DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گندم نان (*Triticum aestivum* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD

مژده رحمانی، مهدی رحیمی*، مریم عبدلی نسب و محمود ملکی

ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۹

چکیده

ارزیابی دقیق مقدار و پراکنش تنوع ژنتیکی در گیاهان به منظور تدوین راهبرد حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این پژوهش روابط ژنتیکی بین ۴۰ رقم گندم نان (*Triticum aestivum* L.) با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR و ۴ آغازگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. ۱۰ آغازگر ISSR تعداد ۹۲ باند چندشکل با میانگین ۹/۲ باند چندشکل برای هر آغازگر تولید نمودند و میانگین درصد چندشکلی ۸۶/۷۹ درصد بود. همچنین چهار آغازگر نشانگر RAPD تعداد ۱۹ باند چندشکل با میانگین ۴/۷۵ باند چندشکل برای هر آغازگر تولید کردند و میانگین درصد چندشکلی ۶۷/۸۵ درصد بود. بالا بودن معیارهای تعداد آلل مؤثر، تنوع ژنی، شاخص شانون، محتوای اطلاعات چندشکل، در مورد نشانگرهای ISSR برای آغازگرهای UBC813، UBC816 و UBC824 و در مورد نشانگرهای RAPD برای آغازگرهای OH-04 و OPA02 نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپهای گندم مورد مطالعه در این تحقیق بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه جاکارد بر اساس کل باندهای چندشکل نشانگر ISSR و RAPD ارقام گندم را در دو گروه جداگانه قرار داد. همچنین تجزیه به مختصات اصلی و تعیین ساختار جمعیت بر اساس روش بیزی با نرم‌افزار STRUCTURE ارقام را نیز در دو گروه قرار دادند و نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمودند. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع درون گروهها بیشتر از بین گروههاست. اطلاعات به دست آمده از این تحقیق و تنوع موجود در ارقام گندم می‌تواند در پژوهشهای به‌نژادی برای افزایش عملکرد مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی، ساختار جمعیت، روش UPGMA.

* نوسینده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۷۳۰۷۹۸۷۴، پست الکترونیکی: me.rahimi@kgut.ac.ir

مقدمه

گندم منبع اصلی کالری و پروتئین برای بخش بزرگی از جمعیت دنیا و همچنین ایران محسوب می‌شود و سطح زیر کشت گندم در ایران در سال ۹۵-۹۶ برابر با ۵۴۳۷۸۰۴ هکتار با تولیدی به میزان ۱۲۴۰۰۰۰۰ تن بوده است (۱) ولی با این وجود کشور سالانه میزان زیادی گندم وارد می کند که میزان واردات در سال ۹۳ برابر با ۷۱۲۲۸۷۰ تن بوده است (۶). گندم دارای گونه‌های زیادی است ولی بیشترین سطح زیر کشت (۹۰ درصد) و بیشترین میزان تولید (۹۴ درصد) مربوط به گونهٔ *T. aestivum* یا گندم نان است با وجود اینکه کشور ایران از غنای ژنتیکی بالایی برخوردار است و تنوع ژنوتیپها، نژادها و جمعیتهای گیاهان زراعی در گذشته در آن زیاد بوده است، ولی در حال حاضر این تنوع به شدت کاهش یافته است و ارقام زراعی اندکی بخش عمده تولید هر محصول را به خود اختصاص می‌دهند (۸). بنابراین برای کاهش میزان واردات گندم با توجه به کمبود زمینهای قابل کشت باید به دنبال افزایش تولید در هکتار از طریق افزایش عملکرد ارقام جدید بود. این اتفاق زمانی به وجود می‌آید که امکان انتخاب مواد

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7

گیاهی مناسب در برنامه‌های اصلاحی وجود داشته باشد و این مواد گیاهی نیز دارای تنوع کافی باشند. تنوع مبنای همه گزینشهاست و انتخاب ژنوتیپی نیز نیازمند تنوع است (۱۹). میزان تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آنها جهت انتخاب والدین مناسب در برنامه اصلاحی کلید موفقیت اصلاح‌گران است و بنابراین حفظ تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی بسیار مهم می‌باشد (۱۹) و یک برنامه اصلاحی زمانی موفق است که دو عامل تنوع و انتخاب در گیاه مورد آزمایش وجود داشته باشد. روشهای مختلفی مانند انواع نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی یا DNA جهت تعیین و برآورد تنوع ژنتیکی گیاهان وجود دارد. در بررسی تنوع ژنتیکی داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی نسبت به داده‌های مورفولوژیکی، شجره‌نامه‌ها، بیوشیمیایی برتری دارند (۱۷).

به کارگیری نشانگرهای مولکولی در گندم کاربرد گسترده‌ای در دهه گذشته داشته است. از جمله نشانگرهایی که برای بررسی تنوع ژنتیکی در گندم استفاده شده نشانگرهای ISSR و RAPD می‌باشد (۲۲ و ۲۴). این نشانگرها مبتنی بر PCR بوده و به طراحی آغازگر نیازی ندارند. نشانگر ISSR قطعه DNAی موجود و قابل تکثیر بین دو ریز ماهواره را که در جهت مخالف هم قرار دارند تکثیر می‌کند (۲۴) و نشانگر RAPD یک نشانگر تصادفی بوده و نواحی تصادفی در ژنوم را تکثیر می‌کند. این نشانگرها در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نشان‌دار کردن ژنی، نقشه‌یابی ژنومی و زیست‌شناسی تکاملی به کار می‌روند (۲۱). خلستکنیا و همکاران (۱۴) تنوع ژنتیکی ۵۴ رقم قدیمی و جدید گندم بهاره را با ۲۳ جایگاه ریز ماهواره ارزیابی و در مجموع ۱۵۱ آلل با تعداد آلل بین ۱۱-۳ آلل و میانگین ۶/۹ آلل برای هر جایگاه گزارش کردند. در تحقیقی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم گندم دوروم (*Triticum turgidum* ssp. durum) با استفاده از توالیهای ساده تکراری (ریزماهواره‌ها) ارزیابی شد. یکصد و چهل ژنوتیپ متعلق به مناطق مختلف (۱۰ کشور) با ۴۸ جفت نشانگر ریزماهواره (با پوشش یکنواخت ژنوم) مورد بررسی قرار گرفتند و از این تعداد، ۳۷ جفت نشانگر چند شکلی نشان دادند. در مجموع از ۳۷ جفت نشانگر، ۲۴۵ آلل چند شکل متفاوت، در دامنه‌ای بین ۲ تا ۱۷ آلل و با متوسط ۶/۹ آلل در هر جایگاه ژنی تکثیر گردید. میزان اطلاعات چندشکل (PIC) از ۰/۰۰۷ (جایگاه ژنی Xgwm274) تا ۰/۷۹۹ (جایگاه ژنی Xgwm427) متفاوت بود (۴). در تحقیقی دیگر ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای گندم با استفاده از مارکرهای ISSR انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به پرایمر IS-10 (۰/۳۶) و کمترین آن مربوط به پرایمرهای IS-16 و IS-11 (۰/۲۲) بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه دایس ژنوتیپها را در سه گروه دسته‌بندی کرد که ژنوتیپ شماره ۲۵ (شاهد گندم نان) در یک گروه کاملاً جداگانه با فاصله زیادی از سایر گروهها قرارگرفت (۳). در بررسی الگوی تغییرات ژنتیکی درون و بین دو مجموعه ارقام بومی گندم نگهداری شده در مرکز بین المللی اصلاح گندم و ذرت (CIMMYT) با استفاده از ۷۶ نشانگر ریز ماهواره، تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای درون توده‌های مکزیکی و ترکیه مشاهده شد (۱۱). سفالیان و همکاران (۲۳) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۹ رقم گندم بومی بهاره از ۱۱ نشانگر ISSR استفاده کردند که در مجموع ۱۰۸ باند تشکیل شد که ۷۸ قطعه (۷۲/۲۲ درصد) از آنها چندشکل بودند.

با توجه به اینکه این ارقام با هم و با این آغازگرها مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند و شباهت و تفاوت این ارقام با هم بررسی نشده است. بنابراین اهداف این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان از طریق نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD و تعیین روابط ژنتیکی آنها برای شناسایی والدین مناسب برای برنامه‌های اصلاحی و ژنتیکی می‌باشد. تا بتوان از ارقامی که تفاوت زیادی باهم دارند در برنامه‌های

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7

دورگ‌گیری برای افزایش عملکرد گندم و مناسب کشت در منطقه ماهان استفاده نمود.

مواد و روشها

برای بررسی تنوع ژنتیکی بذور تعداد ۴۰ رقم گندم زراعی که از بانک ژن تهیه گردیده بودند (جدول ۱) به مدت ۲۴ ساعت در آب و در تاریکی در دمای اتاق خیسانده شدند و سپس در پتری‌دیش کشت شدند و پس از ۱۲ روز برگها برای استخراج DNA برداشت شدند.

جدول ۱- ارقام گندم نان مورد مطالعه

ردیف	ژنوتیپ	ردیف	ژنوتیپ	ردیف	ژنوتیپ	ردیف	ژنوتیپ
۱	اکبری	۱۱	زرین	۲۱	الوند	۳۱	رسول
۲	نیک نژاد	۱۲	تجن	۲۲	شیراز	۳۲	شعله
۳	روشن	۱۳	فلات	۲۳	اکسکلیبر	۳۳	سبلان
۴	چمران	۱۴	آذر ۲	۲۴	بزاستایا	۳۴	مرودشت
۵	هیرمند	۱۵	مغان ۳	۲۵	داراب	۳۵	آرتا
۶	مغان ۱	۱۶	امید	۲۶	هامون	۳۶	کرج ۲
۷	دز	۱۷	ارگ	۲۷	گاسپارد	۳۷	کویر
۸	آستارا	۱۸	سرداری	۲۸	وی ناک	۳۸	بولانی
۹	طوس	۱۹	الموت	۲۹	شاه پسند	۳۹	mv-17
۱۰	سرخ تخم	۲۰	آزادی	۳۰	پیشتاز	۴۰	مهدوی

جدول ۲- خصوصیات آغازگرهای ISSR و RAPD مورد مطالعه

نوع آغازگر	نام آغازگرها	توالی	دمای اتصال	درصد GC
ISSR	UBC812	$5(GA)_8A3'$	۴۲	۴۷
	UBC813	$5(CT)_8T3'$	۴۲	۴۷
	UBC815	$5(CT)_8G3'$	۴۳	۵۳
	UBC816	$5(CA)_8T3'$	۴۷	۴۷
	UBC817	$5(CA)_8A3'$	۴۷	۴۷
	UBC823	$5(TC)_8C3'$	۴۴	۵۳
	UBC824	$5(TC)_8G3'$	۴۵	۵۳
	UBC825	$5(AC)_8T3'$	۴۸	۴۷
	UBC826	$5(AC)_8C3'$	۴۹	۵۳
	UBC876	$5(AC)_8A3'$	۴۳	۴۷
RAPD	OH-04	5´GGAAGTCGCC3´	۳۴	۷۰
	OA12	5´TCGGCGATAG3´	۳۲	۶۰
	OC4	5´CCGCATCTAC3´	۳۲	۶۰
	OPA02	5´TGCCGAGCTG3´	۳۰	۷۰

برگهای برداشت شده بلافاصله درون نیتروژن مایع قرار گرفته و پس از انجماد سریع به فریزر در ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند. استخراج DNA از برگهای جوان به روش دلاپورتا با اندکی تغییرات انجام شد (۱۰). کمیت و

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7

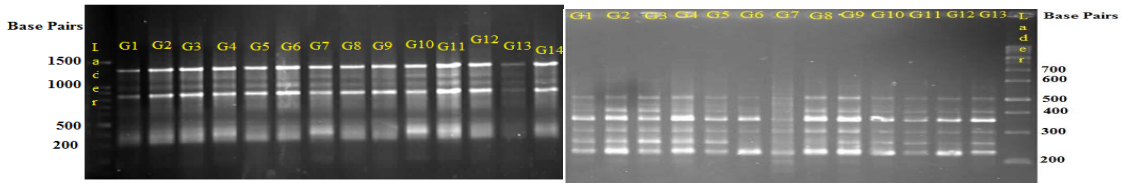
کیفیت DNA استخراجی از طریق اسپکتروفتومتری و مطالعه طیف جذبی DNA در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نیز الکتروفورز ژل آگارز یک درصد (۱۳، ۱۶ و ۲۵) تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR و چهار آغازگر RAPD انجام شد (جدول ۲). واکنش PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سینا ژن و در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر بافر 10X PCR، ۰/۲۵ میکرولیتر کلریدمنیزیم ۵۰ میلی‌مولار، U ۰/۲۵ آنزیم Tag DNA Polymerase، ۰/۷۵ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۰/۲۵ میکرولیتر محلول نوکلئوتیدی (dNTPs) ۱۰ میلی‌مولار و دو میکرولیتر DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم) در دستگاه ترموسایکلر (مدل Biometra) انجام شد.

الگوی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای آغازگر ISSR به این شرح بود: اولین چرخه حرارتی شامل چهار دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت، سپس ۳۵ سیکل بعدی به‌صورت ۴۰ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه، ۴۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر در دمای مناسب (بسته به آغازگر متفاوت بود)، دو دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه صورت گرفت و آخرین چرخه هم به‌صورت پنج دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه انجام گرفت، سپس نگهداری در دمای ۴ درجه بود. همچنین الگوی دمایی برای آغازگر RAPD نیز به این شرح بود: اولین چرخه حرارتی شامل پنج دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه، سپس ۳۵ سیکل به‌صورت یک دقیقه واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه مرحله اتصال آغازگر در دمای TM (بسته به آغازگر متفاوت بود)، یک دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه و پنج دقیقه بسط انتهایی در دمای ۹۴ درجه، سپس نگهداری در دمای در ۴ درجه بود. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد (۱۳، ۱۶ و ۲۵) با ولتاژ ۷۰ ولت طی یک ساعت الکتروفورز تفکیک شدند. رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. در انتها ژل با آب مقطر شسته شده و توسط دستگاه ژل داک (مدل Bio-Rad) عکس‌برداری انجام شد. آغازگرهای چند شکل به دست آمده روی ۴۰ ژنوتیپ به صورت داده‌های صفر و یک وارد نرم افزار Excel و سپس به وسیله نرم افزارهای Power Marker، STRUCTURE، PAST، PopGene 32 و SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت به دست آوردن تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات نشانگری از نرم افزارهای Power Marker و PopGene32 استفاده شد. همچنین تجزیه خوشه‌ای، ضریب همبستگی کوفنتیک و تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم افزار PAST انجام شد. تجزیه تابع تشخیص با استفاده از نرم‌افزار SAS و روش cross-validation انجام شد. همچنین از نرم‌افزار STRUCTURE برای تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای و همچنین تعیین تعداد گروه و ساختار آن استفاده شد. در نهایت از نرم‌افزار GenAlEx 6.5 برای بررسی تنوع درون و بین گروههای به دست آمده از نرم‌افزار STRUCTURE استفاده شد.

نتایج

در شکل ۱ تکثیر پرایمر UBC826 (قسمت الف) برای نشانگر ISSR و پرایمر OH-04 (قسمت ب) برای نشانگر RAPD نشان داده شده است. از مجموع ۱۰ آغازگر ISSR مورد استفاده تعداد ۹۲ باند چندشکل به‌دست آمد که ۴ آغازگر ۱۰۰ درصد چندشکلی نشان دادند و میانگین باندهای چندشکل ۹/۲ و درصد چندشکلی ۸۶/۷۹ درصد به‌دست آمد و از ۴ آغازگر RAPD مورد استفاده تعداد ۱۹ باند چندشکل حاصل شد که یک آغازگر ۱۰۰ درصد چندشکلی نشان داد و میانگین باندهای چندشکل ۴/۷۵ و درصد چند شکلی ۶۷/۸۵ درصد به‌دست آمد (جدول ۳).

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7



(ب) (الف)

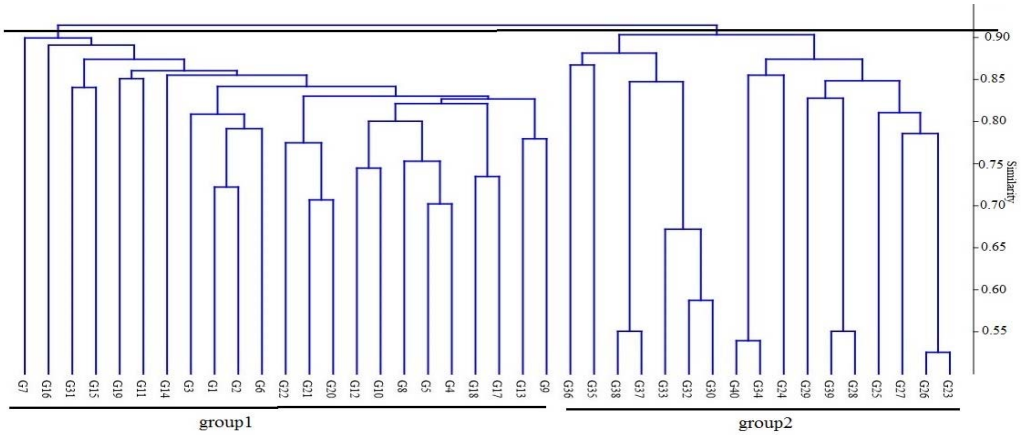
شکل ۱- نمونه الگوی باندی پرایمر UBC826 (الف) نشانگر ISSR و پرایمر OH-04 (ب) نشانگر RAPD حاصل از تکثیر ارقام گندم

جدول ۳- نتایج تجزیه مولکولی برای آغازگرهای ISSR و RAPD در ارقام گندم

نام آغازگرها	تعداد باندهای چندشکل	درصد چندشکلی	محتوای اطلاعات چندشکل	تعداد آلل مؤثر	تنوع ژنی نی	شاخص شانون	شاخص نشانگری	نسبت چندگانه موثر
UBC812	۸	۱۰۰	۰/۲۶	۱/۵۶	۰/۳۳	۰/۵	۲/۰۸	۸
UBC813	۷	۱۰۰	۰/۳	۱/۶۵	۰/۳۸	۰/۵۷	۱/۲	۷
UBC815	۱۰	۶۶/۶	۰/۲۲	۱/۵۲	۰/۲۸	۰/۴۱	۱/۴۶	۶/۶۶
UBC816	۸	۱۰۰	۰/۲۸	۱/۶۱	۰/۳۵	۰/۵۲	۲/۲۴	۸
UBC817	۱۰	۸۳/۳	۰/۱۸	۱/۳۱	۰/۲۱	۰/۳۵	۱/۵	۸/۳۳
UBC823	۱۳	۸۶/۶	۰/۱۷	۱/۳۲	۰/۲۱	۰/۳۴	۱/۹۱	۱۱/۲۶
UBC824	۱۴	۱۰۰	۰/۲۷	۱/۵۹	۰/۳۴	۰/۵۱	۳/۷۸	۱۴
UBC825	۶	۷۵	۰/۲۷	۱/۴۱	۰/۲۵	۰/۳۸	۱/۲۱	۴/۵
UBC826	۷	۸۷/۵	۰/۲۳	۱/۴۲	۰/۲۷	۰/۴۳	۱/۴	۶/۱۲
UBC876	۹	۸۱/۸	۰/۲۴	۱/۵۲	۰/۳	۰/۴۵	۱/۷۶	۷/۳۶
میانگین (Average)	۹/۲	۸۶/۷۹	۰/۲۴	۱/۴۹	۰/۲۹	۰/۴۴	۱/۹۴	۸/۱۲
OH-04	۷	۸۷/۵	۰/۲۹	۱/۷۱	۰/۳۸	۰/۵۴	۱/۷۷	۶/۱۲
OA12	۵	۱۰۰	۰/۱۳	۱/۱۷	۰/۱۴	۰/۲۶	۰/۶۵	۵
OC4	۴	۴۰	۰/۱۲	۱/۲۷	۰/۱۵	۰/۲۳	۰/۱۹	۱/۶
OPA02	۳	۶۰	۰/۲	۱/۴۹	۰/۲۶	۰/۳۸	۰/۳۶	۱/۸
میانگین (Average)	۴/۷۵	۶۷/۸۵	۰/۱۸	۱/۴۱	۰/۲۳	۰/۳۵	۰/۷۴	۳/۶۳

تجزیه خوشه‌ای بر اساس مجموع باندهای چندشکل نشانگرهای RAPD و ISSR (۱۱۱ باند چندشکل) بر اساس روشهای مختلف (نزدیک‌ترین همسایه، دورترین همسایه، وارد و UPGMA) و معیارهای تشابه مختلف (جاکارد، دایس، تطابق ساده و ..) انجام شد که در نهایت روش UPGMA با معیار تشابه جاکارد به دلیل داشتن ضریب کوفنتیک بالاتر (۰/۷۸) انتخاب گردید. برای تعیین تعداد گروهها روشهای مختلفی انجام شد و براساس پرش ناگهانی در فاصله ادغام برش انجام شد که در نهایت با توجه به ناحیه برش، ارقام در دو گروه قرار گرفتند (شکل ۲). جهت اطمینان از صحیح بودن مکان خط برش و یا صحیح قرار گرفتن هر ژنوتیپ در دسته مربوط به خود در تجزیه خوشه‌ای، از تجزیه تابع تشخیص استفاده شد. بر این اساس گروه‌بندی بر اساس تعداد باندهای چندشکل هر دو نشانگر، صدرصد تأیید شد و درصد خطای گروه‌بندی برای تمام کلاسترها صفر درصد بوده و در نتیجه تمام کلاسترها ۱۰۰ درصد درست گروه‌بندی شده بودند (جدول ۴).

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7

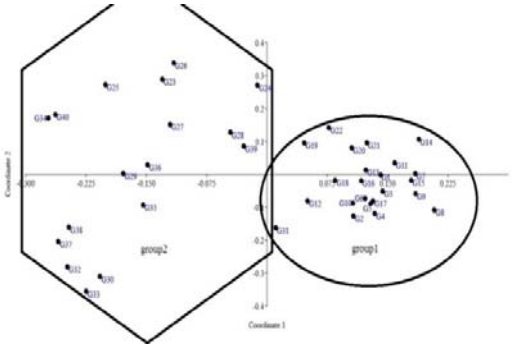


شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های حاصل از نشانگر ISSR و RAPD در ارقام گندم نان

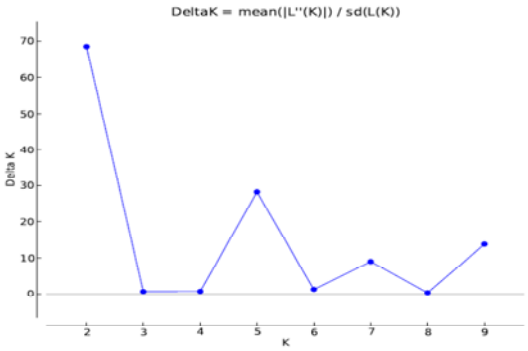
جدول ۴- جدول نسبت موفقیت افراد درون گروهها با تابع تشخیص

تعداد افراد در هر گروه	گروهها	تعداد افراد پیش‌بینی شده در هر گروه با تابع تشخیص	
		۱	۲
۲۳	۱	۲۳ ٪۱۰۰	۰
۱۷	۲	۰	۱۷ ٪۱۰۰
صحت درستی گروه‌بندی براساس دو گروه			٪۱۰۰

برای داشتن دیدگاه بهتر راجع به فواصل ژنتیکی بین ارقام و همچنین برای مشاهده فواصل ژنتیکی بین ارقام به‌صورت چندبعدی، تجزیه به مختصات اصلی نیز برای تکمیل نتایج روش تجزیه خوشه‌ای انجام شد. از تجزیه به مختصات اصلی بر روی داده‌های حاصل از هر دو نشانگر یک پلات دو بعدی (شکل ۳) به‌دست آمد.



شکل ۳- پلات دوبعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با نشانگر ISSR و RAPD

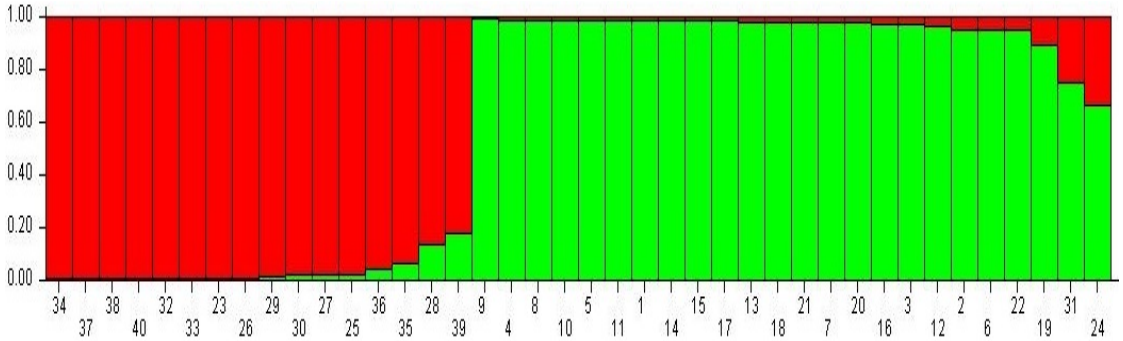


شکل ۴- نمودار دو طرفه برای تعیین تعداد بهینه گروه (K) بر اساس آماره ΔK

دو مؤلفه اصلی که بیشترین سهم را در ایجاد تنوع داشته‌اند به ترتیب ۱۶/۴۷ و ۱۰/۳۸ درصد از کل تغییرات را توجیه کردند. با توجه به پراکنش ارقام براساس این دو مؤلفه، ارقام در دو گروه قرار گرفتند (شکل ۳). همچنین ساختار جمعیت و تعداد گروهها با نرم‌افزار STRUCTURE براساس روش آماری بیزی مورد بررسی قرار گرفت. در

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7

این تحقیق ساختار ژنتیکی جمعیت و چگونگی آن و تعیین تعداد مناسب گروهها (K) بر اساس روش ایوانو و همکاران (۱۲) مشخص شد. این روش بر اساس آمار ΔK استوار است که شیب تابع احتمالی LnP(D) را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. بر اساس نتایج تعداد گروه مناسب برای این ژرم‌پلاسم دو بود (شکل ۴) و دو گروه احتمالی و نحوه قرار گرفتن ارقام در آنها در شکل ۵ نشان داده شده است. براساس دو گروه به دست آمده تنوع درون و بین دو گروه با تجزیه واریانس مولکولی براساس تعداد باندهای چندشکل هر دو نشانگر مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۵). نتایج نشان داد که واریانس درون گروهها نسبت به واریانس بین گروهها بیشتر می‌باشد. به‌طوریکه تنوع بین گروهی ۱۶ درصد و تنوع درون گروهی ۸۴ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند.



شکل ۵- تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian برای ۴۰ رقم گندم مورد مطالعه بر اساس ۱۱۱ باند چندشکل.
هر رنگ یک زیرجمعیت یا کلاستر را نشان می‌دهد. محور عمودی ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر را نشان می‌دهد.

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگرهای ISSR و RAPD

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس	واریانس نسبی تجمعی (٪)
بین گروهها	۱	۸۱/۰۰۴	۸۱/۰۰۴	۳/۳۲۵	٪۱۶
درون گروهها	۳۸	۶۵۲/۳۹۶	۱۷/۱۶۸	۱۷/۱۶۸	٪۸۴
کل	۳۹	۷۳۳/۴۰		۲۰/۴۹۳	٪۱۰۰
ارزش آماره PhiPT				۰/۱۶۲	
احتمال آماره PhiPT				۰/۰۰۱	

بحث

از آنجایی که یکی از معیارهای مهم در انتخاب آغازگرهای مناسب و سودمند، تعداد آللهای مؤثر است. نتایج حاصل از بررسی تعداد آلل مؤثر برای تمام جایگاههای ژنی نشان داد میانگین تعداد آلل مؤثر در کل جمعیت برای نشانگرهای ISSR، ۱/۴۹ به دست آمد. بیشترین تعداد آلل مؤثر به ترتیب مربوط به آغازگرهای UBC813، UBC816 و کمترین برای آغازگر UBC817 در بین کل ارقام بود. همچنین میانگین تعداد آلل مؤثر برای نشانگرهای RAPD در جمعیت موردمطالعه ۱/۴۱ و بیشترین مقدار مربوط به آغازگر OH-04 و کمترین برای آغازگر OA12 به‌دست آمد. میزان اطلاعات چندشکل (PIC) قدرت تفکیک یک نشانگر را به واسطه تعداد آللهای چندشکل و فراوانی نسبی این آللها در جمعیت تحت مطالعه نشان می‌دهد. این شاخص در نشانگرهای ISSR برای جایگاه ژنی UBC813 در بیشترین مقدار (۰/۳۰) و برای جایگاه ژنی UBC823 در کمترین مقدار (۰/۱۷) و برای نشانگر RAPD برای جایگاه ژنی OH-04 بیشترین مقدار (۰/۲۹) و برای جایگاه ژنی OC4 کمترین مقدار (۰/۱۲) به دست آمد. شاخص اطلاعات شانون (I) و تنوع ژنتیکی نی (Nei) برای هر دو نشانگر نیز محاسبه شد. شاخص شانون معیاری برای

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7

اندازه‌گیری میزان آللهای چندشکل در یک جایگاه است. این شاخص برای نشانگر ISSR در جایگاه ژنی UBC813 بیشترین مقدار (۰/۵۷) و برای جایگاه ژنی UBC823 کمترین مقدار (۰/۳۴) و برای نشانگرهای RAPD در جایگاه ژنی OH-04 بیشتر از سایر جایگاهها (۰/۵۴) و برای جایگاه ژنی OC4 کمتر از سایر جایگاهها (۰/۲۳) به دست آمد. یکی دیگر از مهم‌ترین شاخصها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ارقام و جمعیتها، شاخص تنوع ژنی نی می‌باشد. تنوع ژنتیکی نی برای نشانگر ISSR در جایگاه ژنی UBC813 به میزان ۰/۳۸ (بیشترین مقدار) و برای جایگاه ژنی UBC823 به میزان ۰/۲۱ (کمترین مقدار) و برای نشانگر RAPD برای جایگاه ژنی OH-04 به میزان ۰/۳۸ (بیشترین مقدار) و برای جایگاه ژنی OA12 به میزان ۰/۱۴ (کمترین مقدار) ارزیابی شد. با توجه به نتایج حاصل می‌توان بیان داشت که جایگاههای ژنی UBC813 در نشانگر ISSR و OH-04 در نشانگر RAPD به دلیل داشتن بیشترین میزان شاخص شانون، تنوع ژنتیکی نی، تعدا آلل مؤثر و محتوای اطلاعات چندشکل بیشترین تنوع را بر روی جمعیت مورد مطالعه داشته است. در آزمایشی از نشانگرهای SSR برای تنوع ژنتیکی گندم استفاده شد و از مجموع ۱۰ آغازگر انتخابی، ۹ آغازگر چند شکلی قابل توجهی نشان داده و ۳۱ نوار چند شکل با میانگین ۳/۴ نوار به ازای هر آغازگر مشاهده شد (۹). همچنین در مطالعه دیگری تنوع ژنتیکی گندم با استفاده از نشانگر ISSR بررسی شد و بیشترین مقدار شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگر ۶ (۰/۳۶) و کمترین آن مربوط به آغازگرهای ۱ و ۵ (۰/۲۲) بود و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه دایس ژنوتیپها را در سه گروه دسته‌بندی کرد که ژنوتیپ شماره ۲۵ (شاهد گندم نان) در یک گروه کاملاً جداگانه با فاصله زیادی از سایر گروهها قرارگرفت (۳). همچنین در تحقیقی که بر روی لاینها و ارقام گندم نان و دو رقم گندم دوروم با نشانگر نیمه تصادفی اینترونی-اگزونی انجام شد، کارایی این نشانگرها در بررسی تنوع گندم نشان داده شد و توانست ارقام و لاینهای بهاره و زمستانه، و گندم نان و دوروم را به خوبی از همدیگر تفکیک نماید (۲). همچنین کارایی نشانگرهای ISSR در گروه‌بندی ارقام و لاینهای ذرت در مطالعه دیگری نشان داه شد و توانست این نشانگر به خوبی لاینها را از هم تفکیک نماید (۷) و در این تحقیق نیز این نشانگر در تفکیک ارقام توانایی خود را نشان داد.

تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای ISSR و RAPD ارقام را در دو گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل ارقام اکبری، نیک نژاد، روشن، چمران، هیرمند، مغان ۱، دز، آستارا، طوس، سرخ تخم، زرین، تجن، فلات، آذر۲، مغان۳، امید، ارگ، سرداری، الموت، آزادی، الوند، شیراز، رسول و گروه دوم شامل ارقام اکسکلیبر، بزاستایا، داراب، هامون، گاسپارد، وی ناک، شاه پسند، پیشتاز، شعله، سبلان، مرودشت، آرتا، کرج ۲، کویر، بولانی، mv-17 و مهدوی بود. نتایج حاصل از میزان شباهت ژنتیکی در مجموع نشان داد که بیشترین میزان شباهت به‌ترتیب بین ارقام اکسکلیبر و هامون (۹۷/۴۴ درصد) و مرودشت و مهدوی (۹۶/۰۵ درصد) محاسبه گردید. در مقابل بیشترین فاصله ژنتیکی یا کمترین شباهت مربوط به ارقام دز و داراب (۴۶/۶ درصد) و دز و شعله (۴۸/۵۲ درصد) محاسبه گردید.

با استفاده از اطلاعات به‌دست‌آمده از پلات دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی براساس نشانگر ISSR و RAPD نتیجه گرفته شد که این گروه‌بندی با گروه‌بندی حاصل با دندروگرام خوشه‌ای مطابقت بالایی دارد ولی با توجه به اینکه درصد تجمعی این دو مؤلفه (۲۶/۸۵) پایین می‌باشد ولی توانسته‌اند نتایج گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای را تأیید نماید به این احتمال است که این نشانگرها در طول ژنوم به خوبی پراکنده شده و ژنوم را پوشش داده‌اند (۵). همچنین نتایج گروه‌بندی به روش بیزی با نرم‌افزار STRUCTURE نیز نشان داد که دو گروه برای این ارقام

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7

وجود دارد و نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمود. تعداد ارقام در دو گروه با تجزیه خوشه‌ای به ترتیب ۲۳ و ۱۷ ژنوتیپ بود درحالی که در روش بیزی در دو گروه به ترتیب ۲۴ و ۱۶ ژنوتیپ قرار گرفته بودند و تنها یک ژنوتیپ در گروهی دیگر قرار گرفته بود و در حدود ۹۷/۵ درصد دو گروه باهم شباهت داشتند. تجزیه ساختار با نشانگرهای غالب (مانند ISSR و ...) در مطالعات دیگر هم انجام شده است (۱۵، ۱۸، ۲۰ و ۲۶). تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگرهای ISSR و RAPD نشان داد که واریانس درون گروهها نسبت به واریانس بین گروهها بیشتر می‌باشد به‌طوری که تنوع بین جمعیتی ۱۶ درصد و تنوع درون جمعیتی ۸۴ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند و این نتیجه نشان می‌دهد که بر اساس نشانگرهای ISSR و RAPD تفاوت داخل گروهها بیشتر از تفاوت بین گروهها می‌باشد. همچنین وجود تنوع بالا در درون گروهها نشان می‌دهد که در درون گروهها هم به اندازه کافی تنوع برای انتخاب وجود دارد. شاخص دیگری که جهت ارزیابی تنوع بین جمعیتها محاسبه گردید شاخص PhiPT بود. این شاخص نشان داد که تنوع بین گروهها از لحاظ نشانگرهای ISSR و RAPD در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد (۰/۱۶۲**) و تأیید در جهت وجود تنوع ژنتیکی معنی‌دار در بین ارقام گندم مورد مطالعه است.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق تعداد ۹۲ باند چندشکل برای ۱۰ آغازگر نشانگر ISSR و همچنین ۱۹ باند چندشکل برای چهار آغازگر نشانگر RAPD حاصل شد. همچنین ارقام براساس تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه کلاستر به روش بیزی با نرم‌افزار STRUCTURE در دو گروه قرار گرفتند و نتایج هم را تأیید نمودند. تجزیه واریانس مولکولی به خوبی تنوع بین گروهها و درون گروهها را نشان داد. بنابراین با توجه به نتایج، بین ارقام گندم نان از لحاظ نشانگرهای ISSR و RAPD تنوع ژنتیکی بسیار خوبی براساس ماتریس شباهت، همچنین نتایج گروه‌بندی و تجزیه واریانس مولکولی وجود دارد و این امید را می‌دهد که بتوان با تلاقی ارقام که شباهت کمی باهم دارند و انتخاب در نسلهای در حال تفرق و انتخاب روشهای صحیح اصلاحی باعث انتخاب لاینهای مناسب در جهت بهبود کمیت و کیفیت گندم شد. به منظور ارزیابی دقیق، مطالعات مقایسه‌ای در سطح صفات مورفولوژیکی و مولکولی با نشانگرهای دیگری مانند SSR و همچنین تعداد بیشتری آغازگر با پراکنش کروموزومی بالا پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فنآوری پیشرفته به خاطر تأمین هزینه مالی و همچنین امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- احمدی، ک.، عبادزاده، ح.ر.، عبدشاه، ه.، کاظمیان، آ. و رفیعی، م. ۱۳۹۷. آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵، جلد اول: محصولات زراعی. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات.

۲- اسماعیلی، ا.، نظریان فیروزآبادی، ف.، سمیعی، ک. و دریکوند، ر. ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای گندم دیم با استفاده ازآغازگرهای نیمه تصادفی اینترونی-اگزونی. پژوهشهای سلولی و مولکولی. ۳۰(۲): ۱۲۶-۱۱۷.

۳- الوندی، ر.، محمدی، ر. و شوشتری، ل. ۱۳۹۴. تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای گندم دوروم با استفاده ازخصوصیات زراعی و مارکرهای مولکولی. مجله به نژادی نهال و بذر. ۳۱ (۳): ۴۵۸-۴۴۱.

۴- امیدبخش فرد، م.ا.، نقوی، م.ر.، مردی، م.، بی همتا، م.ر.، کاظمی، م. و پیرسیدی، س. م. ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های گندم دوروم (*Triticum turgidum*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۰(۲): ۸۳-۷۵.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7

۵- جهانی، م.، نعمت‌زاده، ق.ع. و محمدی‌نژاد، ق. ۱۳۹۵. بررسی تنوع ژنتیکی یک کلکسیون بین المللی برنج به وسیله نشانگر ریزماهواره. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۸(۱): ۳۲-۱۹.

۶- حسینپور، ر.، احمدی، ک.، عبادزاده، ح.ر.، محمدنیا افروزی، ش. و عباسطاقانی، ر. ۱۳۹۴. صادرات و واردات بخش کشاورزی سال ۱۳۹۳. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات.

۷- غفاری آذر، ع.، درویش زاده، ر.، آقاعلی، ز.، کهریزی، د. و درویشی، ب. ۱۳۹۷. ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی لاینهای ذرت (*Zea mays* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهشهای سلولی و مولکولی. مقالات آماده انتشار.

۸- کوچکی، ع.ر.، نصیری محلاتی، م.، جهان‌بین، غ.ح. و زارع فیض آبادی، ا. ۱۳۸۳. تنوع واریته های گیاهان زراعی در ایران. بیان. ۹(۱): ۶۸-۴۹.

۹- نظری، م. و عبدالشاهی، ر. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان (*Triticum aestivum* L.) از طریق صفات مورفوفیزیولوژیک و نشانگرهای مولکولی SSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۶(۱): ۲۳۱-۲۱۵.

10- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter. 1: 19-21.

11- Dreisigacker, S., Zhang, P., Warburton, M., Van Ginkel, M., Hoisington, D., Bohn, M. and Melchinger, A. 2004. SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different megaenvironments. Crop Science. 44: 381-388.

12- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology. 14: 2611-2620.

13- Hu, Y., Xie, X., Wang, L., Zhang, H., Yang, J. and Li, Y. 2014. Genetic variation in cultivated Rheum tanguticum populations. Genetics and Molecular Biology. 37: 540-548.

14- Khlestkina, E., Röder, M., Efremova, T., Börner, A. and Shumny, V. 2004. The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellite markers. Plant Breeding. 123: 122-127.

15- Li, M., Zhao, Z., Miao, X. and Zhou, J. 2014. Genetic diversity and population structure of Siberian apricot (*Prunus sibirica* L.) in China. International Journal of Molecular Sciences. 15: 377-400.

16- Monfared, M.A., Samsampour, D., Sharifi-Sirchi, G.R. and Sadeghi, F. 2018. Assessment of genetic diversity in Salvadora persica L. based on inter simple sequence repeat (ISSR) genetic marker. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 16: 661-667.

17- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A. and Labhane, N. 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 32: 261-285.

18- Nilkanta, H., Amom, T., Tikendra, L., Rahaman, H. and Nongdam, P. 2017. ISSR marker based population genetic study of Melocanna baccifera (Roxb.) Kurz: a commercially important bamboo of manipur, north-east India. Scientifica. 2017: Article ID 3757238, 9 pages.

19- Pearce, S., Knox, M., Ellis, T., Flavell, A. and Kumar, A. 2000. Pea Ty1-copia group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in Pisum. Molecular Genetics and Genomics. 263: 898-907.

20- Pérez de la Torre, M., García, M., Heinz, R. and Escandón, A. 2012. Analysis of genetic variability by ISSR markers in Calibrachoa caesia. Electronic Journal of Biotechnology. 15: fulltext-8, 12 pages.

21- Reddy, M., Sarla, N. and Siddiq, E. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica. 128: 9-17.

22- Salem, H.H., Ali, B.A., Huang, T.H., Qin, D.N., Wang, X.M. and Xie, Q.D. 2007. Use of random amplified polymorphic DNA analysis for economically important food crops. Journal of Integrative Plant Biology. 49: 1670-1680.

23- Sofalian, O., Chaparzadeh, N. and Dolati, M. 2009. Genetic diversity in spring wheat landraces from northwest of Iran assessed by ISSR markers. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 37(2): 252-256.

24- Terzopoulos, P. and Bebeli, P. 2008. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (Vicia faba L.) with ISSR markers. Field Crops Research. 108: 39-44.

25- Toledo, A.V., Franco, M.E., Medina, R., de Remes Lenicov, A.M.M. and Balatti, P.A. 2019. Assessment of the genetic diversity of

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.8.7

Argentinean isolates of Beauveria bassiana (Ascomycota: Hypocreales) using ISSR markers. Journal of King Saud University-Science. 7pages (In Press).

26- Zhang, Y., Yan, H., Jiang, X., Wang, X., Huang, L., Xu, B., Zhang, X. and Zhang, L. 2016. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in Switchgrass with ISSR, SCoT and EST-SSR markers. Hereditas. 153: Article:4, 12 pages.

Evaluation of genetic diversity of different bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties using molecular markers ISSR and RAPD

Rahmani M.,[1] Rahimi M.,[2] AbdoliNasab M.[2] and Maleki M.[2]

[1] Dept. of Plant Genetics and Breeding, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran.

Abstract

Exact evaluation of the amount and distribution of genetic diversity in plants is essential for developing a strategy for conservation and use of genetic resources. Study, the genetic diversity of 40 genotypes of bread wheat *(Triticum aestivum* L.) was investigated using 10 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers and four Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. The 10 ISSR primers produced 92 polymorphic bands with an average of 9.2 polymorphic bands for each primer and the polymorphic percentage was 86.79%. Also, four RAPD primers produced 19 polymorphic bands with an average of 4.75 bands for each primer, and the average polymorphic percentage was 67.85%. High levels of effective number of alleles, Nei index, Shannon index, and the Polymorphism information content of ISSR markers for UBC813, UBC816 and UBC824 primers, and RAPD markers for OH-04 and OPA02 primers was indicated the high efficiency of these primers in differentiating the studied wheat genotypes in this research. Cluster analysis using UPGMA method based on Jaccard's similarity coefficient based on the whole polynomial bands of ISSR and RAPD markers divided wheat genotypes in two separate groups. Also, principal coordinates analysis and determining population structure based on Bayesian method with STRUCTURE software placed the cultivars in two groups and confirmed cluster analysis results. Molecular analysis of variance showed that within groups' diversity is more than between groups' diversity. Information obtained from this research and variation in wheat cultivars can be used in the breeding programs for yield improvement.

Key words: Cluster analysis, Principal coordinates analysis, UPGMA method, Population structure.