

بررسی ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گندم نیای وحشی *Aegilops cylindrica* با استفاده از لوکوس‌های بین ریزماهواره ژنومی

سمیرا محمدی^۱، علی اشرف مهربانی^{۱*}، علی آرمینیان^۲ و آرشد فاضلی^۲

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۸)

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۳۵ جمعیت *Aegilops cylindrica* با استفاده از ۱۷ آغازگر ISSR، در مجموع ۱۹۰ آلل تکثیر شدند که از این تعداد، ۱۸۸ آلل (۹۸/۹۵ درصد)، به‌عنوان آلل چندشکل تشخیص داده شدند. تعداد آلل‌های تکثیر شده از ۶ تا ۲۰ با میانگین ۱۱/۱۸ آلل متغیر بود. محتوای اطلاعات چندشکلی از ۰/۱۰ در آغازگر UBC841 تا ۰/۳۵ برای آغازگر UBC836 متفاوت بود. همچنین شاخص نشانگر از ۰/۶ برای آغازگر UBC841 تا ۶ برای آغازگر ۱۵ متفاوت بود. روش‌های گروه‌بندی خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی نتوانست جمعیت‌ها را به‌طور کامل از هم تفکیک کند و عدم ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان داد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای این جمعیت‌ها می‌باشد. در مجموع جمعیت‌های غرب و جنوب غرب کشور، تنوع بیشتری نسبت به جمعیت‌های شمال و شمال غرب کشور نشان دادند، بنابراین مرکز تنوع و پیدایش گونه *Ae. cylindrica* احتمالاً غرب و جنوب غرب کشور بوده و از این مناطق به سمت شمال کشور انتقال یافته‌اند. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ISSR ابزار مفیدی برای مدیریت منابع ژنتیکی خویشاوندان وحشی گندم می‌باشد.

واژگان کلیدی: *Aegilops cylindrica*، تجزیه به مختصات اصلی، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: a.mehrabani@mail.ilam.ac.ir

مقدمه

گونه *Aegilops cylindrica* Host گیاهی یک‌ساله، خودگشن و متعلق به خانواده Poaceae و طایفه Triticeae می‌باشد. این گونه آلوتتراپلوئید ($2n = 4x = 28$) با ژنوم CCDD است که با دورگ‌گیری بین گونه‌های دیپلوئید *Ae. tauschii* ($2n = 2x = 14$) با ژنوم DD و *Ae. caudata* ($2n = 2x = 14$) با ژنوم CC به وجود آمده است (Jaaska, 1976; Johnson, 1981). مرکز تنوع این گونه در هلال حاصلخیز و آسیای مرکزی بوده و در بیشتر نواحی ایران یافت می‌گردد (Van Slageren, 1994). این گونه به دلایل مختلفی در سراسر جهان اهمیت اقتصادی دارد، از جمله این که یک علف هرز شایع در مزارع گندم نان است و به‌طور وسیعی در مزارع ایالات متحده آمریکا، خاورمیانه و بخش‌هایی از اروپا گسترش می‌یابد (Gandhi et al., 2005). دورگ‌گیری طبیعی بین این گونه و گندم نشان‌دهنده پتانسیل برای جریان ژن بین این گونه و گندم تحت شرایط مزرعه می‌باشد (Gandhi et al., 2009; Gandhi et al., 2005). این گونه همچنین به‌عنوان یک منبع از صفات مفید مانند تحمل به شوری (Farooq et al., 1992)، مقاومت به مگس گندم (El Bouhssini et al., 1998) و متحمل به سرما (Iriki et al., 2001) شناخته شده است. برای اصلاح گندم بررسی تنوع ژنتیکی در خویشاوندان وحشی آن امری ضروری می‌باشد. تنوع ژنتیکی در گونه *Ae. cylindrica* با استفاده از نشانگرهای RAPD (Farkhari et al., 2007; Goryunova et al., 2004)، ترکیب نشانگرهای RAPD و AFLP (Pester et al., 2003)، نشانگرهای ریزماهواره کلروپلاست و هسته‌ای (Gandhi et al., 2009)، تنوع آلوزایم‌ها (Watanabe et al., 1994) و پروتئین‌های ذخیره‌ای (Khabiri et al., 2012; Khabiri et al., 2013) مورد بررسی قرار گرفته است. یکی از نشانگرهایی که در مطالعات تنوع ژنتیکی موجودات زنده و گیاهان کاربرد دارد، نشانگر ISSR است، ISSR نشانگری مبتنی بر PCR است که قطعه DNA

موجود و قابل تکثیر بین دو ریز ماهواره را که در جهت مخالف هم قرار دارند را تکثیر می‌کند. این تکنیک به طراحی آغازگر نیاز ندارد و میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تری نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی دارد (Terzopoulos and Bebeli, 2008). این نشانگرها در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نشان‌دار کردن ژنی، نقشه‌یابی ژنومی و زیست‌شناسی تکاملی به‌کار می‌روند (Reddy et al., 2002). جم باراندوزی و همکاران (Jam Baranduzi et al., 2013)، برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۶ توده از ۶ گونه آژیلوپس شامل *Ae. tauschii*، *Ae. triuncialis*، *Ae. umbellulata*، *Ae. cylindrica* و *Ae. crassa* از ۱۷ آغازگر ISSR استفاده کردند، در نهایت ۱۳۷۶ باند تکثیر شد که ۱۷۱ باند از آن‌ها چندشکل بودند. فرخاری و همکاران (Farkhari et al., 2007) با مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۸ جمعیت *Ae. cylindrica* ایران با استفاده از ۱۴ آغازگر RAPD دریافتند که ارتباطی بین تنوع ژنتیکی و منشأ جغرافیایی آن‌ها وجود ندارد. مرادخانی و همکاران (Moradkhani et al., 2012)، نیز با ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ از ۵ گونه گندم زراعی و وحشی *Ae. crassa*، *Ae. cylindrica*، *A. tauschii* و *speltoides* و *Triticum aestivum* با ۱۰ آغازگر ISSR، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در درون گونه‌ها مشاهده کردند. نقوی و همکاران (Naghavi et al., 2009)، ۲۱ جفت آغازگر ریزماهواره را برای بررسی روابط ژنتیکی بین ۵۲ نمونه از چهار گونه *Ae. tauschii*، *Ae. cylindrica*، *Ae. crassa* و *T. aestivum* به‌کار بردند. نتایج نشان داد که در میان چهار گونه مورد بررسی، تنوع ژنتیکی در گونه‌های *Ae. cylindrica* و *T. aestivum* بسیار کمتر بود.

به‌طورکلی اهداف اصلی این تحقیق عبارت بودند از:

۱. شناخت ارتباط ژنتیکی و قرابت بین و درون توده‌های *Ae. cylindrica*، گروه‌بندی آن‌ها و تشکیل یک درخت‌واره

نانوگرم)، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۸ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs ۱ میلی‌مولار، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۵ واحد) و در نهایت با ۱۲/۸ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) با برنامه زمانی ۴ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱۰ چرخه اولیه به صورت Touchdown (به طوری که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۵ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و به ازای هر چرخه، ۰/۵ درجه از دمای اتصال کاهش یافته تا به دمای اتصال واقعی برسد) و ۲۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای توصیه شده برای هر آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه (جهت اتصال آغازگرها) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط انجام گردید و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر 1x TAE، تفکیک و جهت رنگ‌آمیزی ژل از محلول اتیدیوم بروماید استفاده شد. برای تعیین اندازه قطعات تکثیری از سایز مارکر ۱۰۰ bp استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: باندهای حاصل از تکثیر جمعیت‌ها با استفاده از هر آغازگر به‌عنوان داده‌های اولیه با اعداد یک (برای وجود باند) و صفر (برای عدم وجود باند) امتیازدهی شدند. میزان اطلاعات چندشکل (PIC^3) فرمول $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$ محاسبه گردید که در آن P_{ij} بیانگر فراوانی آلل زام برای نشانگر نام است. همچنین میزان شاخص نشانگر (MI^4) با استفاده از فرمول $MI = PIC \times N \times \beta$ (Powell et al., 1996; Anderson et al., 1993). به طوری که PIC میانگین میزان اطلاعات چندشکلی برای هر آغازگر، N

بر اساس انگشت‌نگاری ژنومی حاصل از نشانگرهای ISSR. ۲. مطالعه میزان تنوع و تفرق ژنتیکی جمعیت‌های شناسایی شده به منظور مدیریت بهتر ژرم‌پلاسم موجود و استفاده بهینه از آن در برنامه‌های به‌نژادی. ۳. استفاده از اطلاعات به‌دست آمده در برنامه‌ریزی حفاظت ژرم‌پلاسم و ایجاد کلکسیون از جمعیت‌های *Ae. cylindrica* جهت کارهای اصلاحی. ۴. بررسی ارتباط جغرافیایی پراکنش توده‌های *Ae. cylindrica* با اطلاعات مولکولی

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق از ۳۵ جمعیت *Ae. cylindrica* استفاده شد که از ۱۱ استان شامل گیلان، اردبیل، آذربایجان شرقی، زنجان، کردستان، همدان، کرمانشاه، لرستان، چهارمحال و بختیاری، خوزستان و فارس که توسط بانک ژن غلات و حبوبات غرب کشور واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام جمع‌آوری شده بود (جدول ۱).

استخراج DNA ژنومی: DNA ژنومی به صورت بالک از بافت برگ گیاهچه‌های دو تا سه برگی رشد یافته در گلدان (۷ گیاهچه از هر جمعیت)، به روش $CTAB^1$ براساس دستورالعمل دوایل و دوایل (Doyle and Doyle, 1987) با اندکی تغییرات استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA نمونه‌ها با استفاده از روش الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر 1x TAE² و نیز روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید و DNA نمونه‌ها تا حد ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد.

مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ۴۵ آغازگر ISSR آزمایش شد که از بین آن‌ها ۱۷ آغازگر (جدول ۲) که دارای چندشکلی بودند، انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر DNA ژنومی (غلظت ۱۰۰

3. Polymorphic Information Content
4. Marker Index

1. Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide
2. Tris Acetate EDTA

جدول ۱- جمعیت‌های *Aegilops cylindrica* مورد استفاده در این تحقیق

Tab 1. List of *Aegilops cylindrica* populations used in this study

ردیف کد	Collection sites	محل جمع‌آوری	ردیف کد	Collection sites	محل جمع‌آوری
Row Code			Row Code		
1	AC1	-	19	AC19	Lorestan-Nourabad
					لرستان- نورآباد-روستای ده سفید
2	AC2	-	20	AC20	-
					-
3	AC3	Ardebil-sareyn	21	AC21	-
		جاده اردبیل- سرعین - ۱۵ کیلومتری سرعین			-
4	AC4	Kurdestan-Sanandaj	22	AC22	Kermanshah-Javanroud
		کردستان- ۲۰ کیلومتری دیواندره به سمت سنندج			جاده کرمانشاه-جوانرود-بعد از پلیس راه
5	AC5	Iran-Unknow	23	AC23	-
		ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)			-
6	AC6	Khuzestan-Izeh	24	AC24	Kermanshah-Harsin
		خوزستان- ناغان- ایذه			کرمانشاه- هرسین- نزدیک روستای چغاسعید
7	AC7	Azarbayejan-Kaleybar	25	AC25	Azarbayejan-Kaleybar
		آذربایجان شرقی- ۱۰ کیلومتری اهر- کلبر			آذربایجان شرقی- ۱۰ کیلومتری جاده اهر- کلبر
8	AC8	Lorestan-Sepiddasht	26	AC26	Hamedan-Hamedan
		سپیددشت- ۵۵ کیلومتر تا سپیددشت			همدان- جاده اسدآباد- همدان
9	AC9	Tehran-Tehran	27	AC27	Guilan-Astara
		ورودی جاده زنجان- تهران			گیلان- آستارا- روستای حیران
10	AC10	Kurdestan-Saghez	28	AC28	Chaharmahale Bakhtiari-Shahrekord
		کردستان- بعد از زرینه به سمت سقز			چهارمحال و بختیاری- حومه شهرکرد
11	AC11	Lorestan-Dorud	29	AC29	Kermanshah-Harsin
		لرستان- جاده الیگودرز- دورود- ۴۵ تا دورود			کرمانشاه- هرسین
12	AC12	Azarbayejan-Miandoab	30	AC30	Lorestan-Sepiddasht
		آذربایجان شرقی- جاده ملکان- میاندوآب			لرستان- ۳۰ کیلومتری خرم آباد- سپیددشت
13	AC13	Azarbayejan-Tabriz	31	AC31	Kermanshah-Songhor
		آذربایجان شرقی- کیلومتر ۶۰ اهر- تبریز			کرمانشاه- سنقر- اسد آباد- روستای یاسر
14	AC14	Kermanshah-Kermanshah	32	AC32	Tehran-Tehran
		کرمانشاه- جاده هرسین- کرمانشاه			ورودی جاده زنجان- تهران
15	AC15	Fars-Shiraz	33	AC33	Azarbayejan-Bonab
		فارس- بردج شیراز			آذربایجان شرقی- جاده آذر شهر- بناب
16	AC16	Kurdestan-Kamyaran	34	AC34	Lorestan-Sepiddasht
		کردستان- ۵ کیلومتری کامیاران			لرستان- جاده خرم آباد- سپیددشت- ۵۵ کیلومتر تا سپیددشت
17	AC17	Lorestan-Veysian	35	AC35	Guilan-Astara
		جاده خرم آباد- اندیمشک- روستای ویسیان			گیلان- جاده صومعه سرا- آستارا
18	AC18	Kermanshah-Javanrud			
		کرمانشاه- دوراهی جوانرود			

نمونه های شماره ۸ و ۳۴ از لحاظ مورفوتیپ و رنگ خوشه کاملاً از هم متمایز بودند.

The samples No. 8 and 34 are entirely different with respect to morphotype and spike color.

همکاران (Farkhari *et al.*, 2007) با استفاده از ۱۴ آغازگر RAPD، درصد چندشکلی ۶۹ درصد گزارش شد. تعداد آلل‌ها در تحقیق حاضر، از ۶ تا ۲۰ متغیر بود و میانگین آلل‌های تولید شده، ۱۱/۱۸ برای هر آغازگر بود. در بین این آغازگرها، آغازگر ۱۵ با ۲۰ آلل و سپس آغازگر ۱۴۴ با ۱۸ آلل، بیشترین آلل را در میان آلل‌های تولیدی توسط هر آغازگر داشتند. آغازگر UBC823 نیز با ۶ آلل کمترین تعداد آلل را به خود اختصاص داد (جدول ۲).

نجفی و همکاران (Najaphy *et al.*, 2011) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم تعداد آلل‌ها را ۵ تا ۲۰ و میانگین ۸/۶ آلل برای هر آغازگر ISSR به دست آوردند. محدوده قطعات تولید شده در تحقیق حاضر، از ۲۰۰ جفت باز (آغازگر UBC836) تا ۲۵۰۰ جفت باز (آغازگر UBC815) متغیر بود (جدول ۲).

محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر: محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر هر آغازگر، به طور جداگانه محاسبه گردید که نتایج در جدول ۲ آمده است. آغازگر UBC836 بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۳۵) و آغازگر ۱۵ بیشترین شاخص نشانگر (۶) را نشان دادند. کمترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۱۰) و شاخص نشانگر (۰/۶) برای آغازگر UBC841 به دست آمد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۲۳) و میانگین شاخص نشانگر (۲/۷۱) محاسبه شد. توماس و بیلی (Thomas and Bebeli, 2010) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های آزیلپوس میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی را ۰/۲۲ و میانگین شاخص نشانگر را ۳/۷۱ گزارش کردند.

با توجه به نتایج به دست آمده، آغازگر ۱۵ و آغازگر ۱۴۴ با داشتن بیشترین شاخص نشانگر، قدرت تفکیک بالاتری در مقایسه با سایر آغازگرها دارند، بنابراین

تعداد کل باندها برای هر آغازگر و β نسبت چندشکلی برای هر آغازگر می‌باشد. شاخص MI علاوه بر مزایای شاخص PIC، تعداد کل نوار و نسبت چندشکلی را نیز در نظر گرفته و پتانسیل هر آغازگر را جهت تولید آلل بیشتر نشان می‌دهد. شاخص‌های عدم تشابه همراه با روش‌های اتصال میانگین ($UPGMA^1$) و اتصال مجاور (NJ^2) با استفاده از نرم‌افزار، DARwin 5.0 (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006) محاسبه و با استفاده از نرم‌افزار XLSTAT مقایسه شدند. با روش تجزیه به مختصات اصلی ($PCoA^3$) با استفاده از نرم‌افزار DARwin 5.0 گروه‌بندی جمعیت‌ها در یک نمودار سه بعدی ترسیم شده با نرم‌افزار Minitab 16 (Barbara *et al.*, 2012) مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه به مختصات اصلی گروه‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار GenALEx 6.41 (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه گردید و نمودار سه بعدی گروه‌ها با نرم‌افزار Minitab 16 ترسیم شد. از نرم‌افزار MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) برای تجزیه خوشه‌ای و محاسبه فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌ها استفاده گردید و سپس با استفاده از نرم‌افزار GenALEx 6.41، فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، درصد آلل‌های چندشکل، شاخص تصحیح شده هتروژنی و شاخص اطلاعات شانون محاسبه و تجزیه واریانس مولکولی نیز انجام گرفت.

نتایج و بحث

محاسبه چندشکلی: با استفاده از ۱۷ آغازگر به کار رفته در مجموع ۱۹۰ باند (آلل) تکثیر شد که از این تعداد ۱۸۸ آلل، به عبارت دیگر ۹۸/۹۵ درصد آلل‌ها به عنوان آلل چندشکل تشخیص داده شدند. در مطالعه فرخاری و

1. Unweighted Paired Group Method using Arithmetic average
2. Neighbor Joining
3. Principal Coordinates Analysis

می‌توان استفاده از این آغازگرها را برای بررسی تنوع ژنتیکی سایر گونه‌های آزیلوپس و گندم با ژنوم نزدیک به *Ae. cylindrica* در اولویت قرار داد.

محاسبه ضرایب همبستگی کوفتیک: در این تحقیق برای مشخص کردن بهترین شاخص عدم تشابه و تشخیص بهترین الگوریتم برای ترسیم مناسب‌ترین دندروگرام برای گزارش نتایج، همه شاخص‌های عدم تشابه شامل دایس^۱، جاکارد^۲، اوشیایی^۳ و سوکال^۴ با روش‌های اتصال میانگین (UPGMA) و اتصال مجاور (NJ) محاسبه و بر اساس ضرایب کوفتیک حاصل از آزمون مانتل^۵ مقایسه شدند. ضرایب همبستگی بسیار بالا و معنی‌دار (جدول ۳) نشان‌دهنده تطابق ماتریس‌های به‌دست آمده از این چهار شاخص است. از این رو به‌هنگام استفاده از تعداد زیاد نشانگر، نتایج حاصل از هر کدام از این روش‌ها مشابه خواهد بود. تشابه شاخص‌های دایس و جاکارد در مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی گندم‌های وحشی قبلاً نیز گزارش شده است (Kharestani, 2010; Shiri, 2009).

به‌دلیل گزارشات متعدد و عمومیت بیشتر شاخص دایس، از این شاخص در محاسبه فواصل ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها استفاده گردید. با توجه به نتایج به‌دست آمده، بین دو الگوریتم UPGMA و NJ، الگوریتم NJ در آزمون مانتل ضریب کوفتیک بالاتری نشان داد، در نتیجه در گزارش نتایج از این روش استفاده شد.

تجزیه خوشه‌ای: برای بررسی میزان شباهت بین جمعیت‌های مختلف و گروه‌بندی آن‌ها، با استفاده از داده‌های حاصل از ماتریس عدم تشابه دایس و الگوریتم NJ، دندروگرام جمعیت‌های مختلف ترسیم شد. دندروگرام به‌دست آمده (شکل ۱)، جمعیت‌ها را در دو گروه عمده و زیرگروه‌های متعددی قرار داد. به‌طوری‌که در گروه اول ۳۱ جمعیت از استان‌های خوزستان،

آذربایجان شرقی، کردستان، لرستان، زنجان، اردبیل، کرمانشاه، گیلان، همدان، چهارمحال و بختیاری، و در گروه دوم نیز ۴ جمعیت از استان‌های کردستان، فارس، لرستان و کرمانشاه قرار گرفت. نتایج حاصل از این دندروگرام، عدم ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان می‌دهد، به طوری‌که جمعیت‌های جمع‌آوری شده در یک استان یا شهر در گروه‌ها یا زیرگروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی بالای این جمعیت‌ها می‌باشد. از طرف دیگر بسیاری از جمعیت‌هایی که در یک گروه قرار گرفته‌اند از مناطق جغرافیایی متفاوت هستند که این مورد دلیل تشابه ژنتیکی گسترده این جمعیت‌ها در مناطق مختلف کشور می‌باشد. این نتایج با مطالعات دیگر آزیلوپس‌ها با نشانگرهای مولکولی همخوانی دارد (Haji Karam et al., 2011; Ranjbar et al., 2008; Farkhari et al., 2007).

در تحقیق حاضر، جمعیت ناشناخته با کد AC۵ با جمعیت AC۶ (ناغان-ایذه) در یک خوشه قرار گرفته‌اند، بنابراین می‌توان احتمال داد که این جمعیت ناشناخته با کد AC۵ به جمعیت AC۶ نزدیک است. جمعیت‌های ناشناخته با کدهای AC۱ و AC۲ با جمعیت AC۳ (سرعین اردبیل) در یک خوشه قرار گرفته، بنابراین این جمعیت‌ها به هم نزدیک هستند. جمعیت‌های ناشناخته با کدهای AC۲۰، AC۲۱ و AC۲۳ نیز به جمعیت‌های AC۱۹ و AC۲۲ (لرستان و کرمانشاه) نزدیک می‌باشند.

تجزیه به مختصات اصلی جمعیت‌ها: اطلاعات حاصل از آلل‌های نمره‌دهی شده با روش تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) مورد بررسی تکمیلی قرار گرفت (شکل ۲). نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نشان می‌دهد که بعد اول، دوم و سوم به‌ترتیب ۲۹/۵۲، ۱۷/۹۳ و ۱۱/۷۸ مجموعاً ۵۹/۲۳ درصد از اطلاعات را در بر داشتند و این به نوبه خود می‌تواند نشان‌دهنده پراکنش گسترده آغازگرهای مختلف بر روی سطح ژنوم

1. Dice
2. Jaccard
3. Ochiai
4. Sokal
5. Montel test

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده به همراه محتوی اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر آنها

Table 2. Primer characteristics used in this study, polymorphic information contents and marker index

اندازه قطعات تکثیری (جفت باز)	MI	PIC	درصد چندشکلی	چندشکلی تعداد آلل‌های	تعداد آلل‌ها	دمای اتصال	توالی آغازگر	نام آغازگر
Amplified fragment length (bp)			Percentage of polymorphism	No. Allelepolymorphic alleles	Allele No.	(°C) Annealing Tm (°C)	5'→3' Primer sequence	Primer name
330-800	1.5	0.2	100	7	7	50	(GA)8A	UBC812
350-2500	2.2	0.3	100	7	7	52	(CT)8G	UBC815
400-900	0.7	0.1	100	6	6	52	(TC)8C	UBC823
200-980	4.9	0.4	100	14	14	53	(AG)7ACYA	UBC836
350-1300	2.8	0.2	100	12	12	53	(GA)8YT	UBC840
250-1000	0.6	0.1	85.7	6	7	55	(GA)8YC	UBC841
200-900	3.2	0.3	100	12	12	55	(GA)8YG	UBC842
320-2000	2.9	0.2	100	12	12	53	(TC)8RT	UBC853
600-1500	1.8	0.2	100	10	10	52	(AC)8C	ISSR04
280-1200	1.4	0.1	91.7	11	12	50	(GA)8T	ISSR08
470-2000	2.2	0.2	100	11	11	52	(AC)8G	ISSR10
520-2000	2.2	0.3	100	8	8	52	(TCC)5	ISSR15
430-1300	3.6	0.3	100	12	12	52	(CA)8G	ISSR17
450-2000	3.3	0.2	100	15	15	52	(AC)8AT	12
300-1700	6	0.3	100	20	20	54	(AC)8TG	15
330-800	1.1	0.2	100	7	7	52	(AG)8AA	134
300-2000	5.6	0.3	100	18	18	54	(AC)8G	144

Y = (C / T), R = (A / G)

جدول ۳- ضرایب همبستگی کوفنتیک

Table 3. Cophenetic correlation coefficients

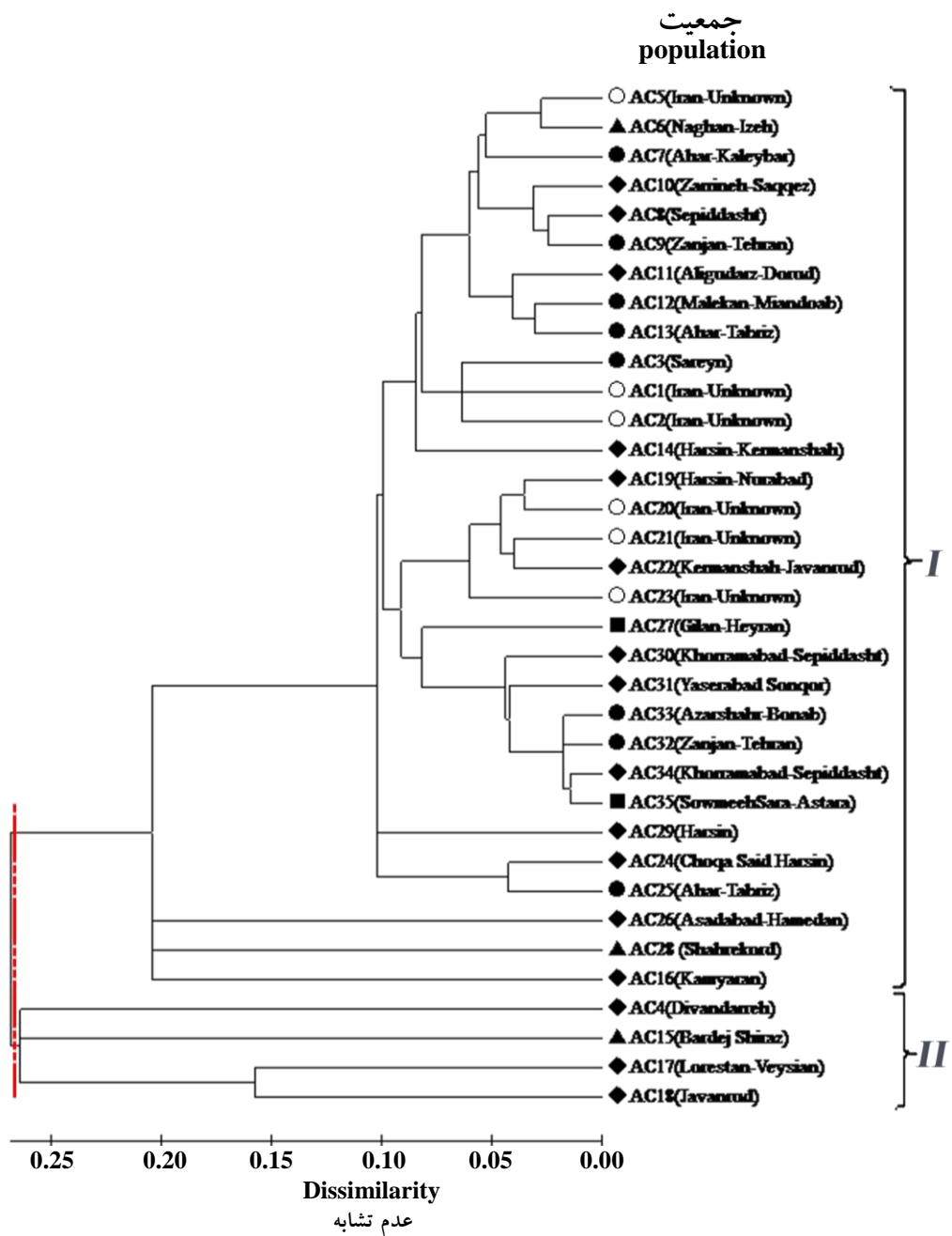
الگوریتم ترسیم دندروگرام (Clustering algorithms)

تابع محاسبه ماتریس فاصله	UPGMA	NJ
Computable function of distance matrix		
Dice	0.966 ***	0.987 ***
Jaccard	0.973 ***	0.987 ***
Ochiai	0.966 ***	0.987 ***
Sokal	0.974 ***	0.984 ***

$r_{Dice-Jaccard} = 0.995$ ***

***: Significant at 0.001 probability level.

***: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۰۱.



شکل ۱- گروه‌بندی جمعیت‌های *Ae. cylindrica* با استفاده از روش دایس و الگوریتم NJ
Figure 1. Grouping of *Ae. cylindrica* populations using Dice coefficient and NJ algorithm

کلی شمال با ۲ جمعیت، شمال غرب با ۸ جمعیت، جنوب غرب با ۳ جمعیت، غرب با ۱۶ جمعیت و گروهی شامل ۶ جمعیت با منشأ ناشناخته تقسیم شدند. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که بعد اول، دوم و سوم به ترتیب ۸۹/۰۳، ۹/۴۸ و ۱/۴۹ مجموعاً ۱۰۰ درصد از اطلاعات را در بر داشتند. بر اساس این نمودار (شکل ۳)

Ae. cylindrica و همه کروموزوم‌های آن باشد. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی تا حدود زیادی با دندروگرام ترسیم شده (شکل ۱)، همخوانی دارند. تجزیه به مختصات اصلی گروه‌ها: به منظور بررسی بهتر و دقیق‌تر اطلاعات مولکولی نشانگر ISSR، ۳۵ جمعیت مورد بررسی براساس محل جمع آوری آن‌ها به پنج گروه

هتروژنی بیشتری نشان داد. کمترین درصد آلل‌های چندشکل (۱۶/۳۲)، شاخص تصحیح شده هتروژنی (۰/۰۹۰) و شاخص شانون (۰/۰۹۹) نیز مربوط به گروه جمعیت‌های شمال کشور بود.

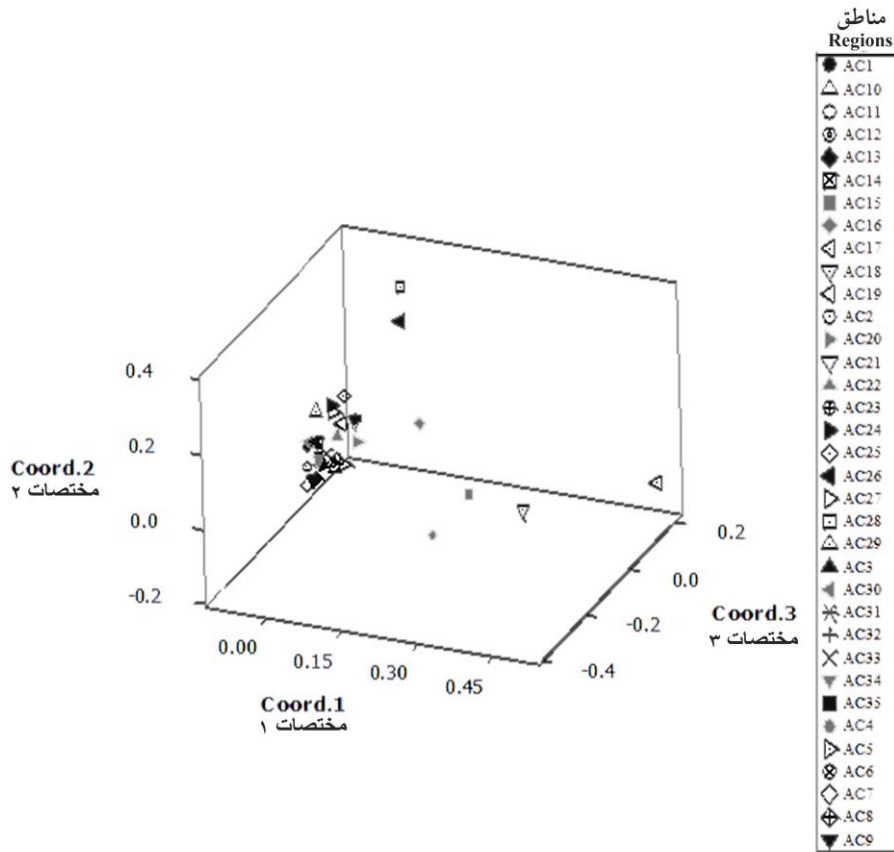
تجزیه واریانس مولکولی: از آنجایی که یکی از مهم‌ترین جنبه‌های تجزیه خوشه‌ای، تعیین تعداد مطلوب خوشه است، به منظور تعیین تعداد مطلوب خوشه و تعیین بهترین نقطه برش دندروگرام، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) درون و بین گروه‌ها صورت گرفت. در تجزیه واریانس مولکولی این امکان نیز وجود دارد تا اجزاء واریانس محاسبه و سهم هر یک از آن‌ها در تنوع کل تعیین شود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۶) نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۱۰٪ بین پنج گروه وجود دارد که طبق این اطلاعات ۹۵ درصد از تنوع کل مربوط به تنوع درون گروهی و فقط ۵ درصد آن مربوط به تنوع بین گروه‌هاست.

به‌طورکلی جمعیت‌های غرب و جنوب غرب کشور تنوع بیشتری نسبت به جمعیت‌های شمال و شمال غرب کشور نشان دادند، بنابراین مرکز تنوع و پیدایش گونه *Ae. cylindrica* احتمالاً غرب و جنوب غرب کشور بوده و این گونه از این مناطق به سمت شمال کشور انتقال یافته‌اند. یکی از اهداف اولیه برای حفظ طبیعت، نگهدارای تنوع ژنتیکی است. برای جمعیت‌های با سطوح بالای تنوع ژنتیکی در مناطق مختلف غرب و جنوب غرب کشور پیشنهاد می‌گردد که رویشگاه‌های آن‌ها حفاظت شده و بهره‌برداری از منابع وحشی ممنوع گردد. جمعیت‌های شمال و شمال غرب کشور نیز بهتر است خارج از محل اصلی نگهداری شوند و به برنامه دقیق و تهیه بانک ژرم پلاسما نیاز دارند.

تنوع موجود در گروه جمعیت‌های ناشناخته به گروه شامل جمعیت‌های شمال غرب نزدیک‌تر است. گروه جمعیت‌های غرب و جنوب غرب نسبت به سایر جمعیت‌ها فاصله کمتری با مرکز محور مختصات داشته و این نشان‌دهنده تنوع آلی و هتروژنی بالای این جمعیت‌ها نسبت به سایر جمعیت‌ها است. جمعیت‌های غرب و شمال غرب نزدیکترین جمعیت‌ها به هم و دورترین جمعیت‌ها شمال و جنوب غرب هستند.

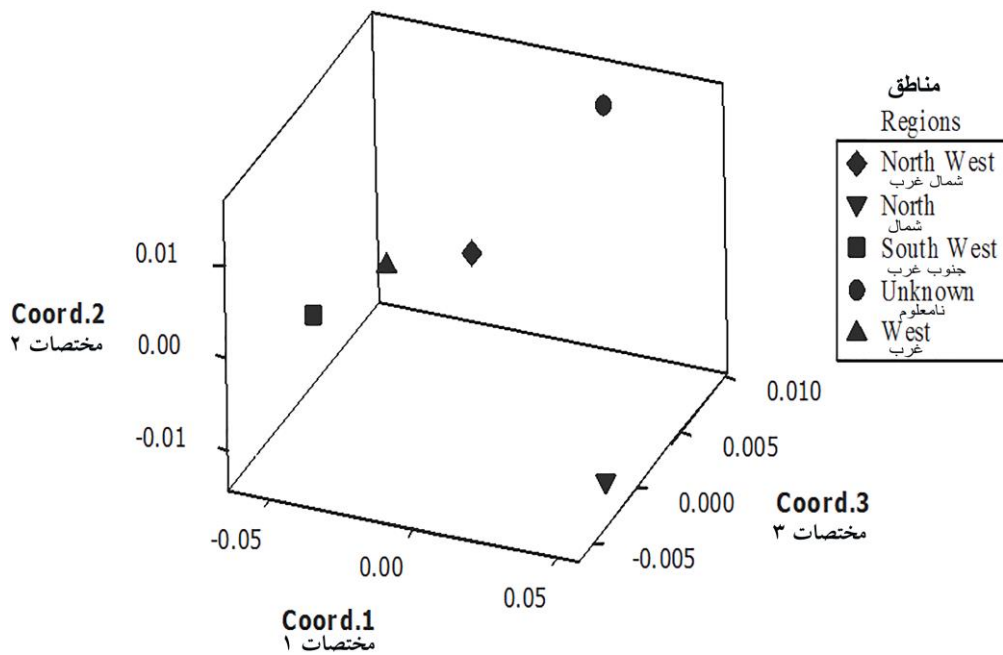
محاسبه فاصله ژنتیکی درون و بین گروه‌ها: برای آگاهی از تنوع ژنتیکی درون و بین گروه‌های مورد بررسی، فواصل ژنتیکی درون گروه‌ها بر اساس ماتریس عدم تشابه دایس و نیز ماتریس فاصله و تشابه بین گروه‌ها از طریق شاخص تصحیح شده Nei، محاسبه شد. بر اساس اطلاعات به‌دست آمده (جدول ۴) فاصله ژنتیکی درون گروه‌ها دامنه‌ای از ۰/۱۶۲ تا ۰/۶۱۲ داشت که کمترین فاصله ژنتیکی درون گروه‌ها (۰/۱۶۲) مربوط به گروه شمال کشور و بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۶۱۲) مربوط به گروه جنوب غرب کشور می‌باشد. بیشترین فاصله ژنتیکی شاخص Nei میان دو گروه شمال و جنوب غرب کشور (۰/۲۳۱) و کم‌ترین فاصله نیز میان گروه با منشأ ناشناخته و گروه شمال غرب کشور (۰/۰۳۰) وجود داشت، به‌عبارت دیگر این دو گروه بیشترین شباهت ژنتیکی را با یکدیگر دارند.

محاسبه شاخص‌های ژنتیکی: میزان آلل‌های چندشکل، شاخص تصحیح شده هتروژنی و شاخص اطلاعات شانون، برای هر گروه و میانگین کل آن‌ها به‌دست آمد (جدول ۵). گروه جمعیت‌های غرب کشور با بالاترین درصد آلل‌های چندشکل (۸۸/۴۲)، شاخص تصحیح شده هتروژنی (۰/۲۹۱) و شاخص شانون (۰/۴۲۴) تنوع آلی و



شکل ۲- نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی جمعیت‌های *Ae. cylindrica* بر روی سه محور مختصات اول، دوم و سوم

Figure 2. Three-dimensional plot based on principal coordinate analysis for *Ae. cylindrica* populations



شکل ۳- نمودار سه بعدی پراکنش گروه‌های مختلف *Ae. cylindrica* بر روی سه محور مختصات اصلی اول، دوم و سوم

Figure 3. Three-dimensional scatter plot of the different groups of *Ae. cylindrica*

جدول ۴- مقادیر فاصله ژنتیکی درون گروه‌ها، فاصله ژنتیکی (پایین قطر) و همسانی ژنتیکی (بالای قطر) بین گروه‌های *Ae.*

Cylindrical

Table 4. The genetic distance between groups of *Ae. Cylindrica*, genetic distance (above the diagonal) and genetic identity (below the diagonal)

گروه	Group	درون گروه‌ها Within groups	بین گروه‌ها (Between groups)				ناشناخته Unknown
			شمال North	شمال غرب Northwest	جنوب غرب Southwest	غرب West	
شمال	North	0.16	***	0.93	0.79	0.88	0.93
شمال غرب	Northwest	0.17	0.07	***	0.86	0.94	0.97
جنوب غرب	Southwest	0.61	0.23	0.15	***	0.97	0.87
غرب	West	0.34	0.12	0.06	0.04	***	0.94
ناشناخته	Unknown	0.18	0.07	0.03	0.15	0.07	***

جدول ۵- محاسبه شاخص‌های ژنتیکی در گروه‌های *Ae. Cylindrical*

Table 5. Estimation of genetic index among *Ae. Cylindrical* groups

گروه	Group	تعداد نمونه No. of samples	درصد آل‌های چندشکل Percentage of polymorphic alleles	شاخص تصحیح شده هتروژنی Modified heterogeneous index	شاخص اطلاعات شانون Shannon information index
شمال	North	2	16.32	0.090±0.015	0.099±0.016
شمال غرب	Northwest	8	41.05	0.145±0.014	0.205±0.020
جنوب غرب	Southwest	3	64.21	0.277±0.016	0.348±0.020
غرب	West	16	88.42	0.291±0.014	0.424±0.018
ناشناخته	Unknown	6	36.84	0.140±0.015	0.193±0.020
میانگین کل / Total mean		35	49.37	0.189±0.007	0.254±0.009

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی پنج گروه *Ae. Cylindrical*

Table 6. Analysis of molecular variance (AMOVA) related to 5 groups of *Ae. Cylindrical*

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی D.f.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	درصد واریانس % of Variance	آماره PhiPT	درصد احتمال (P_Value)
بین گروه‌ها Between groups	4	119.27	29.81	5 %	0.045+	0.09
درون گروه‌ها Within groups	30	694.04	23.13	95 %		
جمع کل Total Sum	34	813.31		100 %		

References

- Anderson, J.A., Church, G.A., Autrique, J.E., Thanksley, S.D. and Sorrells, M.E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, **36**: 181-86.
- Barbara, F.R., Brian, L.J. and Jonathan, D.C. (2012). MINITAB Handbook: Update for Release 16. Web site at URL: <http://www.minitab.com/en>. Accessed 15 Aug 2013.
- 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.
- El Bouhssini, M., Benhabib, O., Nachit, M.N., Houari, A., Bentika, A., Nsarellah, N. and Lhaloui, S. (1998). Identification in *Aegilops* species of resistant sources to Hessian fly (*Diptera: Cecidomyiidae*) in Morocco. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **45**: 343-45.
- Farkhari, M., Naghavi, M.R., Pyghambari, S.A. and Sabokdast, M. (2007). Genetic variation of Jointed Goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host.) from Iran, using RAPD-PCR and SDS-PAGE of Seed Proteins. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **10**: 2868-73.
- Farooq, S., Iqbal, N., Asghar, M. and Shah, T.M. (1992). Intergeneric hybridization for wheat improvement VI. Production of salt tolerant germplasm through crossing wheat (*Triticum aestivum*) with *Aegilops cylindrica* and its significance in practical agriculture. *Journal of Genetics and Plant Breeding*, **46**: 125-32.
- Gandhi, H.T., Vales, M.I., Mallory-Smith, C.A. and Riera-Lizarazu, O. (2009). Genetic structure of *Aegilops cylindrica* Host in its native range and in the United States of America. *Theoretical and Applied Genetics*, **119**: 1013-25.
- Gandhi, H.T., Vales, M.I., Watson, C.J.W., Mallory-Smith, C.A., Mori, N., Rehman, M., Zemetra, R.S. and Riera-Lizarazu, O. (2005). Chloroplast and nuclear microsatellite analysis of *Aegilops cylindrica*. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**: 561-72.
- Goryunova, S.V., Kochieva, E.Z., Chikida, N.N. and Pukhalskyi, V.A. (2004). Phylogenetic relationships and intraspecific variation of D-genome *Aegilops* L. as revealed by RAPD analysis. *Russian Journal of Genetics*, **5**: 515-23.
- Haji Karam, M., Naghavi, M.R., Taleii, A.R. and Aghaii, M.J. (2011). Evaluation of Genetic Diversity of *Aegilops tauschii* from Northern Area of Iran Using SSR Markers. *Iranian Journal of Biology*, **24**: 390-99 (In Persian).
- Iriki, N., Kawakami, A., Takata, K., Kuwabara, T. and Ban, T. (2001). Screening relatives of wheat for snow mold resistance and freezing tolerance. *Euphytica*, **122**: 335-41.
- Jaaska, V. (1981). Aspartate aminotransferase and alcohol dehydrogenase isoenzymes: intraspecific differentiation in *Aegilops tauschii* and the origin of the D genome polyploids in the wheat group. *Plant Systematics and Evolution*, **137**: 259-73.
- Jam-Baranduzi, A., Sofalian, O., Asghari Zakaria, R., Asghari, A. and Shokrpour, M. (2013). Assessment of genetic diversity in *Aegilops* species in North-West of Iran using ISSR marker. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, **23**: 66-75.
- Johnson, B.L. 1976. Confirmation of the genome donors of *Aegilops cylindrica*. *Nature*, **216**: 859-62.
- Khabiri, T., Asghari-Zakaria, R., Zareh, N. and Sofalian, O. (2012). Analysis of genetic diversity based on HMW and LMW glutenin subunits in *Aegilops cylindrica* from Northwest of Iran. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, **4**: 529-33.
- Khabiri, T., Asghari Zakaria, R., Zareh, N. and Sofalian, O. (2013). Assessing genetic diversity based on gliadin proteins in *Aegilops cylindrica* populations from Northwest of Iran. *Notulae Scientia Biologicae*, **5**: 109-13.
- Kharestani, H. (2010). *Assessment of genetic diversity and genomic relationships wild and cultivated wheat species possessing a genome in different ploidy levels using SSR markers*, M.Sc. Thesis, Ilam University, Iran (In Persian).
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**: 150-63.

- Moradkhani, M., Mehrabi, A.A., Etmnan, A.R. and Pour Aboughadareh, A.R.** (2012). Evaluation of genetic diversity in *Aegilops tauschii* subspecies from Iran in compare with some wheat with D genome by using of ISSR marker. *12th Iranian Genetics Congress, Shahid Beheshti University International Congress Center, Tehran, Iran.*
- Naghavi, M.R., Aghaei, M.J., Taleei, A.R., Omid, M., Mozafari, J. and Hassani, M.E.** (2009). Genetic diversity of the D-genome in *T. aestivum* and *Aegilops* species using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **56**: 499-506.
- Najaphy, A., Ashrafi-Parchin, R. and Farshadfar, E.** (2011). Evaluation of genetic diversity in wheat cultivars and breeding lines using Inter Simple Sequence Repeat markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **25**: 2634-38.
- Peakall, R. and Smouse, P.E.** (2006). GenA1Ex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288-95.
- Perrier, X. and Jacquemoud-Collet, J.P.** (2006). DARwin software. Web site at URL: <http://darwin.cirad.fr/darwin>. Accessed 10 June 2013.
- Pester, T.A., Ward, S.M., Fenwick, A.L., Westra, P. and Nissen, S.J.** (2003). Genetic diversity of jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) determined with RAPD and AFLP markers. *Weed Science*, **51**: 287-93.
- Powell, W., Morgante, M., Ander, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingy, S. and Rafalaski, A.** (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2**: 225-38.
- Ranjbar, M., Naghavi, M.R., Zali, A.A., Aghaii, M.J., Pirseiedi, M. and Mardi, M.** (2008). Evaluation of genetic diversity of *Aegilops crassa* of Iran using SSR markers. *Journal of Genetic Novin*, **3**: 29-38 (In Persian).
- Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A.** (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, **128**: 9-17.
- Shiri, M.** (2009). *Genetic diversity assessment of Einkorn wheat populations of T.boeoticum and T.urartu from West and North-West areas of Iran using SSR markers*, M.Sc. Thesis, Ferdowsi University of Mashad, Iran (In Persian).
- Thomas, K.G. and Bebeli, P.J.** (2010). Genetic diversity of Greek *Aegilops* species using different types of nuclear genome markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**: 951-961.
- Terzopoulos, P.J. and Bebeli, P.J.** (2008). Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research*, **108**: 39-44.
- Van-Slageren, M.W.** (1994). *Wild Wheats: a Monograph of Aegilops L. and Amblyopyrum (jaub. and Spach) Eig (Poaceae)*, Agricultural University Wageningen, Netherlands.
- Watanabe, N., Mastui, K. and Furuta, Y.** (1994). Uniformity of the alpha-amylase isozymes of *Aegilops cylindrica* introduced into North American In: *Comparisons with ancestral Eurasian accessions* (Wang R.R.C., Jensen K.B. and Jaussi, C., Eds.) pp. 215-218, Proc 2nd Int. Wheat Symp, Logan, UT.

Genetic Diversity Structure of *Aegilops cylindrica* Accessions Revealed by Genomic ISSR Markers

Samira Mohammadi¹, Ali Ashraf Mehrabi^{2,*}, Ali Arminian² and Arash Fazeli²

1- Former M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam

2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam

(Received: October 27, 2013 – Accepted: February 17, 2014)

Abstract

Genetic diversity among 35 accessions of *Ae. cylindrica* using 17 ISSR primers were investigated. Totally, 190 alleles were amplified and 188 alleles (98.95%) were polymorphic. Number of Amplified alleles ranged from 6 to 20 with average 11.18 alleles for each primer. Polymorphic information content (PIC) varied from 0.10 (primer UBC841) to 0.35 (primer UBC836). Marker index criterion ranged from 0.6 (primer UBC841) to 6 (primer 15). Cluster and Principal Coordinate Analysis could not completely separate accessions and showed no association between molecular diversity and geographic diversity of genotypes, indicating that there is high genetic diversity among accessions. West and south-west genotypes showed more diversity than genotypes from north and north-west of the country. Therefore, the center of diversity and origin of *Aegilops cylindrica* might be the western and south-western regions of country and this species might transferred from these regions to the northern parts of the country. Results of this study showed that ISSR markers are useful tools for management of genetic resources of wheat and their wild relative species.

Keywords: *Aegilops cylindrica*, Cluster analysis, Genetic diversity, ISSR marker, Principal coordinate analysis

* Corresponding Author, E-mail: a.mehrabi@mail.ilam.ac.ir