

کاربرد نشانگر ISSR جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای چاودار

الهام رضایی میرقائد*، رسول امیریان، ایمان آرضی

- 1- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، اصفهان، اصفهان، ایران
- 2- بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران
- 3- بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

*نویسنده مسئول: rezaeimirghayed@gmail.com

تلفن: 09167905852

پذیرش: 1400/3/22

دریافت: 1399/3/11

چکیده:

چاودار یکی از گیاهان زراعی مهم ایران با نام علمی *Secale* متعلق به خانواده گندمیان می‌باشد. بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه در برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی، امری حیاتی بوده و اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های موجود برای انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش تنوع ژنتیکی 39 جمعیت چاودار از مناطق مختلف ایران، آمریکا و شوروی با استفاده از 28 نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که 8 آغازگر ISSR 48 باند تولید کردند که شامل 18 باند چند شکل (37/5 درصد چند شکلی) بود. میانگین میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) 0/15 و شاخص نشانگر (MI) در آغازگرهای ISSR معادل 2/7 عدد بود. بیشترین مقدار PIC (0/3) مربوط به آغازگر 5+6 و بیشترین MI (0/96) مربوط به آغازگر 1+6 بود. پس از مشاهده محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمر بر روی ژل آگارز و امتیازدهی باندهای DNA، تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار NTSYS انجام شد. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد جمعیت‌های چاودار را به 9 گروه تقسیم کرد که نتایج گروه‌بندی آن با گروه‌بندی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مطابقت داشت. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع درون گونه‌ای بیشتر از تنوع بین گونه‌ای بود. میانگین تنوع ژنی h (0/350) و میانگین شاخص شانون (I) در گونه‌های چاودار 0/523 بود که بیانگر تنوع خوب درون گونه‌ها می‌باشد. نتایج نشان داد که نشانگر ISSR ابزار مفیدی در تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای چاودار است.

کلید واژگان: چاودار، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR، چندشکلی، تجزیه واریانس مولکولی

مقدمه

چاودار با نام علمی اسکيله¹ گیاهی از خانواده گندمیان²، بسیار خودناسازگار³ و دگرگشن می باشد که در تغذیه دام ها به صورت علوفه سبز، خشک و یا سیلو مورد استفاده قرار می گیرد. این گیاه بومی کشورهای آسیای مرکزی، سوریه و ایران است [1]. بیشتر چاودارهای زراعی دیپلوئید ($2n=14$) بوده و انواع تتراپلوئیدشان نیز موجود می باشد. زراعت چاودارهای تتراپلوئید نیز در سطح محدودی در اروپا متداول است. نوع دیپلوئید چاودار زراعی دارای چرخه رشدی یک ساله و روز بلند و دارای سنبله دراز مرکب از سنبلكها می باشد که روی هر سنبله فرعی سه گل وجود دارد. سیستم ریشه ای چاودار بسیار انبوه و گسترده تر از گندم می باشد و دارای ریشک های دراز، نازک و برسی است. چاودار از نظر شکل مابین گندم و یولاف است. رنگ کدر خاک آلود دارد و فاقد پوسته⁴ می باشد. دانه هایش برای تهیه آرد و نان به کار می رود. گیاه چاودار مقاوم ترین غله به سرماست و با شرایط آب و هوایی نامساعد و خاک های فقیر غیر حاصلخیز و شنی سازگاری نشان می دهد. حداقل دما برای جوانه زنی چاودار 3 تا 5 درجه سانتی گراد است [2]. شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه بندی ذخایر توارثی، یک امر زیر بنایی و بنیادی برای طراحی موفق برنامه های به نژادی بوده است و در آسان نمودن مدیریت حفظ و نگهداری مجموعه های ژنتیکی نقش به سزایی دارد [3]. ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر PCR از دستاوردهای مهم بیوتکنولوژی برای اصلاح نباتات محسوب می شود [4]. در این راستا نشانگرهای مولکولی به طور موفقیت آمیزی در ارزیابی تنوع ژنتیکی انواع گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گرفته اند. یکی از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR، نشانگر ISSR

می باشد. یکی از نشانگرهای ژنتیکی، نشانگر ISSR⁵ می باشد که این نشانگر به صورت تصادفی عمل کرده و تکرارپذیری و چندشکلی بالایی دارد و در دامنه وسیعی از گیاهان به کار می رود. واکنش ISSR با استفاده از آغازگرهایی که مکمل با توالی های ریزماهورای به اضافه یک نوکلئوتید لنگری در انتهای 3' و سه نوکلئوتید لنگری در انتهای 5' آغازگر انجام می گیرد. این روش نیازمند آگاهی از توالی ژنوم نیست و الگوهای چندشکلی زیاد و چندمکانی ایجاد می کند. این نشانگر از ریزماهورای با طول 16 تا 25 جفت باز به عنوان آغازگرهایی که در یک واکنش PCR مکان های ژنومی متعدد را مورد هدف قرار می دهند، استفاده می کنند. این نشانگر جزء نشانگرهای غالب طبقه بندی می شود و از اصول وراثت ساده مندلی پیروی می کند [5]. چندین مطالعه در رابطه با تنوع ژنتیکی گیاه چاودار با نشانگرهای مولکولی ISSR و دیگر نشانگرهای مولکولی صورت گرفته است [6]. مطالعه ای درخصوص مفید بودن کاربرد نشانگرهای AFLP و RAPD برای تعیین تشابه ژنتیکی در گونه ها و زیر گونه های چاودار، شباهت ژنتیکی در 12 گونه وحشی چاودار و زیر گونه و یک رقم کنترل شده آن (*S. cereal* cv. walet) مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش نشانگر RAPD برای بررسی چهار گروه با شباهت ژنتیکی و ضریب تشابه بین 0/32 تا 0/81 استفاده شد و از نشانگر AFLP برای ارزیابی دو گروه ژنتیکی مشابه و ضریب تشابه بین 0/49 تا 0/79 استفاده شد [7]. در مطالعه ای تکنیک ISSR برای شناسایی روابط ژنتیکی بین یازده رقم سردسیری هگزاپلوئید تربیت کاله مورد استفاده قرار گرفت. 12 آغازگر ISSR باندهای تکرارپذیر ایجاد کردند. به جای هر آغازگر ISSR می توان بین 5 تا 31 باند مشاهده کرد که تفاوت اندازه آنها بین 270 تا 320 جفت باز بوده است. در مجموع از 209 باند ISSR 159 باند چندشکلی بودند. براساس تجزیه و تحلیل UPGMA

1. Secale
2. Poaceae
3. Self-incompatible
4. Hall

5. Inter Simple Sequence Repeat

یازده رقم تریبتیکاله را به دو گروه تقسیم کردند که الگوی چندشکلی تولید شده به وسیله ISSR درجه متفاوتی از روابط ژنتیکی میان ارقام مورد مطالعه این پژوهش را نشان داد. ارزش شباهت بین ارقام از بازده 0/58 تا 0/89 درصد بود [8]. گزارش کردند که ISSR به عنوان روشی چند-شکلی مؤثر و قابل تکثیر می تواند برای ارزیابی تفاوت-های درون گونه ای و بین گونه ای جمعیت مؤثر باشد. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) از روش ISSR دارای میانگین 0/7 بود [9]. محققان تکنیک های ISSR و IRAP را به منظور بررسی تنوع ژنتیکی میان گونه های جنس چاودار مورد بررسی قرار دادند. آنها توزیع کروموزومی AAC تکرار توالی ساده با روش FISH را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که منحصر به فردترین توزیع کروموزومی در رقم *S. sylvestre* بوده

است [10]. هدف از اجرای این پژوهش ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی چندشکلی ژنتیکی بین جمعیت های چاودار و ارزیابی تنوع بین و درون گونه ای این گیاه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR می باشد.

مواد و روش ها

در این پژوهش 39 جمعیت چاودار از مناطق مختلف کشور به همراه دو جمعیت از کشورهای آمریکا و شوروی از شرکت پاکان بذر اصفهان و مؤسسه بانک بذر کشور جمع آوری شد (جدول 1). بذور گیاهان مورد استفاده در محیط گلخانه و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت گردید.

جدول 1- نام گونه های چاودار و محل جمع آوری آنها

شماره	گونه ها	محل جمع آوری	شماره	گونه ها	محل جمع آوری
1	<i>S. montanum</i>	کرج-تهران	21	Unknown	سمیرم-اصفهان
2	<i>S. montanum</i>	زنجان	22	<i>S. cereale</i>	قهدریجان-اصفهان
3	<i>S. montanum</i>	دماوند	23	Unknown	کرج
4	<i>S. montanum</i>	کردستان	24	<i>S. montanum</i>	خلخال-اردبیل
5	<i>S. montanum</i>	سمنان	25	<i>S. montanum</i>	تهران
6	<i>S. cereale</i>	سمیرم-اصفهان	26	<i>S. sermont</i>	ملایر-همدان
7	<i>S. montanum</i>	سمیرم-اصفهان	27	Unknown	شوروی
8	<i>S. sermont</i>	اراک	28	<i>S. montanum</i>	نجف آباد-اصفهان
9	<i>S. cereale</i>	فریدونشهر-اصفهان	29	<i>S. montanum</i>	زنجانرود-زنجان
10	<i>S. cereale</i>	چادگان-اصفهان	30	<i>S. montanum</i>	کاشان-اصفهان
11	<i>S. montanum</i>	بهیز-اصفهان	31	<i>S. montanum</i>	کرج-البرز
12	<i>S. cereal</i>	سمنان	32	<i>S. montanum</i>	کرج-تهران
13	<i>S. cereale</i>	فریدن-اصفهان	33	<i>S. montanum</i>	زنجان
14	Unknown	ارومیه-آذربایجان غربی	34	<i>S. montanum</i>	خراسان شمالی
15	Unknown	کرج	35	<i>S. cereale</i>	فریدن-اصفهان
16	<i>S. montanum</i>	پارک جهان نما تهران	36	<i>S. montanum</i>	فریدونشهر-اصفهان
17	<i>S. montanum</i>	کرج-البرز	37	<i>S. sermont</i>	آمریکا
18	<i>S. cereale</i>	فریدونشهر-اصفهان	38	Unknown	آمریکا
19	<i>S. cereale</i>	چهارمحال بختیاری	39	Unknown	آمریکا
20	<i>S. cereale</i>	داران-اصفهان	-	-	-

نمونه‌گیری از برگ‌های جوان مربوط به نمونه بالک (10-12 گیاهچه) از هر جمعیت در مرحله 3 تا 4 برگی انجام شد. به‌منظور به‌دست آوردن DNA ژنومی با کیفیت مطلوب، چندین روش استخراج DNA از برگ مورد آزمایش قرار گرفت. درنهایت استخراج DNA به روش CTAB با اندکی تغییرات به‌عنوان مناسب‌ترین روش انتخاب شد [11]. کیفیت و کمیت DNA استخراجی به ترتیب با الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتر ساخت کشور آمریکا اندازه‌گیری شد. از نمونه‌های DNA استخراجی، محلول پایه 50 نانوگرمی در هر میکرولیتر برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تهیه گردید.

تعداد 9 آغازگر ISSR در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت (جدول 2). واکنش PCR با استفاده از دستگاه‌های ترموسایکلر ساخت کشور BIORAD حاوی 96 چاهک، در حجم نهایی 12 میکرولیتر با ترکیب 1/4 میکرولیتر DNA، 1/2 میکرولیتر بافر 10x، یک میکرولیتر کلرید منیزیم (با غلظت 50 میلی‌مولار)، 0/12 میکرولیتر dNTPs از هر کدام (با غلظت 10 میلی‌مولار)، 0/12 میکرولیتر آنزیم تک‌پلیمرز (با غلظت 5 واحد) و 0/6 میکرولیتر آغازگر (با غلظت 10 پیکومول) انجام شد. واکنش PCR با نشانگر ISSR بر پایه روش ووس و همکاران [12] انجام گرفت. واکنش PCR با برنامه زمانی سه دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در 94 درجه سانتی‌گراد، 40 چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 52 تا 58 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و سنتز در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه صورت گرفت. سنتز نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه انجام شد. الکتروفورز به مدت دو ساعت با بافر TBE 1X و ولتاژ 120 ولت و رنگ‌آمیزی ژل آگارز 2/5 درصد با اتیدیدم بروماید صورت گرفت.

برای تعیین اندازه قطعات از نشانگر با باندهای استاندارد 50 جفت بازی استفاده شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، باندهای حاصل از محصولات PCR به صورت داده‌های صفر (نبود وجود باند) و یک (وجود باند) در آمدند، برای بررسی چندشکلی بین جمعیت‌ها و بررسی تنوع درون و بین گونه‌ای، ستون‌ها به جمعیت‌ها و گونه‌ها و سطرها به باندها اختصاص یافت، از این ماتریس برای محاسبه تشابه ژنتیکی با استفاده از سه ضریب تشابه Dice، SM و Jaccard استفاده شد. پس از تشکیل ماتریس تشابه، تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار NTSYSpc Ver 2.02 انجام شد.

برای بررسی محتوای اطلاعاتی چندشکلی نشانگرها و آغازگرها از شاخص PIC (قدرت تفکیک) استفاده شد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی بر اساس رابطه پاول و همکاران $PIC=1-\sum f_i^2$ محاسبه شد. در این رابطه f_i برابر با فراوانی آلل i ام است. جهت تخمین آماری و حمایت شاخه‌های داخلی دندروگرام حاصله، از گروه‌بندی توده‌ها و ارقام براساس ضریب تشابه SM به روش UPGMA استفاده شد. رسم خوشه براساس روش گروه‌های غیروزی جفت شده UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc انجام شد. همچنین شاخص اطلاعاتی شانون¹

از طریق فرمول $H = -\sum_{i=1}^s (P_i) \cdot (\log_2 P_i)$ محاسبه شد [13]. در این فرمول s تعداد گونه‌ها و P_i نسبتی از مجموعه نمونه است که به گونه i ام تعلق دارد. تنوع ژنی نی² توسط نی [14] با فرمول $H = \sum h_i/L$ محاسبه شد. تجزیه واریانس مولکولی³ برای تفکیک واریانس مولکولی به واریانس بین و درون گونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAlex انجام شد [15]. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین

1. Shannon Information Index

2. Nei's genic diversity

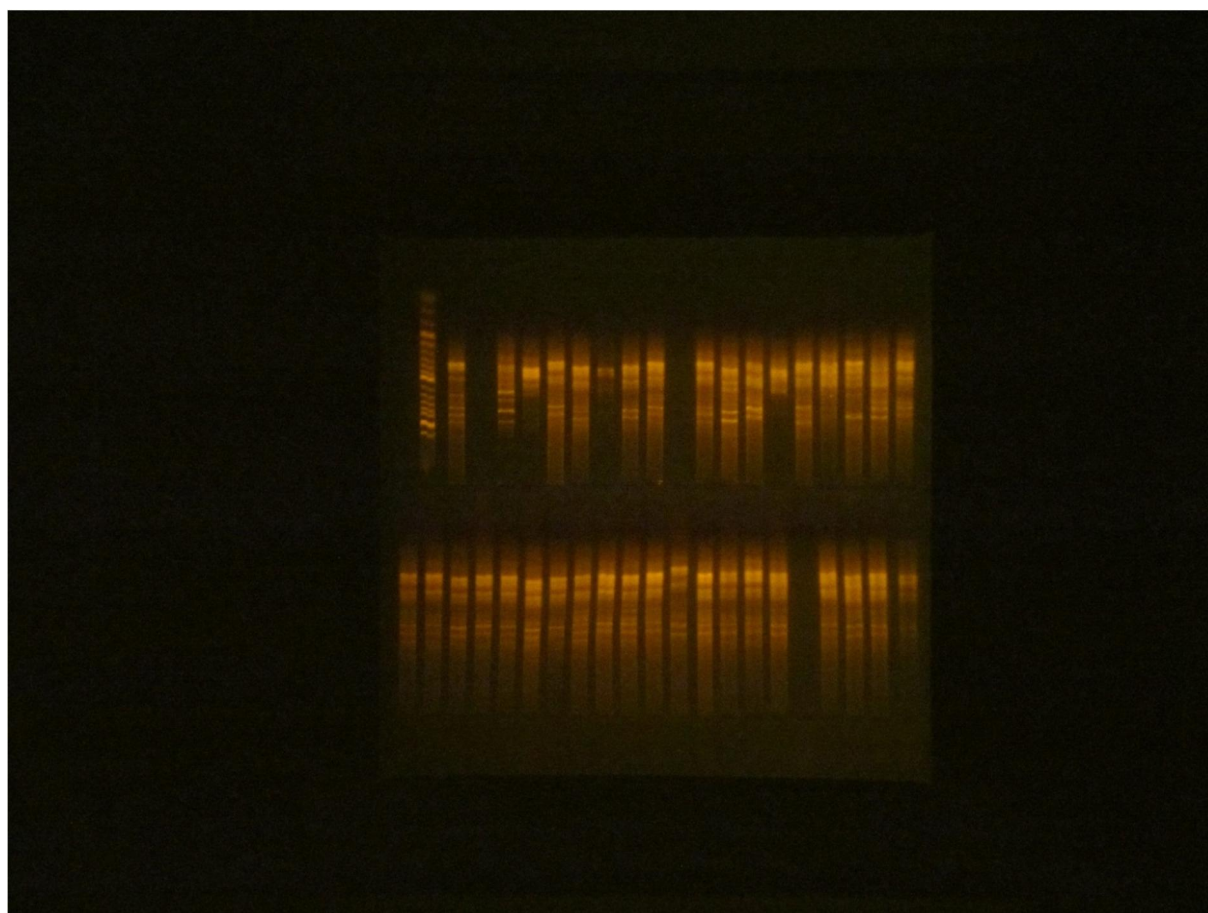
3. Analysis of Molecular Variance

گونه‌ای به روش نی، ضریب تمایز ژنی (G_{ST}) بوسیله فرمول $G_{ST} = D_{ST} / H_T$ محاسبه شد که در آن H_T تنوع ژنی کل ($H_S + D_{ST}$)، تنوع ژنی درون جمعیت و D_{ST} تنوع بین جمعیتی ($H_S - H_T$) است. جریان ژنی (N_m) نیز با فرمول مربوطه محاسبه گردید [16].

نتایج و بحث

در این پژوهش تمامی باندهای حاصل از نشانگر ISSR در فاصله 50 تا 1500 جفت باز امتیازدهی شدند. هشت

آغازگر ISSR در مجموع 18 باند چندشکل تولید کردند که تقریباً 37/50 درصد از کل 48 باند تولید شده را شامل گردید (شکل 1). در این مطالعه متوسط تعداد کل باندها به ازای هر آغازگر 6 عدد و به ازای هر ژنوتیپ 1/23 عدد بود. همچنین متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر و هر ژنوتیپ به ترتیب 2/25 و 0/46 عدد بود. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر آغازگر محاسبه شد.



شکل 1- الگوی باندی حاصل از ISSR-PCR مربوط به آغازگر Primer 1+6 در 39 ژنوتیپ چاودار

به منظور بررسی قدرت تفکیک نشانگرها در نمایش چندشکلی در یک جمعیت محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر نشانگر محاسبه شد. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت

مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود. تعداد PIC براساس تعداد آلل شناسایی شده و نحوه پراکنش آنها در جمعیت محاسبه می‌شود. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه

نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد. بنابراین نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ-های با خویشاوندی نزدیک مفید هستند. در این مطالعه، بیشترین و کمترین مقدار PIC به ترتیب برابر با 0/3 و 0/00001 و مربوط به آغازگرهای 5+6 و 22+11 بود. میانگین PIC برای کل آغازگرهای ISSR 0/15 به دست آمد. بالا بودن میزان PIC در نشانگرهای به کار رفته نشان دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق می‌باشد که نشان‌دهنده سودمندی این آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه

می‌باشد [17]. محاسبه شاخص نشانگر برای هر کدام از آغازگرها نشان داد که بیشترین مقدار شاخص نشانگر مربوط به آغازگر 1+6 برابر با 0/96 بود. میانگین شاخص نشانگر 2/7 محاسبه شد. از نتایج به دست آمده می‌توان گزارش کرد که از آنجا که شاخص نشانگر پتانسیل هر آغازگر جهت تولید باند بیشتر را نشان می‌دهد، بنابراین آغازگر 1+6 بهترین آغازگر ISSR شناخته شد. این آغازگر بیشترین درصد چندشکلی (66/67 درصد) را نشان داد (جدول 2).

جدول 2- مشخصات آغازگرهای ISSR با استفاده از اطلاعات چندشکلی

شاخص نشانگر (MI)	میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)	درصد چندشکلی	باندهای چندشکلی	کل باندها	نام آغازگر	ردیف
0/7	0/23	50	3	6	Primer 20+30	1
0/96	0/24	66/67	4	6	Primer 1+6	2
0/4	0/2	40	2	5	Primer 1+5	3
0/9	0/3	60	3	5	Primer 5+6	4
0/36	0/12	42/85	3	7	Primer 23	5
0/3	0/1	60	3	5	Primer 4	6
0	0	0	0	6	Primer 22+11	7
0	0	0	0	8	Primer 1	8
2/7	0/15	37/5	18	48	مجموع	

PIC= Polymorphic Information Content

MI= Marker Index

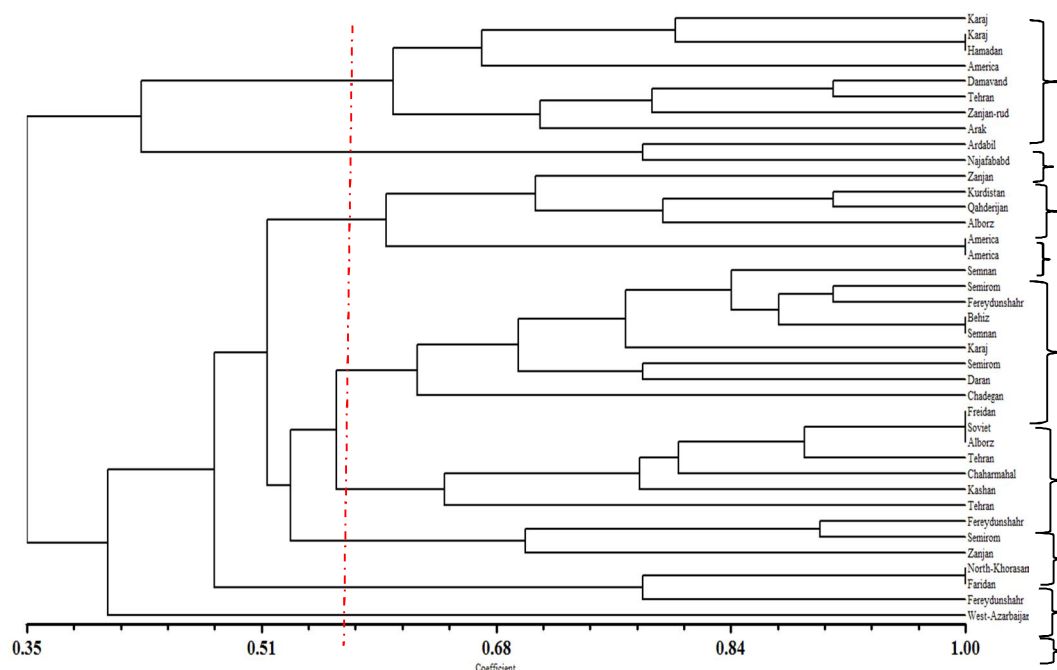
ژنتیکی جمعیت‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد از 0/54 تا 0/98 در نوسان بود و متوسط آن 0/78 بود، بیشترین شباهت بین جمعیت‌های 1 و 25 و کمترین شباهت بین جمعیت‌های 28 و 33 مشاهده شد. میزان کم شباهت نشان‌دهنده این است که دو ژنوتیپ دارای اختلاف ژنتیکی زیادی می‌باشند، بنابراین می‌توان آنها را در صورت داشتن صفات مطلوب، به عنوان والد در برنامه‌های دورگ‌گیری برای اصلاح چاودارهای زراعی استفاده کرد [18].

به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با نشانگرهای ISSR، ابتدا آزمون مانتل¹ برای ضرایب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده براساس روش خوشه‌بندی UPGMA انجام شد. براساس نتایج به دست آمده در این مطالعه دارای بالاترین ضریب تشابه جاکارد و دارای بالاترین ضریب همبستگی کوفتیک (0/97) بود که حاکی از برآزش خوب و همبستگی بالا بین ماتریس تشابه و دندوگرام نهایی بر اساس ضریب تشابه جاکارد می‌باشند. تشابه

1. Mantel

گروه‌بندی آغازگرهای ISSR ژنوتیپ‌های چاودار در ضریب تشابه 60 درصد به 9 گروه اصلی تقسیم شد. در گروه اول دندروگرام دو نمونه سرمونت اراک و سرمونت همدان و مونتانوم‌های کرج (تهران)، دماوند- تهران و یک نمونه مونتانوم زنجان‌رود و یک نمونه ناشناس از کشور آمریکا قرار داشت. در ضریب تشابه 62 درصد به دو زیر گروه تقسیم شدند که در زیرگروه اول بیشترین شباهت (100 درصد تشابه) بین سرمونت همدان و یک نمونه ناشناس از کرج دیده شد. به علت شباهت 100 درصدی آنها احتمال دارد نمونه ناشناس از گونه سرمونت چاودار باشد زیرا در صفات مورفولوژیکی طول سنبله و طول برگ پرچمی شباهت نزدیکی داشتند. در زیر گروه دوم نمونه سرمونت اراک در کنار نمونه‌های مونتانوم تهران، دماوند و زنجان‌رود قرار گرفته بود. علت این نحوه قرارگیری را می‌توان به نزدیکی مناطق و مشابهت اقلیمی این مناطق نسبت داد. به همین دلیل، گونه سرمونت هیبرید حاصل از دو گونه سرال و مونتانوم است. در گروه دوم فقط دو نمونه از گروه مونتانوم از نجف‌آباد و اردبیل با ضریب تشابه 78 درصد در کنار هم قرار گرفتند. هر چند این مناطق از نظر جغرافیایی از هم دور هستند اما مشابهت اقلیمی و یکسان بودن نوع گونه علت مجاورت آنها بوده است. در گروه سوم، سه نمونه مونتانوم از کردستان، زنجان، کرج (البرز) در کنار نمونه سرال از اصفهان (قهدریجان) قرار گرفته بود که نمونه مونتانوم زنجان با ضریب تشابه 71 درصد دورتر از بقیه نمونه‌ها در این گروه قرار گرفته بود. در گروه چهارم دندروگرام دو نمونه چاودار از کشور آمریکا با 100 درصد تشابه در کنار هم قرار گرفته بودند که گونه یکی از آنها سرمونت بود. بنابراین می‌توان گفت که به احتمال زیاد گونه دیگر نیز سرمونت بوده است. در گروه پنجم نمونه‌های سرال سمنان، سرال اصفهان، مونتانوم اصفهان با یک نمونه

ناشناس از کرج قرار داشتند. در این گروه نمونه سرال چادگان با ضریب تشابه 63 درصد دورتر از بقیه قرار داشت. در این گروه دو نمونه سرال سمنان و مونتانوم اصفهان (بهیز) 100 درصد شباهت نشان دادند. در گروه ششم نمونه چاودار از کشور شوروی در کنار نمونه‌هایی از سرال چهارمحال بختیاری، مونتانوم کرج (البرز)، مونتانوم کاشان، مونتانوم پارک جهان‌نما و سرال اصفهان (فریدن) قرار گرفته بود. بین نمونه شوروی، سرال اصفهان (فریدن) و مونتانوم کرج (البرز) 100 درصد شباهت دیده شد. در گروه هفتم در ضریب تشابه 70 درصد به دو زیر گروه تقسیم شد که در زیر گروه اول نمونه سرال فریدونشهر و یک نمونه ناشناس از سمیرم قرار داشتند. در زیر گروه دوم مونتانوم زنجان با ضریب تشابه 70 درصد دورتر از بقیه قرار گرفته بود. این نمونه ناشناس با نمونه سرال فریدونشهر 90 درصد شباهت نشان داد بنابراین به احتمال زیاد این گونه نیز سرال می‌باشد که در تعدادی از صفات مورفولوژیکی مانند دارا بودن کرک در نوک پوشینه و دارا بودن کرک و مو در زیر سطح برگ مشابه بودند. در گروه هشتم دندروگرام 98 درصد شباهت بین مونتانوم خراسان شمالی و سرال فریدن اصفهان دیده شد که در کنار آنها گونه مونتانوم از فریدونشهر نیز قرار داشت. قرار گرفتن گونه مونتانوم و سرال با شباهت زیاد می‌تواند به علت مشابهت اقلیمی این مناطق باشد. نمونه سرال فریدونشهر با 77 درصد تشابه دورتر از بقیه نمونه‌ها قرار گرفته بود. در گروه نهم فقط یک نمونه از آذربایجان غربی با نام گونه نامشخص بود که داده‌های ماتریس تشابه نشان داد که این نمونه با نمونه سرال اصفهان (فریدن) با 62 درصد شباهت، بیشترین شباهت را داشت و با نمونه آمریکا با 10 درصد تشابه، کمترین شباهت را داشت. بنابراین به احتمال زیاد این نمونه می‌تواند از گونه سرال چاودار باشد (شکل 2).



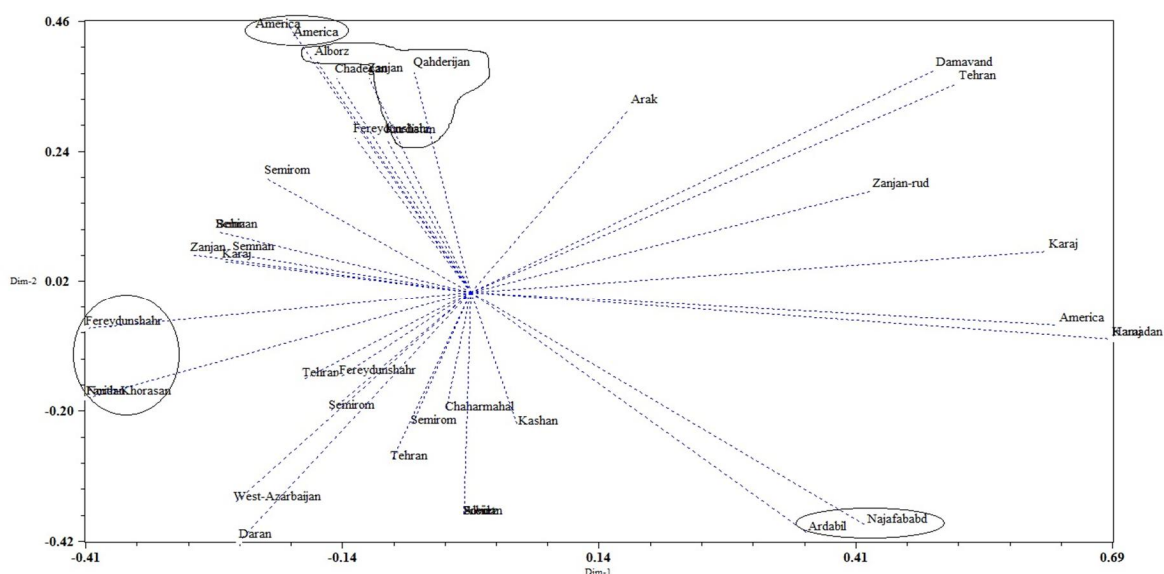
شکل 2- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با نشانگر ISSR در جمعیت‌های چاودار با نرم‌افزار NTSYS

اثر متقابل ژنوتیپ و محیط، ژنتیک این گیاهان از محیط طی تکامل طی سالیان تأثیر پذیرفته است و یکی از احتمالاتی ممکن درخصوص این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به منشأ جغرافیایی آنها باشد که از مکان‌های مختلف جمع‌آوری شده‌اند. در کل دندروگرام تعدادی از نمونه‌ها با 100 درصد تشابه بیشترین شباهت را نشان دادند. کمترین شباهت و به عبارتی دورترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ای با نام گونه نامشخص از آذربایجان غربی و نمونه آمریکا با 10 درصد تشابه بود. محاسبه فاصله ژنتیکی برای دستیابی به هتروزیس بالا در برنامه‌های اصلاحی دو رگه‌گیری اهمیت زیادی دارد. استفاده از ژنوتیپ‌هایی که داری کمترین خویشاوندی باشند و شناسایی تلاقی‌های حاوی هتروزیس بالا مهم‌ترین قدم در تولید محصولات هیبرید است و والدین با قدرت ترکیب‌پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالاتر تولید کنند [19].

از آن‌جا که بیشترین شباهت‌ها در این دندروگرام بین دو گونه مونتانوم و سرال دیده شد، تنها علت این شباهت‌ها را می‌توان به دلیل مشابهت اقلیمی و نزدیکی استان‌های محل جمع‌آوری چاودار دانست. بنابراین نشانگرهای مولکولی به کار رفته قادر به تفکیک گونه‌های چاودار نبوده است و اینگونه در اکثر گروه‌های دندروگرام به‌طور پراکنده قرار گرفتند اما نشانگر ISSR توانست به خوبی نمونه‌های چاودار را از نظر منشأ جغرافیایی و مشابهت اقلیمی مناطق از هم تفکیک کند. در این دندروگرام نمونه چاودار از کشور شوروی در کنار نمونه‌های ایران قرار داشت. یک گونه ناشناس از آمریکا در مجاورت سرمونت همدان بود که به نظر می‌رسد این گونه ناشناس نیز سرمونت باشد. در مجموع قرار گرفتن نمونه‌های خارجی با نمونه‌های ایران در یک گروه دندروگرام ممکن است ناشی از شباهت ژنتیکی آنها به دلیل داشتن منشأ اولیه مشترک و یا به دلیل مشابهت اقلیمی این مناطق باشد. از آن‌جا که این ژنوتیپ‌ها از اقلیم‌های متفاوت منشأ گرفته‌اند، به علت

مقدار از نظر آماری خوب است اما از نظر ژنتیکی نشان‌دهنده عدم توزیع مناسب نشانگرها در ژنوم جمعیت‌های به کار رفته و یا شباهت زیاد توالی‌ها می‌باشد. در این پژوهش نتایج گروه‌بندی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مطابقت چندانی با نحوه گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای نداشت (شکل 3).

نتایج آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشانگرهای ISSR نشان داد که سه مؤلفه اصلی 51/80 درصد از تغییرات کل را توجیه کردند که سهم مؤلفه اول فقط 21/66 درصد بود. مؤلفه دوم و سوم نیز به ترتیب 17/34 درصد و 13/80 درصد از تغییرات کل را توجیه کردند. از آن‌جا که سه مؤلفه اول بیش از 50 درصد از کل تغییرات را توجیه نمودند، بنابراین هر چند این



شکل 3- نمودار داده‌های تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای 39 جمعیت چاودار با نشانگر ISSR

افزار GenAlex محاسبه شد. نتایج حاصل از این تجزیه نشان داد که تنوع درون گونه‌ها بیشتر از تنوع بین گونه‌ها بوده است. به طوری که 97 درصد تنوع مربوط به درون گونه‌ها و 3 درصد از تنوع کل مربوط به تنوع بین گونه‌ها بوده است (جدول 3).

در این مطالعه هر گونه چاودار به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شد. این نمونه‌ها نیز به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شدند و با استفاده از نرم‌افزارهای GenAlex و PopGene به ترسیم دندروگرام فاصله ژنتیکی نی و روش تجزیه مختصات اصلی پرداخته شد. میزان تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ها با آغازگرهای ISSR با نرم-

جدول 3- آنالیز AMOVA برای اندازه‌گیری تنوع درون و بین گونه‌ای با نشانگر ISSR با نرم‌افزار GenAlex

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	اجزای واریانس	درصد واریانس
بین گونه‌ها	3	4/022	0/088**	3%
درون گونه‌ها	35	3/254	3/254**	97%

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

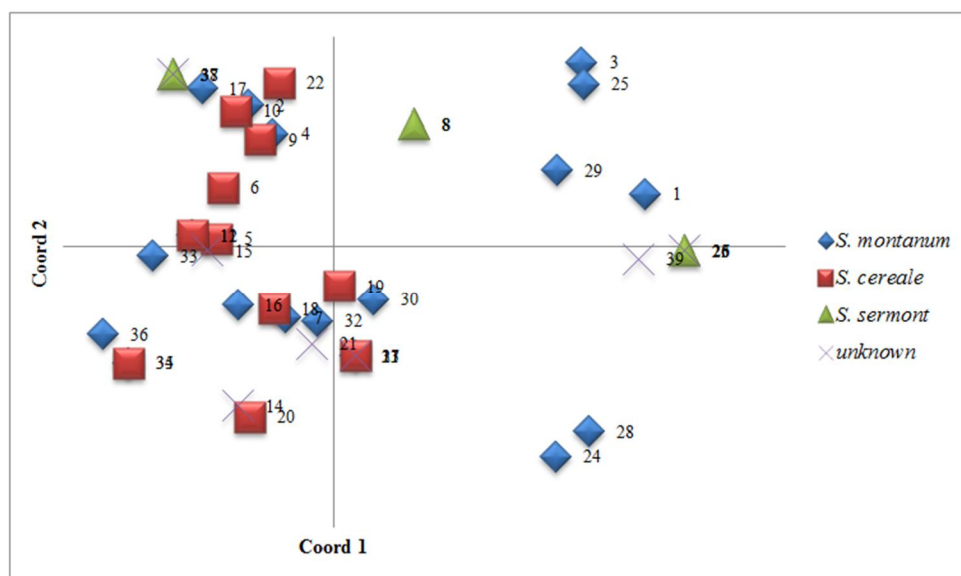
جمعیت‌های درون گونه چاودار هتروزیگوسیتی بالایی داشته‌اند که علت این امر را می‌توان به مهاجرت‌های جغرافیایی و روابط تکاملی دراز مدت گیاه، درصد دگرگشتی بالای چاودار توسط حشرات، باد و انتقال دانه-های گرده نسبت داد. اجزای واریانس در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. چنین الگوی ساختار ژنتیکی در گیاهان دگرگشتن تأیید شده است.

تجزیه مختصات اصلی تعیین روابط ژنتیکی بین گونه‌ها و افراد درون یک گونه را انجام می‌دهد. در تجزیه مختصات اصلی هر ژنوتیپ توسط نقطه‌ای در فضای اقلیدسی نمایش داده می‌شود [20]. در این روش فصل‌ها بین نقاط موجود در پلات با فصل‌های اصلی همخوانی دارد [21, 22, 3]. در نتایج حاصل از نشانگر ISSR سهم دو مختصات اول 51 درصد بود که نشان‌دهنده این مطلب است که این نشانگرها فقط در یک قسمت ژنوم تجمع نیافته‌اند و به اندازه کافی در تمام سطح ژنوم پراکنده‌اند. سهم دو مختصات اول و دوم به ترتیب 31/68 و 19/42 بود. همانطور که مشاهده می‌شود تمامی نمونه‌های چاودار از گونه *S. montanum* در چهار ناحیه نمودار به طور پراکنده قرار گرفته‌اند. تمامی نمونه‌های چاودار از گونه *S. cereale* در دو ناحیه سمت چپ نمودار و در کنار گونه *S. montanum* و یک نمونه چاودار از گونه *S. sermont* و چند نمونه با گونه نامشخص قرار داشت. دو نمونه دیگر از گونه *S. sermont* در یک ناحیه نمودار و در مجاورت چند نمونه از گونه *S. montanum* قرار گرفته‌اند (شکل 4). در مجموع نتایج حاصل از گروه‌بندی تجزیه مختصات اصلی با گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای مطابقت کامل داشت.

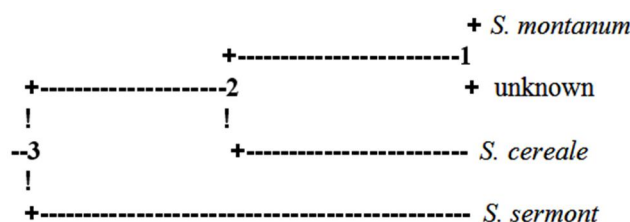
در این مطالعه شاخص اطلاعاتی شانون (I) به‌عنوان یک شاخص درون گونه‌ای برای گونه‌های چاودار با نرم‌افزار PopGene محاسبه شد. بیشترین شاخص

اطلاعاتی شانون را گونه *S. montanum* (53 درصد) به خود اختصاص داد. میانگین شاخص شانون در کل گونه‌ها 52 درصد بود که بیانگر تنوع خوبی در درون گونه‌ها بود. میانگین تنوع ژنی نی (h) 35 درصد بود. تنوع ژنی و جریان ژنی از شاخص‌های با اهمیت است که ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها را در یک گونه مشخص می‌کند. مقدار جریان ژنی (N_m) تحت تأثیر ضریب تمایز ژنی (G_{ST}) بین جمعیت‌ها بوده و همبستگی منفی با آن دارد. ضریب تمایز ژنی بین گونه‌ها 0/167 و جریان ژنی 2/58 محاسبه شد. آماره G_{ST} نشان داد که 16 درصد از تنوع مشاهده شده ناشی از تنوع بین گونه‌ها و 84 درصد تنوع مربوط به تنوع درون گونه‌ها بوده است.

به کمک نرم‌افزار پاپ ژن¹ دندروگرام حاصل از فاصله ژنتیکی نی به روش UPGMA ترسیم شد. در دندروگرام حاصل از نرم‌افزار PopGene گونه ناشناخته چاودار با گونه *S. montanum* در یک گروه قرار گرفتند. سپس گونه *S. cereale* بیشترین نزدیکی را به آن‌ها داشت و گونه *S. sermont* دورتر از بقیه قرار گرفت. بیشترین شباهت ژنتیکی (100 درصد) یا کمترین فاصله ژنتیکی بین گونه مونتانوم و گونه ناشناس بود. کمترین شباهت ژنتیکی (82 درصد) نیز در بین گونه *S. sermont* و *S. cereale* دیده شد (شکل 5).



شکل 4- نمودار توزیع 4 گونه چاودار با آزمون تجزیه مختصات اصلی با نرم افزار GenAlex



شکل 5- دندروگرام ناریب جمعیت‌های چاودار با استفاده از فاصله ژنتیکی نی به روش UPGMA

نتیجه‌گیری

در اصلاح نباتات می‌باشد، به کار رود. گروه‌بندی‌های ایجاد شده برای جمعیت‌ها می‌تواند در برنامه‌های توسعه ارقام مناسب جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه به کار روند.

منابع

- [1] Mazaheri, D. (1999) *Mixture agronomy*. Tehran: Publishing Center of Tehran University
- [2] NourMohammadi, G., Siadat, S. A., and Kashani, A. (1999) *Cereals agronomy*. Ahvaz: Publishing Center of Chamran University
- [3] Hamid, R., Siahpoosh, M., Mamaghani, R., and Siahpoosh, A. (2014) Evaluation the genetic diversity of 10 Milk thistle (*Silybum marianum* L.) ecotypes using morphological, phenological and phytochemical traits

نتایج این مطالعه می‌تواند نقطه عطفی برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت ژرم‌پلاسما ارقام و جمعیت‌های چاودار باشد. آغازگرهای 1+6 Primer و 5+6 Primer با برخورداری از بیشترین PIC به عنوان بهترین آغازگرها جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در این تحقیق معرفی شدند که این امر نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز جمعیت‌های چاودار مورد مطالعه است. این آغازگرهای در مطالعات آینده نیز می‌توانند بسیار مفید واقع شوند. مشاهده شده است، فاصله ژنتیکی مشاهده شده می‌تواند برای کارهای اصلاحی بعدی و انجام تلاقی بین ژنوتیپ‌ها، به منظور بالا بردن کیفیت و کمیت عملکرد که هدف نهایی

- [14] Peakall, R., and Smouse, P. E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. **6**, 288-295
- [15] Slatkin, M., and Barton, N. (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*. **43**(7), 1349-1368
- [16] Farshadfar, A. A. (1997) *Application of Quantitative Genetic in Plant Breeding*. Volume II. Bostan Publications-Razi University in Kermanshah, PP 396
- [17] Shazdehahmadi, M., and Kharrazi, M. (2016) Application of ISSR Molecular Markers for Genetic Diversity Study of Some Tobacco Genotypes. *Journal of Plant Genetic Research*. **2**(2), 33-46
- [18] Yang, B., Xiao, B., Chen, X., Shi, C. (2007) Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using intersimple sequence repeat and inter retrotransposon amplification polymorphism markers. *Ann. applied Bio*. **150**(3), 393-401
- [19] Tulsani, N.J., Hamid, R., Jacob, F., Umretiya, N. G., Nandha, A. K., and Tomar, R. S. (2020). Transcriptome landscaping for gene mining and SSR marker development in Coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Genomics*. **112**(2), 1545-53
- [20] Rohlf, M. (1998) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Department of Ecology and Evolution, State University of New York
- [21] Shazdehahmadi, M., and Kharrazi, M. (2016) Application of ISSR Molecular Markers for Genetic Diversity Study of Some Tobacco Genotypes. *J. Plant Genetic Research*. **2**(2), 33-46
- [22] Schaut, J. W., Qi, X., and Stam, P. (1997) Association between relationship measures AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. **95**, 1161-1168
- [4] Arzani, A. (2010). *Breeding of crops plants*. Isfahan: Publishing Center of Isfahan University of Technology
- [5] Cwiklinska, A., and Broda, Z. (2010) The usefulness of RAPD and AFLP markers for determining genetic similarity in rye (*secale*) species and subspecies. *Acta Bio. cracoviensia Series Bot*. **52**(1), 19-25
- [6] Arjmand, G. R., Tavassolian, I., and Mohammadi, N. G. (2015) Evaluation of genetic diversity in 25 Iranian pistachio genotypes using ISSR markers
- [7] Emel, S. (2010) Evaluation of ISSR markers to assess genetic variability and relationship among winter triticale (*Triticosecale wittmack*) cultivars *Pak. J. Bot*. **42**(4), 2755-2763
- [8] Gradzielewska, A. (2011) Application of the ISSR method to estimate the genetic similarity of *Dasyphyrum villosum* candargy greek populations to *Triticum* and *Secale* species. *Research Conservation*. **21**, 7-12
- [9] Magdalena, A., and Kalinka, A. (2009) Assessment of genetic relationships among *Secale* taxa by using ISSR and IRAP markers and the chromosomal distribution of AAC microsatellite sequence. Stanisława Maria ROGALSKA University of Szczecin, Faculty of Biology, Chair of Cell Biology. ul. Wąska. **13**, 71-415
- [10] Rogers, S. O., and Bendich, A. J. (1994). Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: *Plant Molecular Biology Manual*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 183-190
- [11] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. (1995) AFLP a new technique for DNA fingerprinting *Nucleic Acids Res*. **23**, 4407-4414
- [12] Lewontin, R. C. (2009) The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*. **6**, 381-398
- [13] Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. In: *Proceeding of the National Academy of Sciences*. United States America. **70**, 3321-3323

Using of ISSR Marker in Assessment of Genetic Diversity Inter and Intra Specific of Rye

Rezaei Mirghayed E.^{*1} MSc, Amirian R.² PhD, Arezi I.³ MSc

1- Biotechnology Department, Agriculture Faculty, University of Payam Noor, Isfahan, Isfahan, Iran

2- Department of genomics, Branch of Central Region (Isfahan), Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Extension and Education Organization of Iran (AREEO), Isfahan, Iran

3- Department of genomics, Branch of Central Region (Isfahan), Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Extension and Education Organization of Iran (AREEO), Isfahan, Iran

*Corresponding Author: rezaeimirghayed@gmail.com

Received: 2020/5/31

Accepted: 2021/6/16

Abstract:

Rye is one of Iran's most important crops, known as *Secale*, belonging to the Poaceae. Evaluation of Rye genetic diversity is essential for breeding programs and preservation of genetic resources. Genetic diversity level in Rye genotypes is very important for selection of parents in breeding programs. In this research, genetic diversity of 39 families of rye populations from different regions of Iran, the USA, and the Soviet Union was evaluated with the 28 ISSR markers. The results showed that 8 ISSR initiators produced 48 bands which included 18 polymorphic bands (37.5% polymorphism). The mean of polymorphic information content (PIC) and marker index value (MI) for ISSR primers was 0.15 and 7.2 respectively. The highest PIC (3.0) was related to primer 5+6 and the highest MI (0.96) reached for primer 1+6. After observing polymerase chain reaction products on an agarose gel and scoring DNA bands, the analysis was performed with NTSYS software. The cluster analysis dendrogram of UPGMA and Jaccard's similarity coefficient divided the rye populations into 9 groups, the results were compiled with grouping by principal component analysis. The results of analysis of Molecular Variance indicated an in-species variation more than inter-species variation. The mean Nei's genetic variation (h) was 350 and the mean of Shannon index (I) in rye species was 523, which indicates a relatively good variety within species. The results showed that the ISSR marker was a useful tool in determining genetic variation of inter and intra specific of rye.

Keywords: Rye, Genetic Diversity, ISSR Marker, Polymorphism, Analysis of Molecular Variance