



بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف گندم بهاره پاییزه شمال ایران با استفاده از نشانگر ISSR

علی کلی^۱، عیسی جرجانی^۲، حسین صبوری^۳ و حسین علی فلاحی^۴

۱ و ۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه گنبد کاووس
۳- دانشیار، دانشگاه گنبد کاووس (نویسنده مسؤل: hos.sabouri@gmail.com)
۴- استادیار، پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گنبدکاووس
تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱

چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی یکی از فعالیت‌های مهم در زمینه‌ی به‌نژادی و حفظ ذخایر ژنتیکی در گیاهان است. به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۴۸ ژنوتیپ گندم، تکثیر مکان‌های ژنی با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR در آزمایشگاه ژنتیک و اصلاح نباتات دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس در سال ۱۳۹۳ انجام شد. از تعداد ۶۲ نوار تولید شده در کل ژنوتیپ‌ها، ۴۱ نوار چند شکل بودند. تعداد نوارهای چند شکل از ۲ تا ۸ به ازای هر آغازگر متفاوت بود. بیشترین نوارهای چند شکل مربوط به آغازگر PRI-10 بود. مقادیر محتوای چندشکلی (PIC) بین ۰/۳۷۵ تا ۰/۴۹۸ و شاخص نشانگری (MI) هم بین ۱۸/۷۵ تا ۳۹/۸۴ در هر آغازگر متغیر بود. بیشترین درصد چندشکلی به آغازگرهای (PRI-2+PRI-4)، (PRI-3+PRI-4) و (PRI-5) با ۵۰ درصد تعلق داشت. آغازگر (PRI-3+PRI-4) بیشترین میزان شاخص شانون را با مقدار ۰/۶۶۶ و آغازگر PRI-5 با ۰/۵۰۲ کمترین را نشان دادند. بیشترین میزان تنوع ژنتیکی نی در آغازگر (PRI-3+PRI-4) با مقدار ۰/۴۷۴ و کمترین در آغازگر PRI-5 با مقدار ۰/۳۳۶ مشاهده شد. بیشترین تعداد آلل مؤثر برای آغازگر (PRI-3+PRI-4) با مقدار ۱/۹۰۸ و کمترین تعداد آلل مؤثر برای آغازگر PRI-5 با مقدار ۱/۵۸۴ به دست آمد. تجزیه‌ی خوشه‌ای به روش UPGAM و با استفاده از ضریب تشابه جاگارد، ۴۸ ژنوتیپ را در چهار گروه مجزا گروه‌بندی کرد. کمترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گروه یک و پنج مشاهده شد و این موضوع نشان‌دهنده اختلاف ژنتیکی زیاد بین دو گروه می‌باشد. لذا می‌توان از آن‌ها در صورت داشتن صفات مطلوب به‌عنوان والد در برنامه‌های اصلاحی و دورگ‌گیری برای به دست آوردن حداکثر هتروزیس استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، چندشکلی، گندم، نشانگر ISSR، PIC

مقدمه

گندم منبع اصلی کالری و پروتئین برای بخش بزرگی از جمعیت دنیا محسوب می‌شود (۳۲). یک اصلاح‌گر در صورتی شانس موفقیت در برنامه‌های اصلاحی دارد که امکان انتخاب مواد مناسب را داشته باشد و این مواد نیز دارای تنوع کافی باشند. تنوع مبنای همه‌ی گزینه‌هاست و انتخاب ژنوتیپی نیز نیازمند تنوع است (۳۲). تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و نیز پایه اساسی و اولیه برای تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی می‌باشد (۱۸). جهت تعیین و برآورد تنوع ژنتیکی گیاهان می‌توان از روش‌های مختلفی مانند انواع نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی یا DNA استفاده نمود. در بررسی تنوع ژنتیکی داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی نسبت به داده‌های مورفولوژیکی، شجره‌نامه‌ها، بیوشیمیایی (نظیر آللوایم‌ها و کروماتوگرافی) برتری دارند (۱۵). از مهم‌ترین ویژگی‌های یک نشانگر مناسب دسترسی آسان به آن، سادگی روش کار و سرعت عمل بالا، تکرارپذیری و بالا بودن درصد چندشکلی آن، هم‌بارز بودن و آسان بودن تجزیه و آنالیز داده‌های حاصل از آن می‌باشد (۳۶). از نظر تکنیک، مواد مورد استفاده، هزینه و

سرعت انجام آزمایش‌ها، مقدار DNA مورد نیاز، درجه چندشکلی، ISSRها (توالی‌های بین ریزماهوره) نشانگرهای مولکولی مطلوبی هستند (۷).

در بررسی تنوع ژنتیکی ۴۸ رقم گندم نان و ۵۱ رقم قنتشی گندم دوروم 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 (۸). این پژوهشگران اشاره کردند که ISSR بازتاب خوبی از تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای، بین گونه‌ای و بین ارقام‌ها را نشان داد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۸ رقم گندم *Triticum aestivum* L. از ۵ آغازگر ISSR و ۲ آغازگر SSR استفاده کردند و از مجموع ۴۳ نوار تکثیر شده توسط ۵ آغازگر ISSR، ۲۹ نوار (۶۷/۴۴ درصد) چندشکلی مشاهده شد. تعداد نوارهای چند شکل تکثیر شده توسط هر یک از آغازگرهای ISSR در دامنه ۳ تا ۸ نوار بود و میانگین تعداد نوارها برای هر پرایمر ۴/۸ بود و آغازگر UBC-849 قادر به تشخیص تمام ارقام مورد مطالعه بود. در بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام متحمل و حساس به خشکی گندم نان با استفاده از نشانگر ISSR مشاهده شد که دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward، ارقام را به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود (۳۸).

مواد و روش‌ها کشت

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین برخی از ژنوتیپ‌های گندم، تعداد ۴۸ ژنوتیپ گندم (جدول ۱) از ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گنبدکاووس تهیه شد و سپس جهت استخراج DNA ژنوتیپ‌ها در یک خط دو متری جهت اطمینان از خلوص آنها با فاصله‌ی بین ردیف‌ها ۲۰ سانتی‌متر کشت شدند. آبیاری اولیه قبل از کشت صورت گرفت.

استخراج DNA

نمونه‌های برگ‌ی در اوایل صبح از ژنوتیپ‌های مختلف گندم به‌طور جداگانه جمع‌آوری شدند و برگ‌های هر نمونه درون کیسه‌های نایلونی همراه با اسم ژنوتیپ بسته‌بندی و بلافاصله درون ظرف یخ نگه‌داری شدند و سپس به آزمایشگاه منتقل و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در مرحله بعد DNA ژنومی آن‌ها استخراج گردید و در نهایت کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و کمیت DNA استخراج‌شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر تعیین شد. استخراج DNA ژنومی در این تحقیق با تغییر در روش CTAB انجام شد.

تکثیر DNA ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای ISSR

تعداد ۱۰ پرایمر ISSR از موسسه‌ی سینا کلون تهیه گردید که پس از چند مرحله آزمایش و ژل‌گذاری و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ۶ پرایمر ISSR انتخاب شد که دارای نوارهای واضح و قابل نمره‌دهی بودند که در (جدول ۲) آورده شدند. همچنین جهت بالا بردن تعداد نوارهای چند شکل از چهار ترکیب آغازگری نیز استفاده شد به این ترتیب که نمونه‌های مورد بررسی با ترکیب‌های آغازگری ۲ و ۳، ۴ و ۸ و ۴ و نهایتاً ۶ و ۱۰ تکثیر شدند. پس از اتمام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، جهت بررسی محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد، پس از اتمام عمل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، ژل با آب مقطر شسته شده و DNA در زیر نور UV در دستگاه Geldoc شرکت UVP آمریکا، مشاهده و عکس‌برداری شده و فایل‌های ایجاد شده جهت آنالیز با نرم‌افزار ذخیره‌سازی گردیدند.

تحلیل آماری داده‌های مولکولی

از نرم‌افزار Popgene برای تجزیه و تحلیل پارامترهای مربوط به جمعیت مانند محتوای اطلاعاتی چند شکل (PIC)، فراوانی آلل و تعداد آلل‌های مشاهده شده، شاخص شانون، تعداد آلل‌های مؤثر و شاخص تنوع نی از نرم‌افزار POP Gene و برای به دست آوردن فواصل ژنتیکی و رسم دندروگرام مورد انتظار از نرم‌افزار PAST استفاده گردید. هم‌چنین از نرم‌افزار PAST برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده گردید. شاخص نشانگری که بیانگر کارایی نشانگر می‌باشد، از حاصل ضرب، درصد پلی مورفیسم مشاهده شده هر پرایمر در PIC آن پرایمر به دست آمد.

نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگر ISSR به‌طور مؤثری می‌تواند برای مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام گندم استفاده شوند. پاسکوالون و همکاران (۲۸) به‌منظور ارزیابی سودمندی نشانگرهای ISSR برای شناسایی ۳۰ رقم و ۲۰ لاین اصلاحی گندم دوروم ایتالیایی که با ۹ آغازگر صورت گرفت به این نتیجه رسیدند که آغازگرهای مورداستفاده برای متمایز کردن همه ارقام گندم دوروم مورد بررسی مناسب بودند. نشانگر RAPD را برای تعیین چندشکلی در ۲۸ رقم تجارتي سبب‌زمینی به کاربردند و سودمندی این نشانگر را برای دسته‌بندی ژرم‌پلاسم و ارزیابی تنوع ژنتیکی بیان کردند. کاربرد نشانگرهای RAPD به‌عنوان مارکر ژنتیکی در گیاهان خودگرد افشان با سطح تنوع داخل گونه‌ای پایین مانند گندم ثابت شده است. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۴ نمونه از گندم‌های نان منطقه مدیترانه (مصر و یونان) ۱۷ آغازگر RAPD را برای تجزیه و تحلیل و مقایسه ژنتیکی مورد استفاده قرار دادند و گزارش کردند متوسط ضریب تشابه بر اساس آغازگر RAPD برای نمونه‌های مورد مطالعه ۰/۷۱۸ است و میانگین و دامنه ضرایب تشابه ژنتیکی بین ارقام به دست آمده از مصر و یونان به‌طور مستقل ۰/۷۶۵ و ۰/۶۶ (از ۰/۶۶ تا ۰/۸۸) و ۰/۷۲۳ (از ۰/۶۰۴ تا ۰/۸۹۶) بود. ضرایب همبستگی کوفنتیک (r) از سه دندروگرام RAPD (برای ۱۴ رقم، ۷ رقم مصر و ۷ رقم یونان به‌طور جداگانه)، ۰/۷۷۴، ۰/۸ و ۰/۷۴ بود و تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی قدر به تفرق بین رقم‌های مصری و یونانی بودند اما تجزیه به مؤلفه‌های اصلی کارآمدتر بود (۱).

در آزمایش تنوع ژنتیکی ۵۴ رقم قدیمی و جدید گندم بهاره با ۲۳ جایگاه ریزوماهواره ارزیابی و در مجموع ۱۵۱ آلل با تعداد آلل بین ۱۱-۳ آلل و میانگین ۶/۹ آلل برای هر جایگاه گزارش شد (۱۶). لیو و همکاران (۱۹) در مطالعه‌ای ۳۰ رقم گندم را با ۲۴ آغازگر ریزوماهواره ارزیابی و در مجموع ۱۱۵ آلل در دامنه‌ای از ۲ تا ۹ آلل و میانگین ۴/۶ آلل برای هر جایگاه گزارش کردند. تنوع ژنتیکی ۲۸ رقم و لاین ایرانی گندم نان را با استفاده از تجزیه RAPD مورد مطالعه قراردادند که دامنه ضریب تشابه از ۰/۴ تا ۰/۹۱ متغیر بود و تشابه ژنتیکی زیادی بین لاین‌ها دیده شد (۲). تنوع ژنتیکی گندم‌های بومی شمال غرب ایران را با استفاده از ۳۹ نمونه و مارکر ISSR بررسی کردند، تجزیه خوشه‌ای نشان داد که تمام نمونه‌ها در فاصله ژنتیکی ۲۵ در یک گروه قرار گرفتند (۳۷). از نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی دیگر مانند کلزا (۲۱) و برنج (۱۲) نیز استفاده شده است. با توجه به اینکه استفاده از نشانگرهای ISSR تاکنون برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم ایرانی انجام نشده بود و همچنین درصد چندشکلی بالایی که با استفاده از این نشانگر حاصل می‌شود، این پژوهش بدین منظور انجام گرفت.

جدول ۱- نام و شجره ژنوتیپ‌های مورد بررسی

Table 1. Name and pedigree of evaluated genotypes

شجره	ژنوتیپ
Improved	گنبد
SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y...	N-80-19
Improved	مروارید
Improved	فلات
Improved	تجن
Improved	شیرودی
Improved	پاستور
Improved	اترک
Improved	روشن
Improved	ورنیاک
Improved	قدس
Improved	کوبیر
Improved	بم
Improved	پیشناز
Improved	دریا
Improved	رسول
Improved	سایونز
Improved	گاسکوئن
Improved	خزرا
trap#1/yaco/3/kauz*2//trap//kauz CM96-099y-099m	N-80-9
SABUF7/ALTAR 84/AE.SQUARROSA (224)/...	N-87-20
MILAN CM75118/KA CM75118/K 1/TAJAN	N-87-19
BAV92/PRINIA/TAM200/PRL	N-87-4
PFAU/MILAN/5/CHEN/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)/BCN/3/VEE#7/BOW/4/PASTOR	N-91-8
TILH/5/PF74354/LD/ALD/4/2*BR12*2/3/JUP/PAR214*6/FB6631/6/ATTILA/2*PASTOR	N-91-10
PF74354/LD/ALD/4/2*BR12*2/3/JUP/PAR214*6/FB6631/5/SW89-5124*2/FASAN/6/TILH	N-91-14
PFAU/SHANGHAI#3/3/NAI60/HN//SY/4/SHIROODI/5/KAUZ/STAR	N-91-6
MILAN/S87230/BABAX	N-91-17
BABAX/LR42//BABAX*2/3/VIVITSI	N-90-12
OASIS/SKAUZ//4*BCN/3/2*PASTOR	N-90-7
Improved	کریم
Improved	لاین A
Improved	لاین ۱۷
Improved	کوه‌دشت
Improved	زاگرس
Improved	ناز
Improved	اینیا
Improved	گلستان
Improved	گهر
Improved	مغان ۳
Improved	آرتا
Improved	مارون
Improved	هیرمند
Improved	البرز
Improved	نیک نژاد
CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN	D-88-2
Improved	دنا
Improved	آریا
Improved	سیمره
Improved	دهدشت

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده

Table 2. Information of used ISSR primers

نام آغازگر	دمای اتصال	توالی آغازگر
PRI-1	۵۴	(CAG) ₅
PRI-4	۴۲	(CT) ₈ T
PRI-5	۴۷	(CCA) ₅
PRI-7	۴۲	(CCA) ₅
PRI-9	۵۴	(ACTG) ₄
PRI-10	۴۲	(GT) ₆ CC
PRI-2+PRI-4	۴۶	(GAAT) ₄ +(CT) ₈ T
PRI-3+PRI-4	۴۷	(CCTA) ₄ +(CT) ₈ T
PRI-8+PRI-4	۴۷	(CT) ₈ A+(CT) ₈ T
PRI-6+PRI-10	۴۸	(ATG) ₃ +(GT) ₆ CC

نتایج و بحث ارزیابی‌های مولکولی

از جمله معیارهای تعیین میزان چندشکلی، شاخص شانون (I) و تعداد آل مؤثر (Ne) می‌باشند. نتایج مربوط به این معیارها برای هر جایگاه در (جدول ۳) آورده شده است. تعداد آل تشخیص داده شده در هر جایگاه برای نمونه‌های مورد بررسی یک شاخص خوبی از تنوع ژنتیکی می‌باشد (۲۶). تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گندم با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. مطابق (جدول ۴) از میان همه آغازگرهای مورد بررسی ۷ آغازگر چندشکلی مناسبی را نشان دادند. آغازگرهای استفاده شده برای آنالیز تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گندم در مجموع توانستند ۶۲ مکان را شناسایی کنند که ۴۱ مکان از آن‌ها چندشکلی را نشان دادند. از ۶۲ نوار تشکیل شده، ۶۶/۱۲ درصد از نوارها چند شکل بودند و ۳۳/۸۷ درصد از نوارها هم یک‌شکل بودند و نیز میانگین درصد چندشکلی، ۶۵/۲۸ درصد برآورد شد که با توجه به این درصد چندشکلی می‌توان انتظار داشت که این نشانگرها بتوانند به عنوان یک ابزار قدرتمند در شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌های گندم عمل نمایند. نشانگر PRI-10 با ۱۰ نوار و توالی آغازگری CC(GT)₆، بیشترین تعداد نوار و ترکیب نشانگری (PRI-8+PRI-4) با توالی آغازگری CT₈A+(CT)₈T با ۳ نوار کمترین تعداد نوار را به خود اختصاص داد. آل‌های چندشکلی شناسایی شده توسط هر نشانگر بین ۲ تا ۸ آل متغیر بود و به طور متوسط ۴/۱ آل برای هر جایگاه مشاهده شد؛ و محتوای اطلاعات چندشکلی بین ۰/۳۷۵ تا ۰/۴۹۸ متغیر بود و به طور متوسط ۰/۴۷۵ بود. از معیارهای دیگر برای ارزیابی کارایی نشانگر در تعیین چندشکلی، شاخص شانون است که مقدار آن برای ترکیبات (PRI-3+PRI-4)، (PRI-8+PRI-4) و PRI-7 به ترتیب ۰/۶۶۶، ۰/۶۶۳ و ۰/۶۵۸ به دست آمد که با نتایج PIC هم‌خوانی داشت. تعداد آل‌های مؤثر در بین نشانگرهای مطالعه شده متفاوت بود. میانگین تعداد آل‌های مؤثر در کل ۱/۷۷ به دست آمد و از ۱/۵۸ تا ۱/۹۰ متغیر بود. بیشترین تعداد آل مؤثر برای ترکیبات (PRI-3+PRI-4)، (PRI-8+PRI-4) به ترتیب با مقادیر ۱/۹۰ و ۱/۸۹ شناسایی شد. یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین کل ژنوتیپ‌ها، شاخص ژنتیکی نی است. برآورد شاخص نی نشان داد میزان تنوع از ۰/۳۳۶ تا ۰/۴۷۴ متغیر است و ترکیبات آغازگری (PRI-3+PRI-4) و (PRI-8+PRI-4) به ترتیب با مقادیر ۰/۴۷۴ و ۰/۴۷۰ بیشترین میزان تنوع ژنتیکی نی را دارا بودند. ترکیب PRI-5 کمترین میزان تنوع نی را با مقدار ۰/۳۳۶ در بین کلیه ترکیبات نشان داد. میانگین تنوع نی ۰/۴۲۱ برآورد گردید. بررسی کلی آماره‌های تنوع ژنتیکی نشان داد که از بین ۱۰ ترکیب آغازگری ISSR، سه ترکیب (PRI-3+PRI-4)، (PRI-8+PRI-4) و PRI-7 نسبت به سایر ترکیبات ISSR مقادیر بالاتری را به خود اختصاص دادند. در حقیقت می‌توان ادعان داشت که در تمایز ژنوتیپ‌ها نقش بارزتری

ایفا می‌کنند. کمترین درصد چندشکلی با مقدار ۵۰ درصد به آغازگرهای PRI-5، (PRI-2+PRI-4) و (PRI-3+PRI-4) با داشتن تعلق گرفت. آغازگرهای PRI-4 و PRI-10 با داشتن بالاترین میزان درصد چندشکلی (۸۰ درصد)، نشانگرهای مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم بودند. نشانگر PRI-10 دارای بیشترین تعداد آل چند شکل با مقدار ۸ و ترکیب (PRI-8+PRI-4) دارای کمترین تعداد آل چند شکل را با مقدار ۲ بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، ۰/۴۵۷ برآورد شد که نشانگر (PRI-2+PRI-4) با ۰/۴۹۸۴ بیشترین و PRI-5 با ۰/۳۷۵ کمترین PIC را نشان دادند. هم‌چنین کمترین شاخص نشانگری MI به نشانگر PRI-5 با مقدار ۱۸/۷۵ و بالاترین شاخص نشانگری MI هم با مقدار ۳۹/۸۴ به نشانگر PRI-4 تعلق گرفت. ترکیب نشانگری (PRI-3+PRI-4) با دارا بودن بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی و تنوع نی و تعداد آل مؤثر در این مطالعه به‌عنوان بهترین نشانگر جهت بررسی تنوع ژنی شناسایی شد. مقدار متوسط درصد چندشکلی به‌دست‌آمده برای نشانگرهای مورد استفاده ۶۸/۲۸ درصد محاسبه گردید. در تحقیقی روی ۴۱ توده محلی طالبی به همراه دو رقم خربزه با استفاده از نشانگر SSR، مقدار PIC حاصل بین ۰/۲۴ تا ۰/۷۷ به دست آمد (۲۵). مقدار PIC به‌دست‌آمده در بررسی تنوع ژنتیکی روی ۵۴ ژنوتیپ از توده‌های مختلف خربزه و طالبی با استفاده از ۸ آغازگر ISSR از ۰/۹۲ تا ۰/۷۴ متغیر بود (۳۰). آغازگر ترکیبی (PRI-3+PRI-4) بیشترین میزان شاخص شانون را با مقدار ۰/۶۶۶۸ و آغازگر PRI-5 کمترین میزان شاخص شانون را با مقدار ۰/۵۰۲۹ به خود اختصاص دادند. نتایج نشان می‌دهد که در اکثر موارد با افزایش تعداد آل، شاخص شانون افزایش می‌یابد (۲۱). بیشترین میزان شاخص تنوع ژنتیکی نی در آغازگر ترکیبی (PRI-3+PRI-4) با مقدار ۰/۴۷۴۲ و کمترین میزان تنوع ژنتیکی نی در آغازگر PRI-5 با مقدار ۰/۳۳۶۲ مشاهده شد. بیشترین تعداد آل مؤثر برای آغازگر ترکیبی (PRI-3+PRI-4) با مقدار ۱/۹۰۸ و کمترین تعداد آل مؤثر برای آغازگر PRI-5 با مقدار ۱/۵۸۴ به دست آمد. به‌منظور کاهش خطای استاندارد تخمین فاصله‌ای، نشانگرهای ریزماهوره مورد استفاده در مطالعات فاصله ژنتیکی باید بیشتر از ۴ آل داشته باشند (۵). بنابراین نشانگرهای ریزماهوره در این مطالعه برای آنالیزهای تنوع ژنتیکی مناسب می‌باشند. در تحقیقی که در ۵ توده و ۱۱ رقم هیبرید ارائه کردند، میانگین آل مؤثر ۱/۳۱ به‌دست‌آمده آمد. بیشترین میزان شاخص نشانگری در آغازگر PRI-4 با مقدار ۳۹/۸۴ مشاهده شد که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگر نسبت به سایر آغازگرها است و کمترین شاخص نشانگری هم مربوط به آغازگر PRI-5 بود (۲۹) از نشانگر ISSR برای شناسایی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های اصلاحی گندم استفاده شد (۲۴). در این آزمایش از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده شد که مجموعاً ۸۶ نوار تولید شده ۶۹ نوار از بین آن‌ها چندشکلی نشان دادند (۸۰/۲ درصد).

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی ۴۸ ژنوتیپ گندم با استفاده از نشانگر ISSR

Table 3. Results caused evaluation of 48 wheat genotypes using ISSR markers

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال آغازگر	تعداد کل نوارها	تعداد نوارهای چند شکل	درصد چندشکلی	شاخص نشانگری MI	محتوای اطلاعات ژنتیکی PIC	شاخص شانون I	شاخص تنوع ژنتیکی H	تعداد آلل مؤثر ne
PRI-1	(CAG) ₅	۵۴	۷	۵	۷۱/۴۲	۳۰/۴۲	۰/۴۲۶۵	۰/۵۸۷۸	۰/۴۰۲۴	۱/۷۱۳۸
PRI-4	(CT) ₈ T	۴۲	۵	۴	۸۰	۳۹/۸۴	۰/۴۹۸۰	۰/۵۷۶۲	۰/۳۹۸۰	۱/۷۳۷۱
PRI-5	(CCA) ₅	۴۷	۶	۳	۵۰	۱۸/۷۵	۰/۳۷۵	۰/۵۰۲۹	۰/۳۳۶۲	۱/۵۸۴۵
PRI-7	(CCA) ₅	۴۲	۷	۵	۷۱/۴۲	۳۳/۵۶	۰/۴۷۰۷	۰/۶۵۸۹	۰/۴۶۶۵	۱/۸۷۹۰
PRI-9	(ACTG) ₄	۵۴	۶	۴	۶۶/۶۶	۲۵/۹۹	۰/۳۹۰۱	۰/۵۶۵	۰/۳۷۹۵	۱/۶۳۱۸
PRI-10	(GT) ₆ CC	۴۲	۱۰	۸	۸۰	۳۹/۰۴	۰/۴۸۸۵	۰/۵۸۱۸	۰/۴۰۶۵	۱/۷۵۹۵
PRI-2+PRI-4	(GAAT) ₄ +(CT) ₈ T	۴۶	۶	۳	۵۰	۲۴/۹	۰/۴۹۸۴	۰/۶۵۳۶	۰/۴۶۱۰	۱/۸۶۰۹
PRI-3+PRI-4	(CCTA) ₄ +(CT) ₈ T	۴۷	۶	۳	۵۰	۲۴/۶	۰/۴۹۲۱	۰/۶۶۶۸	۰/۴۷۴۲	۱/۹۰۸۶
PRI-8+PRI-4	(CT) ₈ A+(CT) ₈ T	۴۷	۳	۲	۶۶/۶۶	۳۱/۸۶	۰/۴۷۸۲	۰/۶۶۳۱	۰/۴۷۰۴	۱/۸۹۳۱
PRI-6+PRI-10	(ATG) ₅ +(GT) ₆ CC	۴۸	۶	۴	۶۶/۶۶	۳۰/۲۶	۰/۴۵۴۳	۰/۶۰۸۹	۰/۴۱۹۵	۱/۷۳۹۶
میانگین	-	-	۶/۲	۴/۱	۶۵/۲۸	۲۹/۹۲	۰/۴۵۷	۰/۶۰۶۵	۰/۴۲۱	۱/۷۷

تعیین ژنوتیپ‌های تأثیرگذار و بحرانی

برخلاف صفات فنوتیپی که در بیشترین موارد و مخصوصاً هنگامی که صفت دارای همبستگی بالا باشند، دو مؤلفه اول بیش از ۹۰ درصد تغییرات را توجیه می‌کنند، در داده‌های نشانگرهای مولکولی امکان توجیه مقادیر بیشتر واریانس متغیرهای اولیه توسط چند مؤلفه‌ای اصلی وجود ندارند. در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی بهترین حالت این است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسب در ژنوم داشته باشند تا بتوانند کل ژنوم را نمونه‌برداری کنند. بنابراین در صورتی که نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه تعداد بیشتری مؤلفه برای توجیه تغییرات کل آن‌ها لازم است. به عبارت دیگر عدم همبستگی بین آغازگرها باعث می‌شود، در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی تعداد زیادی مؤلفه، مقدار کمی از تغییرات را توجیه می‌کنند. ۱۰ مؤلفه توانستند ۶۷/۶۰ درصد از تغییرات را توجیه نمایند. نتایج حاصل از تجزیه

به مختصات اصلی PCOA با توجه به (جدول ۴) اولین مؤلفه ۱۳/۴ درصد از تغییرات را توجیه می‌کند و مؤلفه دوم ۱۰/۵۷ درصد از تغییراتی که مؤلفه اول توجیه نمی‌کرد را توجیه نمود. به همین ترتیب روند توجیه تغییرات توسط مؤلفه‌ها ادامه دارد و در نهایت مؤلفه دهم، ۳/۵۶ درصد از تغییراتی که توسط ۹ مؤلفه قبلی توجیه نشده بود را توجیه کرد. در پژوهشی به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰ لاین امیدبخش گندم نان با استفاده از روش‌های آماری چند متغیره با انجام تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، دو مؤلفه اول در مجموع ۷۳ درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه کردند که بر اساس آن، صفات وزن پدانکل، وزن هزار دانه، طول پدانکل و شاخص برداشت به‌عنوان مؤثرترین صفات در ایجاد تنوع بین لاین‌ها شناسایی شدند و تجزیه خوشه‌ای به روش WARD لاین‌های مورد بررسی را در ۳ گروه قرار داد و تجزیه تابع تشخیص این گروه‌بندی را تأیید کرد (۱۷).

جدول ۴- مقادیر ویژه، نسبت واریانس تجمعی عامل‌های استخراج شده

مؤلفه اصلی	مقدار ویژه	درصد واریانس
۱	۵/۴۹	۱۳/۴
۲	۴/۳۳	۱۰/۵۷
۳	۳/۰۷	۷/۴۹
۴	۲/۶۷	۶/۵۱
۵	۲/۵۵	۶/۲۴
۶	۲/۲۵	۵/۴۹
۷	۲/۱۱	۵/۱۶
۸	۲/۰۰۹	۴/۹۰
۹	۱/۷۴	۴/۲۵
۱۰	۱/۴۶	۳/۵۶

مورد استفاده در این بررسی باشد (۳۰). البته تأثیر عوامل محیطی در بروز صفات ریخت‌شناسی را نباید فراموش کرد. بیشترین تعداد ژنوتیپ‌ها در گروه یک جای گرفتند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های گلستان با گاسکوژن و N-91-17 یا N-80-19 بیشترین شباهت ژنتیکی را داشتند این دو ژنوتیپ دارای والدین مشترکی بودند. در گروه پنجم ژنوتیپ‌های پیشتاز و N-87-19 و ژنوتیپ‌های شیروودی و روشن بیشترین شباهت ژنتیکی را داشتند. کمترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گروه یک و پنج مشاهده شد و این موضوع نشان‌دهنده اختلاف ژنتیکی زیاد بین دو گروه می‌باشد. لذا می‌توان از آن‌ها در صورت داشتن صفات مطلوب به‌عنوان والد در برنامه‌های اصلاحی و دورگ‌گیری برای به‌دست آوردن حداکثر هتروزیس استفاده نمود. نتیجه گرفته شد ژنوتیپ‌هایی که در یک گروه قرار گرفتند باوجود تفاوت‌های ظاهری دارای تعداد توالی‌های تکراری مشابه هستند. اختلاف بین ژنوتیپ‌ها می‌تواند ناشی از پدیده‌های مختلف جهش‌زا مانند کراس‌ینگ‌آور نابرابر و عدم جفت شدن بوده باشد. در تحقیقی بر روی ۳۹ ژنوتیپ گندم دوروم با استفاده از مارکر ISSR، ۴۹ نوار، چندشکل بودند (۳۶) و در دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر و پلات، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در ۷ گروه طبقه‌بندی کرد. در

تجزیه‌ی بای پلات با استفاده از نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ژنوتیپ‌های وریناک، زاگرس، فلات، خزر ۱، نیک‌نژاد کریم، مروارید، کوه‌دشت، مغان ۳ و N-90-7 جزء ژنوتیپ‌های بحرانی بودند (شکل ۱) و در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها نقش مهمی را ایفا کردند تجزیه‌ی خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های مولکولی با تجزیه کلاستر بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد و برش دندروگرام در فاصله 10 ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه تقسیم کرد (شکل ۲). در گروه یک ژنوتیپ‌های کریم، پاستور، اترک، گاسکوژن، کویر، آرتا، رسول، مروارید، البرز، تجن، N-87-20 و N-80-19، قرار داشتند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های خزر ۱، سایونز، دریا، پیشتاز، N-87-4، N-91-10 و N-91-8 بودند. در گروه سوم ژنوتیپ‌های بم، شیروودی، گهر، گلستان، وریناک، ناز، زاگرس، فلات گنبد، N-87-19 و N-91-14 قرار داشتند. در گروه مرفولوژیک در چهار گروه مجزا قرار داشتند. در گروه چهارم هیچ کدام از ژنوتیپ‌ها والد مشترک نداشتند و از نظر مورفولوژیکی شبیه نبودند اما در یک گروه قرار گرفتند. از آنجایی که نشانگرهای ISSR جزء نشانگرهای تصادفی هستند بنابراین قرارگیری ژنوتیپ‌های متفاوت از نظر ظاهری شاید به دلیل تکثیر مناطق غیر رمز کننده توسط آغازگرهای

منابع

1. Abdellatif, K.F. and H.M. AbouZeid. 2011. Assessment of genetic diversity of Mediterranean bread wheat using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 9: 157-163.
2. Abdollahi, B., B. Tabatabaei, A. Bushehri, O. Ghannadha and M. Omid. 2003. Assessment of Genetic Diversity Among Wheat Cultivars by Using RAPD-PCR Technique, 2: 447-454 (In Persian).
3. Antonio, G.A., F.L. Benchimol, A.M. Barbosa, I.O. Geraldi, L.S. Claudio and P.S. Anete. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetic and Molecular Biology*, 27: 579-588.
4. Bakhshandeh, M.A. and R.M. Rahnama. 2005. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics, proceeding of the National Academy of Sciences. USA, 91: 5466-5570 (In Persian).
5. Barker, J.S. 1999. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proceeding of the 5th world congress on genetics applied to live stock productions. University of Guelph, Guelph, 21: 501-508.
6. Bommineni, R., P.P. Jauhar, T.S. Peterson and R.N. Chibbar. 1997. Analysis of hybrids of Durum Wheat with *Thinopyrum junceiforme* using RAPD markers. *Theoretical Genetics*, 95: 757-763.
7. Brantestam, A.K., R.V. Bothmer, C. Dayteg, I. Rashal, S. Tuveesson and J. Weibull. 2004. Inter-simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationship in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. *Hereditas*, 141: 186-192.
8. Carvalho, A., J. Lima-Brito, B. Macas and H. Guedes-Pinto. 2009. Genetic diversity and variation among botanical varieties of old Portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. *Biochemical Genetic*, 47: 276-294.
9. Chamani Mohasses, F., H. Samezade, M. Sohani and B. Rabiei. 2012. Assessment of genetic diversity in rice, *Oryza sativa* L. using molecular markers. Third National Conference on Agricultural Biotechnology, 82-84 (In Persian).
10. Dastourani, A., KH. Zeinali nejad, M. Soltani and M. Pahlavani. 2014. Genetic variation genotypes of bread wheat (*Triticum aestivum*) using ISSR markers. Thirteenth Congress of Crop Sciences of the Third Conference of Science and Technology Seed, Crop Science Society of Iran, 125-126 (In Persian).
11. Ghulam, M.A., Y. Sirato and S.K. Masumi. 2007. Assessment of genetic diversity in sesame Detected by Amplified Fragment Length Polymorphism markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10:15-31.
12. Honarvar1, F., H. Saoburi and A.R. Dadras. 2016. Study of Genetic Diversity of Rice Genotypes by SSR Markers and Association Analysis for Related Traits to Cold Tolerance. *Journal of Crop Breeding*, 8:166-173.
13. Kalate Arab, M., F. Sheikh and H. Farshadfar. 2010. Evaluation of genetic diversity and cluster analysis of wheat genotypes in mountain conditions in Golestan province. The 11th Iranian Crop Science Congress. Tehran, Shahid Beheshti University, 126-130 (In Persian).
14. Kejun, S., F. liu, V. Mus, V. Spencer. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21: 2128-2129.
15. Kendall, A., R. Lamkey and M. Lee. 1993. Quantitative genetics, molecular markers, and plant improvement. 10th Australian Plant Breeding Conferences, 18-23.
16. Khlestkina, E.K., M.S. Roder, A. Borner and V.K. Shumny. 2004. The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellite markers. *Plant Breeding*, 123: 122-127.
17. Kian Ersi, F., S. Mousavi, D. Afyoni and M. Abdollahi. 2013. Genetic variation promising wheat lines using multivariate statistical methods, the first national conference on e-agriculture and sustainable natural resources, Mehr Arvand Institute of Higher Education, Tehran, 123 pp (In Persian).
18. Lavi, U., M. Akkaya, A. Bhagwat, E. Lahav and P.B. Cregan. 1994. Methodology of generation and characteristics of simple sequence repeat DNA markers in avocado. *Euphotic*, 80: 171-177.
19. Liu, J., L. Liu, N. Hou and A. Zhang. 2007. Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. *Euphytica*, 155: 249-258.
20. Louis, E. and E. Dempfle. 1987. An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. *Biometrics*, 43: 805-811.
21. Marzoni, H. and L. Samiezadeh. 2016. Genetic Diversity Assessment of Lines and Varieties in Winter Rapeseed (*Brassica napus* L.) using RAPD and SSR Molecular Markers *Journal of Crop Breeding* 8: 131-139.
22. Manifesto, M.M., A.R. Schlatter, H.E. Hopp, E.Y. Suarez and J. Dubcovsky. 2011. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Science*, 41: 682-690.
23. Mohammadi, D. 2006. Genetic variation analysis of molecular data from the perspective of key articles of the Ninth Congress of Crop Sciences, 96-119 (In Persian).
24. Najafy, A., R. Ashrafi Parchin and E. Farshadfar. 2011. Evaluation of genetic diversity in wheat cultivars and breeding lines using inter simple sequence repeat markers. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 10: 2634-2638.
25. Nei, M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations Proceeding of National Academy of Science USA, 70: 3321-3323.
26. Nevo E. 1978. Genetic variation in natural populations. Patterns and theory. *Theoretical Population Biology*, 13: 121-127.

27. Parvathaneni, R.K., S. Natesan, A.A. Devaraj, R. Muthuraja, R. Venkatachalam, A.P. Subramani and p. Laxmanan. 2011. Fingerprinting in cucumber and melon (*Cucumis sp.*) Genotypes using morphological and ISSR markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 14: 39-43.
28. Pasqualone, A., C. Lotti, A. Bruno, P. De Vita, N. Di Fonzo and A. Blanco. 2000. Use of ISSR markers for cultivar identification durum wheat. *Mediterraneennes Ressourcsciheam. Org*, pp: 157-161.
29. Rahmanpour, S., B. Abdollahi and S. Gholamzadeh. 2012. Inter-simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationship in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. *Hereditas*, 141: 186-92 (In Persian).
30. Roldan Ruiz, F.A., T.J. Gilliland, P. Dubreuil, C. Dillmann and J. Lallemand. 2001. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1138-1150.
31. Saghai Maroof, M.A., R.M. Biyashev, G.P. Yang, Q. Zhang and R.W. Allard. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley species diversity, chromosomal location, and population dynamics, proceeding of the National Academy of Sciences. USA, 91: 5466-5570.
32. Salehi Jozani, GH. 1999. Some of the commercial varieties of potato genetic diversity techniques using RAPD-PCR Master Thesis, Department of Horticulture, College of Agriculture, Tehran University, 130 pp (In Persian).
33. Saunders, J.A., M.J. Pedroni, L.D.J. Penrose and A.J. Fist. 2001. AFLP Analysis of Opium Poppy. *Crop Science*, 41: 1596-1601.
34. Shafiei Homa, N., A. Zebarjadi, A. Najafi and R. Mohammadi. 2012. Genetic variation in Geneva types of durum wheat using molecular markers ISSR, Third National Conference on Agricultural Biotechnology of plant, animal and industrial, Mashhad, Ferdowsi University of Mashhad. 33-36 (In Persian).
35. Shannon, C. and W. Weaver. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press: Urbana, USA, 362 pp.
36. Sharma, R. and P. Konandreas. 2008. "WTO Provisions in the Context of Responding to Soaring Food Prices", *FAO Commodity and Trade Policy Research Working Paper No.25*. FAO, Rome.
37. Sofalian, O., N. Chaparzadeh, A. Javanmard and M.S. Hejazi. 2008. Study the genetic diversity of wheat landraces from Northwest of Iran based on ISSR molecular markers. *International Journal of Agriculture and biology*, 10: 466-468.
38. Sofalian, O. and B. Maryam. 2013. Assessment of winter survival in barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using molecular markers and some physiological traits, 30: 45-54.
39. Virik, P.S., J. Zhu, H.J. newbruy, G.G.J. Bryan, M.T. Taksa and B.V. Fard. 2000. Effectiveness of different class of molecular marker for classifying reveling variation in rice germplasm. *Euphytica*, 112: 275-284.
40. Zar, M., J. Ahmadi, G.A. Garosi and A.H. Beiki. 2010. Evaluation of genetic diversity in some drought tolerant and susceptible bread wheat cultivars using inter- microsatelite (ISSR) markers. *Modern Genetic Journal*. 15: 69-76 (In Persian).
41. Zhu, Y.F., J. Hu, R. Han, Y. Wang and S. Zhu. 2011. Fingerprinting and identification of closely related wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using ISSR and fluorescence-labeled TP-M13-SSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 5: 846-850.

Assessment of Genetic Diversity of Facultative wheat Genotypes Belong to North of IRAN using ISSR Markers

Ali Goli¹, Issa Jorjani², Hossein Sabouri³ and Hossein Ali Fallahi⁴

1 and 2- Graduated M.Sc. and Assistant Professor, Gonbad Kavous University

3- Associate Professor, Gonbad Kavous University (Corresponding author: hos.sabouri@gmail.com)

4- Assistant Professor, Research Center for Agriculture and Natural Resources Gonbad Kavous

Received: January 31, 2015

Accepted: November 1, 2015

Abstract

Identification and classification of genetic source are important in plant breeding and genetic diversity. In order to evaluate genetic diversity of 48 Facultative wheat genotypes belong to north of IRAN, an experiment was done using 10 ISSR primers in the genetic laboratory of Gonbad Kavous University. Out of 62 produced fragments, 41 fragments were polymorphic. The number of polymorphic bands were different from 2 to 8 for each primer. The maximum number of polymorphic bands were related to PRI – 10. PIC value were variable between 0.375 to 0.498 and Marker index were variable between 18.75 to 39.84. The maximum percent of polymorphism with 80% were belong to PRI-4 and PRI-10, and the minimum percent of polymorphism with %50 were belong to (PRI -2 + PRI -4), (PRI -3 + PRI -4) and PRI-5. (PRI-3 + PRI-4) and PRI-5 showed maximum Shanon index with 0.666 and 0.502, respectively. The maximum and minimum Nei genetic variability were observed for (PRI-3 + PRI-4), and PRI-5 as 0.336 and 0.474 respectively. Maximum (1.908) and minimum (1.584) number of effective alleles obtained for (PRI-3 +PRI-4), and PRI-5, respectively. The 48 genotypes were grouped in four groups by using Jacard Coefficient similarity in UPGMA cluster analysis. Cluster analysis showed that ISSR markers are reliable to manifest higher level polymorphism. It also showed that ISSR indicators is useful to evaluate genetic variability and breeding programs in wheat.

Keywords: Genetic diversity, ISSR marker, Polymorphism, PIC, Wheat