



مقاله پژوهشی

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های کینوا (*Chenopodium quinoa*) با استفاده از نشانگرهای ISSR

فاطمه جعفری^۱، محمد فرخاری^۲، عبدالرضا سیاهپوش^۳، محمود باقری^۴ و مهدی قنوتی^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران
۲- استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران، (نویسنده مسؤل: farkhari@asnrukh.ac.ir)
۳- استادیار بازنشسته گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران
۴- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۵- استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۲۳
صفحه: ۱۲۵ تا ۱۳۴

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: با توجه به سازگاری بالای کینوا با خاک‌های ضعیف و در عین حال مقاوم بودن به تنش خشکی و شوری این گیاه را گزینه جذابی جهت کشت در بسیاری از مناطق کشور نموده است. کشت کینوا طی سالیان اخیر در کشور در حال افزایش بوده و دستیابی به ارقام متحمل به تنش یکی از لازمه‌های حفظ این روند می‌باشد. بررسی تنوع ژرم‌پلاسما قدم اول در مطالعات به‌نژادی است. در این تحقیق تنوع موجود در بین و داخل تعدادی از جمعیت‌های کینوا با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این تحقیق در سال ۹۹-۱۳۹۸ در دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان اجرا شد. در این مطالعه تنوع بین و درون (با انتخاب سه فرد از هر توده) ۱۳ توده کینوا شامل ارقام زراعی (Giza1 و Titicaca)، مواد اصلاحی Q1، Q3، Q4، Q5، Q12، Q29، Q26 و چهار ژنوتیپ وحشی Chen با استفاده از نه نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل از ۹ نشانگر ISSR مورد استفاده، از مجموع ۹۰ باند حاصل، تعداد ۷۹ باند فرم چند شکلی (۸۷/۶۹) داشتند. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را به جز چند استثنا، در دو گروه Q و غیر Q (گروه Q: شامل ژنوتیپ‌هایی که نام آنها دارای پیشوند Q می‌باشند، گروه غیر Q: سایر ژنوتیپ‌ها) تقسیم‌بندی نمود. منشأ توده‌های گروه غیر Q (Giza1، Titicaca) و ژنوتیپ‌های وحشی (Chen) پرو و بولیوی است. همچنین منشأ ژنوتیپ‌های گروه Q (البته منشأ توده‌های Q1، Q3، Q4 و Q5 ناشناخته است) شیلی است. مطابق با گروه‌بندی دندروگرام، منشأ ژنوتیپ‌های Q1، Q3، Q4 و Q5 شیلی می‌باشد. در تجزیه به مختصات اصلی دو مولفه اول با مجموع توجیه ۲۶/۱۷ درصد از تغییرات، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در دو گروه تقسیم‌بندی نمود. این تقسیم‌بندی تقریباً در تطابق با تقسیم‌بندی حاصل از دندروگرام بود. همچنین در تجزیه واریانس مولکولی تنوع بین و داخل توده به ترتیب برابر با ۲۷ و ۷۳ درصد بود که حاکی از تنوع بالای درون توده است. تنوع داخل ارقام Giza1 و Titicaca از سایر توده‌ها کمتر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق نشان داد که نشانگرهای ISSR قادر به شناسایی چندشکلی قابل توجهی در بین ژنوتیپ‌های مختلف کینوا گردیدند. همچنین درصد بالایی از تنوع متعلق به تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها بود که نشان می‌دهد گزینش در داخل توده‌های کینوا می‌تواند تمبرخش باشد. در مجموع دندروگرام ژنوتیپ‌ها را در دو بخش دسته‌بندی نمود که منطبق با ژرم‌پلاسما کینوای متعلق به مناطق مرتفع و ساحلی می‌باشد. از این الگو می‌توان جهت مدیریت منابع ژرم‌پلاسما کینوا و نیز تعیین والدین جهت تلاقی و ایجاد جمعیت متنوع بهره‌برداری نمود.

واژه‌های کلیدی: به‌نژادی گیاهی، تنوع مولکولی، ژرم‌پلاسما کینوا، نشانگرهای مولکولی

مقدمه

صفات کیفی رفتاری دیپلوئید از خود نشان می‌دهد و از نظر فتوسنتز جزء گروه سه‌کربنه^۱ می‌باشد (۱۰). بالغ بر ۱۶۲۶۳ ژنوتیپ *Chenopodium* در جهان عمدتاً از منطقه آندی (بویژه بولیوی و پرو) جمع‌آوری شده است (۸). بزرگترین بانک ژن کینوا، مجموعه ملی بولیویایی واقع در بنیاد ارتقا و تحقیق در حوزه تولید آندی (PROINPA^۲) است. بهبود ارقام زیر کشت به میزان قابل توجهی به تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسما بستگی دارد. تنوع ژنتیکی که در میان جمعیت‌های گیاهی وجود دارد، یک نیاز اساسی برای به‌نژادی ارقام است (۴). درک میزان تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی موجود بین اکوتیپ‌های مختلف برای شناسایی و حفاظت مؤثر از منابع ژنتیکی و هم برای موفقیت برنامه‌های به‌نژادی مفید است (۱۱). کینوا به دلیل تنوع ژنتیکی گسترده مشهور است که آن را به یک محصول کاملاً متنوع تبدیل می‌کند که این خصوصیت باعث شده این گیاه با موفقیت با انواع مختلف محیط‌های رشد سازگار شود (۱۶).

نشانگرهای مولکولی یکی از ابزارهای در دسترس به نژادگر برای بررسی دقیق تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسما است. از مهم‌ترین مزایای این نشانگرها می‌توان به فراوانی و

کینوا شبه غله‌ای است که با توجه به سازگاری بالای آن با خاک‌های ضعیف و در عین حال مقاوم بودن به تنش خشکی و شوری گزینه جذابی برای کشت در بسیاری از مناطق کشور می‌باشد. علاوه بر آن کینوا از نظر پروتئین دانه (از لحاظ میزان و کیفیت) در شرایط مطلوبی قرار دارد و فاقد گلوتن می‌باشد. از مهمترین مشکلات موجود در کشورهای در حال توسعه می‌توان به سوء تغذیه ناشی از کمبود پروتئین و انرژی اشاره کرد. به دلیل کمبود منابع پروتئین حیوانی، تلاشی بی‌وقفه در راستای یافتن منابع جدید پروتئینی که از هر دو ویژگی خواص عملکردی و ارزش تغذیه‌ای برخوردار باشد، صورت می‌گیرد (۱۴). بذر گیاه کینوا سال ۱۳۸۷ از خارج از کشور وارد ایران شد و در سال ۱۳۸۸ برای نخستین بار در مزرعه تحقیقاتی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج کشت شد و در همان سال سازگاری و تولید محصول آن در کرج (استان البرز) به اثبات رسید (۳۰).

کینوا متعلق به خانواده *Amaranthaceae*؛ جنس *Chenopodium* و گونه *Quinoa* است (۵) که از نظر ژنتیکی گیاهی آلوتراپلوئیدی (2n=۳۶) است که در بیشتر

سایر ژنوتیپ‌ها در گروه دیگر قرار گرفتند. البته ژنوتیپ‌های جنوب و مرکز شیلی در گروه دوم، در دو زیر گروه جدا از یکدیگر قرار گرفتند. عبارتی تقسیم‌بندی ژنوتیپ‌های مربوط به مناطق مختلف شیلی، در تطابق با نواحی جغرافیایی بود.

در مطالعه الگار و همکاران (۲) برای بررسی چندشکلی ژنتیکی ۵ (سه ژنوتیپ با منشا بولیوی، یک ژنوتیپ با منشا پرو و یک ژنوتیپ دریافت شده از دانشگاه کلرادو آمریکا) ژنوتیپ کینوا از ۷ آغازگر ISSR استفاده کردند. گروه‌بندی قادر به تفکیک ژنوتیپ‌های منشا گرفته از مناطق بولیوی و پرو از یکدیگر نگردید. در مطالعه کریمی مقدم (۱۵) بر روی کینوا نتایج ۲۰ آغازگر ریزماهواره نشان داد که در مجموع ۱۷۷ باند با میانگین چندشکلی ۷۷/۷۷ درصد به دست آمد. ضریب تشابه ژنتیکی در دامنه‌ای از ۰/۴۳ تا ۰/۷۲ متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد اکوتیپ‌ها را در ۳ گروه طبقه‌بندی نمود.

مورگان و همکاران (۱۹) برای تولید اولین نقشه لینکاژی کینوا از بررسی ژنتیکی ۴ والد کاندید برای تشکیل جمعیت مد نظر، دو والد Ku-2 (متعلق به مناطق ساحلی شیلی) و 0654 (متعلق به مناطق مرتفع پرو) که دارای بیشترین عدم تشابه ژنتیکی بودند، بهره بردند.

در مطالعه حاضر تنوع مولکولی تعدادی از توده‌های کینوا (درون و بین توده) در سطح دی.ان.ای با استفاده از نشانگر ISSR برای برآورد میزان فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های موجود، و تخمین تنوع ژنتیکی مواد ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

دو رقم تجاری و یازده اکوتیپ (مجموعاً سیزده ژنوتیپ) در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است (جدول ۱). همچنین از ۹ آغازگر ISSR استفاده شده است (جدول ۲). استخراج دی.ان.ای توسط روش سی‌تپ تغییر یافته انجام پذیرفت (۲۳). بدین ترتیب که ابتدا ۰/۲ گرم نمونه گیاهی توسط ازت مایع در هاون به خوبی ساییده شده و سپس ۸۰۰ میکرولیتر محلول CTAB (CTAB ۲ درصد، کلرید سدیم ۱/۴ مولار، تریس ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۵۰ میلی‌مولار) و نیز ۲ میکرولیتر ۲-مرکابتو اتانول به آن اضافه و یک ساعت در بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت (در این مدت هر ۵ دقیقه یکبار تیوپ‌ها به آرامی تکان داده شدند). بعد از این مرحله ۵۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم:ایزوامیل الکل (۱:۲۴) به هر نمونه اضافه و بعد از اختلاط کامل و ایجاد محلول سبز رنگ یکدست، میکروتیوپ‌ها ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور سانتیفریوژ و فاز شفاف رویی جداسازی و توسط ایزوپروپانول سرد و سانتریفیوژ دی.ان.ای ته نشین و سپس شستشو با الکل ۷۰ انجام شد.

چند شکلی بالا، عدم تاثیرپذیری از عوامل محیطی، غیر وابسته بودن به مرحله رشدی گیاه و سهولت استفاده در آزمایشگاه اشاره کرد. نشانگر ISSR به طور گسترده برای تخمین تنوع ژنتیکی در سطح درون گونه‌ای و میان گونه‌ای در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی مانند برنج (۱۳)، گندم (۲۱)، ارزن انگشتی (۱)، سیب زمینی شیرین (۱۲)، بارهنگ (۳۳)، پونه (۳۲) و کبر (۱۷) بکار گرفته شده است.

در تحقیق سپهوند و همکاران (۲۹) تنوع ژنتیکی ۴۵ مورفوتیپ کینوا حاصل از دو توده Santamaria و Sajama را توسط ۱۱ نشانگر ریزماهواره بررسی شد. میانگین PIC برابر ۰/۶۲ و نشانگر ریزماهواره QAAT074 با ۰/۸۸ و نشانگر ریزماهواره QCA26 با ۰/۱۸ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان PIC را دارا بودند. گروه‌بندی با روش UPGMA بر اساس ماتریس تشابه Dice انجام و ژنوتیپ‌ها در سه گروه دسته‌بندی شدند. سه گروه حاوی مورفوتیپ‌هایی از هر دو توده بودند و از یکدیگر تفکیک نشدند. آنها دلیل عدم تفکیک مورفوتیپ‌های حاصل از دو توده از یکدیگر را تنوع بالا در بین مورفوتیپ‌های منشا شده از دو جمعیت و نیز دگرگشتی این گیاه و اختلاط فیزیکی در طول زمان اعلام نمودند.

ماسون و همکاران (۱۸) آغازگرهای SSR را طراحی و از آنها برای تعیین تنوع ۳۲ ژنوتیپ مختلف کینوا بهره بردند. موتیف‌های CA، ATG، ATT، GA و CAA دارای بیشترین فراوانی بودند. ژنوتیپ‌ها توسط ۳۹۷ آغازگر طراحی شده در این آزمایش در دو دسته ژنوتیپ‌های مناطق ساحلی و ژنوتیپ‌های مناطق مرتفع گروه‌بندی شدند. میزان چندشکلی به طور متوسط ۵۷ درصد بود و ۶۷ نشانگر ریزماهواره چندشکلی بالایی نشان دادند. رودریگوئز و ایسلا (۲۵) سطح پلی‌مورفیسم و ارتباط ژنتیکی بین ۲۰ ژنوتیپ کینوا را با استفاده از ۲۰ صفت مورفولوژیک و نشانگرهای AFLP مورد ارزیابی قرار دادند. آنها تفاوت و تشابه مولکولی بین ژنوتیپ‌ها را با استفاده از نشانگرها نیز محاسبه کردند که نتایج با صفات مورفولوژیک مهمی چون رنگ دانه، رنگ پانیکول، فنولوژی و توزیع جغرافیایی ژنوتیپ‌ها همبستگی بالایی داشتند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از صفات مورفولوژیک ژنوتیپ‌ها را در ۳ گروه دسته‌بندی کرد که هر گروه از ژنوتیپ‌ها متعلق به منطقه جغرافیایی خاصی بود. فوئنتس و همکاران (۹) تنوع ژنتیکی ۳۴ نمونه کینوای جمع‌آوری شده از مناطق جنوبی، مرکزی و شمالی شیلی به همراه چندین اکوتیپ کینوا از اکوادور، کلمبیا، آرژانتین، پرو و بولیوی را بررسی کردند. آنها در این پژوهش با ۱۱۸ نشانگر ریزماهواره ژنوتیپ‌ها را مورد ارزیابی قرار دادند. گروه‌بندی با روش UPGMA و ماتریس تشابه جاکارد انجام و ژنوتیپ‌ها را در دو گروه اصلی طبقه‌بندی نمود. ژنوتیپ‌های شمال شیلی به‌علاوه ژنوتیپ‌های مربوط به پرو و بولیوی و آرژانتین در یک گروه و

جدول ۱- توده‌های کینوای مورد بررسی در این پژوهش

Table 1. Populations of Quinoa that assessed in this research

SEED SOURCES مرکز تهیه بذر	ORIGIN منشاء	TYPE نوع	GENOTYPE NAME نام توده
International Center for Biosaline Agriculture (ICBA) مرکز بین‌المللی کشاورزی شورزیست	Unknown نامشخص	Accession	Q1
International Center for Biosaline Agriculture (ICBA) مرکز بین‌المللی کشاورزی شورزیست	Unknown نامشخص	Accession	Q3
International Center for Biosaline Agriculture (ICBA) مرکز بین‌المللی کشاورزی شورزیست	Unknown نامشخص	Accession	Q4
International Center for Biosaline Agriculture (ICBA) مرکز بین‌المللی کشاورزی شورزیست	Unknown نامشخص	Accession	Q5
Seed and Plant Improvement Institute (SPII) موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج	Chile	Accession	Q12
Seed and Plant Improvement Institute (SPII) موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج	Chile	Accession	Q26
Seed and Plant Improvement Institute (SPII) موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج	Chile	Accession	Q29
Seed and Plant Improvement Institute (SPII) موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج	Peru & Bolivia	Cultivar	TITICACA
Seed and Plant Improvement Institute (SPII) موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج	Bolivia	Cultivar	GIZA1
The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research موسسه IPK کشور آلمان	Bolivia	Accession	CHEN67
The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research موسسه IPK کشور آلمان	Peru	Accession	CHEN184
The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research موسسه IPK کشور آلمان	Peru	Accession	CHEN281
The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research موسسه IPK کشور آلمان	Peru	Accession	CHEN533

رابطه $EMR = f_j \times \beta$ بدست آمد. شاخص نشانگر^۵ با استفاده از رابطه $MI = EMR \times PIC$ محاسبه گردید. برای محاسبه شاخص‌های مذکور و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، از نرم‌افزار GenAlEx استفاده گردید. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc نسخه 2.02e صورت گرفت.

نتایج و بحث

از ۹ آغازگر ISSR که برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شد، در مجموع ۹۰ باند با متوسط ۱۰ باند به ازای هر آغازگر حاصل گردید که از این تعداد ۷۹ باند چندشکلی نشان دادند (۸۷/۶۹ درصد). در این میان آغازگرهای $(AC)_8CT$ ، $(GTC)_6$ ، $(AG)_8G$ و $(GACA)_4$ چندشکلی ۱۰۰ درصدی نشان دادند و آغازگر $(CAC)_3GC$ با مقدار ۶۴/۶۴ درصد کمترین میزان چندشکلی را دارا بود. بیشترین قطعه‌ی تکثیر شده (۱۲ عدد) با استفاده از آغازگر $(AG)_8G$ و کمترین قطعه‌ی تکثیر شده (۵ عدد) توسط آغازگر $(GACA)_4$ به دست آمد. در مجموع ۸۷/۶۹ درصد چندشکلی برای کلیه آغازگرها، میزان بالا و قابل توجهی است (جدول ۲). در سایر مطالعات نیز بالا بودن تنوع ژنتیکی گزارش شده توسط نشانگر ISSR در کینوا ثبت شده است. النگار و همکاران (۲) با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR میزان چندشکلی ۶۲ درصدی در ۵ ژنوتیپ مختلف کینوا را گزارش کردند. همچنین آناکروز و همکاران (۳) برای بررسی ۸۱ ژنوتیپ کینوا از هفت نشانگر ISSR استفاده کردند که چندشکلی ۹۹ درصدی مشاهده شد.

مخلوط واکنش شامل ۱/۳۳ میلی‌مولار آغازگر، DNA الگو ۲۰ نانوگرم به‌همراه مسترمیکس 2x مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل سه چرخه، چرخه اول با یک مرتبه تکرار شامل واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، چرخه دوم با ۳۵ مرتبه تکرار شامل سه مرحله، مرحله اول واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دوم اتصال آغازگر (دمای اتصال برای آغازگرهای مختلف به کار رفته در این تحقیق بین ۴۹/۶ الی ۶۰ درجه سانتی‌گراد متغیر است، جدول ۲) به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله سوم بسط آغازگر توسط آنزیم دی.ان.ای پلی‌مراز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، چرخه سوم بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه با ۱ مرتبه تکرار بود. محصول واکنش پس از الکتروفورز و عکس‌برداری، به صورت "۱" و "صفر" به ترتیب برای وجود و عدم وجود باند برای هر جایگاه نشانگری امتیازدهی گردید. برای محاسبه شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی^۱ (PIC) از رابطه $PIC = 2f_i(1 - f_i)$ (۱) فرآوانی آلل^۲ (λ) و درصد چندشکلی از رابطه $\%P = \frac{np}{n} \times 100$ (۲) np تعداد باندهای چندشکل حاصل از آغازگر و n تعداد کل باندهای حاصل از آغازگر مورد نظر) استفاده شد. شاخص اطلاع‌دهی باند^۳ نیز با استفاده از رابطه $Ib = 1 - [2 \times (0.5 - p)]$ (۳) نسبت افراد دارای باند در نشانگر مد نظر) محاسبه شد (۲۴). شاخص قدرت تفکیک^۴ از رابطه $Rp = \sum Ib$ (۷، ۲۴) محاسبه شد. شاخص نسبت سهم موثر^۴ از

1- Polymorphic information content
4- Effective multiplex ratio

2- Band informativeness
5- Marker index

3- Resolving power

جدول ۲- نشانگرهای ISSR مورد مطالعه و شاخص‌های محاسبه شده

Table 2. Used ISSR primers and calculated indexes

Row ردیف	Name of marker نام نشانگر	Sequence of primer توالی آغازگر	Temperature of annealing دمای اتصال °C	n	np	%p	Ib	Rp	PIC	EMR	MI
1	(AC)8CT	ACACACACAC ACACACCT	55.0	8	8	100	0.658	5.267	0.419	8.000	3.353
2	(CAC)3GC	CACCACCACGC	44.0	11	7	63.64	0.400	4.400	0.253	4.455	1.127
3	(GA)6CC	GAGAGAGAGA GACC	50.7	11	11	100	0.382	4.207	0.303	11.000	3.329
4	(GTC)6/	GTCGTCGTCGT CGTCGTC	57.9	11	10	90.91	0.489	5.379	0.318	91.091	2.893
5	(GA)8YC	GAGAGAGAGA GAGAGAYC	49.9	10	8	80.00	0.400	4.000	0.270	6.400	1.727
6	(AG)8G	AGAGAGAGAG AGAGAGG	52.0	12	12	100	0.567	6.800	0.360	12.000	4.324
7	(GA)9T	GAGAGAGAGA GAGAGAGAT	56.0	11	8	72.73	0.339	3.733	0.217	5.818	1.265
8	(GACA)4	GACAGACAGA CAGACA	48.0	5	5	100	0.514	2.571	0.327	5.000	1.633
9	(GA)9C	GAGAGAGAGA GAGAGAGAC	58.0	11	10	90.91	0.606	6.667	0.384	9.091	3.493
کل											
میانگین											
				90	79	88.69	0.484	4.780	0.317	7.873	2.572

n: تعداد کل نواریها، np: تعداد نواریهای چندشکل، %p: درصد چندشکلی، Ib: شاخص اطلاع دهی باند، Rp: قدرت تفکیک، PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی، EMR: نسبت سهم موثر، MI: شاخص نشانگری

n: Total number of bands, np: Number of polymorphism bands, %p: Percentage of polymorphism, Ib: Band informativeness, Rp: Resolving power, PIC: Polymorphic information content, EMR: Effective multiplex ratio, MI: Marker index

آزمایش به نظر می‌رسد نشانگر (AG)8G با دارا بودن توانایی تولید تعداد نوار بالا و همچنین ایجاد مقادیر بالایی از شاخص‌های تنوع بررسی شده، بهتر از سایر نشانگرها عمل کرده است و می‌توان آن را برای استفاده در مطالعات آتی پیشنهاد داد (شکل ۱ و جدول ۲).

برای رسم دندروگرام به کمک نتایج به دست آمده از نشانگرهای ISSR از ضرایب تشابه مختلف Jaccard، Dice و SM و به همراه سه روش رسم دندروگرام Single، UPGMA و COMPLETE استفاده شد. از بین ۹ دندروگرام حاصله، سه دندروگرام به دلیل نداشتن حالت زنجیره‌ای انتخاب شدند و در نهایت با توجه به ضریب کوفاکتیک بالاتر ($r=0.796 \sim 0.8$)، دندروگرام ایجاد شده براساس ماتریس تشابه Jaccard و الگوریتم رسم دندروگرام COMPLETE انتخاب گردید. با توجه به اینکه این مقدار از ضریب همبستگی در محدوده خوب $0.9 > r \geq 0.8$ قرار دارد (۲۵)، بنابراین مشابهت قابل قبولی بین خروجی داده‌های تجزیه یعنی دندروگرام و ورودی داده‌ها یعنی ماتریس تشابه وجود دارد.

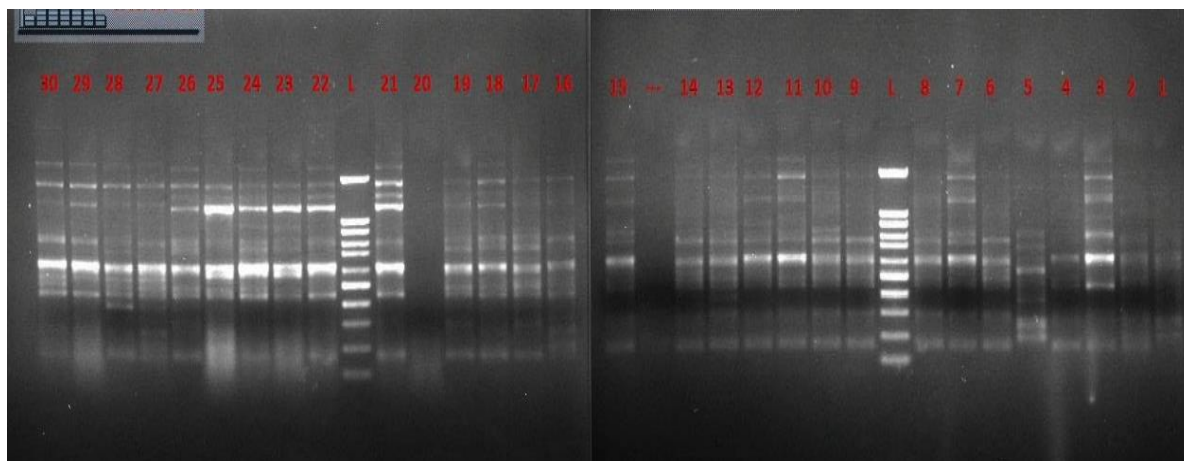
در نشانگرهای ISSR مقدار تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد در دامنه‌ای از ۰/۳۲۹ تا ۰/۸۹۵ با متوسط ۰/۵۷۴ قرار داشت. به این ترتیب نشانگرهای ISSR دامنه قابل توجهی از تنوع بین ژنوتیپ‌ها را شناسایی کرده است.

در گروه اول (A) دو فرد از هر یک از توده‌های Q1 و Q3 قرار گرفتند و گروه دوم حاوی دو زیر گروه است. یکی از این زیرگروه‌ها (B2) شامل توده‌های وحشی CHEN و دو رقم زراعی Titicaca و Giza1 به همراه دو فرد از ژنوتیپ Q29 قرار گرفته است. با توجه به اینکه منشأ رقم گیزا بولیوی و تی‌تی‌کاکا دریاچه تی‌تی‌کاکا واقع در پرو و بولیوی است، قرار گرفتن این دو رقم در کنار توده‌های وحشی CHEN با منشأ پرو و بولیوی قابل انتظار بود. در مطالعه الگار و همکاران (۲) گروه‌بندی ۵ ژنوتیپ مختلف مربوط به پرو و

سعدالله و یوسف (۲۸) نیز در مطالعه روی ۵ ژنوتیپ کینوا توسط هفت نشانگر ISSR و چهار نشانگر RAPD به ترتیب چندشکلی ۵۳/۴۳ و چندشکلی ۵۳/۰۶ درصدی گزارش نمودند. در مجموع به نظر می‌رسد علاوه بر بالا بودن تنوع کینوا، نشانگرهای ISSR نیز دارای توانمندی مناسبی برای تشخیص میزان تنوع و چندشکلی در این گیاه می‌باشند. بیشترین مقدار محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) در آغازگر (AC)8CT با مقدار ۰/۴۱۹ و کمترین مقدار نیز در آغازگر (GA)9T با میزان ۰/۲۱۷ به دست آمد. مقدار میانگین PIC برای نشانگرهای استفاده شده در این آزمایش برابر با ۰/۳۱۷ بود. با توجه به اینکه در نشانگر غالب حداکثر مقدار PIC برابر با ۰/۵ می‌باشد، محتوای چندشکلی بالایی در ژرم‌پلاس تحت بررسی وجود دارد. همچنین سروت و همکاران (۳۱) برای نشانگر غالب مقادیر PIC بین ۰/۳ الی ۰/۴ و ۰/۴ الی ۰/۵ را به ترتیب زیاد و بسیار زیاد در نظر گرفتند. به نظر می‌رسد در مجموع اکثر نشانگرهای استفاده شده در این پژوهش (۶ نشانگر از ۹ نشانگر) توانایی مطلوبی در تشخیص چندشکلی داشته‌اند. آغازگرهایی که بیشترین مقدار PIC را ایجاد کنند توانایی بیشتری در مشخص کردن فواصل ژنتیکی و ایجاد تمایز بین ژنوتیپ‌ها را دارا هستند و می‌توان در مطالعات آتی از آن‌ها استفاده کرد. بیشترین مقدار قدرت تفکیک (Rp) در نشانگر (AG)8G با مقدار ۶/۸ و کمترین مقدار آن نیز در نشانگر (GACA)4 با میزان ۲/۵۷۱ به دست آمد. مقدار متوسط این شاخص نیز برابر با ۴/۷۸ بود. بیشترین مقدار شاخص نسبت سهم موثر (EMR) با مقدار ۱۲ در نشانگر (AG)8G و کمترین میزان در نشانگر (CAC)3GC با میزان ۴/۴۵۵ و میزان متوسط آن برای نشانگرهای استفاده شده در این آزمایش برابر با ۷/۸۷۳ بود. بیشترین مقدار شاخص نشانگر (MI) با مقدار ۴/۳۲۴ نیز در نشانگر (AG)8G و کمترین مقدار ۱/۱۲۷ در نشانگر (CAC)3GC و میزان متوسط این شاخص برای همه برابر با ۲/۵۷۲ محاسبه گردید. در مجموع از میان نشانگرهای ISSR استفاده شده در این

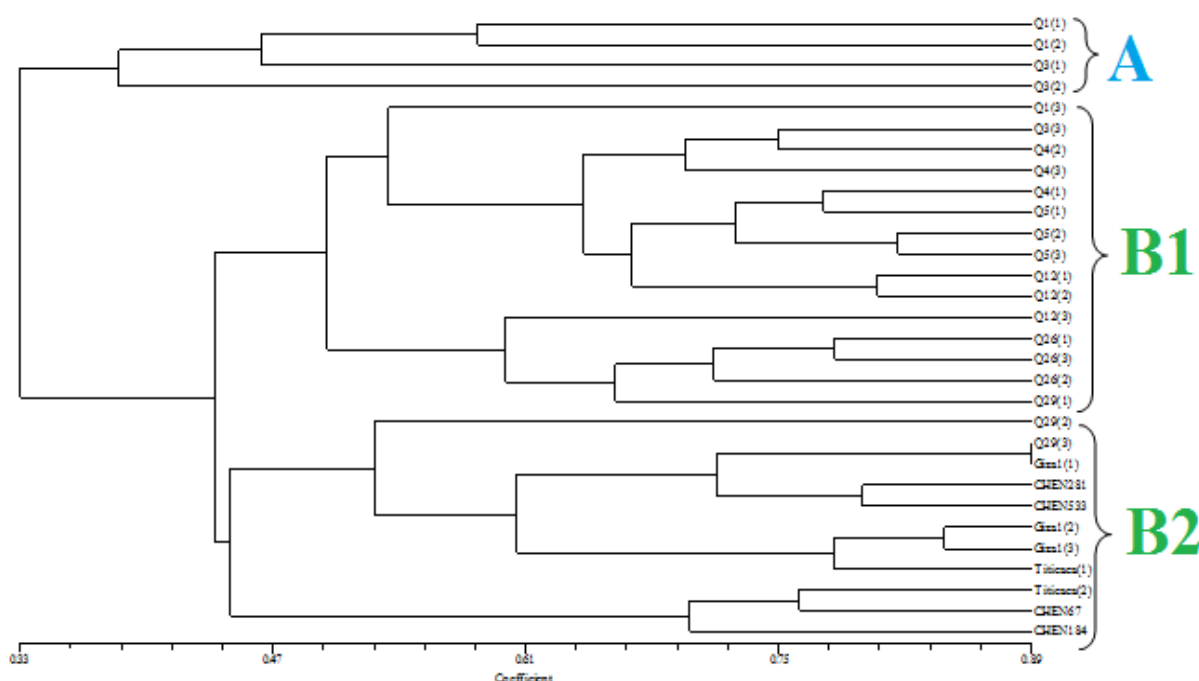
فرد سوم از این دو توده در گروه B1 قرار گرفته، بنابراین گروه A و زیر گروه B1 مرتبط با هم و می‌توان آن را یک گروه مشابه در نظر گرفت. بدین ترتیب در مجموع دو گروه شامل گروه توده‌های متعلق به شیلی و گروه توده‌هایی با منشأ پرو و بولیوی تقسیم‌بندی نمود. ماسون و همکاران (۱۸) توسط نشانگرهای ریزماهواره ۳۲ ژنوتیپ مختلف کینوا را در دو دسته گروه‌بندی نمودند که با مناطق ساحلی و مناطق مرتفع کوهستانی منطبق بود. فوئنتس و همکاران (۹) نیز تنوع ژنتیکی ۳۴ نمونه کینوای جمع‌آوری شده از مناطق جنوبی، مرکزی و شمالی شیلی را به همراه چندین اکوتیپ کینوا از اکوادور، کلمبیا، آرژانتین، پرو و بولیوی را توسط نشانگرهای ریزماهواره بررسی کردند. آن‌ها توده‌ها را در دو گروه اصلی (ژنوتیپ‌های شمال شیلی بعلاوه ژنوتیپ‌های مربوط به پرو و بولیوی و آرژانتین در یک گروه و سایر ژنوتیپ‌ها در گروه دوم) تقسیم‌بندی نمودند. رودریگوئز (۲۵) ارتباط ژنتیکی بین ۲۰ ژنوتیپ کینوای مربوط به مناطق جنوب شیلی و مناطق مرتفع را با استفاده از ۲۰ صفت مورفولوژیک در ۳ گروه دسته‌بندی نمود که با مناطق جغرافیایی توده‌ها (مناطق مرتفع شمالی و مناطق مرکزی و جنوبی شیلی) منطبق بود.

بولیوی توسط ۷ آغازگر نیز ژنوتیپ‌های مربوط به پرو و بولیوی را از یکدیگر نتوانست تفکیک نماید. توده‌های مربوط به پرو و بولیوی هر دو گروه جزو ژنوتیپ‌های مناطق مرتفع آندی است و قرارگیری آن‌ها در یک گروه دور از انتظار نیست. اما Q29 از نقطه جغرافیایی متفاوتی منشأ (شیلی) گرفته است. دلیل قرار گرفتن آن در کنار ژنوتیپ‌های متعلق به مناطق پرو و بولیوی می‌تواند تنوع زیاد داخل توده در این گیاه، اختلاط فیزیکی و نیز دگرگرده‌افشانی این گیاه باشد. در تحقیق سپهوند و همکاران (۲۹) مورفوتیپ‌های حاصل از دو توده Santamaria و Sajama توسط نشانگر SSR قابل تفکیک از یکدیگر نبودند که دلیل آن را دگرگشتن بودن این گیاه و اختلاط فیزیکی در طول زمان و نیز تنوع بالای داخل توده این گیاه گزارش نمودند. در زیر گروه دیگر (B1) نیز بقیه ژنوتیپ‌های Q قرار دارند. منشأ ژنوتیپ‌های Q26, Q29 و Q12 شیلی و Q1 الی Q5 متعلق به مرکز ICBA و منشأ آن نامشخص است. اما با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های Q1 الی Q5 در دسته متفاوتی از ژنوتیپ‌های CHEN و در کنار سایر ژنوتیپ‌های متعلق به شیلی قرار گرفته‌اند، نشان می‌دهد که منشأ این ژنوتیپ‌ها به احتمال زیاد شیلی است. با توجه به اینکه گروه A شامل دو فرد از توده‌های Q3 و Q1 است و



شکل ۱- الگوی بانندی متعلق به نشانگر (AG) 8G بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. L, "----" و اعداد به ترتیب نشاندهنده سایز مارکر، کنترل منفی و کد مربوط به هر ژنوتیپ است

Figure 1. Band patterns belonging to the marker (AG) 8G on 1.5% agarose gel. L, "----" and numbers in the figure shows size marker, negative control and code of genotypes, respectively



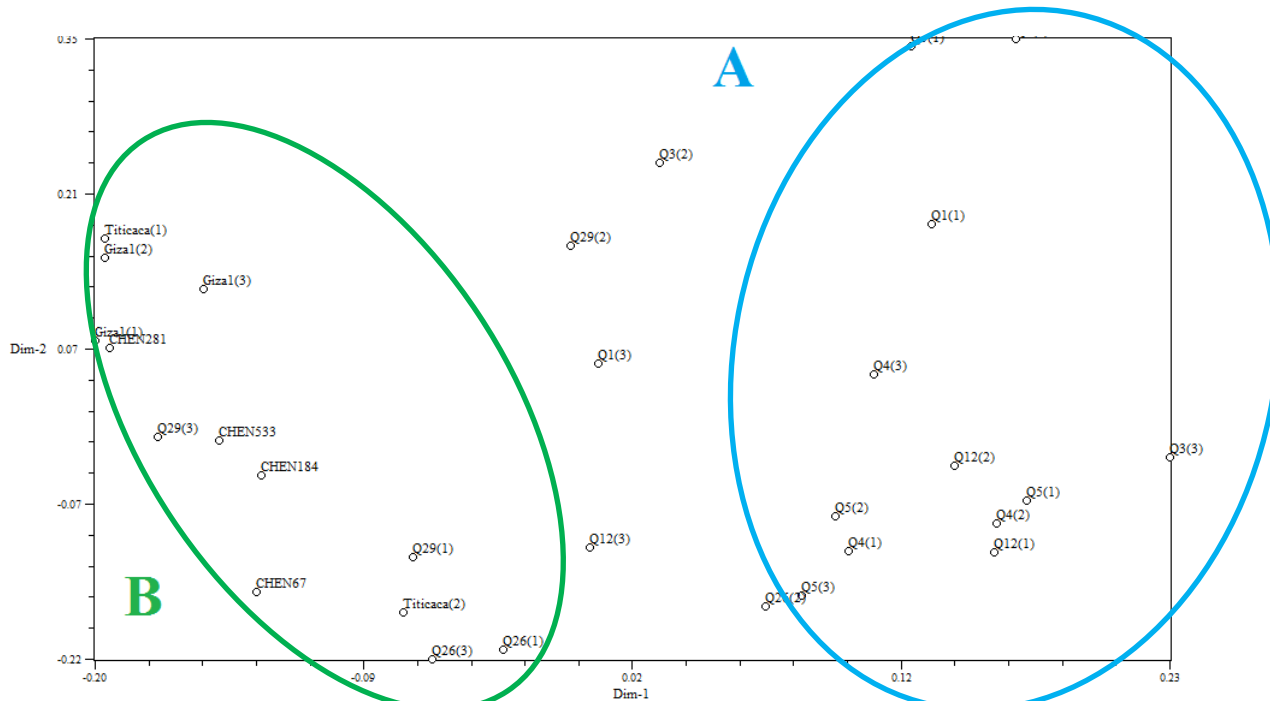
شکل ۲- دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مختلف کینوا توسط نشانگرهای ISSR با استفاده از روش Complete و ضریب تشابه جاکارد

Figure 2. Dendrograms obtained from cluster analysis of quinoa genotypes by ISSR markers using complete method and Jaccard similarity coefficient

قرار دارند و در گروه B هم ژنوتیپ‌های Giza1, Titicaca, CHEN26, Q29 و Q1 قرار گرفتند. همچنین در این میان یک فرد از هر کدام از توده‌های Q1, Q3, Q12 و Q29 در میان دو گروه قرار گرفتند. با توجه به اینکه چند مولفه اول درصد کمی از تغییرات داده‌ها را توجیه کردند بنابراین می‌توان گفت که نشانگرهای ISSR مورد استفاده در این پژوهش مستقل از یکدیگر و پراکندگی مناسبی بر روی ژنوم دارند. در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی بهترین حالت این است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسب در کل سطح ژنوم داشته باشند تا بتوانند تمام ژنوم را به خوبی بررسی نمایند. بنابراین در صورتی که نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه به تعداد مولفه‌های بیشتری جهت توجیه تغییرات کل نیاز است. به همین دلیل در داده‌های نشانگرهای مولکولی امکان توجیه مقادیر بالای واریانس متغیرهای اولیه توسط چند مولفه اصلی وجود ندارد (۲۰).

به‌نژادگران با گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس تنوع ژنوتیپی موجود در بین آنها، از میزان و پروفایل تنوع در میان ژرم‌پلاسما خود آگاه می‌شوند که می‌توانند از آن جهت مدیریت بهتر ژرم‌پلاسما و نیز بهره‌برداری موثرتر از آن استفاده نمایند. میزان شباهت کم بین دو توده نشان می‌دهد که دو توده دارای فاصله ژنتیکی زیادی بوده و در صورت داشتن صفات مطلوب مکمل می‌توان از آن‌ها جهت دورگ‌گیری استفاده کرد.

شکل (۳) پراکنش و توزیع نمونه‌ها بر اساس دو مولفه اول تجزیه به مختصات اصلی را ارائه نموده است. دو مولفه اول که دارای مقادیر ویژه بالاتری بودند در نظر گرفته شدند که در مجموع ۲۶/۱۷ درصد از تغییرات را توجیه می‌نمودند. این مقدار در مطالعه سپهوند و همکاران (۲۹) بر روی کینوا با استفاده از نشانگر SSR نیز ۲۶/۸۶ درصد بود که با مطالعه حال حاضر در تطابق است. بر اساس تجزیه به مختصات اصلی، ژنوتیپ‌ها تقریباً در دو دسته Q و غیر Q تقسیم شده است. در گروه A تقریباً تمامی ژنوتیپ‌های Q به غیر از Q29 و Q26



شکل ۳- نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نشانگرهای ISSR.
Figure 3. Two-dimensional plot of principal coordinates analysis (PCoA) of ISSR markers

هتروزیس بالا استفاده از والدینی است که دارای کمترین خویشاوندی باشند چرا که والدین با قدرت تفکیک پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالا ایجاد کنند (۲۲). با توجه به اینکه میزان دگرگشتی در کینوا بالاست، انتظار می‌رود که هتروزیس قابل توجهی هم در کینوا قابل بهره‌برداری باشد که در اینصورت ایجاد حداقل دو گروه هتروتیک در ژرم‌پلاسما منطبق بر نواحی مرتفع و ساحلی شیلی توصیه می‌شود. مورگان و همکاران (۱۹) برای تولید اولین نقشه لینکازی کینوا دو والد Ku-2 (متعلق به مناطق ساحلی شیلی) و ۰۶۵۴ (متعلق به مناطق مرتفع پرو) که دارای بیشترین عدم تشابه ژنتیکی در میان ژرم‌پلاسما آنها بودند، بهره بردند. همچنین دورگ‌گیری بین گروه‌های هتروتیک می‌تواند جهت ایجاد تنوع مورد استفاده قرار گیرد.

تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۷۳ درصد از تنوع ژنتیکی شناسایی شده درون جمعیت‌ها و ۲۷ درصد بین جمعیت‌ها می‌باشد (چهار توده CHEN در این آنالیز، به‌عنوان یک توده در نظر گرفته شد) (جدول ۳). در مجموع بنظر می‌رسد که با توجه به درصد دگرگشتی بالای کینوا، تنوع در داخل توده‌های کینوا بسیار بالاست. در مطالعه دل‌کاستیلو و همکاران (۶) با استفاده از نشانگرهای RAPD، تنوع درون جمعیتی موجود در درون دو مورفوتیپ کینوا برابر با ۹۱/۴ درصد بود، در حالی که تنها ۸/۶ درصد از تغییرات در بین دو مورفوتیپ بود. وجود تنوع بالا در درون توده‌ها در مقایسه با تنوع بین توده‌ها نشان از تنوع بالا در داخل جمعیت‌های کینوا است که از این تنوع می‌توان جهت استخراج لاین‌ها و ژنوتیپ‌های متنوع بهره جست. روش‌های دستیابی به قدرت

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی

Table 3. Molecular analysis of variance						
P-value	Percentage of variance	Estimated variance	Mean of square	Sum of square	Degree of freedom	Source of variation
احتمال	درصد واریانس	واریانس تخمینی	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
0.01	27	4.041	23.180	208.617	9	Among populations میان جمعیت‌ها
	73	11.088	11.088	221.750	20	Within populations درون جمعیت‌ها
	100	15.128	—	430.367	29	Total کل

تقسیم‌بندی نمود. منشا ژنوتیپ‌های گروه غیر Q به جز Q29، بولیوی یا پرو می‌باشند. همچنین منشا ژنوتیپ‌های Q12، Q29 و Q26 از گروه Q متعلق به شیلی است. اما اطلاعاتی در ارتباط با منشا اولیه ژنوتیپ‌های Q1، Q2، Q3، Q4 و Q5 در دسترس نیست که با توجه به اینکه در یک گروه در کنار سه ژنوتیپ متعلق به شیلی قرار گرفته‌اند، به احتمال فراوان منشا اصلی این چهار توده نیز شیلی می‌باشد. پنج گروه اکوتیپی در

نتیجه‌گیری کلی

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، بوته‌های حاصل از توده‌های مورد مطالعه را تقریباً در دو دسته ژنوتیپ‌های Q (همه بوته‌های مربوط به توده‌های Q1، Q2، Q3، Q4، Q5، Q12، Q26 و یک بوته از توده Q29) و ژنوتیپ‌های غیر Q (CHEN67، CHEN184، CHEN281، Giza1، CHEN533 و Titicaca و دو بوته از Q29)

خصوصیات ژنوتیپ‌ها را پیش‌بینی نمود (۱۰). مجموعاً ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این مطالعه را می‌توان در دو بخش نواحی مرتفع و مناطق ساحلی تقسیم‌بندی نمود. از این الگو جهت ایجاد گروه‌های هتروژیک نیز می‌توان بهره برد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی که حاکی از وجود تنوع بالا در درون توده‌ها بود. این تنوع در راستای گزینش توده‌ای مثبت برای افزایش عملکرد و بهبود خصوصیات زراعی توده‌ها، می‌تواند موثر واقع شود. همچنین گزینش لاین خالص نیز قابل توصیه است. وجود تنوع بالا در درون توده حاکی از دگرگشتی بالای این گیاه است که می‌تواند نوید بخش وجود هتروزیس بالا در این گیاه باشد.

کینوا براساس شرایطی که سازگار شده‌اند، شناسایی شده است که از لحاظ ظاهری، فنولوژی و سازگاری با استرس‌های زیستی و غیر زیستی از یکدیگر متفاوت هستند. این پنج گروه شامل (۱) بین دره‌های آندی واقع در کلمبیا، اکوادور و پرو (۲) کینوای مناطق مرتفع (در پرو و بولیوی) (۳) کینوای یونگاس^۱ (در جنگل‌های نیمه گرمسیری بولیوی) (۴) کینوای سالرس^۲ در مناطق شور (در بولیوی، شمال شیلی و آرژانتین) و (۵) کینوای ساحلی در مناطق با ارتفاع کم و یا در سطح دریا (در مرکز و جنوب شیلی) می‌باشد. تنوع بالایی در بین جمعیت‌های مختلف کینوا وجود دارد و از لحاظ مقاومت به شوری و خشکی، طول دوره رشدی گیاه و غیره با یکدیگر متفاوت هستند. با توجه به منشأ هریک از ژنوتیپ‌ها می‌توان

منابع

- Ajibade, S.N. Weeden and S. Chite. 2000. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica*, 111(1): 47-55.
- Al-Naggar, A.M.M., R.M. Abd El-Salam, A.E.E. Badran and M.M. El-Moghazi. 2017. Molecular differentiation of five quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) genotypes using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biotechnology Journal International*, 1-12.
- Ana-Cruz, M.C., M.E. Helena and M.C. Yacenia. 2017. Molecular characterization of *Chenopodium quinoa* Willd using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 16(10): 483-489.
- Caliskan, M. 2012. Genetic Diversity in plants. 1th edn. BoD-Books on Demand. Hatay, Turkey, 512 pp.
- Dallagnol, A. M., M., Pescuma, G. F. De Valdez and G. Rollán. 2013. "Fermentation of quinoa and wheat slurries by *Lactobacillus plantarum* CRL 778: proteolytic activity." *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 3129-3140.
- Del Castillo, C., T. Winkel, G. Mahy and J.P. Bizoux. 2007. Genetic structure of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) from the Bolivian altiplano as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(4): 897-905.
- Fernández, M.E., A.M. Figueiras and C. Benito. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin, 104: 845-851.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2010. The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Rome. ISBN 978-92-5-106534-1.
- Fuentes, F., D. Bazile, A. Bhargava and E.A. Martinez. 2011. Relationship between genetic diversity of *Chenopodium quinoa* and the dynamics of its seed exchanges in Chile.
- Gangopadhyay, G., S. Das and K.K., Mukherjee. 2002. Speciation in *Chenopodium* in West Bengal, India. *Genet. Res. Crop Evol.* 49: 503-510.
- Guliyev, N., S. Sharifova, J. Ojaghi, M. Abbasov and Z. Akparov. 2018. Genetic diversity among melon (*Cucumis melo* L.) accessions revealed by morphological traits and ISSR markers. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42: 393-401.
- Huang, J. and M. Sun. 2000. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (*Convolvulaceae*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(7): 1050-1060.
- Joshi, SP., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar and D.s. Brar. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*. 100(8): 1311-1320.
- Kanu, P.J., Z. Kerui, Z.H. Ming, Q. Haifeng, J.B. Kanu and Z. Kexue. 2007. Sesame protein 11: Functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate as influenced by pH, temperature, time and ratio of flour to water during its production. *Asian Journal of Biochemistry*, 5: 289-301.
- Karimi-Moghaddam, S.H. 2018 Assessing adaptation and diversity of quinoa morph-types by morphological asn SSR markers in different moisture conditions. MSc, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. 187 pp (In Persian).
- Katwal, T.B., N. Wangdi and P.L. Giri. 2018. Adaptation of Quinoa in Bhutanese Cropping Systems. *Bhutan Journal of Agriculture*.
- Mahmoudi, N., Gh. Sharifi Sirchi and K. Chaghmirza. 2022. Study of Population Structure of *Capparis Spinosa* and Analysis of Morphological Traits using ISSR and SCoT Markers. *Journal of Crop Breeding*, 14(41): 138-149 (In Persian).

18. Mason, S.L., M.R. Stevens, E.N. Jellen, A. Bonifacio, D.J. Fairbanks, C.E. Coleman and P.J. Maughan. 2005. Development and use of microsatellite markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Crop Science, 45(4): 1618-1630.
19. Maughan, P.J., A. Bonifacio, E.N. Jellen, M.R. Stevens, C.E. Coleman, M. Ricks and D.J. Fairbanks. 2004. A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD, and SSR markers. Theoretical and Applied Genetics, 109(6): 1188-1195.
20. Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. Crop science, 43(4): 1235-1248.
21. Nagaoka, T. and Y. Ogiwara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics, 94(5): 597-602.
22. Pank, F. 2007. Breeding of Medicinal Plants. In Kayser, O. and Quax, W.J. (Eds). Medicinal Plant Biotechnology from Basic Research to Industrial Applications. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, Co. 576 pp.
23. Porebski, S. Bailey, L.G. and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter, 15(1): 8-15.
24. Prevost, A. and M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. 98: 107-112.
25. Rodríguez, L.A. and M.T. Isla. 2009. Comparative analysis of genetic and morphologic diversity among quinoa accessions (*Chenopodium quinoa* Willd.) of the South of Chile and highland accessions. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 1(5): 210-216.
26. Rohlf, F.J. 1992. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics.
27. Roldan-Ruiz, I., E. Calsyn, T.j. Gilliland, R. Coll, M.J.T. Van Eijk and M. De Loose. 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties.2. AFLP characterization. Molecular breeding. 6(6): 593-602.
28. Saad-Allah, K.M. and M.S. Youssef. 2018. Phytochemical and genetic characterization of five quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) genotypes introduced to Egypt. Physiology and Molecular Biology of Plants, 24(4): 617-629.
29. Sepahvand, N.A., M. Sarhangi, R. Mehrabi and Kh. Mostafavi. 2015. Study on genetic diversity of quinoa morphotypes using microsatellite molecular markers. Journal New Genetics, 1(12): 115-122 (In Persian).
30. Sepahvand, N.A., M. Tavazoe and M. Kahbazi. 2010. Quinoa is a valuable plant for food security and sustainable agriculture in Iran. 11th Iranian Congress of Agricultural Sciences and Plant Breeding. Iran. Tehran. <https://civilica.com/doc/199369>.
31. Serrote, C.M.L., L.R.S. Reiniger, K.B. Silva, S.M. Dos Santos Rabaiolli and C.M. Stefanel. 2020. Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. Gene, 726: 144-175.
32. Torkaman, S., O. Sofalian, N. Zare and S. Hasanian. 2021. Investigation of Genetic Diversity of Native Ecotypes of Northwestern Medicinal Plant *Mentha longifolia* using ISSR Molecular Markers. Journal of Crop Breeding, 13(37): 1-10 (In Persian).
33. Wolf, K. and M. Morgan-Richards. 1998. PCR markers distinguish Plantago major subspecies. Theoretical and Applied Genetics, 96(2): 282-286.

Assessment of Genetic Diversity in Some Quinoa (*Chenopodium Quinoa*) Genotypes using ISSR Markers

Fatemeh Jafari¹, Mohammad Farkhari², Abdulreza Siahpoosh³, Mahmoud Bagheri⁴ and Mehdi Qanavati⁵

-
- 1- M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, (Corresponding author: farkhari@asnrukh.ac.ir)
3- Retired Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
4- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research Education and Extension (AREEO), Karaj, Iran
5- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), P.o Box 19395-3697, Tehran, Iran

Received: 26 June, 2022 Accepted: 14 August, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: Quinoa is an attractive crop in many parts of country based on its tolerance to salinity and drought stresses and its adaptability to poor soils. Area under Quinoa cultivation has been increased in recent years in Iran. Breeding of new Quinoa cultivars is essential to keep this trend. Assessment genetic diversity in the germplasm is the first step of plant breeding. In this study, genetic diversity of within and among of some Quinoa populations were determined by ISSR molecular markers.

Material and Methods: Diversity among and within 13 Quinoa populations (by assessment of three plants in each population) was examined by 9 ISSRs primers. A total of 13 genotypes including breeding material Q1, Q3, Q4, Q5, Q12, Q26 and Q2, four Chen wild accessions and Giza1 and Titicaca cultivars.

Results: A total of 90 bands (with 87.69% polymorphism) were detected with using of 9 ISSR primers. The genotypes were divided in two groups (Q group: including those genotypes with prefix Q in their names and None Q group: other genotypes) with a few exceptions by cluster analysis. Peru or Bolivia are the origin of None Q group genotypes (consisting Titicaca, Giza1 and Chen wild accessions). Also Chile is the origin of other genotypes located on Q group except Q1, Q3, Q4 and Q5 that their origin was not specified. According to the results of clustering, origin of Q1, Q3, Q4 and Q5 populations must be Chile. The first two components in the principal coordinate analysis (PCoA) account for 26.17% of total variance. The genotypes were divided into two groups by PCoA almost similar to the dendrogram grouping. Molecular analysis of variance (AMOVA) recognized high variation within the populations. AMOVA showed that 73% and 27% variations were within and among populations, respectively. Cultivars Titicaca and Giza exhibited lowest within population variance in comparison of other populations.

Conclusion: ISSR markers showed acceptable polymorphism based on the results. Positive mass selection is recommended according to the high variation within populations. In general, consideration of two origins for quinoa germplasm management, including Andean highlands and coastal areas is suggested.

Keywords: Molecular diversity, Molecular markers, Plant Breeding, Quinoa germplasm