آغازگر ISSR و 6 آغازگر RAPD که توانایی ایجاد چندشکلی بالایی داشتند انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول 2).

¹ Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)

² Doyl et al 1987

جدول 2- وضعیت تکثیر آغازگرهای ISSR مورد استفاده در تکثیر ژنوم 34 ژنوتیپ جو مورد استفاده در تحقیق

PIC	اندازه قطعات	درصد چندشکلی	تعداد آل‌های چندشکلی	تعداد آل	دمای اتصال	توالی آغازگر	نام آغازگر
0/385	100-1000	100	10	10	53	(AG)7ACYA	UBC836
0/32	200-1000	100	9	9	55	(GA)8YC	UBC841
0/301	200-1500	100	10	10	52	(AC)8G	ISSR10
0/31	200-1500	100	9	9	52	(AC)8AT	12
0/28	300-1000	100	8	8	45/7	(AC)8C	826
0/31	200-1500	100	10	10	53	(TC)8RT	UBC853
0/39	400-1500	100	8	8	53	(GA)8YT	UBC840
0/33	500-1500	100	9	9	50	(GA)8A	UBC812
0/317	500-1500	100	6	6	35/7	(GA)8C	811
0/34	400-1500	100	8	8	41/8	GACAGACAG- AGAGACATT	LBMB-B
0/29	300-1000	100	7	7	52	(AC)8C	ISSR04
0/44	400-1000	100	6	6	41/7	GACAAAGA- CAGACAGTC	LBMB-C
0/21	300-1500	80	4	5	39	(AG)8G	809
0/17	300-1000	100	7	7	54	(AC)8TG	15
0/38	100-1000	100	7	7	50	(AG)8AA	134
0/41	300-800	100	6	6	54	(GA)9C	144
0/46	400-1500	100	5	5	36	GGTGGCGGGA	Oligo 16
0/38	400-1500	100	6	6	34	ACCGGGCTCA	Oligo 33
0/36	300-1500	100	5	5	32	TCCGGGTTTG	Oligo 20
0/47	400-1500	100	6	6	36	CCCGCCCTCC	Oligo 23
0/26	300-1500	100	5	5	30	TGTTAGGCTC	Oligo 343
0/41	300-1500	100	5	5	34	GAGCACC	Oligo 340

R =(A یا G) ، Y =(C یا T)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگر ISSR در دستگاه ترموسایکلر (Baiorad) (مدل C1000 Termal Cyclor ساخت کشور آلمان) در حجم 20 میکرولیتر شامل 1/5 میکرولیتر DNA ژنومی، بافر PCR 10X به میزان 2 میکرولیتر، 1/8 میکرولیتر MgCl₂، 0/4 میکرولیتر dNTPs، 0/3 میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز و 1/2 میکرولیتر از هر آغازگر انجام گرفت. برای آغازگر RAPD واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم 16 میکرولیتر شامل 3 میکرولیتر

DNA ژنومی، بافر PCR 10X به میزان 2 میکرولیتر، 0/6 میکرولیتر $MgCl_2$ ، 1 میکرولیتر dNTPs، 0/4 میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز، 2 میکرولیتر از هر آغازگر انجام گرفت.

چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگر ISSR با برنامه زمانی 4 دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای 94 درجه سلسیوس، 10 چرخه اولیه به صورت تاج داون (به طوری که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو 5 درجه سلسیوس بالاتر از دمای واقعی در نظر گرفته شد و به ازای هر چرخه، 0/5 درجه از دمای اتصال کاهش یافته تا به دمای اتصال واقعی برسد) و 25 چرخه شامل 30 ثانیه واسرشته‌سازی در 94 درجه سلسیوس، دمای توصیه شده برای هر آغازگر به مدت 45 ثانیه (جهت اتصال آغازگرها) و 2 دقیقه در 72 درجه سلسیوس جهت بسط نهایی در دمای 72 درجه سلسیوس به مدت 7 دقیقه انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگر RAPD با برنامه زمانی 4 دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای 94 درجه سلسیوس، 10 چرخه دمای 93 درجه سلسیوس به مدت 45 ثانیه، یک دقیقه دمای اتصال با توجه به نوع آغازگر 37 تا 38/5 درجه سلسیوس و دمای تکثیر 72 درجه سلسیوس به مدت 2 دقیقه، 35 چرخه دمای 93 درجه سلسیوس به مدت 45 ثانیه، 1 دقیقه دمای اتصال 37 و دمای تکثیر 72 درجه سلسیوس برای تکثیر نهایی انجام شد.

تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز 1/5% و بافر 1X TAE با زمان 120 دقیقه و ولتاژ 90 انجام شد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. برای تعیین اندازه نوارها از سایز مارکر¹ 100 جفت باز ساخت شرکت سیناژن استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده های حاصل برای صفت AUDPC که بر اساس علائم برگ می شود نرمال بوده ولی داده های صفت شدت بیماری نرمال نبودند که برای نرمال کردن آنها تبدیل جذری اعمال گردید، امتیازبندی باندها بر مبنای صفر (عدم وجود باند) و 1 (وجود باند) صورت گرفت. هر باند در بین ژنوتیپ‌ها به عنوان یک آلل در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از نمره‌دهی باندها به صورت یک ماتریس در نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 وارد شدند. جهت بررسی تنوع ژنتیکی، از برنامه های رایانه ای MINITAB 17 و Microsoft Excel 2010 و برای اندازه‌گیری شاخص‌های ژنتیکی از نرم افزار GenALEX 6.41 و NTSYS 2.1 استفاده گردید. همچنین برای بررسی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق از نظر میزان تحمل به بیماری، از ماتریس عدم تشابه دایس و الگوریتم نزدیکترین همسایه استفاده شد.

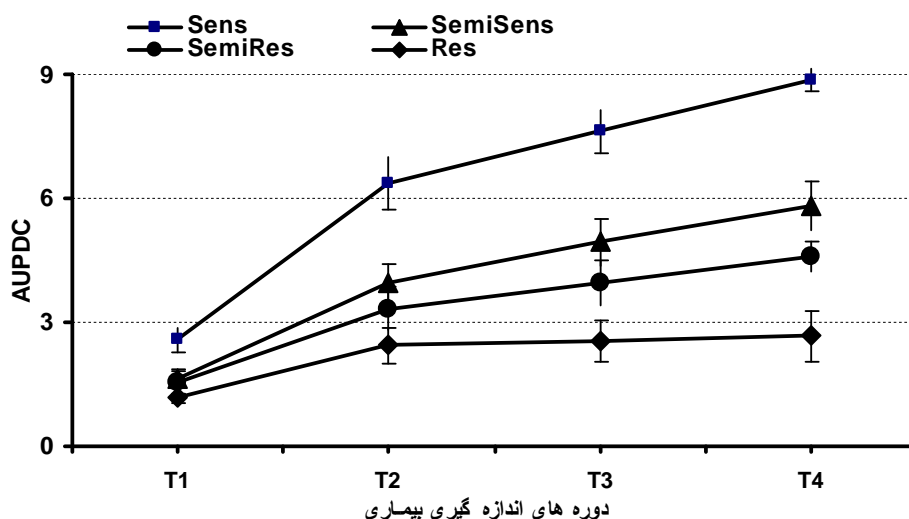
تجزیه واریانس مولکولی AMOVA با سیستم رایانه ای Arlequin 3.5 انجام گرفت. در این برنامه، برخی شاخص‌های تنوع سنجی، تعداد جایگاه‌های چندشکل و تنوع ژنی بررسی گردید. در این سیستم، اطلاعات مولکولی را به صورت صفر و یک برای ژنوتیپ‌ها منظور نموده و ژنوتیپ یابی و سپس به تجزیه واریانس مربوطه اقدام شد

¹ Ladder

که در آن به برآورد واریانس درون و بین جوامع پرداخته شده و بر اساس کم و زیاد بودن واریانس‌های مذکور به نتیجه‌گیری‌های لازم دست یافته شد.

نتایج و بحث

نتایج سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در مرحله بلوغ در ارقام مختلف نشان داد که ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس به ترتیب از مقادیر کمتری از میزان پیشرفت بیماری برخوردار بوده و در دوره‌های اندازه‌گیری اول تا دوم، مقادیر صعودی بوده و از آن به بعد روند افزایش کندتر شده است (شکل 2). به طوری که در رقم مقاوم بعد از این دوره ثبات در تغییرات پیشرفت بیماری دیده شده و در روزهای اول مقداری حساسیت دیده شده و به تدریج کاهش یافت. بیشترین میزان گسترش بیماری مربوط به رقم حساس افضل مشاهده شد و ژنوتیپ‌های حساس 20، 22، 29، 28 و 27 نیز به ترتیب بیشترین مقدار گسترش بیماری را به میزان 9/8، 9/7، 9/5، 9/4، 9/22 و 9/2 نشان دادند (شکل 1).

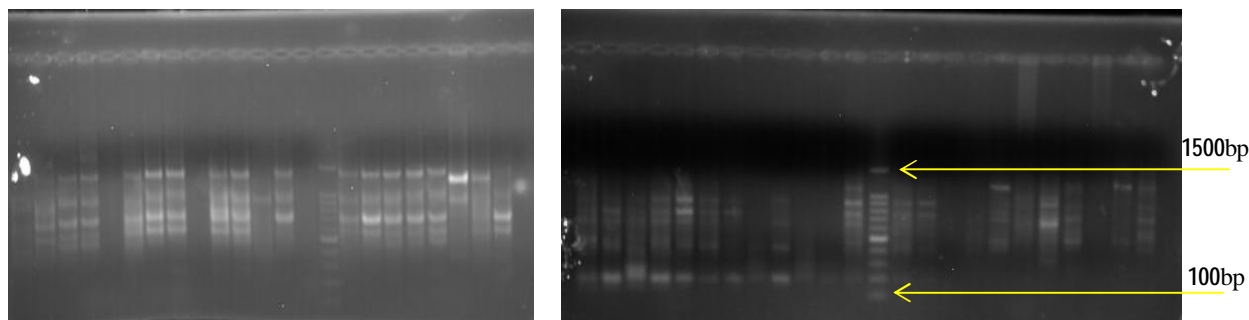


شکل 1- نمودار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUPDC) برای ژنوتیپ‌ها در دوره‌های مورد اندازه‌گیری پس از اسپورپاشی (T1 تا T4). اصطلاحات Res، SemiRes، Sens و SemiSens به ترتیب به معنای ژنوتیپ‌های مقاوم، نیمه‌مقاوم، حساس و نیمه‌حساس است.

نتایج ارزیابی‌های مولکولی

با استفاده از آغازگر ISSR در مجموع 125 آلل تکثیر شد که از این تعداد 124 آلل، ه عبارت دیگر 99/2% آلل‌ها به عنوان چند شکل تشخیص داده شدند. متوسط تعداد آلل‌های تولید شده برای هر آغازگر، 7/93 بود. در بین این 16 آغازگر، آغازگرهای UBC836 و UBC853 با 10 آلل بیشترین تعداد آلل در میان آلل‌های تولیدی توسط هر آغازگر را داشتند. آغازگر 809 نیز با 5 آلل کمترین تعداد آلل را به خود اختصاص داد. دامنه آللی برای کل

آغازگرهای مورد استفاده از 100 الی 1500 جفت باز متغیر بود (شکل 2). با استفاده از آغازگر RAPD، 23 آلل تکثیر شد که همگی چندشکل بوده و متوسط تعداد آلل برای هر آغازگر 5/33 بود و دامنه آلی از 300 تا 1500 متغیر بود (شکل 2). در این رابطه، زوینگیلا و همکاران¹ (2012) با استفاده از آغازگر RAPD و ISSR از بین 113 جایگاه RAPD و 153 جایگاه ISSR تولید شده، تنها 53/8-85/7% قطعات چندشکلی گزارش نمودند.



شکل 2- سمت راست الگوی تکثیر DNA ژنومی با استفاده از آغازگر UBC836. سمت چپ الگوی تکثیر DNA ژنومی با آغازگر OLigo16

در سیستم نشانگری ISSR بیشترین محتوای اطلاعات چند شکلی مربوط به آغازگر LBMB-B به مقدار 0/44 و کمترین محتوای چندشکلی متعلق به آغازگر 15 با مقدار 0/17 بود. متوسط محتوای اطلاعات چند شکلی در این آغازگرها به میزان 0/32 مشاهده شد و در سیستم نشانگری RAPD بیشترین محتوای اطلاعات چند شکلی مربوط به آغازگر OLigo23 به مقدار (0/47) و کمترین محتوای چندشکلی متعلق به آغازگر OLigo20 با مقدار 0/36 بود. متوسط محتوای اطلاعات چند شکلی در این آغازگرها به میزان 0/39 مشاهده شد. آغازگر LBMB-B و آغازگر OLigo23 با محتوای اطلاعات چندشکل بیشتر از سایر آغازگرهای بکار رفته توانستند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را مشخص کنند (جدول 2). مقادیر چند شکلی به دست آمده در این تحقیق با اطلاعات گزارش شده عشقی و همکاران (2012) با استفاده از ISSR در جو (با 0/725 تا 0/936) و هو و همکاران (2005) در ژنوتیپ‌های جو با ISSR و RAPD (به ترتیب 0/574 و 0/631) کم و بیش همخوانی داشت.

مقدار محاسبه شده شاخص نشانگر در آغازگرهای ISSR مورد مطالعه از 0/84 تا 3/85 متغیر و میانگین شاخص نشانگرها 2/44 بود. بیشترین مقدار شاخص نشانگر به ترتیب مربوط به آغازگرهای UBC836 و UBC853 بود که نشان دهنده قدرت تفکیک زیاد و کارایی این آغازگرها در بروز چندشکلی ژنوتیپ‌هاست و آغازگر 809 با 0/84 کمترین مقدار شاخص نشانگر را به خود اختصاص دادند. مقدار شاخص نشانگر RAPD از 1/3 تا 2/35 متغیر بود و میانگین شاخص نشانگرها، 2/01 بود. بیشترین شاخص نشانگر مربوط به آغازگر OLigo23 و کمترین مقدار مربوط به آغازگر OLigo343 بود.

¹ Žvingila et al.

در سیستم نشانگری ISSR، میانگین تعداد آلل مشاهده شده 1/64 و میانگین تعداد آلل موثر 1/93 و میانگین هتروژنی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب 0/32 و 0/25 و میانگین شاخص شانون 0/35 بود و در سیستم نشانگری RAPD، میانگین تعداد آلل مشاهده شده 1/64 و میانگین تعداد آلل موثر 1/49 و میانگین هتروژنی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب 0/28 و 0/31 و میانگین شاخص شانون 0/42 بود. ارقام حساس بیشترین مقدار شاخص شانون و تنوع ژنی را داشتند که نشان دهنده این است که آغازگرهای ISSR و RAPD می‌توانند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجه کنند بنابراین می‌توان از آنها به عنوان آغازگرهای کارا جهت بررسی تنوع ژنتیکی جو در مطالعات بعدی استفاده کرد. در این خصوص، دیزکیرسی و همکاران¹ (2008) در بررسی که روی 80 لاین جو انجام دادند میانگین تعداد آلل موثر را 3/30 و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده را 60% و میانگین شاخص شانون را 0/71 گزارش کردند.

در تجزیه واریانس مولکولی این امکان وجود دارد که اجزای واریانس محاسبه و سهم هر یک از آنها در تنوع کل تعیین شود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (جدول 3) نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح آماری 5% بین چهارگروه وجود دارد که طبق این اطلاعات 93% از تنوع کل مربوط به تنوع درون گروهی و فقط 7% آن مربوط به تنوع بین گروهها بود.

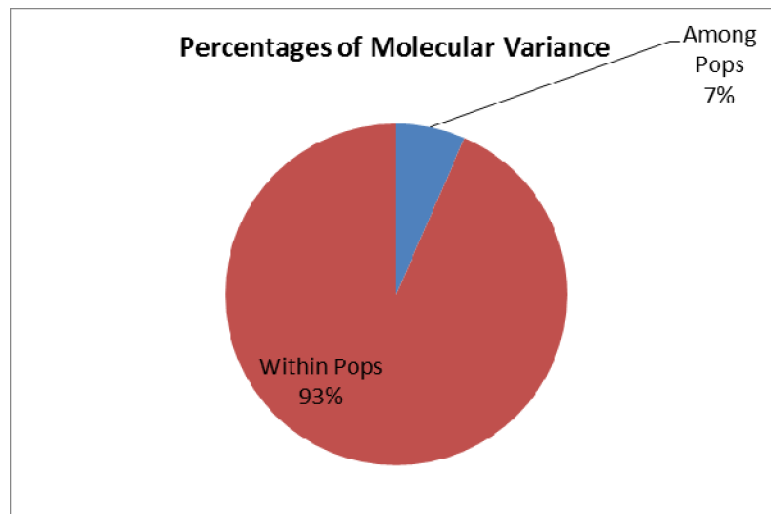
جدول 3- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) چهار گروه جو از نظر میزان مقاومت

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس	آماره PhipT	سطح احتمال معنی‌داری
تیمار	3	98/608	%32/968	7%	0/065	0/05
اشتباه آزمایشی	30	660/865	%22/019	93%		
کل	33	759/176		100%		

بیشترین فاصله ژنتیکی میان ارقام مقاوم و حساس با میزان ضریب تشابه ژنتیکی 0/059 بود و کمترین فاصله نیز میان گروه مقاوم با گروه نیمه مقاوم بود به میزان 0/093 تشابه ژنتیکی بود و به عبارت دیگر گروههای مذکور بیشترین شباهت را داشتند (شکل 3). تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، 34 ژنوتیپ مورد مطالعه را در 5 گروه قرار داد که به ترتیب گروههای 1 و 2 ژنوتیپ‌های مقاوم و نیمه‌مقاوم، گروه 3 ژنوتیپ‌های حساس، گروه 4 و 5 ژنوتیپ‌های نیمه‌حساس تا حساس را شامل شدند (شکل 4). در تحقیق مربوط به پسرکلو و همکاران² (1392) در تجزیه خوشه‌ای با رسم دندوگرام با روش UPGMA بر اساس فاصله اقلیدسی، ژنوتیپ‌ها به هفت گروه تفکیک شدند، این موضوع بیانگر تنوع بالا در ژنوتیپ‌های مورد بررسی نسبت به بیماری سفیدک پودری بود.

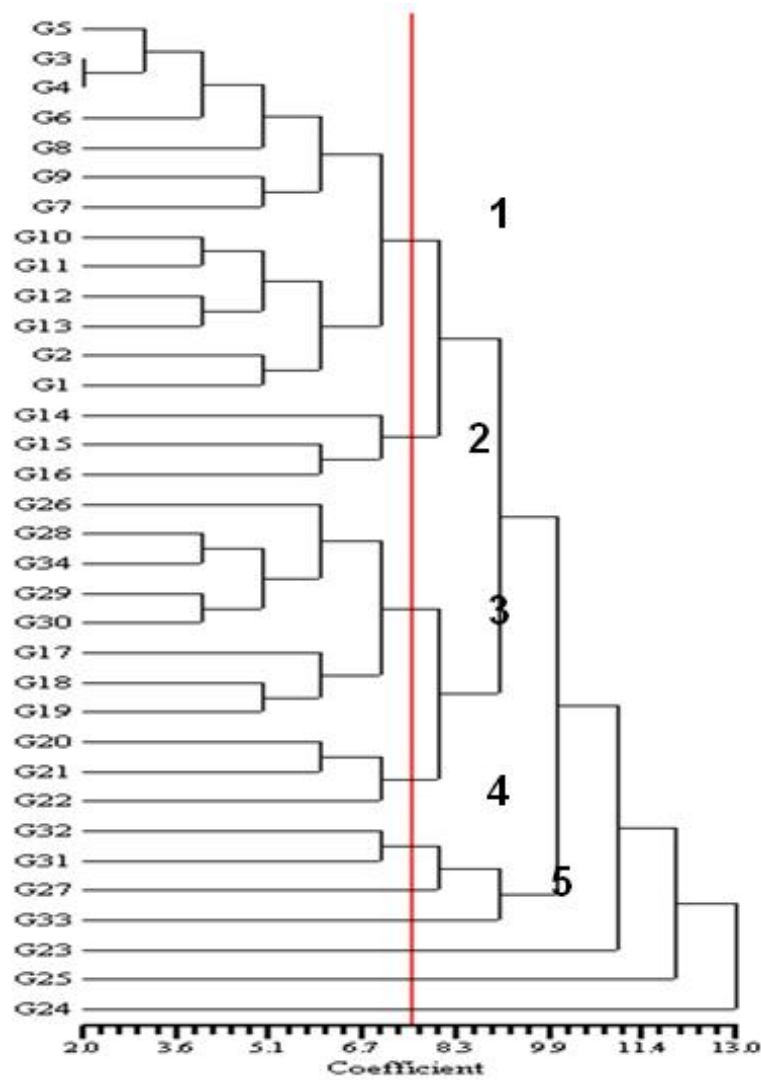
¹ Dizkirici *et al.*

² Psraku *et al.*, 2013



شکل 3- درصد واریانس درون و بین گروهها بر اساس داده‌های مولکولی

با توجه به تنوع و تغییرات شدید جمعیت‌های بیماریزای عامل سفیدک پودری جو، دستیابی به منابع مقاومت برای این بیماری کمی با مشکل همراه است به طوری که نتایج سایر پژوهشگران نیز بیانگر آن است که منابع مقاومت به این بیماری بسیار تغییر پذیر است (Mossman *et al.*, 1955). بهترین روش برای شناسایی و جداسازی ارقام با سطوح متفاوت تحمل به بیماری سفیدک پودری در حال حاضر مطالعه تفاوت‌های موجود در سطح DNA و شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفات، به عنوان تکنیکی بسیار مفید، جهت شناسایی این تفاوت‌ها می‌باشد. بنابراین با استفاده از نشانگرهای بیشتر و اختصاصی می‌توان در روند شناسایی و انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود. با توجه به این که انتخاب براساس نشانگرهای مولکولی یک روش سریع و مفید در ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین مکان‌های مقاومت به بیماری و تنش‌های محیطی است، اطلاعات ژنتیکی به دست آمده از نشانگرهای مولکولی در انتخاب به کمک مارکرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی نقش مهمی ایفا می‌کنند.



شکل 4- گروه‌بندی 34 ژنوتیپ زراعی و وحشی جو نسبت به بیماری سفیدک پودری، با استفاده از اطلاعات مولکولی نشانگرهای ISSR و RAPD و الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه و ماتریس عدم تشابه جاکارد

References

1. Dizkirici A, Elif Guren H, Onde S, Ternel F, Akar T, Budak, H and Kaya, Z. 2008. Microsatellite (SSR) variation in barley germplasm and its potential use for marker assisted selection in scald resistance breeding. *International Journal of Integrative Biology* 4: 1–9.
2. Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
3. Hiura U. 1962. Hybridization between varieties of *Erysiph graminis*. *Phytopathology* 52: 664–666.
4. Hou YC, Yan ZH, Wei YM and Zheng YL. 2005. Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. *Barley Genetics Newsletter* 35: 9–22.
5. Jørgensen JH. 1988. *Erysiphe graminis*, powdery mildew of cereals and grasses. *Advances in Plant Pathology* 6:137–157
6. Khush GS. 1999. Green revolution: preparing for the 21st Century. *Genome*. 42:646–655.
7. Kuznetsova TE and Kalyadina TT. 1987. Study of resistance to powdery mildew in winter barley. *Interrirovannaga-Zashchita-Zernovykh-Kulture to-Vreditelei-i-boleznei-pri-intensivnoc-tekhnologi-Vozdelyveniya* 5–99.
8. Mains EB and Dietz SM. 1930. Physiological forms of barley powdery mildew, *Erysiphe graminis hordei* Marchal. *Phytopathology* 20: 22–239.
9. McDermott JM, Brandle U, Dutty F, Haemmerli UA, Keller S, Muhher, KE and Wolf MS. 1994. Genetic variation in powdery mildew of Barley: Development of RAPD, SCAR and VNTR Markers. *Phytopathology* 84: 1316–1321.
10. Moldovan V, Moldovan M and Kadar R. 2005. Assessment of winter wheat cultivars for resistance to *Fusarium* head blight. *Annual Wheat Newsletter* 51: 97–98.
11. Moseman JC. 1955. Source of resistance to powdery mildew of barley. *Plant Disease Reporter* 39: 967–972.
12. Ovesna J, Kucera L, Bockova R and Holubec V. 2002. Characterisation of powdery mildew resistance donors within *Triticum boeoticum* accessions using RAPDs. *Plant Breeding* 38: 117–124.
13. Paillard S, Goldringer I, Enjalbert J, Doussinault G and Brabant P. 2000a. Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. I—is specific seedling resistance selected? *Theoretical and Applied Genetics* 101: 449–456.
14. Paillard S, Goldringer I, Enjalbert J, Trottet M, David J and Brabant P. 2000b. Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. II—adult resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 457–462.

15. Patpour M, Dehghan MA and Afshari A. 2006. Reaction of some dryland barley advanced lines to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *Hordei.*, Em. Marchal. Seed and Plant Journal 22 (4): 431–441.
16. Psraklu S, Soltanlu H, Ramezanpoor SS, Nasrollah Nejad Qomi AA, Kalateh Arabi M and Kia S. 2013. Genetic analysis of powdery mildew resistance in some barely lines. Journal of Plant Production 20(3): 49–70.
17. Saari EE and Prescott JM. 1975. A scale for appraising the foliar intensity of wheat disease. Plant Disease Reporter 59: 377–380.
18. Ward DJ. 1953. Disease and agronomic notes records on the world collection of barley grown at Bogota, Columbia in 1953. World Collection of Barley. Data Complication No. 4. United States Department of Agriculture. 148 p.
19. Ward DJ. 1957. Disease and agronomic data on 431 Manchurian barleys grown at five locations in the north center US and Manitoba, Canada, in 1956. World Collection of Barley Data Complication No. 5. United States Department of Agriculture. 173 p.
20. Younis RAA, Ismail OM and Soliman SS. 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.
21. Žvingila D, Vaitkuniene V, Patamsts j, Leisturmaite A, StanIute M, Balciuniene L, Česniene T, Kleizaite V and Šiuksta RV. 2012. DNA polymorphism and agronomic traits of revertants from barley (*Hordeum vulgare* L.) mutant tw. Žemdirbystė=Agriculture 99: 139–148.

Genetic diversity of some wild and cultivated barleys regarding their reaction to powdery mildew using ISSR and RAPD markers

M. Ahmadi¹, A. Fazeli², A. Arminian^{2*}

Abstract

Genetic diversity of 34 wild and cultivated barley cultivars along with susceptible cultivar namely Afzal was evaluated regarding their sensitivity and resistance to powdery mildew in a randomly complete design with three replications in greenhouse of Ilam University. Plants were inoculated at anthesis stage with *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. When 16 ISSR and 6 RAPD primers were used, 125 and 32 alleles were amplified where 99.27% and 100% of the alleles had polymorphism, respectively. Average expected and observed heterogeneity and average Shannon index in ISSR were calculated to be 0.32, 0.25 and 0.35 and for RAPD were 0.28, 0.31 and 0.42. Cluster analysis by UPGMA method categorized genotypes in five clusters of which groups 1 and 2 were resistant to semi-resistant, group 3 as susceptible, and also group 4 and 5 were moderately susceptible to susceptible ones, respectively. In general, our results indicated that using molecular markers such as RAPD and ISSR can differentiate genotypes into resistant or susceptible groups that would help researchers in breeding programs.

Key words: Resistance to disease, effective allele, ISSR and RAPD

¹- Former BSc Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

²- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

*Corresponding author: a.arminian@ilam.ac.ir