ارزیابی ساختار جمعیت و برآورد پارامترهای ژنتیکی در جمعیت‌های اصلاحی و بومی گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای ISSR

محمود اصلان پرویز[۱]، ورهرام رشیدی[۲]، منصور امیدی[۳،*]، علیرضا اطمینان[٤] و علیرضا احمدزاده[٥]

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

٤- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه

٥- استادیار، گروه کشاورزی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر

(تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۰۳/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۲/۰۹)

چکیده

ارزیابی تنوع ژنتیکی یکی از اصول اولیه برنامه‌های اصلاحی می‌باشد که شرایط مناسبی جهت بررسی ویژگی‌های ژنتیکی و شناسایی آلل‌های جدید برای به‌نژادگران گیاهی را فراهم می‌آورد. در این پژوهش تنوع ژنتیکی موجود در ٦۹ ژنوتیپ بومی و لاین اصلاحی گندم دوروم با استفاده از آغازگرهای ISSR، مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از ١٦ آغازگر در مجموع ١٦٣ قطعه تکثیر شد که ١٦٠ قطعه از آن‌ها چندشکل بودند. با توجه به میانگین شاخص‌های محتوای چندشکلی (PIC)، قدرت تمایز (Rp) و شاخص نشانگر (MI)، مشخص شد که آغازگرهای استفاده شده کارایی لازم جهت بررسی روابط بین ژنوتیپ‌ها و ساختارهای ژنتیکی را دارند. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که میزان تنوع درون جمعیت‌ها نسبت به بین جمعیت‌ها بیشتر است. بر اساس مقادیر شاخص‌های تنوع ژنتیکی مشخص شد که بیشترین تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، بیشترین میزان شاخص شانون (I) و درصد مکان‌های چندشکل (PPL) مربوط به ژنوتیپ‌های بومی است. تجزیه خوشه‌ای و بررسی ساختار جمعیت، تمامی ژنوتیپ‌های ارزیابی شده را به‌ترتیب در سه گروه اصلی و شش زیرجمعیت دسته‌بندی کردند. به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در درون جمعیت‌های بومی گندم دوروم وجود دارد؛ بنابراین این مجموعه می‌تواند به‌عنوان یک منبع ژنی با ارزش جهت گزینش لاین‌های والدینی جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی گندم دوروم مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، ساختار جمعیت، گندم دوروم، نشانگرهای مولکولی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **momidi@ut.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.1.7]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.2]

مقدمه

در بین گونه‌های موجود در جنس تریتیکوم علاوه‌بر گندم نان (*Triticum aestivum* L.; 2*n* = 6*x* = 42) گونه تتراپلوئید گندم دوروم (*Triticum turgidum* L.var durum; 2*n* = 4*x* = 28) که به‌عنوان گندم ماکارونی نیز شناخته می‌شوند از لحاظ تجاری و تأمین نیاز غذایی دارای اهمیت قابل‌توجهی است. گندم دوروم محصولی صنعتی است که عمدتاً در صنایع تولید ماکارونی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اهمیت این نوع گندم به‌واسطه خصوصیاتی است که آرد آن دارد، به‌گونه‌ای که آن را مناسب تهیه انواع ماکارونی و اسپاگتی می‌نماید (Fbriani and Lintas, 1988). در سال ۲۰۱۷ میلادی تولید کل گندم دنیا حدود ۷۳٤ میلیون تن گزارش شده است که حدود ۳۷/۵ میلیون تن آن گندم دوروم بوده است (Anonymous, 2018). از این‌رو به‌نظر می‌رسد اجرای برنامه‌های به‌نژادی در جهت اصلاح و معرفی واریته‌های پربازده جهت کشت در مناطق مختلف کشور امری ضروری باشد.

تنوع و گزینش دو رکن اصلی برنامه‌های به‌نژادی بوده و انجام گزینش منوط به وجود تنوع مطلوب از حیث هدف مورد بررسی می‌باشد. بررسی‌های متعدد بیانگر این واقعیت است که تاکنون از تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای گندم به‌طور کامل استفاده نشده است (Maxted *et al.*, 2006)؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد علاوه‌بر تسلط بر فن‌آوری‌های مدرن، موفقیت در به‌نژادی گندم وابسته به استفاده از طیف گسترده‌ای از تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های بومی و یا گونه‌های وحشی آن است (De Ponti, 2010). بررسی ساختار و میزان تنوع ژنتیکی در توده‌های بومی و خویشاوندی گندم یکی از گام‌های اولیه در اکثر برنامه‌های به‌نژادی محسوب می‌شود و اطلاع از سطح تنوع موجود در منابع ژرم‌پلاسمی می‌تواند جهت غنی‌سازی پایه‌های ژنتیکی و شناسایی ژن‌های مناسب به‌کار رود (Pour-Aboughadareh *et al.*, 2018). یکی از مهم‌ترین ابزارهای ارزیابی تنوع ژنتیکی نشانگرهای مولکولی می‌باشند (Garrido-Cardenas *et al.*, 2018). نشانگرهای مولکولی به‌عنوان مکان‌هایی روی کروموزوم‌ها با قابلیت کمک به محققین در تجزیه و مطالعه ژنوم موجودات و دارا بودن مزایای مطلوب زیاد مانند داشتن توارث مندلی، برخورداری از میزان چندشکلی بالا، هم‌بارز بودن، بیان مستقل از شرایط محیطی، نماینده‌ای از کل ژنوم فرد بودن و کم‌هزینه بودن موجب موفقیت بسیاری از برنامه‌های به‌نژادی گیاهان شده‌اند (Collard and Mackill, 2008). یکی از نشانگرهای مولکولی مبتنی‌بر DNA مورد استفاده در مطالعات ژنتیکی، به‌ویژه زمانی‌که اطلاعات اولیه در مورد ژنوم مورد نظر وجود ندارد، نشانگر ISSR (Inter-simple sequence repeat) است (Liu and Wendel, 2001). این نشانگر اولین‌بار توسط زیتکیویکز و همکاران (Zietkiewicz *et al.*, 1994) برای بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی و جانوری معرفی شد. نشانگرهای ISSR یکی از مهم‌ترین گروه از نشانگرهای مولکولی هستند که در مقایسه با سایر روش‌ها، مشکلات تکرارپذیری پایین RAPD (Random amplified polymorphic DNA)، هزینه بالا و دقت لازم برای AFLP (Amplified fragment length polymorphism) و نیاز به اطلاعات ژنومی در مورد SSR (Simple sequence repeat) را ندارد (Navabpour *et al.*, 2021). این مزایا سبب شده است تا استفاده از این سیستم نشانگری در مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی و ساختارهای ژنتیکی به‌طور گسترده‌ای صورت گیرد (Eghliman *et al.*, 2021). در رابطه با به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی گندم دورم گزارش‌های متعددی موجود است. در این راستا این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی بین مجموعه‌ای متشکل از ٦۹ لاین اصلاحی و توده بومی گندم دورم با استفاده از نشانگرهای ISSR و همچنین بررسی ساختار جمعیت اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل ٦۹ ژنوتیپ بومی و اصلاح‌شده گندم دوروم تهیه شده از مرکز تحقیقات دیم واقع در سرارود، کرمانشاه بود (جدول ۱). پس از کشت بذور هر یک از ژنوتیپ‌ها در شرایط گلخانه و تولید گیاهچه، استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان در مرحله دو برگچه‌ای بر اساس روش CTAB انجام شد (Doyle and Doyle, 1987). پس از استخراج DNA ژنومی کیفیت آن با استفاده از ژل (۰/۸ درصد)–الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.1.7]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.2]

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت از ۱۶ آغازگر ISSR طراحی شده بر اساس مطالعات قبلی استفاده و توالی آن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است (Etminan *et al.*, 2017). پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر و تعیین دمای اتصال آغازگرها، واکنش PCR با استفاده دستگاه ترموسایکلر (مدل Biorad-T100) انجام شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر، ۱۲/۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۹/۳ میکرولیتر PCR master Mix (2X) بود. کلیه واکنش‌های تکثیر در برنامه دمایی شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ دقیقه و ۳۰ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به‌مدت ٤٥ ثانیه در دمای بهینه شده برای هر آغازگر، توسعه آغازگر (پلیمریزاسیون) به‌مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

پس از انجام واکنش تکثیر، محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل‌ها با Safeview انجام و عکس‌برداری از آن‌ها صورت گرفت. پس از امتیازدهی الگوهای باندی بر اساس معیار صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند)، مقادیر محتوای چندشکلی (Polymorphism information content, PIC)، قدرت تمایز (Polymorphism information content, Rp) و شاخص نشانگر (Marker index, MI) به‌ترتیب بر اساس روابط پیشنهاد شده توسط آندرسون و همکاران (Anderson *et al.*, 1993)، پروست و ویلکینسون (Prevost and Wilkinson, 1999) و وارشنی و همکاران (Varshney *et al.*, 2007) برای هر آغازگر محاسبه شد.

تجزیه واریانس مولکولی (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) و محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx انجام شد (Peakall and Smouse, 2006). مقادیر فواصل ژنتیکی بین جفت نمونه‌ها بر اساس ضریب فاصله جاکارد محاسبه و به‌منظور گروه‌بندی نمونه‌ها، آنالیزهای تجزیه به مختصات اصلی (Principal coordinate analysis, PCoA) و تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbor-joining با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver.5.1 صورت گرفت (Tamura *et al.*, 2011). تجزیه ساختار جمعیت در توده‌های ارزیابی شده نیز با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE صورت گرفت. در این تجزیه جهت یافتن زیرجمعیت‌های واقعی تجزیه بر پایه مدل بیزین (Bayesian) انجام و به تعداد ۱۰ مرتبه تکرار شد. تعداد شاخص‌های burn-in و شاخص MCMC (Markov Chain Monte Carlo) در هر تکرار به تعداد مساوی و ۵۰۰۰۰ در نظر گرفته شد. سپس به‌منظور دستیابی به تعداد زیرجمعیت‌های واقعی از نرم‌افزار برخط Structure Harvester (Earl and von Holdt, 2012) استفاده شد.

نتایج و بحث

تعداد قطعات تکثیری و شاخص‌های تعیین‌کننده کارایی سیستم نشانگری: بر اساس نتایج به‌دست آمده مشخص شد که تمام آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش قادر به ارائه چندشکلی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی بودند و در مجموع ۱٦۳ قطعه را تکثیر کردند که از بین آن‌ها ۱٦۰ قطعه (۹۸ درصد) چندشکل بودند (جدول ۲). تعداد کل قطعات تکثیری چندشکل بین ۷ (مربوط به آغازگر ISSR-12) و ۱۵ (مربوط به آغازگر ISSR-14) با میانگین ۱۰ قطعه متغیر بود. میانگین شاخص PIC برابر با ۰/٤۲ بود. دو آغازگر ISSR-3 و ISSR-13 با ۰/٤٦ و آغازگر ISSR-9 با ۰/۳۵ نسبت به سایر آغازگرها به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان اطلاعات چندشکل بودند. شاخص PIC یکی از مهم‌ترین معیارهای تعیین‌کننده کارایی سیستم‌های نشانگری است که قدرت تمایز نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهند (Powell *et al.*, 1996). در واقع این شاخص احتمال تشخیص چندشکلی ایجاد شده توسط یک آغازگر بین دو فرد می‌باشد که به تعداد آلل‌های قابل تشخیص و فراوانی آن‌ها وابسته است. از این‌رو با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد که آغازگرهای ISSR-3 و ISSR-13 قابلیت ویژه‌ای در تمایز ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارند.

شاخص Rp نیز توانایی یک سیستم نشانگری را در ایجاد باندهای قابل امتیازدهی تعیین می‌کند. با این وجود، پروست و ویلکینسون (Prevost and Wilkinson, 1999) اظهار داشتند که این شاخص نمی‌تواند اطلاعاتی درباره توانایی یک آغازگر در بازتاب روابط ژنتیکی با تاکسونومی یک گروه ژنوتیپ تحت مطالعه را فراهم کند.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.1.7]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.2]

جدول ۱- لیست ژنوتیپ‌های گندم دوروم ارزیابی شده به‌همراه منشأ جغرافیایی، کد دسترسی بانک ژن و شجره آن‌ها

Table 1. List of the durum wheat analyzed, their origin, genebank code, and pedigree

ردیف Row	کد دسترسی Genebank code	جمعیت Type	منشأ Origin	ردیف Row	کد دسترسی Gene bank code	جمعیت Type	منشأ Origin
1	*IUGB-00038	LR	ایران (Iran)	36	M141994	BL	ایکاردا (ICARDA)
2	IUGB-00268	LR	ایران (Iran)	37	M141995	BL	ایکاردا (ICARDA)
3	IUGB-00517	LR	ایران (Iran)	38	M142005	BL	ایکاردا (ICARDA)
4	IUGB-00520	LR	ایران (Iran)	39	M142017	BL	ایکاردا (ICARDA)
5	IUGB-00522	LR	ایران (Iran)	40	M142025	BL	ایکاردا (ICARDA)
6	IUGB-00531	LR	ایران (Iran)	41	M142038	BL	ایکاردا (ICARDA)
7	IUGB-00543	LR	ایران (Iran)	42	M142045	BL	ایکاردا (ICARDA)
8	IUGB-00651	LR	ایران (Iran)	43	M142069	BL	ایکاردا (ICARDA)
9	IUGB-00658	LR	ایران (Iran)	44	M142070	BL	ایکاردا (ICARDA)
10	IUGB-00663	LR	ایران (Iran)	45	Chesit-1252	BL	ایکاردا (ICARDA)
11	IUGB-00770	LR	ایران (Iran)	46	Berkmen-469	BL	ایکاردا (ICARDA)
12	IUGB-00912	LR	ایران (Iran)	47	Eminbey	BL	ایکاردا (ICARDA)
13	IUGB-01673	LR	ایران (Iran)	48	Kunduru 414-44	BL	ایکاردا (ICARDA)
14	IUGB-01677	LR	ایران (Iran)	49	KC_643	LR	ایران (Iran)
15	IUGB-01859	LR	ایران (Iran)	50	KC_659	LR	ایران (Iran)
16	IUGB-01692	LR	ایران (Iran)	51	KC.911	LR	ایران (Iran)
17	IUGB-01731	LR	ایران (Iran)	52	KC.981	LR	ایران (Iran)
18	IUGB-01688	LR	ایران (Iran)	53	KC.1033	LR	ایران (Iran)
19	IUGB-00332	LR	ایران (Iran)	54	KC.1047	LR	ایران (Iran)
20	46198	BL	ایکاردا (ICARDA)	55	KC_2887	LR	ایران (Iran)
21	46172	BL	ایکاردا (ICARDA)	56	KC_3296	LR	ایران (Iran)
22	46112	BL	ایکاردا (ICARDA)	57	KC_3399	LR	ایران (Iran)
23	46078	BL	ایکاردا (ICARDA)	58	KC_3632	LR	ایران (Iran)
24	46061	BL	ایکاردا (ICARDA)	59	TN_12598	LR	ایران (Iran)
25	SORA/2*PLATA-12/3/SORA/2* PLATA-12//SOMAT-3/4/AJAI	BL	ایکاردا (ICARDA)	60	KC_678	LR	ایران (Iran)
26	SOMAT-4/INTER-8/4/GODRIN/ GUTROS//DUKEM/3/THKNE	BL	ایکاردا (ICARDA)	61	KC.874	LR	ایران (Iran)
27	NUS/SULA//5*NUS/4/SULA/ RBCE-2/3/HUI//CIT71/CII*2/5/AR	BL	ایکاردا (ICARDA)	62	KC.963	LR	ایران (Iran)
28	CNDO/VEE//CELTA/3/PATA-2/6/ ARAM-7//CREX/ALLA/5/ENTE/MEXI	BL	ایکاردا (ICARDA)	63	KC_1298	LR	ایران (Iran)
29	USDA595/3/D67.3/RABI//CRA/4/ALO/5/HUI/ YAV-1/6/ARDENTE/7/HUI/YAV79/8/	BL	ایکاردا (ICARDA)	64	KC_1648	LR	ایران (Iran)
30	AJAIA-12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)// PLATA-13/3/PLATA-6/GREEN	BL	ایکاردا (ICARDA)	65	KC_3296	LR	ایران (Iran)
31	TOPDY-18/FOCHA-1//ALTAR84/3/AJAIA12/F3LOCAL-(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA-13/4/SOMAT-3/	BL	ایکاردا (ICARDA)	66	TN_12736	LR	ایران (Iran)
32	GREEN-22RASCON-37/4/MAGH72/RUFO//ALG86/ RU/3/PLATA-16/5/PORTO-3*2/6/ARMENT// SRN -3/NIGRIS-4/3/CANELO-9.1	BL	ایکاردا (ICARDA)	67	Saji	LR	ایران (Iran)
33	M84859	BL	ایکاردا (ICARDA)	68	Zardak	LR	ایران (Iran)
34	M141979	BL	ایکاردا (ICARDA)	69	Sardari	LR	ایران (Iran)
35	M141982	BL	ایکاردا (ICARDA)				

* بانک ژن دانشگاه ایلام

* Ilam University Genebank

LR و BL به‌ترتیب بیانگر ژنوتیپ‌های بومی و لاین‌های اصلاحی می‌باشند.

LR and BL indicate landraces and breeding lines, respectively.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.1.7]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.2]

جدول ۲- شاخص‌های ژنتیکی آغازگرهای ISSR استفاده شده در ارزیابی ژنوتیپ‌های گندم دوروم

Table 2. Genetic parameters of the used ISSR primers in evaluation of durum wheat genotypes

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer sequence (5-3)	TAB	NPB	PPB	PIC	Rp	MI
ISSR-1	DBDACACACACACACACA	12	11	92	0.41	7.68	4.61
ISSR-2	GACAGACAGACAGACA	10	10	100	0.44	6.69	4.45
ISSR-3	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	9	9	100	0.46	6.46	4.14
ISSR-4	ACACACACACACACACC	11	11	100	0.44	7.24	4.85
ISSR-5	GAGAGAGAGAGAGAGARC	11	10	92	0.40	6.69	4.05
ISSR-6	CTCTCTCTCTCTCTCTG	11	11	100	0.36	5.21	3.98
ISSR-7	CACACACACACACACAG	8	8	100	0.39	4.34	3.16
ISSR-8	ACACACACACACACACYA	9	9	100	0.40	5.04	3.63
ISSR-9	GTGTGTGTGTGTGTGTYG	9	9	100	0.35	4.14	3.19
ISSR-10	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	10	10	100	0.42	6.14	4.25
ISSR-11	AGAGAGAGAGAGAGAGT	11	11	100	0.44	7.39	4.90
ISSR-12	ACACACACACACACACYG	7	7	100	0.44	4.75	3.13
ISSR-13	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	9	9	100	0.46	6.60	4.18
ISSR-14	CACACACACACACACARG	15	15	100	0.44	9.85	6.61
ISSR-15	TGTGTGTGTGTGTGTGRC	11	11	100	0.45	7.56	4.96
ISSR-16	TCTCTCTCTCTCTCTCG	10	9	100	0.40	6.23	3.69
	میانگین (Mean)	10.19	10	99	0.42	6.38	4.24

Ta: دمای اتصال آغازگر؛ TAB: تعداد کل قطعات تکثیری؛ NPB: تعداد قطعات تکثیری چندشکل؛ PPB: درصد چندشکلی؛ PIC: محتوای اطلاعات چندشکل؛ Rp: قدرت تمایز؛ و MI: شاخص نشانگر

Ta: temperature annealing; TAB: total amplified bands; NPB: number of polymorphic; PPB: percentage of polymorphism; PIC: polymorphism information content; Rp: resolving power and MI: marker index

D: A، T یا G و B: C، G یا T

D: A, G or T and B: C, G or T

با توجه به نتایج مندرج در جدول ۲ شاخص Rp با میانگین ٦/۳۸ بین ٤/۷۵ (مربوط به آغازگر ISSR-12) و ۹/۸۵ (مربوط به آغازگر ISSR-14) متغیر بود. دو آغازگر ISSR-14 و ISSR-12 نیز به‌ترتیب دارای بیشترین (٦/٦١) و کمترین (۳/۱۳) مقادیر شاخص MI بودند. پیش از این اطمینان و همکاران (Etminan *et al.*, 2017) با استفاده از نشانگرهای ISSR تنوع ژنتیکی موجود در مجموعه‌ای از توده‌های بومی گندم دوروم را بررسی و گزارش کردند آغازگرهای استفاده شده به‌خوبی قادر به ارائه سطح بالایی از چندشکلی در توده‌های بومی بودند. پورابوقداره و همکاران (Pour-Aboughadareh *et al.*, 2017) نیز از آغازگرهای ISSR جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در برخی از توده‌های دیپلوئید گندم ایران استفاده کردند و نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که این سیستم نشانگری، کارایی بالایی در برآورد تنوع ژنتیکی درون مجموعه‌های ژرم‌پلاسمی دارد.

شاخص‌های تنوع ژنتیکی: به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون ژنوتیپ‌های ارزیابی شده تجزیه واریانس مولکولی انجام و نتایج آن در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تنوع درون‌جمعیتی نسبت به بین‌جمعیتی بیشتر بود (٦٢ درصد در مقابل ۳۸ درصد). بیشترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به درون جمعیت‌ها بود. بالا بودن میزان تنوع درون جمعیتی نسبت به بین‌جمعیتی بیانگر وجود سطح بالایی از تنوع و اختلاف ژنتیکی افراد درون یک جمعیت می‌باشد که به‌نوبه خود این تنوع می‌تواند در یافتن آلل‌های و یا ژن‌های گوناگون و استفاده از آن‌ها در تولید لاین‌های جدید مؤثر باشد. جهت بررسی دقیق‌تر میزان تنوع درون‌جمعیتی برخی از پارامترهای تنوع ژنتیکی برآورد شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد که از نظر شاخص‌های تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) و تنوع ژنی نی (He) بین ژنوتیپ‌های بومی و لاین‌های اصلاحی گندم دوروم تفاوتی وجود نداشت. با این حال، ژنوتیپ‌های بومی از نظر شاخص‌های تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، اطلاعات شانون (I) و همچنین درصد مکان‌های ژنی چندشکل (PPL) نسبت به لاین‌های اصلاحی از مقادیر بالاتری برخوردار بودند (جدول ٤).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.1.7]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.2]

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در جمعیت‌های گندم دوروم
Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) in durum wheat populations.

منابع تغییر Source of variation	بین جمعیت‌ها Between populations	درون جمعیت‌ها Within populations
df	1.00	67
SS	411.43	1252.36
MS	411.43	18.69
Est.Var	11.58	18.69
Var	38%	62%

SS: مجموع مربعات؛ MS: میانگین مربعات؛ Est. var: واریانس تخمین‌زده شده؛ Var: واریانس کل؛ df: درجه آزادی
SS: Sum of squares; MS: Mean squares; Est. Var: Estimated variance; Var: Total variance; df: Degree of freedom

ایران به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مراکز توزیع و پراکنش گونه‌های ژرم‌پلاسمی گندم در دنیا شناخته شده است و بر اساس شواهد به‌دست آمده، مناطق غربی کشور با قرارگیری در ناحیه هلال حاصلخیز منشاء تکامل اولیه گونه‌های اهلی شده گندم به‌شمار می‌آیند (Weide *et al.*, 2013). پیش از این مطالعات گسترده‌ای در رابطه با تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های بومی با استفاده از انواعی از نشانگرهای مولکولی صورت گرفته است و نتایج آن‌ها با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مطابق دارد. در بررسی انجام شده توسط رشیدی‌منفرد و همکاران (Rashidimonfared *et al.*, 2008) میزان چندشکلی و تنوع ژنتیکی در توده‌های بومی گندم دوروم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران بیشتر از تنوع موجود در لاین‌های اصلاحی و ژنوتیپ‌های خارجی بود. مردی و همکاران (Mardi *et al.*, 2011) نیز میزان تنوع ژنتیکی موجود در مجموعه‌ای از ارقام خارجی و توده‌های بومی ایران را با استفاده از انواعی از نشانگرهای مولکولی مقایسه کردند و در نهایت اظهار داشتند که میزان تنوع ژنتیکی در توده‌های بومی ایران بیشتر از سایر ارقام خارجی است. در بررسی‌های صورت گرفته توسط اطمینان و همکاران (Etminan *et al.*, 2016, 2017) با استفاده از نشانگرهای ISSR و SCoT نیز میزان چندشکلی و تنوع ژنتیکی در توده‌های بومی گندم دوروم بیش از سایر ارقام اصلاحی گزارش شده است؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد بالا بودن مقادیر هر یک از پارامترهای ژنتیکی در ارقام بومی گندم دوروم نسبت به لاین‌های اصلاحی بیانگر این موضوع باشد که مجموعه مورد بررسی می‌تواند به‌عنوان یک منبع مناسب برای کاوش ژن‌های مفید و مناسب اصلاح گندم دوروم باشد و بتوان از آن‌ها در برنامه‌های تلاقی و ایجاد جمعیت‌های اصلاحی استفاده نمود.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های ارزیابی شده و تعیین ساختار جمعیت: ضرایب فاصله ژنتیکی بین ۰/۱۶ و ۰/۹۴ با میانگین ۰/۶۳ بین ژنوتیپ‌های ارزیابی شده متغیر بود. بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو ژنوتیپ بومی شماره ۵۹ و لاین اصلاحی شماره ۳۱ مشاهده شد و در مقابل دو ژنوتیپ بومی شماره ۵۰ و ۵۴ دارای کمترین فاصله ژنتیکی بودند (ماتریس فواصل ژنتیکی نشان داده نشده است).

در واقع به‌نظر می‌رسد این تفاوت‌ها به ماهیت ژنتیکی متفاوت لاین‌های اصلاحی و ژنوتیپ‌های بومی برگردد. جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی از تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. این تجزیه بر اساس ماتریس ضرایب فاصله ژنتیکی محاسبه و دندروگرام حاصل از آن در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به الگوی گروه‌بندی به‌دست آمده مشخص شد که کلیه ژنوتیپ‌های مورد بررسی در سه گروه اصلی دسته‌بندی شدند. گروه اول شامل ۱۹ ژنوتیپ بومی و ۱۰ لاین اصلاحی بود. در گروه دوم تعداد ۱۹ ژنوتیپ بومی ۱۹ لاین اصلاحی جای گرفت. یک ژنوتیپ از هر جمعیت نیز در نهایت به‌عنوان گروه سوم از دیگر ژنوتیپ‌ها متمایز شدند. در واقع قرارگیری برخی از ژنوتیپ‌های بومی و لاین‌های اصلاحی با یکدیگر در گروه و زیرگروه‌های مختلف را می‌توان به بالا بودن میزان تنوع ژنتیکی موجود در هر یک از جمعیت‌ها و از طرف دیگر تشابه ژنتیکی آن‌ها نسبت داد. به‌منظور یافتن زیرجمعیت‌های واقعی در مجموعه مورد مطالعه تجزیه ساختار جمعیت انجام شد. نتایج به‌دست آمده از این تجزیه نشان داد که در بهترین شرایط ممکن، تعداد شش زیرجمعیت واقعی در ۶۹ ژنوتیپ ارزیابی شده گندم دوروم وجود داشت (K = ۶) (شکل ۲).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.1.7]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.2]

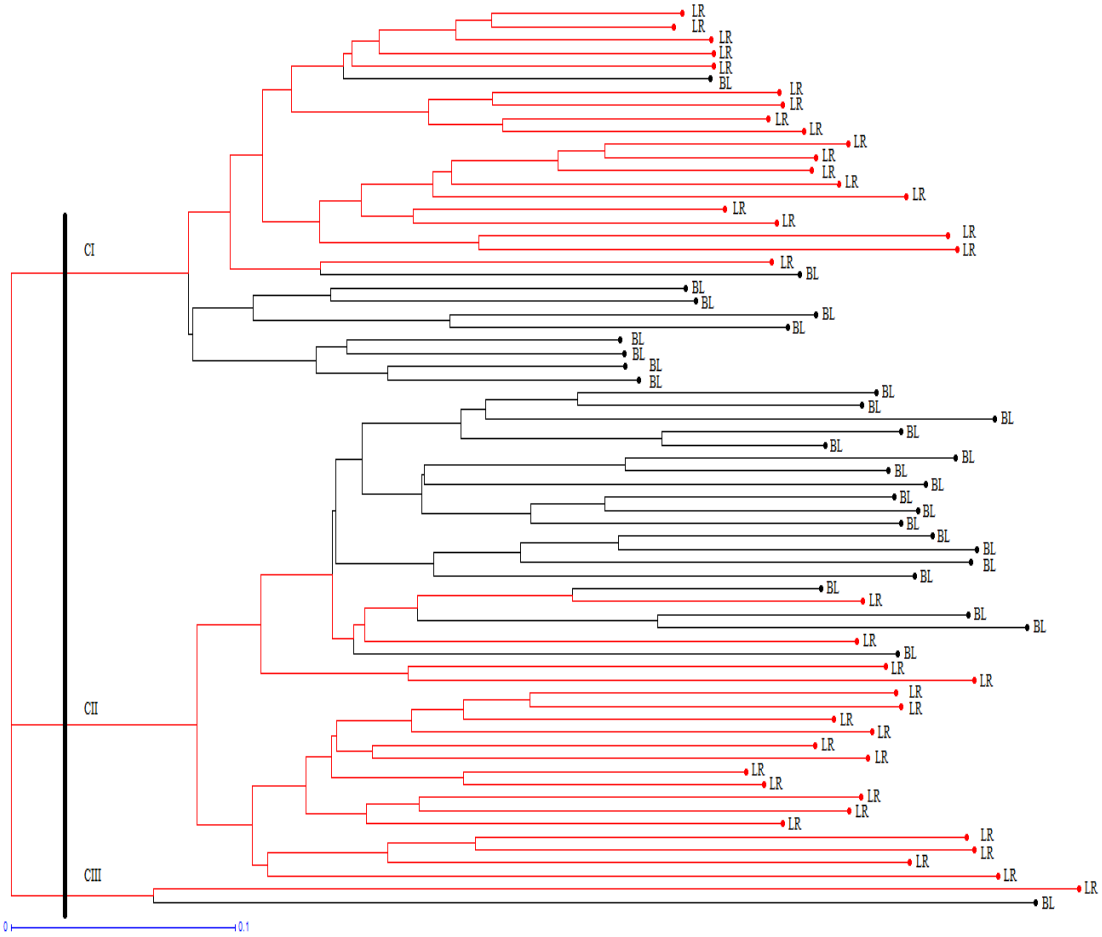
جدول ٤- پارامترهای تنوع ژنتیکی برآورد شده در جمعیت‌های گندم دوروم بر اساس آغازگرهای ISSR

Table 4. Estimated genetic variation parameters for different durum wheat populations using ISSR primers

گونه Species	Na	Ne	I	He	PPL
توده‌های بومی Landraces	1.68 ± 0.06	1.33 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.20 ± 0.01	83.73%
لاین‌های اصلاحی Breeding lines	1.39 ± 0.07	1.33 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.20 ± 0.01	69.28%
میانگین Mean	1.53 ± 0.04	1.33 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.20 ± 0.01	76.51%

Na، Ne، I، He و PPL: به‌ترتیب نشان دهنده تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص شانون، شاخص تنوع ژنی نی و درصد مکان-های ژنی چندشکل می‌باشند.

Na, Ne, I, He and PPL: Indicate number of observed alleles, observed number of alleles, Shannon's information index, Nei's gene diversity, and percentage of polymorphic loci, respectively.



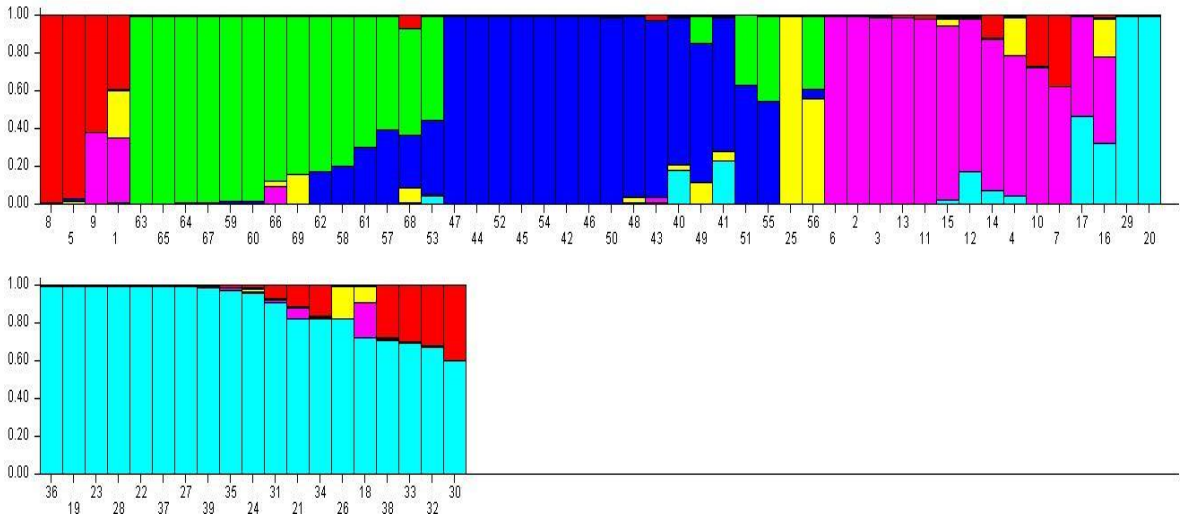
شکل ۱- دندروگرام به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش همسایه نزدیک و ماتریس ضرایب فاصله در ٦٩ ژنوتیپ گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای ISSR

Figure 1. Hierarchical dendrogram created with a neighbor-joining clustering algorithm from the distance coefficient matrix among 69 durum wheat genotypes using ISSR markers

خطوط قرمز و سیاه به‌ترتیب بیانگر توده‌های بومی و لاین‌های اصلاحی هستند.

Red and black lines indicate Iranian landraces and breeding lines, respectively.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.1.7]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.2]



شکل ۲- زیرجمعیت‌های به‌دست آمده از تجزیه ساختار جمعیت در ٦٩ ژنوتیپ گندم دوروم بر اساس نشانگرهای ISSR

Figure 2. Subpopulations obtained using population structure analysis in 69 durum wheat genotypes based on ISSR markers

شماره‌های ذکر شده در محور افقی بیانگر ژنوتیپ‌های بررسی شده می‌باشند.

Numbers in the horizontal axis indicate studied genotypes.

با بررسی حد آستانه ۰/۵ برای قرارگیری هر ژنوتیپ در یک زیرمجموعه، مشخص شد که زیرجمعیت اول شامل سه ژنوتیپ بومی (شماره‌های ۵، ۸ و ۹) بود. ١٤ ژنوتیپ بومی با شماره‌های ٥٣، ٥٧، ٥٨، ٥٩، ٦٠، ٦١، ٦٢، ٦٣، ٦٤، ٦٥، ٦٦، ٦٧، ٦٨ و ٦٩ در زیرجمعیت دوم قرار گرفتند. پانزده ژنوتیپ شامل ۷ ژنوتیپ بومی (شماره‌های ٤٩، ٥٠، ٥١، ٥٢، ٥٤ و ٥٥) به‌همراه هشت لاین اصلاحی (شماره‌های ٤٠، ٤١، ٤٢، ٤٣، ٤٤، ٤٥، ٤٦، ٤٧ و ٤٨) زیرجمعیت سوم را تشکیل دادند. دو ژنوتیپ شماره ٢٥ (لاین اصلاحی) و ٥٦ (ژنوتیپ بومی) در زیرجمعیت چهارم قرار گرفتند. لاین‌های اصلاحی شماره ۲، ۳، ٤، ٦، ۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ١٤ و ١٥ به‌عنوان زیرجمعیت پنجم از سایر ژنوتیپ‌ها متمایز شدند. زیرجمعیت ششم نیز شامل مابقی لاین‌های اصلاحی بود (شماره‌های ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ٢٤، ٢٦، ٢٧، ٢٨، ٢٩، ٣٠، ٣١، ٣٢، ٣٣، ٣٤، ٣٥، ٣٦، ٣٧، ٣٨ و ٣٩).

نتایج به‌دست آمده نشان داد آغازگرهای ISSR استفاده شده در این مطالعه، تنوع ژنتیکی بالایی را در درون جمعیت‌های بومی گندم دوروم آشکار کرد؛ بنابراین مشخص شد که تنوع آللی کافی در مجموعه مورد ارزیابی وجود دارد که امکان غربال ژنوتیپ‌ها از نظر صفات زراعی و کیفی مختلف در شرایط محیطی را فراهم می‌آورد. از این‌رو این مجموعه می‌تواند به‌عنوان یک منبع ژنی ارزشمند جهت گزینش لاین‌های والدینی در برنامه‌های اصلاحی گندم دوروم مورد استفاده قرار گیرند.

References

Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, **36:** 181-186.

Anonymous. (2018). *Word wheat Production-North Dakota Wheat Commission*. Access in: www.ndwheat.com/uploads/resources/546/world-web-charts.pdf

Collard, B.C.Y. and Mackill, D. (2008). Marker-assisted selection**:** an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **363:** 557-572.

De Ponti, O. (2010). Germplasm Exploitation and Ownership**:** Who owns what? 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources, Bologna, Italy.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19:** 11-15.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.1.7]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.2]

Earl, D.A. and Holdt, B.M. (2012). Structure Harvester**:** a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resource*, **4:** 359-361.

Eghlima, G., Kheiry, A., Sanikhani, M., Hadian, J. and Aelaei, M. (2021). Study of genetic diversity of glycyrrizha glabra L. populations using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **8(1):** 81–94 (In Persian).

Etminan, A., Pour-Aboughadareh, A., Mohammadi, R., Ahmadi-Rad, A.A., Moradi, Z. and Noori, A. (2017). Evaluation of genetic diversity in a mini core collection of Iranian durum wheat germplasms. *Journal of Animal and Plant Science*, **19:** 943-956.

Etminan, A., Pour-Aboughadareh, A., Mohammadi, R., Ahmadi-Rad, A., Noori, A., Mahdavian, Z. and Moradi, Z. (2016). Applicability of start codon targeted (SCoT) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic diversity analysis in durum wheat genotypes. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, **30:** 1075-1081.

Fbriani, G. and Lintas, C. (1988). *Durum wheat: Chemistry and Technology*. American Association Cereal Chemist, Saint Paul, Minnesota, USA.

Garrido-Cardenas, J.A., Mesa-Valle, C. and Manzano-Agugliaro, F. (2018). Trends in plant research using molecular markers. *Planta*, **247(3):** 543-557.

Liu, B. and Wendel, J. (2001). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, **1:** 205-208.

Mardi, M., Naghavi, M.R., Pirseyedi, S.M., Kazemi Alamooti, M., Rashidi Monfared, S., Ahkami, A.H., Omidbakhsh, M.A., Alavi, N.S., Salehi Shanjani, P. and Katsiotis, A. (2011). Comparative assessment of SSAP, AFLP and SSR markers for evaluation of genetic diversity of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Journal of Agricultural Science and Technology*, **13:** 905-920.

Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Jury, S.L., Kell, S.P. and Scholten, M.A. (2006). Towards a definition of a crop wild relative. *Biodiversity and Conservation*, **15:** 2673-2685.

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.

Pour-Aboughadareh, A., Ahmadi, J., Mehrabi, A.A., Etminan, A. and Moghaddam, M. (2018). Insight into the genetic variability analysis and relationships among some *Aegilops* and *Triticum* species, as genome progenitors of bread wheat, using SCoT markers. *Plant Biosystem*, **152(4):** 694-703.

Pour-Aboughadareh, A., Mahmoudi, M., Moghaddam, M., Ahmadi, J., Mehrabi, A.A. and Alavikia, S.S. (2017). Agro-morphological and molecular variability in *Triticum boeoticum* accessions from Zagros Mountains, Iran. *Genetics Resource and Crop Evolution*, **64:** 545-556.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2:** 225-238.

Prevost, A. and Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, **98:** 107-112.

Rashidimonfared, S., Hosseinzadeh, A., Mardi, M., Naghavi, M. and Pirseyedi, S. (2008). Evaluation of diversity in durum wheat using retrotransposon markers SSAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism). *Water and Soil Science*, **12(45):** 147-155.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5**:** molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*, **28:** 2731-2739.

Varshney, R.K., Chabane, K., Hendre, P.S., Ramesh, K., Aggarwal, K. and Graner, A. (2007). Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science*, **173:** 638-649.

Weide, A., Rieh, S., Zeidi, M. and Conard, N.J. (2013). Using new morphological criteria to identify domesticated emmer wheat at the aceramic neolithic site of Chogha Golan (Iran). *Journal of Archaeological Science*, **57:** 109-118.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20:** 176-183.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.1.7]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.2]

Evaluation of Population Structure and Estimation of Genetic Parameters in Breeding Lines and Landraces Populations of Durum Wheat Using ISSR Markers

Mahmood Aslanparviz[1], Varahram Rashidi[2], Mansour Omidi[3,*], Alireza Etminan[4] and Alireza Ahmadzadeh[5]

1- Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4- Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
5- Assistance Professor, Department of Agriculture, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

(Received: June 2, 2021 - Accepted: February 28, 2022)

Abstract

Evaluation of genetic diversity is the key principal for plant breeding, providing an opportunity to discover novel characters and alleles for breeders. In the present study, 69 durum wheat genotypes were investigated for genetic diversity using several inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Sixteen ISSR primers amplified a total of 163 fragments, which out 160 fragments were polymorphic. The mean values of polymorphic information content (PIC), resolving power (Rp) and marker index (MI) indicated that the used ISSR primers could be exploited for further assessing relationships among investigated genotypes and population structure analysis. The results of the molecular analysis of variance showed that the genetic variation within populations is more than between them. Based on genetic variation parameters, the highest number of observed alleles (Na), Shannon's information index (I) and the percentage of polymorphic loci (PPL) were found in Iranian landraces. Cluster analysis and population structure grouped all investigated genotypes into three main clusters and six subpopulations, respectively. In conclusion, our results revealed the high rate of genetic diversity within Iranian landraces, so this germplasm can be used as a valuable gene source for the selection of parent lines and use of them in durum wheat breeding programs.

Keywords: Cluster analysis, Population structure, Durum wheat, Molecular markers

* **Corresponding Author, E-mail: momidi@ut.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.1.7]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.2]