



## ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم با استفاده از نشانگرهای AFLP

بابک صارمی‌راد<sup>۱</sup>، مجید شکرپور<sup>۲</sup>، امید سفالیان<sup>۳</sup>، علیرضا پورمحمد<sup>۴</sup> و عزت‌اله اسفندیاری<sup>۵</sup>

۱ و ۳- کارشناس ارشد و دانشیار، دانشگاه محقق اردبیلی

۲- استادیار، دانشگاه تهران

۴- استادیار، دانشگاه مراغه، (نویسنده مسوول: pourmohammad@gmail.com)

۵- دانشیار، دانشگاه مراغه

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱

### چکیده

تنوع ژنتیکی ۴۵ رقم گندم با استفاده از نشانگرهای چند شکلی طول قطعات تکثیر یافته (AFLP) بررسی شد. از یازده ترکیب آغازگر PstI و MseI برای بررسی چند شکلی AFLP، شش ترکیب آغازگر P-ATG/M-CAT، P-ATG/M-CTG، P-CGA/M-CTA، P-ATG/M-CAG و P-AGT/M-CAG نوارهای چند شکل تولید کردند. در مجموع ۲۲۸ نوار به دست آمد که از بین آنها ۲۰۷ نوار (۹۳/۱۰٪) در بین ژنوتیپ‌ها چند شکل بود که نشان‌دهنده درصد بالای چند شکلی در بین ژنوتیپ‌ها است. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) بین ۰/۳۹ تا ۰/۴۴ در آغازگر P-AGT/M-CAG و ۰/۴۴ تا ۰/۴۴ در آغازگر P-ATG/M-CTG متغیر بود. بر طبق شاخص تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانون، بیشترین و کمترین تنوع ژنتیکی درون ژنوتیپ‌ها بر اساس ترکیبات آغازگر در P-ATG/MM-CAT و P-CGA/M-CTA به دست آمد. تجزیه کلاستر بر اساس روش دورترین همسایه‌ها<sup>۱</sup> و با استفاده از فاصله ژنتیکی نی ژنوتیپ‌ها را به شش گروه طبقه‌بندی کرد. بیشترین تعداد ژنوتیپ‌ها در کلاستر ششم (۴۱/۸۶٪) و کمترین آنها در کلاستر چهارم (۴/۶۵٪) قرار گرفتند. دامنه تشابه بر اساس ضریب تشابه دایس از ۰/۵۷ تا ۰/۹۹ متغیر بود. دو ژنوتیپ آرتا و قدس بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۹۹) و دو ژنوتیپ آزادی و کوه‌دشت کمترین شباهت (۰/۵۶۹) را با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به بردارهای اصلی

### مقدمه

یکی از اصلاح نباتات، ایجاد ارقام برتر برای شرایط خاص و مناسب برای تولید اقتصادی است. اصول اولیه‌ی تولید یک رقم زراعی، بسیار ساده و شامل سه عمل مشخص است (۷): ایجاد و یا شناسایی ژرم‌پلاسماهای ژنتیکی متنوع، اعمال روش‌های گزینش ژنوتیپ‌های مورد نظر از درون ژرم‌پلاسما که دارای صفات مورد نظر باشند و تثبیت و تکثیر این ژنوتیپ‌های برتر و معرفی ارقام برای تولید تجاری. از این رو می‌توان گفت تنوع، اساس اکثر برنامه‌های اصلاح نباتات می‌باشد و میزان موفقیت، به وجود تنوع ژنتیکی قابل قبول و متعاقب آن گزینش وابسته است. تکنیک‌های مبتنی بر نشانگرهای DNA قادر به شناسایی چندشکلی مربوط به تفاوت در توالی‌های DNA می‌باشد. این روش‌ها مکمل روش‌های کلاسیک ارزیابی تنوع هستند. مزیت عمده آنها این است که تنوع را در سطح DNA مورد بررسی قرار داده و مستقل از شرایط محیطی می‌باشند. همچنین این تکنیک‌ها می‌توانند در تمام مراحل رشد با مقدار مواد گیاهی کم و با استفاده از هر قسمت گیاه انجام شوند (۹).

الصغیر و همکاران (۱) تنوع ژنتیکی جو از شمال اردن را با نشانگرهای چندشکلی طول قطعات تکثیر یافته AFLP مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس شش ترکیب

آغازگری AFLP، تعداد ۳۰۰ قطعه تکثیر گردید که ۱۵۵ قطعه (۵۱/۷ درصد) چند شکل بود. تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها از درون جمعیت‌ها بیشتر بود. کاربرد نشانگرهای AFLP برای آزمون ارتباطات ژنتیکی در ۳۶ جمعیت *Triticum boeoticum* به دست آمده از غرب ایران ارزیابی شده است (۵). در مجموع ۹۷۹ (۴۲۹ چند شکل) نوار با استفاده از ۱۷ آغازگر AFLP نمایان شد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، ۳۶ جمعیت *T. boeoticum* را به دو گروه عمده تقسیم کرد. طبق این بررسی، سطح خوبی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های استان‌های کرمانشاه و لرستان دیده شد و نشان داد که *T. boeoticum* سطح وسیعی از اکوسیستم‌های کشاورزی را در غرب ایران اشغال کرده است. راسل و همکاران (۱۰) تنوع ژنتیکی ۱۸ رقم جو را توسط نشانگرهای AFLP، RFLP، SSR و RAPD مورد بررسی قرار دادند. نشانگرهای SSR بالاترین سطح چند شکلی را در مقایسه با سه نشانگر دیگر نشان دادند. کراکمن و همکاران (۳) ۱۹ نشانگر AFLP مرتبط با عملکرد دانه را، که ۵۴/۵ درصد از تغییرات را توجیه کرد در جوهای دوردیفه بهاره جدید در اروپا شناسایی کردند. در مطالعه‌ای دیگر، کراکمن و همکاران (۲) رابطه تاریخ ظهور سنبله و ارتفاع بوته را با برخی از نشانگرهای AFLP و SSR عنوان کردند.

## مواد و روش‌ها

دانشگاه محقق اردبیلی انجام گردید. استخراج DNA به روش CTAB (۱۱) انجام گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد.

مواد گیاهی مورد استفاده، ۴۵ ژنوتیپ گندم *Triticum aestivum* بود (جدول ۱). این تحقیق در آزمایشگاه اصلاح نباتات مولکولی دانشکده کشاورزی

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های مورد استفاده در آزمایش

| ردیف | ژنوتیپ       | ردیف | ژنوتیپ   |
|------|--------------|------|----------|
| ۱    | آرتا         | ۲۴   | کوبر     |
| ۲    | مارون        | ۲۵   | قدس      |
| ۳    | پیشناز       | ۲۶   | کرج ۳    |
| ۴    | آتیللا ۴     | ۲۷   | چناب     |
| ۵    | بهار         | ۲۸   | گلستان   |
| ۶    | دریا         | ۲۹   | مهدوی    |
| ۷    | زاگرس        | ۳۰   | اکبری    |
| ۸    | سپاهان       | ۳۱   | فلات     |
| ۹    | سرخ‌تخم      | ۳۲   | پیشناز ۱ |
| ۱۰   | کوه‌دشت      | ۳۳   | شیرودی   |
| ۱۱   | اروند        | ۳۴   | چمران    |
| ۱۲   | البرز        | ۳۵   | لاین A   |
| ۱۳   | آتیللا ۵۰    | ۳۶   | کرج ۲    |
| ۱۴   | سیستان       | ۳۷   | مغان ۱   |
| ۱۵   | داراب ۲      | ۳۸   | کرخه     |
| ۱۶   | هیرمند       | ۳۹   | مرودشت   |
| ۱۷   | روشن         | ۴۰   | طیسی     |
| ۱۸   | بک‌کراس روشن | ۴۱   | ۶۰۵      |
| ۱۹   | نیک‌نژاد     | ۴۲   | KDM      |
| ۲۰   | یاواروس      | ۴۳   | PGS      |
| ۲۱   | آریا         | ۴۴   | ۶۱۱۳۰    |
| ۲۲   | شعله         | ۴۵   | PG-1252  |
| ۲۳   | آزادی        |      |          |

۱۰۰ میکرولیتر آداپتور دو رشته‌ای (برای ۱۰۰ نمونه)، ۵ میکرولیتر از هر کدام از رشته‌های مستقیم (5'GACTGCGTAGGTGCA3') و معکوس (3' CCTACGCAGTCTACGAG 5') آداپتور *PstI* با هم مخلوط و با محلول TE به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد (غلظت نهایی ۵ میکرومولار) و نیز ۵۰ میکرولیتر از هر کدام از رشته‌های مستقیم (5'GACGATGAGTCCTGAG3') و معکوس (3'TACTCAGGACTCAT3') آداپتور *TruII* مخلوط (غلظت نهایی ۵۰ میکرومولار) و در چرخه‌های دمایی ۶۵ درجه (۱۰ دقیقه)، ۳۷ درجه (۱۰ دقیقه) و ۲۵ درجه (۱۰ دقیقه) قرار داده شد (جدول ۲).

تجزیه AFLP بر اساس روش ووس و همکاران (۱۲) با اعمال تغییرات جزئی انجام گرفت. مراحل این تکنیک به ترتیب شامل: تیمار DNA با دو آنزیم برشی، اتصال آداپتورها به قطعات برشی، تکثیر مقدماتی، تکثیر انتخابی با استفاده از آغازگرهایی با سه باز انتخابی، الکتروفورز با ژل توالی‌یابی و رنگ‌آمیزی قطعات تکثیر شده می‌باشد که در زیر تشریح می‌گردد:

برای هضم DNA ژنومی از دو نوع آنزیم برشی به نام *PstI* و *TruII* که به ترتیب دارای جایگاه برشی شش و چهار بازی هستند استفاده شد. پس از برش DNA توسط آنزیم‌های برشی، آداپتورهای الیگونوکلوئوتیدی دو رشته‌ای به هر دو انتهای قطعه‌های برشی چسبنده اضافه و جایگاه اتصال آغازگر برای تکثیر PCR مهیا گردید. برای تهیه

جدول ۲- اجزای واکنش اتصال آداپتور در تجزیه AFLP

| غلظت نهایی          | یک نمونه (میکرولیتر) | اجزا                                 |
|---------------------|----------------------|--------------------------------------|
| ۱ برابر             | ۱                    | بافر T4 (۱۰۰ برابر)                  |
| ۱۰ میلی مولار       | -                    | ATP (۱۰۰ میلی مولار)                 |
| ۵ پیکومول           | ۱                    | آداپتور <i>PstI</i> (۵ میکرومولار)   |
| ۵۰ پیکومول          | ۱                    | آداپتور <i>MseI</i> (۵ میکرومولار)   |
| ۱ واحد              | ۰/۲                  | آنزیم لیگاز T4 (۵ واحد در میکرولیتر) |
| تا حجم ۱۰ میکرولیتر | ۶/۸                  | آب دو بار تقطیر                      |

واکنش تکثیر مقدماتی را نشان می‌دهد. در این واکنش از آغازگرهای بدون باز اضافی *PstI* (5'GACTGCGTAGGTGCAGN3') و *TruII* (5'GATGAGTCCTGAGTAAN3') استفاده شد.

برای تکثیر مقدماتی، DNA حاصل از واکنش‌های برش و اتصال آداپتور به نسبت ۵:۱ با محلول TE<sub>0.1</sub> (غلظت EDTA در این محلول ۰/۱ میلی مولار است) رقیق شد و شش میکرولیتر از آن به‌عنوان DNA الگو در تکثیر مقدماتی استفاده گردید. جدول ۳ اجزای

جدول ۳- اجزای واکنش تکثیر مقدماتی در تجزیه AFLP

| غلظت نهایی          | یک نمونه (میکرولیتر) | اجزا                             |
|---------------------|----------------------|----------------------------------|
| ۱ برابر             | ۲/۵                  | بافر PCR (۱۰۰ برابر)             |
| ۰/۲ میلی مولار      | ۰/۵                  | مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰ میلی مولار) |
| ۰/۴ میلی مولار      | ۱                    | آغازگر M-00 (۱۰ میکرومولار)      |
| ۰/۴ میلی مولار      | ۱                    | آغازگر P-00 (۱۰ میکرومولار)      |
| ۱ واحد              | ۰/۲                  | Taq پلیمرز (۵ واحد در میکرولیتر) |
| -                   | ۶                    | DNA حاصل از مراحل برش و اتصال    |
| ۱/۵ میلی مولار      | ۱/۵                  | MgCl <sub>2</sub> (25mm)         |
| تا حجم ۲۵ میکرولیتر | ۱۲/۳                 | آب دو بار تقطیر                  |

فرآورده‌های حاصل از PCR با چهار میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط گردید و نمونه‌ها پس از واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، بلافاصله روی یخ قرار داده شدند.

به‌منظور گرم شدن ژل و آماده نمودن آن برای بارگذاری نمونه‌ها، ابتدا دستگاه الکتروفورز تا زمانیکه دمای ژل به ۵۰ درجه برسد به جریان الکتریکی با توان ثابت ۱۰۰ وات وصل شد. سپس نمونه‌ها به سرعت در چاهک‌ها بارگذاری شده و الکتروفورز با توان ثابت ۸۰ وات به مدت ۲ ساعت انجام گردید. دمای ژل در طی الکتروفورز ۵۰ درجه بود.

پس از الکتروفورز به‌منظور رویت نوارها از رنگ‌آمیزی نقره استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی، ژل در دمای اتاق خشک و با استفاده از اسکرنر، تصویر ژل در کامپیوتر ذخیره شد.

چرخه‌های حرارتی PCR به‌صورت زیر بود:

مرحله اول: واسرشته‌سازی اولیه در ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه، مرحله دوم: ۳۰ چرخه شامل: واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه، مرحله سوم: بسط نهایی در ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. در تکثیر انتخابی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر با اجزای مربوطه انجام شد (جدول ۴). بطوریکه DNA حاصل از تکثیر مقدماتی به میزان ۵ برابر با TE<sub>0.1</sub> رقیق شد و DNA رقیق شده به‌عنوان الگو در واکنش تکثیر انتخابی استفاده گردید. آغازگرهای *PstI* و *TruII* در این واکنش دارای توالی یکسان با آغازگرهای مرحله تکثیر مقدماتی می‌باشند. با این تفاوت که سه باز انتخابی اضافی داشتند (*PstI*+NNN و *TruII*+NNN). ترکیب آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۵ آمده است.

جدول ۴- اجزای واکنش تکثیر انتخابی در تجزیه AFLP

| غلظت نهایی          | یک نمونه (میکرولیتر) | اجزا                             |
|---------------------|----------------------|----------------------------------|
| ۱ برابر             | ۲/۵                  | بافر PCR (۱۰ برابر)              |
| ۰/۲ میلی مولار      | ۰/۵                  | مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰ میلی مولار) |
| ۰/۲ میلی مولار      | ۰/۵                  | آغازگر M-NNN (۱۰ میکرومولار)     |
| ۰/۲ میلی مولار      | ۰/۵                  | آغازگر P-NNN (۱۰ میکرومولار)     |
| ۰/۵ واحد            | ۰/۲                  | Taq پلیمرز (۵ واحد در میکرولیتر) |
| -                   | ۴                    | DNA حاصل از مراحل برش و اتصال    |
| تا حجم ۲۵ میکرولیتر | ۱۵/۳                 | آب دو بار تقطیر                  |
| ۱/۵ میلی مولار      | ۱/۵                  | (25mm) MgCl <sub>2</sub>         |

جدول ۵- ترکیب‌های آغازگر مورد استفاده در تجزیه AFLP، P آغازگر PstI و M آغازگر TruII

| شماره | کد  | ترکیب آغازگر |
|-------|-----|--------------|
| ۱     | P1  | P-CGA,M-CTA  |
| ۲     | P2  | P-ATG,M-CTG  |
| ۳     | P3  | P-ATG,M-CAT  |
| ۴     | P4  | P-AGT,M-CTA  |
| ۵     | P5  | P-AGT,M-CAG  |
| ۶     | P6  | P-ATG,M-CAG  |
| ۷     | P7  | P-ATG,M-CTA  |
| ۸     | P8  | P-ATC,M-CTG  |
| ۹     | P9  | P-AAT,M-CAA  |
| ۱۰    | P10 | P-ATC,M-CAT  |
| ۱۱    | P11 | P-ACC,M-CAG  |

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش دورترین همسایه‌ها (۴) و ماتریس فاصله دایس انجام شد. تجزیه به بردارهای اصلی با استفاده از ماتریس فاصله ژنتیکی دایس به‌منظور تشخیص دقیق‌تر روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و تأیید گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای صورت گرفت. برای انجام محاسبات فوق‌الذکر از نرم‌افزارهای NTSYS-pc 2.0 و Genelex 6.4 استفاده گردید.

#### نتایج و بحث

برای بررسی چند شکلی‌های DNA در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه، از یازده ترکیب آغازگر PstI و MseI با سه نوکلئوتید انتخابی استفاده شد. شش ترکیب آغازگر (P-ATG/M-CTA، P-ATG/M-CTG، P-CGA/M-CTA) و (P-AGT/M-CAG، P-AGT/M-CTA، CAT) و (P-ATG/M-CAG) نوارهای چند شکلی تولید کرد. نام ترکیب‌های آغازگر، تعداد نشانگرهای تولید شده توسط هر آغازگر و میزان چند شکلی آنها در جدول ۶ آمده است. در مجموع ۳۲۸ نوار (جایگاه‌های ژنی) DNA به‌دست آمد که از بین آنها ۲۰۷ نوار (۶۳/۱۰٪) در بین ژنوتیپ‌ها چند شکلی بود که نشان‌دهنده درصد بالای چند شکلی در بین

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

هر یک از مکان‌های تکثیر شده توسط آغازگر به‌عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و حضور و عدم حضور آنها به ترتیب با اعداد یک و صفر امتیازدهی شد. تنوع ژنی نی (۶) و شاخص اطلاعات شانون (نقل از ۴) برای تنوع درون ژنوتیپ‌ها محاسبه شد. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) هر ترکیب آغازگر محاسبه گردید. برای محاسبه PIC از فرمول  $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$  استفاده شد که در آن  $f_i$  فراوانی قطعه (آلل) تکثیر شده و  $1-f_i$  فراوانی آلل نول (عدم وجود نوار) می‌باشد. شاخص نشانگر (MI) از حاصلضرب PIC در تعداد نوارهای چند شکل هر آغازگر به‌دست آمد (۸). همچنین احتمال همسانی (PI) و قدرت تفکیک (D) برای هر ترکیب آغازگری به‌دست آمد. برای محاسبه PI از رابطه زیر استفاده شد.

$$PI = \sum_{i=1}^n P_i^4 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n (2P_i P_j)^2$$

$$PI = \sum_{i=1}^n P_i^4 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n (2P_i P_j)^2$$

در این رابطه  $P_i$  فراوانی قطعه (آلل) تکثیر شده و  $P_j$  فراوانی آلل نول می‌باشد. احتمال همسانی (D) از رابطه (1-PI) به‌دست آمد.

میانگین PIC و MI برای کلیه آغازگرها به ترتیب ۰/۴۱ و ۱۴/۳۸ بود. احتمال همسانی (PI)، احتمالی را توضیح می‌دهد که دو رقم مستقل توسط یک نشانگر از یکدیگر تفکیک شوند. در جایگاه‌هایی که بیشترین تعداد آل را دارند میزان PI می‌تواند حتی کمتر از ۰/۰۵ نیز باشد که نشان‌دهنده این است که به احتمال ۵ درصد آل‌های آن جایگاه در بین ارقام مجزا مشترک می‌باشند. PI بالا برای ترکیب آغازگر P-ATG/M-CAG نشان‌دهنده این است که دو رقم مستقل از یکدیگر با استفاده از این نشانگر به احتمال ۱٪ ممکن است مشابه شناخته شوند. آغازگر P-ATG/M-CTG از این نظر بهترین بود. PI کل برای نشانگر AFLP در این تحقیق ۰/۰۰۸ بود که نشان‌دهنده احتمالی است که این سری نشانگرها دو رقم مستقل را به اشتباه از همدیگر تفکیک کنند. قدرت تفکیک (D)، احتمال شناسایی ارقام را توسط یک نشانگر نشان می‌دهد. میزان D محاسبه شده برای یک جایگاه با میزان چند شکلی بالا بیشتر از ۰/۸۹۵ و برای یک جایگاه نسبتاً چند شکلی ۰/۸۵-۰/۶۹۷ می‌باشد. میانگین کل (D) به دست آمده در این تحقیق ۰/۹۹ بود. این مقدار بالا نشان‌دهنده دقت بالای نشانگرهای استفاده شده در تفکیک ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. با توجه به اطلاعات بدست آمده در مورد نشانگرهای استفاده شده در این تحقیق، دو نشانگر P-ATG/M-CTG و P-CGA/M-CTA به‌عنوان بهترین نشانگرها شناخته شدند.

ژنوتیپ‌ها است. در تحقیقی روی *T. boeoticum* از غرب ایران با نشانگرهای AFLP، سطح خوبی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های استان‌های کرمانشاه و لرستان دیده شد و نشان داد که *T. boeoticum* سطح وسیعی از اکوسیستم‌های کشاورزی را در غرب ایران اشغال کرده است. در مجموع ۹۷۹ (۴۲۹ چند شکل) نوار با استفاده از ۱۷ آغازگر AFLP نمایان شد (۵). در پژوهش حاضر، بیشترین درصد چند شکلی مربوط به ترکیب آغازگر P-ATG/M-CTG (۸۶/۲۷٪) بود. میانگین تعداد نوارهای تکثیر شده به ازای هر ترکیب آغازگر ۵۴/۶۶ و میانگین تعداد نوارهای چند شکل به ازای هر ترکیب آغازگر ۳۴/۵ نوار می‌باشد. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده با ۲۳۷۲ نوار مربوط به ترکیب آغازگر P-ATG/M-CTG و کمترین آن، مربوط به ترکیب آغازگر P-ATG/M-CAT با ۱۶۳۶ نوار بود. در مطالعه تنوع ژنتیکی جو توسط الصغیر و همکاران (۱) بر اساس شش ترکیب آغازگری AFLP، تعداد ۳۰۰ قطعه تکثیر گردید که ۱۵۵ قطعه (۵۱/۷ درصد) چند شکل بود. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) برای آغازگرهای مورد استفاده در تجزیه AFLP بین ۰/۳۹ در آغازگر P-AGT/M-CAG تا ۰/۴۴ در آغازگر P-ATG/M-CTG متغیر بود. بیشترین میزان شاخص نشانگر (MI) که به‌عنوان یک معیار کارا در تعیین چند شکلی استفاده می‌گردد، در ترکیب آغازگری P-ATG/M-CTG (۱۸/۴۸) به‌دست آمد (جدول ۶).

جدول ۶- تعداد نشانگرهای چند شکل تولید شده توسط شش ترکیب آغازگر AFLP در ژنوتیپ‌های گندم

| ترکیب آغازگر | PIC  | MI    | تعداد کل نوارها | تعداد نوارهای چند شکل | تعداد نوارهای مونومورف | درصد چندشکلی | PI     | D      |
|--------------|------|-------|-----------------|-----------------------|------------------------|--------------|--------|--------|
| P-CGA/M-CTA  | ۰/۴۳ | ۱۶/۳۸ | ۵۸              | ۴۲                    | ۱۶                     | ۷۲/۴۱        | ۰/۰۰۴۸ | ۰/۹۹۵۲ |
| P-ATG/M-CTG  | ۰/۴۴ | ۱۸/۴۸ | ۵۱              | ۴۴                    | ۷                      | ۸۶/۲۷        | ۰/۰۰۴۳ | ۰/۹۹۵۷ |
| P-ATG/M-CAT  | ۰/۴۲ | ۱۳/۶۴ | ۷۱              | ۳۱                    | ۴۰                     | ۴۱/۸۹        | ۰/۰۰۵۲ | ۰/۹۹۴۸ |
| P-AGT/M-CTA  | ۰/۴۲ | ۱۲/۹  | ۴۸              | ۳۰                    | ۱۸                     | ۶۲/۵۰        | ۰/۰۰۵۳ | ۰/۹۹۴۷ |
| P-AGT/M-CAG  | ۰/۳۹ | ۱۲/۱۸ | ۴۹              | ۲۹                    | ۲۰                     | ۵۹/۱۸        | ۰/۰۱۳  | ۰/۹۸۷  |
| P-ATG/M-CAG  | ۰/۴۱ | ۱۲/۷۱ | ۵۱              | ۳۱                    | ۲۰                     | ۶۰/۷۸        | ۰/۰۱۵  | ۰/۹۸۵  |

گندم در کل ترکیب‌های آغازگر ۰/۶۰۹ به‌دست آمد که بیشترین مقدار آن در ترکیب آغازگری P-ATG/M-CAT (۰/۶۳) بود. میانگین شاخص تنوع ژنی نی برای نشانگر AFLP، ۰/۴۰۲ با بیشترین مقدار برای ترکیب‌های آغازگری P-ATG/M-CAT (۰/۴۲) و P-AGT/M-CAG (۰/۴۴) به دست آمد.

#### برآورد تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

میزان تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس شاخص تنوع ژنی نی شاخص اطلاعات شانون (۶) در جدول ۷ درج شده است. وضعیت تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص شانون تقریباً مشابه تنوع ژنی نی بود. شاخص شانون برای نشانگر AFLP در بین ژنوتیپ‌های

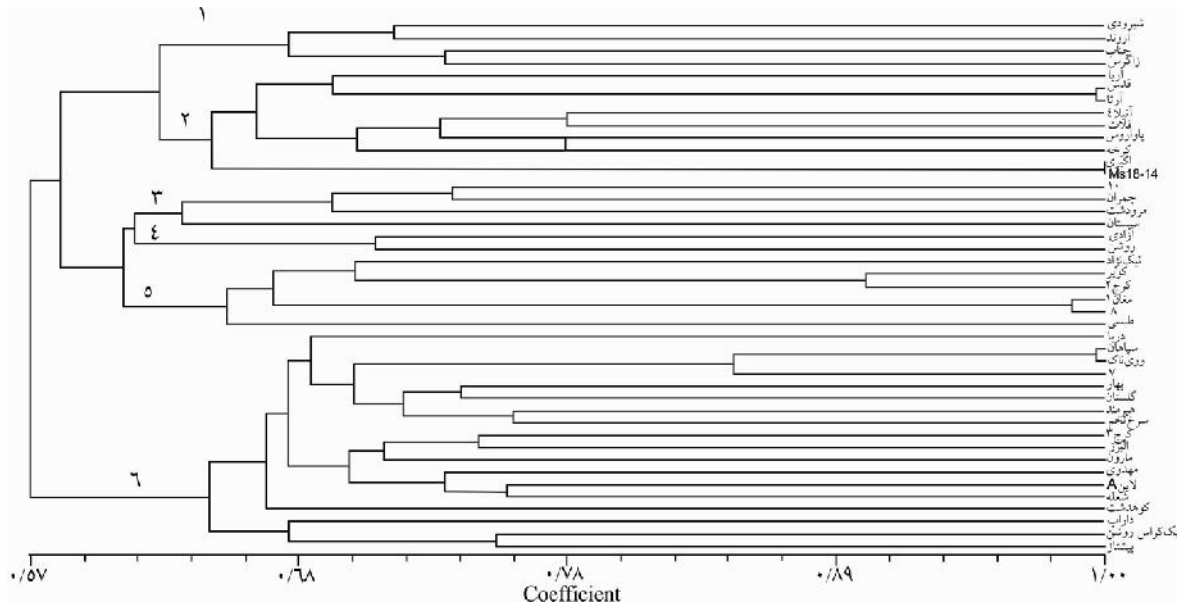
جدول ۷- میانگین تنوع ژنتیکی نشانگرهای مورد مطالعه با استفاده از شاخص تنوع ژنی نی و شاخص شانون

| شاخص تنوع ژنی نی | متوسط تعداد آل مؤثر در هر مکان ژنی | متوسط تعداد آل مشاهده شده در هر مکان ژنی | شاخص اطلاعات شانون | ترکیب آغازگر |
|------------------|------------------------------------|--|--------------------|--------------|
| ۰/۳۸             | ۱/۶۵                               | ۲  | ۰/۵۷               | P-CGA/M-CTA  |
| ۰/۳۸۶            | ۱/۷۷                               | ۲  | ۰/۶۱۹              | P-ATG/M-CTG  |
| ۰/۴۲             | ۱/۸۰                               | ۲  | ۰/۶۳               | P-ATG/M-CAT  |
| ۰/۴۱۲            | ۱/۷۸                               | ۲  | ۰/۶۲               | P-AGT/M-CTA  |
| ۰/۴۴             | ۱/۷۵                               | ۲  | ۰/۶۱۶              | P-AGT/M-CAG  |
| ۰/۳۸             | ۱/۷۱                               | ۲  | ۰/۶۰               | P-ATG/M-CAG  |

که در نتیجه می‌توان خوشه‌بندی صحیحی برای داده‌های حاصل از آن برای ارقام متفاوت انجام داد (۸). دامنه تشابه برای این ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های AFLP بر اساس ضریب تشابه دایس از ۰/۵۷ تا ۰/۹۹ متغیر بود. چون تشابه ژنتیکی با فاصله ژنتیکی رابطه معکوس دارد، لذا دو ژنوتیپ آرتا و قدس (۰/۹۹) که بیشترین تشابه ژنتیکی را نشان دادند دارای کمترین فاصله یا اختلاف ژنتیکی هستند. همچنین دو ژنوتیپ آزادی و کوه‌دشت (۰/۵۶۹) کمترین شباهت را با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند. با توجه به نتایج حاصله می‌توان از ارقامی که فاصله ژنتیکی زیادی باهم دارند در فرآیند تلاقی استفاده کرد. بیشترین تعداد ژنوتیپ‌ها در کلاستر ۶ (۰/۴۱/۸۶) و کلاستر ۲ (۰/۲۰/۹۳) و کمترین آنها در کلاستر ۴ (۰/۴/۶۵) قرار گرفتند.

### گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس داده‌های مولکولی

به‌منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس فواصل ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های AFLP به روش دورترین همسایه‌ها (۴) با استفاده از ماتریس نی انجام شد (شکل ۱). با توجه به دندروگرام حاصل، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در سطح تشابه ۶۳ درصد به شش گروه تقسیم شد. در ارزیابی ارتباطات ژنتیکی در *T. boeoticum* از غرب ایران با نشانگرهای AFLP، تجزیه خوشه‌ای ۳۶ جمعیت را به دو گروه عمده تقسیم کرد (۵). نشانگر AFLP به دلیل تکرارپذیری بالا و تولید زیادی نوار در یک آزمون، یک نشانگر مفید و قابل اعتماد می‌باشد، زیرا تکرارپذیری، یک روش ساده برای ارزیابی کیفیت نشانگر محسوب می‌شود



شکل ۱- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس داده‌های AFLP

به منظور ایجاد جوامع تفرق یافته با تنوع ژنتیکی زیاد را دارا می‌باشد. البته استفاده هم‌زمان از نتایج تجزیه‌های مولکولی و مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های گندم می‌تواند در انتخاب والدین مناسب جهت برنامه‌های تحقیقاتی با اهداف مختلف، مفیدتر واقع شود (۵). در این تحقیق به دست آمدن تعداد بالای نوارهای چندشکل در مقابل تعداد کم نوارهای تک‌شکل در مجموع ترکیبات آغازگری نشان داد که AFLP پتانسیل بالایی برای یافتن تنوع ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌های گندم را دارد.

در تجزیه AFLP، ۶ ترکیب آغازگر، ۲۳۸ نوار چند شکل با میانگین ۳۴/۵ نوار به ازای هر ترکیب آغازگر تولید کرد و ترکیب آغازگر P2 بیشترین نشانگرهای چند شکل را داشت. مقادیر قابل توجه میانگین PIC و MI برای کلیه ترکیب‌های آغازگر حاکی از کارایی و توانمندی بالای روش AFLP در مطالعات ژنتیکی گندم می‌باشد. تجزیه AFLP نشان داد که این نشانگر ابزار مولکولی توانمندی برای مطالعه تنوع ژنتیکی گندم می‌باشد و قابلیت کاربرد برای اهداف مختلف از جمله گزینش ژنوتیپ‌های والدی دور

### منابع

1. Al-Saghir, M.G., H. Malkawi and A. El-Oqlah. 2007. Genetic diversity in *Hordeum spontaneum* C. Koch of northern Jordan (Ajloun area) as revealed by RAPD and AFLP markers. *International Journal of Botany* 3: 172-178.
2. Kraakman, A.T.W., F. Martinez, B. Mussiraliev, F.A. Van Eeuwijk and R.E. Niks. 2006. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Molecular Breeding*, 17: 41-58.
3. Kraakman, A.T.W., R.E. Niks, P.M.M.M. Van den Berg, P. Stam and F.A. Van Eeuwijk. 2004. Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars *Genetics*. 168: 435-446.
4. Manly B.F.J. 2005. *Multivariate Statistical Methods: A Primer*. 2nd edition. Chapman and Hall/CRC. Florida.
5. Naghavi, M.R., M. Malaki, H. Alizadeh, M. Pirseiedi and M. Mardi. 2009. An assessment of genetic diversity in wild diploid wheat *Triticum boeoticum* from West of Iran Using RAPD, AFLP and SSR markers. *Journal of Agriculture, Science and Technology*, 11: 585-598.
6. Nei, M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Science Academy*. 70: 3321-3323.
7. Paakniat, H. 2010. *Introduction to Plant Breeding*. Shiraz University Publications. 245 pp. (In Persian)
8. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Refalsk. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
9. Rao, N.K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3: 136-145.
10. Russell, J.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 714-722.
11. Saghai-Marooif, M.A., K. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *PNAS* 81: 8014-8018.
12. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, D.L. Theovan and M. Hornes. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 310: 137-149.

## Evaluation of Genetic Diversity of Wheat Genotypes by AFLP Markers

**Babak Saramirad<sup>1</sup>, Majid Shokrpour<sup>2</sup>, Omid Sofalian<sup>3</sup>, Alireza Pourmohammad<sup>4</sup> and Ezatollah Esfandiari<sup>5</sup>**

---

1 and 3- M.Sc. and Associate Professor, University of Mohaghegh Ardabili

2- Assistant Professor, University of Tehran

4- Assistant Professor, University of Maragheh, (Corresponding author: pourmohammad@ymail.com)

5- Associate Professor, University of Maragheh

Received: July 11, 2013

Accepted: January 21, 2014

---

### Abstract

Genetic diversity of 45 wheat varieties were studied using AFLP markers. From 11 primer combinations of *Pst*I and *Mse*I for obtaining AFLP polymorphism, six primer combinations (P-CGA/M-CTA, P-ATG/M-CTG, P-ATG/M-CAT, P-AGT/M-CTA, P-AGT/M-CAG and P-ATG/M-CAG) produced polymorphic bands. Totally, 328 bands were produced that 207 bands (63.10%) were polymorphic, which showing high polymorphism among genotypes. PIC was variable between 0.39 in P-AGT/M-CAG and 0.44 in P-ATG/M-CT. According to Nei's gene index and Shannon's information index, the highest and the lowest genetic diversity within genotypes on the basis primer combinations were obtained in P-ATG/M-CAT and P-CGA/M-CTA primer combinations. Cluster analysis based on furthest neighbors linkage and Nei's genetic distance categorized the genotypes into six clusters. The highest and lowest number of genotypes situated in sixth (41.86%) and fourth (4.65%) clusters, respectively. The similarity's range based on Dice similarity coefficient changed between 0.57-0.99. Arta and Ghods had the highest genetic similarity (0.99) and Azadi and Koohdasht owned the lowest genetic similarity.

**Keywords:** Polymorphism, Cluster Analysis, PCoA