

استفاده از نشانگرهای تصادفی جهت مطالعه روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دیم غرب کشور ایران

علی درویشیان^۱، احمد اسماعیلی^{۲*}، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۲، رضا میر دریکوند^۳، طهماسب حسین پور^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور واحد تهران، تهران

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، خرم‌آباد

۴- مربی، مرکز تحقیقات منابع طبیعی و کشاورزی لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۲۶)

چکیده

اصلاح نباتات انتخاب افراد برتر از درون جوامع متنوع گیاهی است. موفقیت انتخاب بستگی به ارزیابی صحیح تنوع در جمعیت گیاهی دارد و نشانگرهای ملکولی توانمندی مناسبی در این موضوع دارند. در این تحقیق، برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۵ رقم و لاین گندم دیم پرکاربرد در مراکز تحقیقاتی غرب کشور (شامل ۹ رقم هگزاپلوئید، ۲ رقم تتراپلوئید و ۱۴ لاین هگزاپلوئید) از نشانگر RAPD استفاده شد. DNA ژنومی به روش دلاپورتا استخراج و پس از انجام واکنش PCR، الگوی باندهای آنها با ۳۰ آغازگر مورد مطالعه قرار گرفت. در مجموع، تعداد ۲۰۰ باند قابل امتیازدهی به دست آمده که از این تعداد، تعداد ۱۳۰ باند (۶۵٪) چندشکل بودند. آغازگر F4 بیشترین تعداد باند و آغازگر A18 کمترین تعداد باند را تولید نمودند. تجزیه خوشه‌ای براساس حضور (۱) و عدم حضور (۰) باند با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و مبتنی بر روش UPGMA انجام گرفت. دامنه ضرایب تشابه از ۰/۲۲ تا ۰/۸۷ متغیر بود. میانگین ضرایب تشابه ۰/۶۴ بود و میانگین ضرایب تشابه لاین‌ها (۰/۶۳) بیشتر از ارقام (۰/۶۰) بود. بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۸۷) بین ارقام آذر ۲ و سرداری که جزء ارقام با تیپ رشد زمستانه هستند و کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۲۲) بین رقم سیمره با لاین Bavicora مشاهده شد. با برش دندروگرام در نقطه ۰/۷۲، ۶ گروه اصلی به دست آمده و بقیه ارقام و لاین‌ها به تنهایی هر یک تشکیل یک گروه جداگانه را دادند. در مجموع نتایج این تحقیق حاکی از تشابه بالای ژنوتیپ‌ها بود که لازم است نسبت به متنوع کردن ژرم پلاسما این گونه در مراکز تحقیقاتی مربوطه اقدام کرد.

واژگان کلیدی: تشابه ژنتیکی، تنوع ژنتیکی، گندم، RAPD

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

مقدمه

موفقیت گذشته، حال و آینده اصلاح گران نبات به میزان تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آنها بستگی دارد (Kumar, 1999). کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه های موردنظر در برنامه های اصلاحی، امکان سازماندهی ژرم پلاسما و نمونه گیری مؤثر از ژنوتیپ ها را فراهم می سازد (Abdmyshany, 1998). فناوری RAPD یکی از فناوری هایی است که به طور گسترده در بررسی های ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد زیرا قادر است با استفاده از مقادیر کم DNA اختلافات موجود بین گیاهان را در سطح DNA شناسایی کند و نیاز به اطلاعات قبلی در مورد ژنوم ندارد (Bagheri et al, 2007; Garcia et al., 2002). این خصوصیت که در RAPD از آغازگرهای تصادفی استفاده می شود و نیاز به DNA کمی دارد باعث شده به روشی ساده برای تجزیه و تحلیل سریع تبدیل گردد (Quiroz and Klos, 2001). کاربرد نشانگرهای RAPD به عنوان نشانگر ژنتیکی در گیاهان خودگشن که تنوع درون گونه ای کمی دارند (مثل گندم هگزاپلوئید)، ثابت شده است (Fahima et al., 1999). عبدالهی مندولکانی و همکاران (Abdulahy Mendolekani et al., 2003) نشانگر RAPD را برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ نمونه گندم به کار بردند و سودمندی این نشانگر را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی اظهار کردند. لیو و همکاران (Liu et al., 1999) با استفاده از نشانگر RAPD ۲۰ لاین گندم هگزاپلوئید را در ۴ گروه قرار دادند و پیشنهاد کردند که تجزیه و تحلیل RAPD برای دسته بندی لاین های گندم و شناسایی والدین برای تولید هیبریدهای برتر مفید است. دشتی و همکاران (Dashti et al., 2009) نیز با استفاده از نشانگر RAPD به بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما های گندم پرداخته و توانستند با استفاده از ضرایب تشابه ۰/۶۵ و ۰/۷ آنها را گروه بندی نمایند. کشور ایران دارای اقلیم خشک و نیمه خشک بوده،

کاهش بارندگی در برخی سال ها در اکثر مناطق منجر به بروز تنش خشکی به خصوص در مراحل انتهایی رشد اکثر گیاهان می گردد (Gupta, 2007). به همین دلیل در حال حاضر نیاز ضروری به تحقیقات در زمینه شناسایی، جمع آوری و تولید ژنوتیپ های متحمل و مقاوم به خشکی در گندم (به ویژه گندم دیم) در کشور و بویژه در استان هایی که کشت غالب آنها دیم است (مثل استان لرستان) احساس می گردد. بر این اساس در این تحقیق، تنوع ژنتیکی به روش نشانگرهای ملکولی در برخی از مهم ترین لاین ها و ارقام گندم دیم رایج در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان (و غرب کشور) به منظور استفاده در پروژه های کاربردی اصلاح این گیاه مورد پژوهش قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این تحقیق ۲۵ رقم و لاین گندم دیم (شامل ۹ رقم هگزاپلوئید، ۲ رقم تتراپلوئید و ۱۴ لاین هگزاپلوئید) که در ایران و بیشتر در منطقه غرب کشور کشت می گردند به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین آنها با استفاده از نشانگر RAPD مورد آزمایش قرار گرفتند. ژنوتیپ های مذکور از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان تهیه شدند و انجام آزمایش های ملکولی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان صورت گرفت. جدول ۱ نام و شجره این ژنوتیپ ها را نشان می دهد. DNA ژنومی از ۰/۱ گرم بافت تازه برگ که ۱۲-۱۰ روز از تاریخ کاشت آن گذشته بود به روش دلاپورتا (Dellaporta et al., 1993) استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراجی از طریق اسپکتروفتومتری مشخص شد. نمونه هایی که دارای کیفیت بالا بودند انتخاب و محلول کاری با غلظت ۵ نانوگرم در میکرولیتر تهیه شده و در آزمایش ها مورد استفاده قرار گرفت. تعداد ۳۰ آغازگر تصادفی از شرکت فزایوتک تهیه و به کار گرفته شدند. آغازگرهای مورد استفاده ۱۰ نوکلئوتیدی و دارای حداقل ۶۰-۵۰ درصد CG بودند. همچنین هیچکدام از آغازگرها دارای انتهای خودمکملی نبودند.

جدول ۱- نام و شجره ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی مورد بررسی

Table 1. Name and pedigree of studied wheat genotype

شماره	ژنوتیپ	تیپ رشد	شجره	شماره	ژنوتیپ	تیپ رشد	شجره
No.	Genotype	Growth type	Pedigree	No.	Genotype	Growth type	Pedigree
1	Azar2	Winter	حاصل کراس با ژنوتیپ های داخلی Progenies of the coss by internal genotype خالص سازی شده از گندم بومی	14	Berkut	Spring	BERKUT CM96
2	Sardari	Winter	منطقه کردستان Purification of local wheat in the Kurdistan Region	15	Florkawa-2	Spring	FLORKWA- 2/KAUZ1CA94
3	Shahivandi	Spring	از توده های بومی استان لرستان Landraces of Lorestan province	16	Hamam-4	Spring	HAMAM-4 -1CA92
4	Symareh	Spring	رقم معرفی شده با منشا ICARDA Cultivar from ICARDA	17	Zemamra-8	Spring	ZEMAMRA-8-ICW91
5	TV2	Spring	TEV2/3/URES/FUN/KAUZ-CM	18	Irena	Spring	IRENA/BABAKAS/PAS TOR-CM
6	Nestor	Spring	NESTOR/3/HE1/3*CNO72//2* SERI/CMS92	19	Chen/Agilops	Spring	CHEN/AGILOPS.SQUA ROSA(TAUS)BCN3/NE E
7	Seri/Rayon	Spring	SERI/RAYON CRG 2753	20	Pigo	Spring	PASTOR CM95
8	Chamran	Spring	(ATTILA).(CM85836-50Y-OM OY-3M-OY	21	Seri	Spring	SERI/3//RL6010/4* YR CM96
9	Pastor	Spring	PASTORCM(CM=CIMMYT)	22	Croc	Spring	CROC_1/AE.SGUARO SA.
10	Zagros	Spring	رقم معرفی شده با منشا ICARDA Cultivar from ICARDA	23	Seri-82	Spring	SERI82/SHUA"S"ISW8 9
11	Ghahar	Spring	رقم معرفی شده با منشا ICARDA Cultivar from ICARDA	24	Bavicora	Spring	BAVIACORA M92 CM.29
12	Maroon	Spring	Avd*Pchu ((28mt54A*N10- Brv21 1c/Kt54B) Nar59> 1093))7	25	Sitta/Chil	Spring	SITTA/CHIL/IRENA/C M
13	Koohdasht	Spring	رقم معرفی شده با منشا ICARDA Cultivar from ICARDA				

دقیقه، ۳۵ درجه به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه؛ قسمت سوم: یک چرخه شامل ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه. برای انجام الکتروفورز از ژل آگارز با غلظت ۱/۵٪ استفاده شد. برای الکتروفورز از ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۲ ساعت استفاده شد. نشانگر مورد استفاده نشانگر با باندهای استاندارد ۱۰۰bp بود. رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفته و در نهایت به کمک دستگاه ژل خوان UVitec (مدل GAS9000) عکس برداری صورت گرفت.

برای تجزیه آماری، نوارهایی در محدوده ۱۰۰ - ۱۳۰۰ جفت باز که دارای تکرارپذیری بالایی بودند انتخاب و وارد محاسبات شدند. ژل های به دست آمده براساس حضور باند (۱) و عدم حضور باند (۰) رتبه بندی شدند. تجزیه خوشه ای بر همین اساس با استفاده از

نام و توالی آنها در جدول ۲ نشان داده شده است. روشی که برای PCR به کار گرفته شد روشی بود که اساس آن روش ویلیامز (Williams *et al.*, 1993) است. اجزای تشکیل دهنده هر واکنش ۲۵ میکرولیتری عبارت بودند از: (۱) بافر ۱۰X با غلظت ۱X، (۲) کلرید منیزیم با غلظت ۱/۵ میلی مول، (۳) dNTP با غلظت ۰/۲ میلی مول، (۴) آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی به غلظت ۰/۵ میکرومول، (۵) ۷ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۵ نانوگرم، (۶) ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمرز واحد در میکرولیتر و (۷) آب مقطر دوبار استریل بود. مخلوط های واکنش آماده شده برای تکثیر به دستگاه ترموسایکلر اپندورف انتقال می یافت. الگوی دمایی واکنش زنجیره ای پلیمرز به این ترتیب بود: قسمت اول: یک چرخه، ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه؛ قسمت دوم: ۴۵ چرخه شامل ۹۴ درجه به مدت یک

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده

Table 2. Name and sequence of used primers

آغازگر	توالی	آغازگر	توالی
Primer	Sequence (5'-3')	Primer	Sequence (5'-3')
UBC1	5'CCTGGGCTTC3'	F3	5'CCTGATCACC3'
UBC5	5'GACCGCTTGT3'	F4	5'TGGCGTCCTT3'
UBC13	5'TCTGTGCTGG3'	F5	5'CCGAATTC33'
UBC64	5'AGTCAGCCAC3'	F6	5'GGGAATTCGG3'
UBC66	5'TGCCGAGCTG3'	F9	5'CCAAGCTTCC3'
UBC77	5'CAGGCCCTTC3'	F10	5'GGAAGCTTGG3'
UBC82	5'GGGCGCGAGT3'	F12	5'ACGGTACCAG3'
UBC84	5'GGGCCCGAGG3'	F13	5'GGCTGCAGAA3'
A1	5'GAGCACCAGG3'	F14	5'TGCTGCAGGT3'
A2	5'GAGGGCGTGA3'	OPE-02	5'GGTGCGGGAA3'
A3	5'GAGGGGGGA3'	OPA-08	5'GTGACGTAGG3'
A14	5'CCTGGGTGGA3'	OPB-10	5'GGACCTTAC3'
A17	5'CCTGGGCTTC3'	OPO-12	5'AGTGTGTG3'
A18	5'CCTGGGTTC3'	OPO-04	5'AAGTCCGCTC3'
A19	5'AGGTGACCGT3'	OPO-06	5'CCACGGGAAG3'

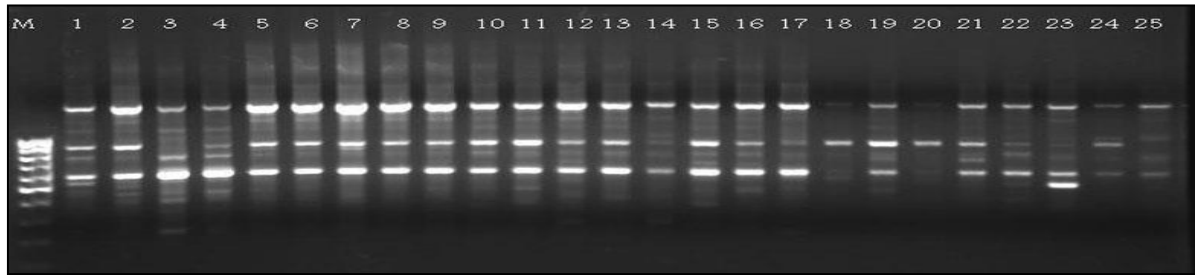
در بین ارقام و خصوصاً لاین های مورد استفاده پایین باشد. با این حال ممکن است تنوع ژنتیکی و تغییرات نسبتاً بالایی در بین این ارقام و لاین ها به جهت اینکه برخی از آنها حاصل تلاقی ارقام خارجی و داخلی می باشند وجود داشته باشد.

با استفاده از امتیازدهی ژنوتیپها و ماتریس تشابه بین ژنوتیپ های گندم که در جدول ۳ ارائه شده است، ارزشهای تشابه ژنوتیپ ها، دامنه‌ای از ۰/۲۲ تا ۰/۸۷ داشتند. میانگین ضرایب تشابه کل ۰/۶۴ بود. میانگین ضرایب تشابه ارقام ۰/۶۰ بود. میانگین ضرایب تشابه لاین ها (۰/۶۳) بیشتر از ارقام بود. کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۲۲) بین رقم سیمره با لاین Bavicora و بیشترین شباهت (۰/۸۷) بین ارقام سرداری و آذرآ وجود داشت. ضمن اینکه میانگین ضریب تشابه بین ارقام هگزابلوئید گندم نیز ۶۸ درصد بود و ضریب تشابه بین دو رقم گندم دوروم نیز ۰/۸۴ برآورد شد. در مجموع این نتایج این پژوهش نشان داد که بین ژنوتیپهای گندم مورد بررسی شباهت ژنتیکی بالایی وجود دارد که بیانگر ضعیف بودن پایه ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه می‌باشد.

ضرایب تشابه جاکارد مبتنی بر روش UPGMA انجام گرفته و در نهایت دندروگرام حاصله رسم شد. تمامی مراحل تجزیه با استفاده از نرم افزار NTSYS صورت گرفت. علاوه بر تجزیه خوشه ای، ضریب همبستگی کوفتیک، تجزیه مؤلفه های اصلی و تجزیه هماهنگ اصلی (PCOA) نیز محاسبه گردید.

نتایج و بحث

به طور کلی با استفاده از ۳۰ آغازگر در مجموع ۲۰۰ باند تکثیر شد. میانگین تعداد باندهای تکثیری برای هر آغازگر ۶/۷ بود. از تعداد کل باندها، ۱۳۰ باند چندشکل بودند، یعنی به طور متوسط هر آغازگر ۴/۳ باند چندشکل تولید نمود. بنابراین درصد باندهای چندشکل ۶۵٪ بود. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرها متفاوت بود. بیشترین تعداد قطعات مربوط به آغازگر F4 و کمترین تعداد مربوط به آغازگر A18 بود. بیشترین تعداد باند چندشکل مربوط به آغازگر F4 و کمترین تعداد باند چندشکل مربوط به آغازگرهای A18، F5 و A3 بود. میزان درصد چندشکلی در بین آغازگرها از ۲۵٪ برای F5 تا ۱۰۰٪ برای F12 متغیر بود. الگوی باندهای آغازگر F4 برای ۲۵ رقم و لاین گندم در شکل ۱ نشان داده شده است. چندشکلی به دست آمده با این نشانگر در این شکل به خوبی مشخص می باشد. با توجه به درصد بالای خودباروری و پیچیدگی ژنوم انتظار می رفت که تغییرات



شکل ۱- الگوی نواریندی قطعات DNA تکثیر شده توسط آغازگر F4. چاهک‌های ۱ تا ۲۵ به ترتیب ژنوتیپ‌های ۱ تا ۲۵ و چاهک M، نشانگر اندازه (۱۰۰bp) می باشد.

Figure 1. DNA banding patterns amplified by F4 primer. Lane 1-25 indicates genotypes and M indicates DNA size marker (100 bp)

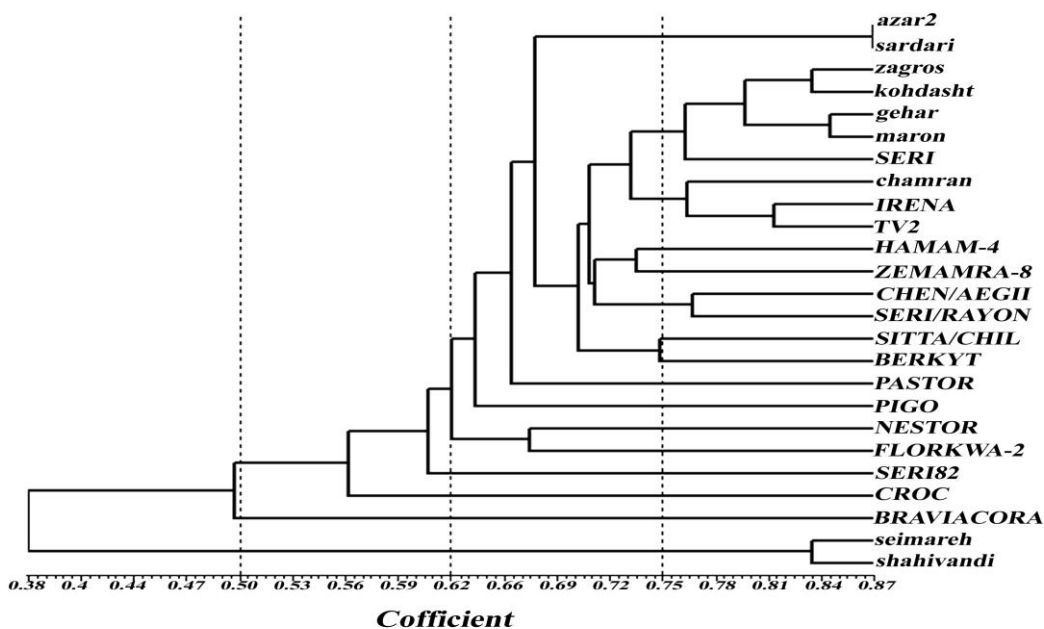
برازش مناسب ژنتیکی بین ارقام و صحت گروه‌بندی را نشان می‌دهد.

در مطالعه حاضر به منظور بررسی توزیع فضائی ژنوتیپ‌ها براساس فاصله آنها از همدیگر از روش تجزیه هم‌هنگ اصلی استفاده گردید. گراف سه بعدی و دوبعدی مورد نظر در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. با مقایسه فواصل فضائی و فواصل ژنتیکی که در روش تجزیه خوشه‌ای به دست آمده بود، مشاهده شد که هر دو روش ژنوتیپ‌ها را به طور مشابهی از همدیگر تفکیک نموده‌اند. در این روش ژنوتیپ‌هایی که در تجزیه خوشه‌ای به طور جداگانه گروه‌های مجزائی را به خود اختصاص داده بودند در فاصله دورتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها قرار گرفته‌اند. علاوه بر این در این روش ارقام گندم دوروم به طور مناسب تری از سایر ارقام گندم نان در فاصله فضائی دورتری قرار گرفته‌اند که نشان دهنده اختلاف ژنتیکی بالا بین این دو گونه می‌باشد. نتایج تجزیه هم‌هنگ اصلی (مؤلفه‌های اصلی) شامل مقادیر ویژه و نسبت واریانس توجیه شده توسط پنج مؤلفه اول برای آغازگرها در جدول ۴ آورده شده است. سه مؤلفه اول مجموعاً ۷۲٪ از کل تغییرات را توجیه نمودند که سهم مؤلفه اول ۶۴٪ و دو مؤلفه بعدی به ترتیب ۵/۹۴٪ و ۳/۲۳٪ بود. در نهایت مشاهدات این تحقیق و سایر مطالعات (Igbal *et al.*, 2007; Joshi and Neuyen, 1993; Fahima *et al.*, 1999; Farooq Ahmed *et al.*, 2010; Patil Vishal *et al.*, 2011; Dashti *et al.*, 2009; Ramshini, 2004) نشان دادند که استفاده از نشانگرهای

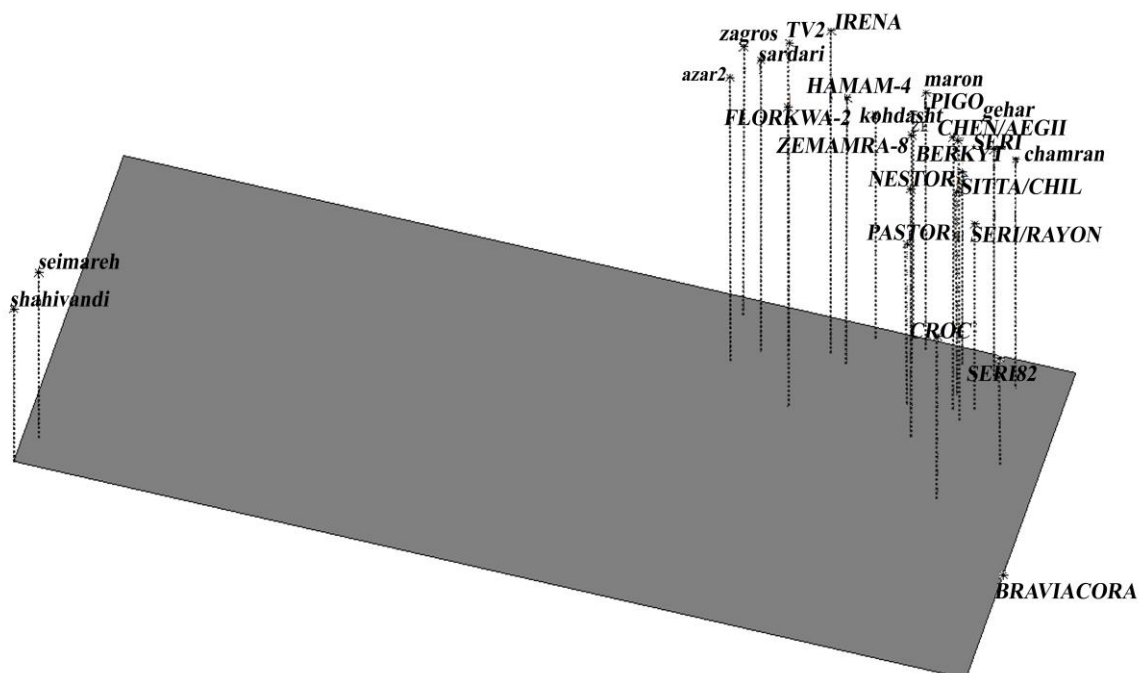
نتایج تجزیه خوشه‌ای و رسم دندروگرام در شکل ۲ آمده است. با برش دندروگرام در نقطه ۰/۷۲، ۶ گروه اصلی به دست آمد و ۵ لاین (Pigo, Croc, Bavicora, Nestor, Seri82) و ۲ رقم (Florkawa-2 و Pastor) نیز به تنهایی هر یک تشکیل یک گروه جداگانه دادند. ۶ گروه اصلی به این صورت می‌باشند: گروه اول شامل دو رقم آذر ۲ و سرداری بوده که هر دو از ارقام زمستانه می‌باشند؛ گروه دوم شامل ارقام زاگرس، کوه‌دشت، گهر، مارون، چمران و لاین‌های Irena و Seri، Tv2₂ می‌باشند؛ گروه سوم شامل ۲ لاین Hamam-4 و Zemamra-8 بوده که هر دو لاین جزو لاین‌های با تیپ رشد بهاره هستند؛ گروه چهارم شامل ۲ لاین Chen و Seri/Rayon می‌باشد که دارای تیپ رشد بهاره هستند؛ گروه پنجم شامل ۲ لاین Berkut و Sitta/Chil می‌باشد که دارای تیپ رشد بهاره هستند؛ گروه ششم شامل ۲ رقم شاهپوندی و سیمره بوده که آنها از ارقام تتراپلوئید بوده و هر دو آنها دارای تیپ رشد بهاره می‌باشند. البته لازم به ذکر است که هر گروه به زیر گروه‌هایی تقسیم می‌شد که ارقام با شباهت بالا در این زیرگروه‌ها قرار داشتند. در تحقیق حاضر با استفاده از تجزیه خوشه‌ای و دندروگرام به دست آمده، ماتریس ضرایب کوفنتیک برآورد شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Ntsys همبستگی بین این ماتریس و ماتریس تشابه اولیه که براساس ضریب تشابه جاکارد بدست آمده بود محاسبه گردید. در مطالعه حاضر همبستگی بین دو ماتریس برابر ۰/۹۴ بود ($R=0/94$)، که

RAPD یک روش سریع و ارزان قیمت برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی تعداد زیادی نمونه و همچنین شناسایی والدین جهت تلاقی و تولید هیبریدهای برتر در برنامه های دورگ گیری می باشد. همچنین با

توجه به میانگین ضرایب تشابه ارقام و لاین های مورد مطالعه، وجود چنین تنوعی در بین لاین ها از جذابیت مطلوبی برخوردار نبوده و باید نسبت به گسترش پایه ژنتیکی آنها اقدام شود.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ۲۵ ژنوتیپ
Figure 2. Dendrogram of cluster analysis of 25 genotypes

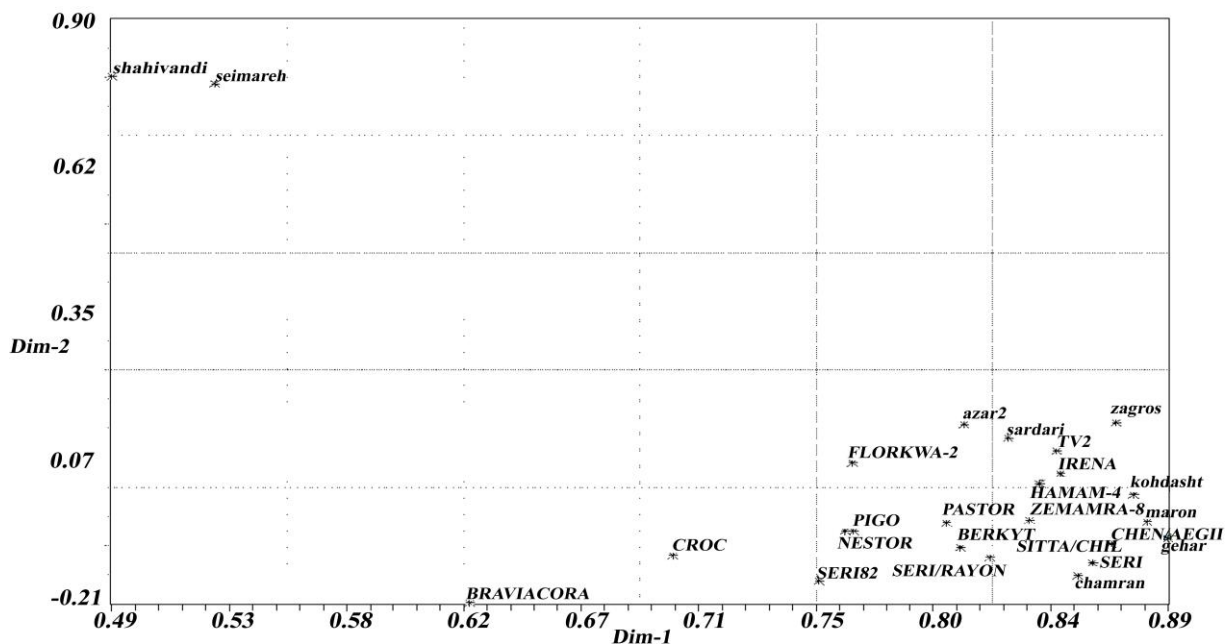


شکل ۳- شکل سه بعدی ژنوتیپ های مورد بررسی
Figure 3. The 3D grouping of genotypes

جدول ۳- ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها بر مبنای ضریب تشابه جاکارد

Table 3. Similarity matrix of genotypes based on Jacard similarity coefficient

Genotypes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1	1																									
2	0.87	1																								
3	0.47	0.45	1																							
4	0.42	0.41	0.84	1																						
5	0.74	0.76	0.52	0.48	1																					
6	0.67	0.69	0.46	0.40	0.83	1																				
7	0.67	0.69	0.41	0.38	0.75	0.84	1																			
8	0.73	0.71	0.42	0.36	0.76	0.83	0.85	1																		
9	0.62	0.66	0.34	0.32	0.71	0.77	0.74	0.75	1																	
10	0.68	0.74	0.42	0.41	0.76	0.72	0.68	0.72	0.78	1																
11	0.66	0.70	0.47	0.43	0.75	0.76	0.72	0.76	0.74	0.81	1															
12	0.54	0.50	0.35	0.31	0.63	0.67	0.68	0.67	0.63	0.66	0.66	1														
13	0.60	0.62	0.40	0.39	0.63	0.64	0.63	0.64	0.6	0.67	0.65	0.67	1													
14	0.50	0.52	0.41	0.35	0.64	0.71	0.70	0.71	0.56	0.61	0.53	0.62	0.60	1												
15	0.71	0.69	0.43	0.39	0.59	0.69	0.74	0.73	0.66	0.68	0.72	0.63	0.71	0.63	1											
16	0.68	0.70	0.39	0.37	0.72	0.73	0.75	0.74	0.74	0.71	0.67	0.65	0.64	0.70	0.76	1										
17	0.58	0.61	0.36	0.35	0.71	0.69	0.73	0.70	0.74	0.55	0.57	0.61	0.59	0.67	0.64	0.76	1									
18	0.61	0.63	0.37	0.36	0.57	0.74	0.76	0.72	0.73	0.61	0.68	0.59	0.67	0.67	0.67	0.69	0.69	1								
19	0.66	0.66	0.40	0.37	0.67	0.68	0.77	0.70	0.69	0.67	0.67	0.59	0.61	0.66	0.73	0.76	0.68	0.73	1							
20	0.61	0.62	0.36	0.33	0.65	0.67	0.72	0.69	0.71	0.70	0.66	0.56	0.59	0.61	0.63	0.67	0.71	0.75	0.71	1						
21	0.60	0.62	0.34	0.31	0.67	0.6	0.65	0.66	0.67	0.68	0.63	0.61	0.58	0.60	0.6	0.64	0.63	0.59	0.68	0.69	1					
22	0.67	0.67	0.36	0.33	0.72	0.76	0.81	0.76	0.74	0.69	0.68	0.60	0.67	0.68	0.74	0.71	0.61	0.76	0.72	0.70	0.64	1				
23	0.56	0.57	0.32	0.26	0.55	0.66	0.58	0.56	0.56	0.54	0.51	0.51	0.52	0.59	0.59	0.70	0.58	0.55	0.57	0.53	0.54	0.59	1			
24	0.47	0.47	0.22	0.23	0.49	0.53	0.56	0.52	0.57	0.47	0.46	0.47	0.4	0.55	0.48	0.55	0.52	0.52	0.49	0.45	0.39	0.52	0.46	1		
25	0.57	0.59	0.32	0.29	0.60	0.62	0.67	0.64	0.66	0.58	0.58	0.57	0.55	0.60	0.60	0.67	0.66	0.63	0.59	0.58	0.54	0.69	0.54	0.59	1	



شکل ۴- شکل دو بعدی ژنوتیپ‌های مورد بررسی

Figure 4. The biplot grouping of genotypes

جدول ۴- تجزیه هم‌هنگ اصلی شامل مقادیر ویژه و نسبت واریانس توجیه شده توسط پنج مؤلفه اول

Table 4. Principle coordinates analysis including eigen value and portion of adjusted variance of 5 factors

واریانس توجیه شده Explained variance	مقادیر ویژه Eigen values	مؤلفه های اصلی Principal factor
63.57	15.89	1
5.94	1.48	2
3.23	0.81	3
2.73	0.68	4
2.49	0.62	5
77.96	----	واریانس تجمعی (Common variance)

References

- Abdmishani, C. and Shahnejatbushehri, A.A.** (1998). Advance plant breeding. Volume II, First Edition, Tehran University Press, Tehran, IR (In Persian).
- Abdollahi Mandoulakani, B., Sayyed Tabatabaei, B.E., Shahnejat-Bushehri, A.A., Ghannadha, M.R. and Omid, M.** (2003). Assessment of genetic diversity among wheat cultivars by using RAPD – PCR technique. *Journal of Agricultural Science*, **34(2)**: 447-454.
- Bagheri, A., Moshtaghi, N. and Sharifi, A.** (2007). Plant biotechnology. First Edition, Jahad Daneshgahi Press, Mashhad, IR (In Persian).
- Dashti, H., Naghavi, M.R., Shahnejat Bushehri, A.A. and Shirani, H.** (2009). Evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using RAPD markers. *Modern Genetics*, **4(3)**: 55-62 (In Persian).
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Ticks, J.B.** (1983). A Plant Molecular DNA Minipreparation Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**: 19-21.
- Fahima, T., Sun, G.L., Beharav Krugman, A.T., Beiles, A. and Nevo, E.** (1999). RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**: 934-447.
- Farooq Ahmed, M., Iqbal, M., Shahid Masood, M., Ashiq Rabbani, M. and Munir, M.** (2010). Assessment of genetic diversity among Pakistani wheat (*Triticum aestivum* L.) advanced breeding lines using RAPD and SDS-PAGE. *Molecular Biology and Genetics*, **13(3)**: 1-10.
- Garcia, M.G., Ontivero, M., Diaz, J., Ricci, C. and Castagnaro, A.** (2002). Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in argentina. *Plant Breeding*, **121**: 76-80.
- Gupta-Yu. S.S.** (2007). Behzray and breeding in rainfed agriculture. Third Printing, Jahad Daneshgahi of Mashhad. Mashhad, IR (In Persian).
- Iqbal, A., Khan, A.S., Khan, I.A., Awan, F.S., Ahmad, A. and Khan, A.A.** (2007). Study of genetic divergence among wheat genotypes through random amplified polymorphic DNA. *Genetics Molecular Research*, **6(3)**: 476-481.
- Joshi, C.P. and Nguyen, H.T.** (1993). RAPD analysis based on international genetic relationship among hexaploid wheat's. *Plant Science*, **93**: 95-103.
- Kumar, L.S.** (1999). DNA marker in plant improvement: an overview. *Biotechnology Advance*, **17**: 143-182.
- Liu, Z.Q., Pel, Y. and Pu, Z.J.** (1999). Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat. *Triticum aestivum* L. *Plant Breeding*, **118**:119-123.
- Patial-Vishal, R., Talati, J.G., Singh Abhishek, S. and Sapre Sarang, S.** (2011). Assessment of genetic diversity and identification of species specific marker for wheat cultivars (*Triticum*

aestivum and *T.durum* L.) grown in india using RAPD marker. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, **24(2)**: 970-974.

Quiroz, H.C. and Klose, F.O. (2001). Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers, *Euphytica*, **122**: 61-67.

Ramshini, H. (2004). *Molecular diversity of bread wheat cultivars using RAPD marker's*. M.Sc. Thesis. Faculty of Agriculture, Tehran University, Tehran, Iran (In Persian).

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingly, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531-6535.

Assessment of Genetic Diversity among Wheat Genotypes of West Iran, Using Randomized Markers

Ali Darvishian¹, Ahmad Ismaili^{2,*}, Farhad Nazarian-Firouzabadi², Reza MirDrikvand³, and Tahmasb Hosseinpour⁴

1- Former M.Sc. Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Payam Noor University Tehran Branch, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Islamic Azad University Khorramabad Branch, Khorramabad, Iran

4- Instructor, Agricultural and Natural Resources Research Center of Lorestan, Khorramabad, Iran

(Received: August 09, 2015 – Accepted: November 17, 2015)

Abstract

Plant breeding is selection of advanced genotypes and its progress depends on correct evaluation of genetic variation. Among different selection procedure, molecular markers have a good potential for evaluation of variation. In this research, RAPD molecular markers were used to evaluation of genetic diversity among 25 wheat cultivars and advanced breeding lines. Genomic DNA was extracted from leaves by Dellaporta method and 30 primers were used for PCR amplification. Results of Primers led to 200 storable electrophoretic bands which 130 of them (65%) were polymorphic. F4 and A18 primers produced the greatest and lowest band, respectively. Cluster analysis was performed based on band presence (1) and absence (0) using Jaccard coefficient similarity and UPGMA method. Similarity coefficient ranged from 0.22 to 0.87 with an average of 0.64. The highest similarity (0.87) was observed between Azar2 and Sardari and lowest similarity (0.22) was observed between Seimareh and BAVICORA. With cut of line on 0.72 in dendrogram, 6 main groups were clustered and other genotypes were clustered in different group. Regarding to the high similarity among these genotypes, it is necessary to develop the wheat germplasm in related research centers.

Keywords: Genetic similarity, Genetic diversity, Wheat, RAPD

* Corresponding Author, E-mail: ismaili.a@lu.ac.ir