



ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های خلر با استفاده از نشانگرهای نیمه تصادفی ISJ

محمدامین سهرابی^۱، احمد اسماعیلی^{۲*}، کریم خادمی^۳، رحمت‌الله کریمی زاده^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

^۲ دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

^۳ مربی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، خرم‌آباد، ایران.

^۴ استادیار، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گچساران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۱

چکیده

خلر (*Lathyrus sativus* L.)، یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی و علوفه‌ای دنیاست که به علت پروتئین و لایسین بالا گیاهی شناخته شده است. به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۳۳ ژنوتیپ خلر، از ۲۰ نشانگر نیمه تصادفی ایترون-آگزونی یا ISJ استفاده شد. استخراج DNA با روش CTAB صورت گرفت. اطلاعات حاصل از آغازگرهای ISJ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و از مجموع باندها، ۷۷٪ باندها مربوط به آغازگرهای ET و ۸۱٪ مربوط به آغازگرهای IT چند شکل بودند. نتایج نشان داد که متوسط تعداد باند چند شکل به ازای هر آغازگر ۳/۹۵ عدد بود و بیشترین میزان اطلاعات چند شکلی و شاخص نشانگر را مربوط به آغازگر ET18-6 بود. بر اساس محاسبه ضریب تشابه جاکارد، محدوده تشابه ژنوتیپ‌ها از ۰/۴۲ تا ۰/۸۹ متغیر بود. تجزیه گروه‌بندی بر اساس روش UPGMA صورت گرفت و براساس دندروگرام بدست آمده و در ضریب تشابه ۰/۷۰، ژنوتیپ‌ها به پنج گروه اصلی تقسیم شدند. نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که سه مولفه اول در مجموع ۷۴/۶۵ درصد از کل واریانس را توجیه نمودند که بیانگر پراکنش محدود این نشانگرها در سطح ژنوم این گیاه می‌باشد. این تحقیق اولین گزارش از کاربرد نشانگر ISJ در گیاه علوفه‌ای مهم خلر در دنیا می‌باشد که امید می‌رود در توسعه اصلاح ملکولی این گیاه مؤثر واقع گردد.

کلمات کلیدی: گروه‌بندی، خلر، نشانگر ISJ، مختصات اصلی.

مقدمه

خلر را مخلوط با یولاف برای تهیه علوفه کشت می‌نمایند (Rastgar, 2013).

در برنامه‌های به‌نژادی و حفظ ذخایر توارثی، اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی از اهمیت بسزایی برخوردار است. اطلاعات تنوع ژنتیکی را می‌توان از خصوصیات مورفولوژیک، پروتئین، آیزوزایم و نشانگرهای مولکولی به دست آورد (Pejic et al., 1998). استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA مناسب‌ترین روش برآورد تنوع ژنتیکی به شمار می‌رود (Keshavarz-Khoob et al., 2015; Odonougue et al., 1999). این نشانگرها تحت تأثیر شرایط محیطی نیستند و در هر مرحله از رشد گیاه کاربرد دارند (Manifesto et al., 2001). پیشرفت در ژنتیک سلولی و مولکولی به توسعه نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR برای مطالعات ژنتیکی متفاوت در گونه‌های زراعی منجر شده است (Mohammadi & Prasanna, 2003).

یکی از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA، نشانگر نیمه‌تصادفی (ISJ) Intron-exon (Splice junction) است که توسط Weining & Langridge (1991) ابداع گردید و سپس توسط Rafalski et al. (1997) اطلاعات کامل‌تری از آن به دست آمد. توالی این نشانگرها بر اساس نواحی برش اتصال اینترون-گزون طراحی شده است و دارای توالی‌های ۹ تا ۱۸ نوکلئوتیدی است. نتایج حاصل از مطالعه Rafalski et al.

در حال حاضر نیاز مبرمی به تحقیقات در زمینه گیاهان علوفه‌ای در کشور احساس می‌شود و استفاده از روش‌های مولکولی از جمله نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزار کارا در جهت اصلاح گیاهان علوفه‌ای حائز اهمیت است (Sandgol, 1996). خلر یا سنگینک با نام علمی *Lathyrus sativus* L. متعلق به زیر تیره Papilionaceae تیره Leguminosae و خانواده پیچک‌داران است. تمامی گونه‌های جنس *Lathyrus* دارای $2n=2x=14$ کروموزوم با تعداد کروموزوم پایه $n=x=7$ می‌باشند. خلر به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی زیاد به‌ویژه محتوای پروتئین بالا در دانه (۳۴-۱۸ درصد) و در برگ-های بالغ (۱۷ درصد) و نیز محتوای لایسین بالا، گیاهی شناخته شده است (Hanburiy et al., 2000). این گیاه در مقایسه با شبدر، یونجه، اسپرس و سایر گیاهان علوفه‌ای ارزش غذایی یکسانی داشته و پروتئین آن‌ها با توجه به مرحله‌ای از رشد که برداشت می‌شوند بین ۱۲ تا ۲۰ درصد متغیر است. به جهت اهمیتی که این گیاهان در میان گیاهان علوفه‌ای از نظر تغذیه دام، کاشت در اراضی کم بازده، مقاومت به سرما و کم‌آبی و همچنین نقشی که در حاصلخیزی خاک دارند، به‌صورت چند منظوره مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این گیاه یک نوع در ایران برای تهیه دانه و علوفه کشت می‌شود ولی در آمریکا انواع

های خلر از سه منطقه جغرافیایی مختلف شد و دیده شد که تنوع زیاد در جمعیت‌های دو منطقه از سه منطقه مورد مطالعه وجود دارد. با توجه به آنچه در بالا در مورد کاربرد نشانگرهای مولکولی در اصلاح گیاهان گفته شد، هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ-های گیاه خلر با استفاده از نشانگرهای نیمه‌تصادفی اگزون-اینترونی بود. قابل ذکر است که تاکنون تحقیقی در مورد تنوع ژنتیکی خلر *Sativus L.* با نشانگر ISJ در داخل و خارج کشور صورت نگرفته است.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی چندشکلی مولکولی، ۳۳ ژنوتیپ خلر از موسسه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان تهیه شد که شرح این ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. این آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام گرفت. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB (Doyle and Doyle, 1990) صورت گرفت. سپس کیفیت و کمیت DNA ژنومی با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه بیوفتومتر ارزیابی شد. در این مطالعه از ۲۰ آغازگر ISJ استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر برای تمامی نمونه‌ها با حداقل دو تکرار بهینه شد. برنامه دستگاه PCR در دو مرحله طبق روش Przetakiewicz *et al.* (2002) در دستگاه

(1997;2002) بیانگر این مطلب بود که نشانگرهای ISJ به علت نیمه‌تصادفی بودنشان نسبت به نشانگر (Random Amplified Polymorphic DNA) پیچیدگی کمتر، تکرارپذیری بالاتر و چندشکلی بیشتری دارند. Przetakiewicz *et al.* (2002) و Weining & Langridge (1991) بیان نمودند که آغازگرهای ISJ برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و جلوگیری از هدف قرار دادن مناطق هتروکروماتینی در ژنوم گیاهان کاربرد دارند. Rafalski *et al.* (1997) بیان کردند که چندشکلی به دست آمده از آغازگرهای ISJ ناشی از تفاوت در تکثیر بخش‌هایی از ژنوم گیاه است که مورد رونویسی قرار می‌گیرند. در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی ژنوتیپ-های خلر با استفاده از نشانگرهای RAPD صورت گرفت و نتایج نشان داد که تنوع بالایی در ژنوتیپ‌های خلر وجود دارد (Chtourou- Ghorbel *et al.*, 2002). Radwan *et al.* (2013) هجده ژنوتیپ خلر جمع‌آوری شده از کشورهای مختلف را برای تغییرات وزن هزار دانه، محتوای پروتئین دانه و الگوهای الکتروفورز کل پروتئین دانه تحت شرایط تنش مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها تنوع ژنتیکی مناسبی برای صفات مورد مطالعه میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان دادند و بیان کردند که از طریق انتخاب ساده می‌توان این صفات را بهبود بخشید. Shiferaw *et al.* (2013) با استفاده از نشانگرهای EST-SSR تنوع ژنتیکی توده‌های خلر اتیوپی را مورد ارزیابی قرار دادند؛ که نتایج منجر به گروه‌بندی جمعیت-

شد. همچنین نمایش گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از روش تجزیه به مختصات اصلی (با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-2.02e) انجام شد.

نتایج و بحث

۲۵ آغازگر نیمه‌تصادفی در مجموع حدود ۱۰۰ باندها قابل امتیازدهی و تکرارپذیر تولید نمودند که از این میان ۷۹ باندها چند شکل (۷۹٪) و ۲۱ باندها منومرف (۲۱٪) است. میانگین تعداد کل باندها و تعداد باندهای چند شکل به ازای هر آغازگر ISJ، به ترتیب ۵ و ۳/۹۵ باندها بود. در بین آغازگرهای تکثیری، بیشترین تعداد قطعات تکثیری مربوط به آغازگر ET18-6 با ۸ باندها تولیدی و کمترین تعداد قطعات مربوط به تعدادی از آغازگرها (ET 15-35، ET 15-36 و ET 12-29) بود (جدول ۲). در تحقیقی توسط Shiferaw *et al.* (2012)، تعداد آلل در هر لوکوس از ۲ تا ۷ آلل (و متوسط ۴ آلل) برای آغازگرهای EST-SSR گزارش گردید. در بررسی دیگری تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ خلر با استفاده از ۲۴ نشانگر ISSR بررسی شد و دیده شد که ۱۲ نشانگر چندشکلی دارند (Ambade *et al.*, 2015).

ترموسایکلر انجام شد. چرخه‌های حرارتی به ترتیب شامل واسرشت شدن اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سپس ۴۰ چرخه دمایی بود که در هفت چرخه اولیه، دمای اتصال آغازگر دو درجه سلسیوس و در ۳۳ چرخه بعدی شش درجه سلسیوس بالاتر از دمای ذوب آغازگر (جهت تکثیر اختصاصی‌تر آغازگرها) در نظر گرفته شد. در تمامی این ۴۰ چرخه، واسرشت شدن به مدت ۴۰ ثانیه و در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه و مرحله سنتز به مدت دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس صورت گرفت. بعد از اتمام ۴۰ چرخه مرحله سنتز نهایی به مدت ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. سرانجام جهت تفکیک باندهای DNA، محصولات تکثیرشده PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر TAE 1X و ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردید.

برای تخمین تنوع ژنتیکی، اطلاعات حاصل به صورت کد صفر (عدم وجود باندها) و کد یک (وجود باندها) با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-2.02e مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از میان ۲۵ آغازگر مورد مطالعه، در نهایت از اطلاعات حاصل از ۲۰ آغازگر چندشکل جهت تشکیل ماتریس تشابه و گروه‌بندی استفاده شد. در این تحقیق جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد استفاده

جدول ۱- نام و محل جمع‌آوری ژنوتیپ.

Table 1- Number and location of *Latyrus sativus* accessions.

نام ثبت شده ژنوتیپ	منشأ جمع‌آوری	نام ثبت شده ژنوتیپ	منشأ جمع‌آوری
Genotype registered name	Location of collection	Genotype registered name	Location of collection
IF3	Turkey	IF1346	ICARDA
IF225	Slovakia	IF1347	ICARDA
IF463	Ethiopia	IF1872	Bangladesh
IF478	Ethiopia	IF2156	Bangladesh
IF587	Syria	IF2177	Bangladesh
IF471	Ethiopia	IF2329	Bangladesh
IF1306	ICARDA	IF1928	Nepal
IF1307	ICARDA	Sel.289	ICARDA
IF1309	ICARDA	Sel.290	ICARDA
IF1312	ICARDA	Sel.299	ICARDA
IF1316	ICARDA	Sel.387	ICARDA
IF1322	ICARDA	Sel.449	ICARDA
IF1327	ICARDA	Sel.587	ICARDA
IF1332	ICARDA	Sel.B111	ICARDA
IF1341	ICARDA	Sel.ETH1/299	ICARDA
IF1344	ICARDA	Sel.521/B1	ICARDA
Sel.B222	ICARDA		

آن‌ها چند شکل (۷۷٪) و ۱۲ باند منومرف (۲۳٪) بودند. گروه آغازگرهای IT تعداد ۴/۲ باند چند شکل به ازای هر آغازگر در مقابل ۳/۷ باند در گروه ET تولید نمودند (جدول ۲). علت پلی-مورفیسم پایین این آغازگرها را می‌توان ناشی از آن دانست که این آغازگرها از ابتدا برای خانواده غلات و سولاناسه طراحی شده‌اند و پیشنهاد می‌شود در کارهای آینده براساس بانک‌های ژنتیکی آغازگرهای جدیدی مبتنی بر توالی‌های حفاظت-شده مرز اگزون-اینترونی این خانواده بهینه‌سازی شود.

در مطالعه‌ای، Nowosielski *et al.* (2002) بر روی ارقام ژنتیکی لوییا با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی، متوسط تعداد باند به ازای هر ژنوتیپ را ۱۱/۵ عدد گزارش کردند. درحالی‌که Rafalski *et al.* (2002) متوسط تعداد باند تولیدشده به ازای هر یک از ژنوتیپ‌های چاودار را ۸/۹ عدد برآورد کردند. نه آغازگر گروه IT، در مجموع ۴۷ باند تولید نمودند که تعداد ۳۸ باند از این تعداد چند شکل (۸۱٪) و ۹ باند منومرف (۱۹٪) بودند. همچنین ۱۱ آغازگر گروه ET در مجموع ۵۳ باند تولید نمودند که ۴۱ باند

جدول ۲- مشخصات آغازگرها از نظر چندشکلی و شاخص‌های مرتبط.

Table 2- Polymorphism and related indices of primers.

ردیف Row	نام آغازگر Primer name	کل باند‌ها Total bands	باندهای چند شکل Polymorphic bands	درصد تنوع Percent of polymorphism	محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)	شاخص نشانگر (MI)
1	IT 10-1	6	6	100	0.50	3
2	IT 10-2	6	4	66.66	0.79	3.16
3	IT 10-3	5	4	80	0.33	1.32
4	IT 10-4	4	2	50	0.94	1.88
5	IT 10-5	5	5	100	0.28	1.40
6	ET 12-25	4	4	100	0.67	2.68
7	ET 12-27	4	3	75	0.89	2.67
8	ET 12-29	3	1	33.33	0.81	1.62
9	ET 12-30	4	3	100	0.49	1.47
10	IT 15-31	6	6	100	0.36	2.16
11	IT 15-32	6	5	83.33	0.46	2.3
12	IT 15-34	6	4	66.66	0.52	2.08
13	IT 15-36	3	2	66.66	0.46	0.92
14	ET 15-32	5	4	80	0.51	2.04
15	ET 15-33	7	6	85.72	0.56	3.36
16	ET 15-35	3	2	66.66	0.63	1.26
17	ET 15-36	4	2	50	0.55	1.10
18	ET 18-1	6	4	66.66	0.87	3.48
19	ET 18-2	5	5	100	0.72	3.60
20	ET 18-6	8	7	87.5	0.70	4.90

که بیشترین شاخص نشانگر مربوط به آغازگر ET18-6 با مقدار ۴/۹ و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر ET15-36 با مقدار ۰/۹۲ بود. این شاخص پتانسیل هر آغازگر جهت تولید باند بیشتر را نشان می‌دهد. مجیری و همکاران در مطالعه‌ای روی گیاه آویشن، بیشترین و کمترین میزان اطلاعات چندشکلی را مربوط به

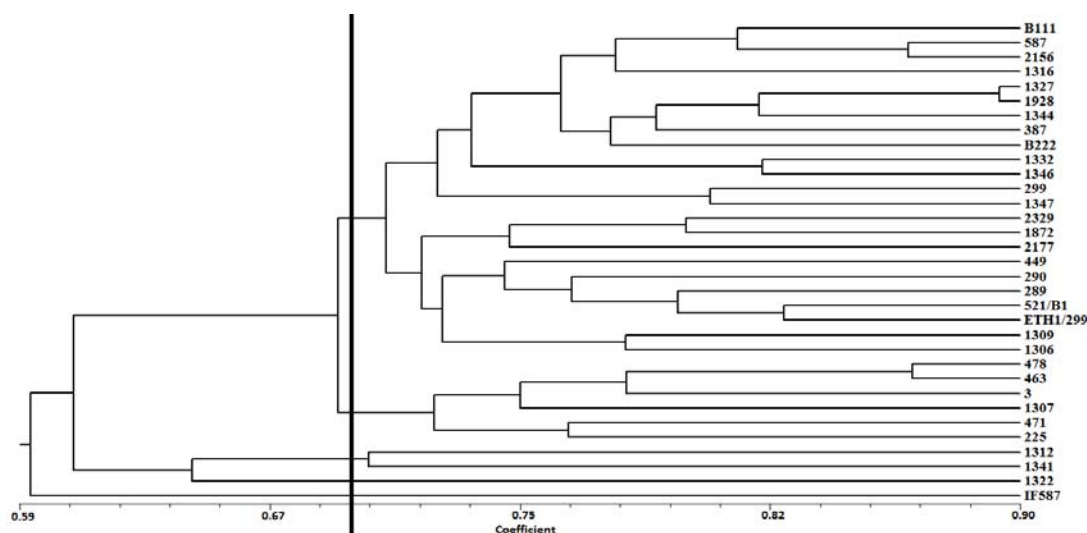
هرچه عدد متوسط باند به ازای هر آغازگر بیشتر باشد کارایی آن نشانگر در گیاه مورد مطالعه بیشتر است. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) برای هر آغازگر محاسبه شد و بیشترین و کمترین PIC به ترتیب مربوط به آغازگر IT10-4 و IT10-5 ۰/۹۴ و ۰/۲۸ بود. محاسبه شاخص نشانگر (MI) برای هر کدام از آغازگرها نشان داد

شباهت ژنتیکی را باهم داشتند. کمترین شباهت ژنتیکی در گروه ژنوتیپ‌های بنگلادشی با ضریب تشابه ۰/۷۹ مربوط به دو نمونه 2329 و 2177 بود. تفاوت در میزان شباهت این ژنوتیپ‌ها را می‌توان تا حدودی ناشی از منشا هرکدام از این ژنوتیپ‌ها دانست. تعدادی از ژنوتیپ‌های ایکاردا نیز با درصد متفاوت شباهت ژنتیکی در این گروه قرار گرفتند.

در گروه دوم قرار گرفتن ژنوتیپ‌های از ایکاردا، اسلواکی، اتیوپی و ترکیه در این گروه قابل توجه است. در ژنوتیپ‌های اتیوپی دو ژنوتیپ 463 و 478 با ضریب تشابه ۰/۸۶ بیشترین ضریب تشابه را دارا بودند که احتمالاً به دلیل منشأ جغرافیایی یکسان است. ژنوتیپ 3 (ترکیه) بالاترین شباهت ژنتیکی را با ژنوتیپ 1928 (نیال) با ضریب تشابه ۰/۷۸ داشت. ژنوتیپ اسلواکی بالاترین شباهت ژنتیکی را با ضریب تشابه ۰/۷۸ با ژنوتیپ 1327 ایکاردا داشت. گروه‌های سوم، چهارم همگی ژنوتیپ‌های ایکاردا هستند که در گروه‌های مختلف قرار گرفتند. قرار گرفتن این ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مختلف را احتمالاً ناشی از آن دانست که منشأ اولیه آن‌ها از مناطق مختلفی است که در این مرکز بین‌المللی جمع شده‌اند و یا آنکه حاصل تلاقی-هایی با والد مشترک باشند. گروه پنجم و آخرین گروه که ژنوتیپی از سوریه است دارای بیشترین اختلاف ژنتیکی با بقیه ژنوتیپ‌ها بود.

آغازگرهای IT15-36 و IT18-2 گزارش کردند (Ismaili & Mojiri, 2013; Mojiri *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای توسط Belaid *et al.* (2006) با استفاده از نشانگرهای ISSR تنوع ژنتیکی درون و بین ژنوتیپ‌های خلر صورت گرفت، نتایج ۶۰ باند DNA چند شکلی نشان داد که بیانگر پلی‌مورفیسم بالا در درون و بین ژنوتیپ‌ها بود. در مطالعه‌ای روی ژنوتیپ‌های اتیوپی گیاه علف‌ای خلر با استفاده از نشانگر EST-SSR مشاهده شد که میانگین شاخص نشانگری برای هر آغازگر ۰/۴۵ بدست آمد (Shiferaw *et al.*, 2012).

تصویری از دندروگرام گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای ISJ در شکل ۱ نشان داده شده است. در ضریب تشابه ۰/۷۰، ژنوتیپ-های خلر مطالعه شده به ۵ گروه اصلی تقسیم گردید. گروه اول بیست‌وسه ژنوتیپ، گروه دوم شش ژنوتیپ، گروه سوم دو ژنوتیپ و گروه چهارم و پنجم هرکدام یک ژنوتیپ را به خود اختصاص دادند. گروه اول شامل ژنوتیپ‌هایی از ایکاردا و بنگلادش است. قرار گرفتن هر چهار ژنوتیپ بنگلادش در این گروه با منشأ جغرافیایی مطابقت دارد. مبادله و جابجایی بذور را می‌توان یک دلیل احتمالی مبنی بر قرار گرفتن این ژنوتیپ‌ها در کنار دیگر ژنوتیپ‌های ایکاردا در یک گروه دانست. ژنوتیپ‌های 1928 (نیال) و 1327 (ایکاردا) با ضریب تشابه ۰/۸۹ بیشترین



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای روش UPGMA.

Figure 1- Dendrogram obtained from cluster analysis based on UPGMA method.

al. (2006) بر روی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی خلر ایران با استفاده از نشانگر تصادفی RAPD صورت گرفت دیده شد که در این توده‌ها تنوع ژنتیکی بالایی وجود دارد. *Rafalski et al.* (1997) در مطالعه خود میانگین ضرایب تشابه بین لاین‌های اینبرد ذرت را ۰/۶۲ گزارش کردند. در مطالعه *Przetakiewicz et al.* (2002) این مقدار از ۰/۱۹ تا ۰/۶۱ متغیر بود. *Gaweł et al.* (2002) میانگین شباهت بین ارقام گندم و تریتیکاله را با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی ۰/۶۳ گزارش کردند. برای تعیین نحوه پراکنش نشانگرهای ISJ مورد استفاده در سطح ژنوم خلر و همچنین گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، تجزیه مختصات اصلی انجام گرفت. نتایج به دست آمده از تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که سه مؤلفه اول در مجموع ۷۴/۶۵ درصد از تغییرات را توجیه می‌کند که سهم مؤلفه اول

ژنوتیپ IF587 (ایکاردا) بیشترین شباهت ژنتیکی را با ضریب تشابه ۰/۶۷ با ژنوتیپ 1347 (ایکاردا) و کمترین شباهت ژنتیکی را با ضریب تشابه ۰/۴۲ با ژنوتیپ 1322 (ایکاردا) داشت. در پژوهشی توسط *Ambade et al.* (2015) روی ۴۸ ژنوتیپ خلر با استفاده از نشانگرهای ISSR دیده شد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ضریب تشابه ۰/۶۱ به دو گروه تقسیم شدند و دو ژنوتیپ با RLK-637 و RLK-466 بیشترین شباهت را نشان دادند. تحلیل تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی توانست اکسیژن‌های دو گونه *Latyris* و *Latyris cicera* را از همدیگر تفکیک نماید. همچنین در گونه *Latyris cicera* میانگین فاصله ژنتیکی ۰/۱۶۷ و در گونه *Latyris sativus* میانگین فاصله ژنتیکی ۰/۲۰۳ برآورد گردید (Almeida *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای که توسط *Vahabi et al.*

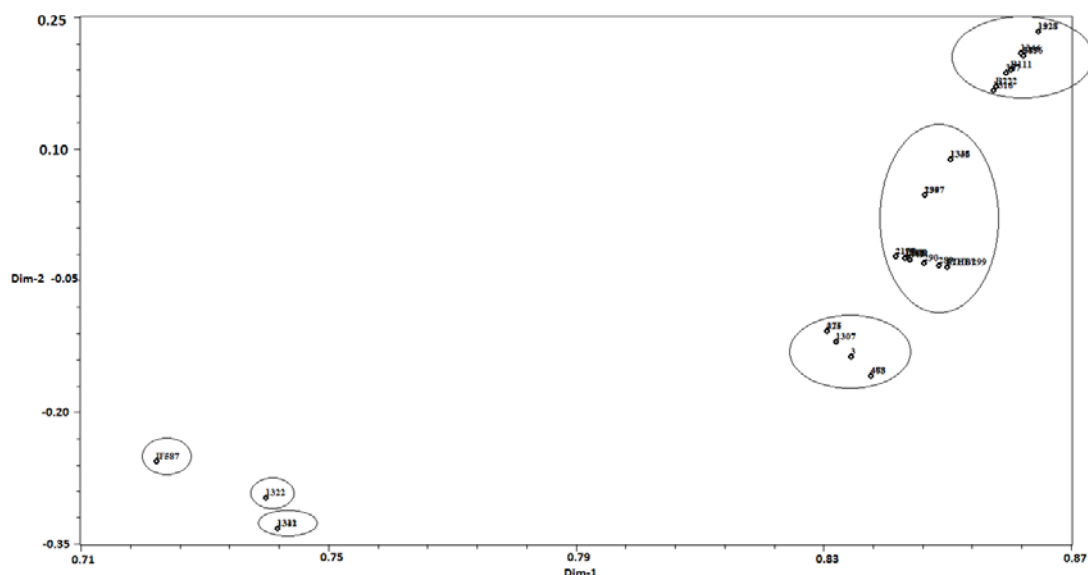
درصد از تغییرات مربوط به نشانگرها را توجیه کنند، از نظر آماری ممکن است برای نمایش گرافیکی مناسب نباشد، ولی از نظر ژنتیکی نشان دهنده نمونه برداری مطلوب نشانگرها و پراکنش آنها در سطح کل ژنوم است. به عبارت دیگر، زمانی که تعداد صفات یا باندها به تعداد کمی مختصات کاهش یابد، به احتمال قوی مبین آن است که آغازگرهای مورد استفاده به طور صحیح انتخاب نشده‌اند و تعداد محدودی از کروموزومها را تحت پوشش قرار می‌دهند. در نتیجه نمی‌توانند افراد را از همدیگر به خوبی جدا کنند؛ اما اگر تعداد مؤلفه‌ها زیاد باشد، آغازگرهای مورد استفاده، کروموزومهای بیشتری را تحت پوشش قرار می‌دهند و نشانگر به خوبی تنوع ژنتیکی افراد را تعیین می‌کند (Siahsar *et al.*, 2010).

۶۹/۸۱، مؤلفه دوم ۲/۶۵ و مؤلفه سوم ۲/۱۹ درصد تغییرات را به خود اختصاص داده است. نمودار دو بعدی نحوه پراکندگی ژنوتیپها را در شکل ۲ به خوبی نشان می‌دهد. نتایج گروه بندی در نمودار دو بعدی مطابق گروه بندی در تجزیه کلاستر می‌باشد. سهم مؤلفه اول در توجیه تغییرات برای نشانگرهای ISJ تا حدودی زیاد است؛ این موضوع نشان دهنده این است که عمده این آغازگرها در یک یا چند قسمت محدود از ژنوم (نواحی ژن در ژنوم) تجمع یافته‌اند و در سطح ژنوم پراکنده نیستند (جدول ۳). در داده‌های مورفولوژیک برعکس داده‌های مولکولی، بهترین حالت زمانی است که بیشترین واریانس توسط تعداد کمی مؤلفه توجیه شود. در داده‌های مولکولی اگر دو یا سه مؤلفه اول حدود ۲۰-۱۰

جدول ۳- مقادیر ویژه، نسبت واریانس توجیه شده توسط هر مؤلفه و واریانس تجمعی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی بر اساس نشانگرهای نیمه تصادفی.

Table 3- Eigen values, proportion of variance explained by each component and the cumulative variance of principle coordinate analysis based on semi-random markers.

واریانس توجیه شده Cumulative variance	مقادیر ویژه Eigen values	مؤلفه‌های اصلی Main components
69.81	23.03	مؤلفه اول First component
2.65	0.87	مؤلفه دوم Second component
2.19	0.72	مؤلفه سوم Third component
74.65		مجموع Total



شکل ۲- نمودار دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی ژنوتیپ‌های خلر با نشانگرهای ISJ.

Figure 2- Two dimensional diagram for principal coordinate analysis in *Lathyrus sativus*, using ISJ markers.

قرار دادن آن‌ها در گروه‌ها و زیرگروه‌های معین بودند؛ بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی روش مناسبی در ارزیابی و بررسی درجه شباهت و تفاوت‌های ژنوتیپ‌های خلر جهت مطالعات کاربردی اصلاح این گیاه در آینده باشد.

این تحقیق اولین کاربرد نشانگرهای نیمه تصادفی اینترون-اگزونی در گیاه علوفه‌ای مهم خلر در دنیا می‌باشد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که ۲۰ آغازگر نیمه تصادفی دارای چندشکلی مورد استفاده در این مطالعه تا حدود قابل توجهی قادر به تمایز ژنوتیپ‌های خلر و

منابع

- Almeida, NF, Leitao ST, Caminero C, Torres AM, Rubiales D, Patto MCV (2014). Transferability of molecular markers from major legumes to *Lathyrus* spp. for their application in mapping and diversity studies. *Molecular Biology Reports* 41: 269-283.
- Ambade RL, Verma SK, Nanda HC, Nair SK, Verulkar SB (2015). Genetic diversity based on molecular markers in Grasspea (*Lathyrus sativus* L). *Legume Research-An International Journal* 38: 43-46.
- Belaid Y, Chtourou-Ghorbel N, Marrakchi M, Trifi-Farah N (2006). Genetic diversity within and between populations of *Lathyrus* genus (Fabaceae) revealed by ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1413-1418.
- Chtourou-Ghorbel N, Lauga B, Ben Brahim N, Combes D, Marrakchi M (2002). Genetic variation analysis in the genus *Lathyrus* using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49: 365-372.

- Doyle JJ, Doyle GL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Hanbury C, White C, Mullan B, Siddique K (2000). A review of the potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 87: 1-27.
- Hazhbari F, Rozbahan Y, Kafilzadeh F (1999). Chemical compound determination and digestibility of grasspea seeds (*Lathyrus sativus* L.) with in vivo method in mutton. *Journal of Modares Agricultural Sciences and Technology* 2: 83-88.
- Ismaili A, Mojiri F (2013). Assessment of genetic diversity among Iranian *Thymus kotschyanus* accessions using semi-random markers. *Biotechnology in Agricultural* 12: 63-69 (In Farsi).
- Keshavarz-Khoob MGh, Gharanjik Sh, Masoumiasl A, Abdollahi-Mandoalkani B (2015). Evaluation of diversity and genetic relationships among some grapevine cultivars using ISSR markers. *Journal of Agricultural Biotechnology* 7: 129-142 (In Farsi).
- Manifesto MM, Schlatter A, Hopp, HE, Suárez EY, Dubcovsky J (2001). Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Science* 41: 682-690.
- Mohammadi S, Prasanna B (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43: 1235-1248.
- Mohammadnezhad A (1990). Grasspea agronomy. *Zeitoon Journal* 280: 60 (In Farsi).
- Mojiri F, Ismaili A, Nazarian F, Madah Arefi H, Ahmadi H (2013). Study of genetic diversity of Iranian *Thymus* accessions, using ISJ semi-random markers. *Journal of Agricultural Biotechnology* 6: 147-162 (In Farsi).
- Nowosielski J, Podyma W, Nowosielska D (2002). Molecular research on the genetic diversity of Polish varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 753-762.
- Odonougue LS, Souza E, Tanksley SD, Sorrells ME (1999). Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphism. *Crop Science* 34: 1251-1258.
- Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M (1998). Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1248-1255.
- Przetakiewicz J, Nadolska-Orczyk A, Orczyk W (2002). The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 671-676.
- Radwan SA, El-Koly AS, Sasmour RH (2013). Genetic variation among accessions of *Lathyrus inconspicuus* L. as revealed by SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Acta Agriculturae Slovenica* 101: 21-30.
- Rafalski A, Gidzinska M, Wisniewska I (1997). PCR-based system for evaluation of relationships among maize inbreeds. In: Tsafarides AS (Eds), *Genetics and Biotechnology of Maize and Sorghom*. Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 106-111.
- Rastgar MA (2013). *Agronomy of forage plants* (2nd Eds). Brahmand Publisher, Tehran, Iran, pp. 512.
- Sandgol H (1996). *Introduction to Plant Breeding forage*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran, pp. 128.

- Shiferaw E (2013). Development and cross-species amplification of grass pea EST-derived markers. *African Crop Science Journal* 21: 153-160.
- Shiferaw E, Pe ME, Porceddu E, Ponnaiah M (2012). Exploring the genetic diversity of Ethiopian grass pea (*Lathyrus sativus* L.) using EST-SSR markers. *Molecular Breeding* 30: 789-797.
- Siahsar BA, AllahDoo M, Shahsavand Hasani H (2010). Evaluation of Genetic Diversity of Tritipyrum, Triticale and wheat lines through RAPD and ISJ markers. *Iran Journal of Field Crop Science* 41: 555-568.
- Vahabi A, Soloki M, Arzani A, EmamJomeh A (2006). Study of genetic diversity in grass pea (*Lathyrus sativus* L.) using RAPD markers. *Proceeding of 1st National Congress of legums*, Nov. 20-21, 2005, Mashhad, Iran. Pp. 602-604 (In Farsi).
- Weining S, Langridge P (1991). Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 209-216.

Assessment of genetic diversity among *Lathyrus sativus* L. genotypes, using semi-random intron-exon splice junction marker

Sohrabi M.A.¹, Ismaili A.*², Khademi K.³, Karimizadeh R.⁴

¹ M.Sc. Student, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran.

² Associate Professor, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran.

³ M.Sc., Agriculture and Natural Resources Research Centre of Lorestan Province, Iran.

⁴ Assistant professor, Dryland Agricultural Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gachsaran, Iran.

Abstract

Grass pea (*Lathyrus sativus* L.), as one of the most important forage crop plants, has high content of protein and Laysin. In order to assess the genetic diversity of 33 genotypes of grass pea, 20 semi-random primers were used in the present study. DNA was extracted by CTAB method. The ISJ data were analyzed and 77% of IT bands and 81% of ET bands were polymorphic. The results showed that the average number of polymorphic bands per primer was 3.95 and the highest amount of polymorphic information content and marker index was belonged to ET18-6 primer. According to the Jaccard's similarity coefficient, the range of similarity among studied genotypes was varied from 0.42 to 0.89. Cluster analysis based on UPGMA method divided genotypes to 5 groups at cut of line in 0.71 similarity coefficient. The principle coordinates analysis showed that the first three components explained 74.65% of total variance indicating the restricted distribution of these ISJ markers at the grass pea genome. Present study is the first report on application of ISJ markers in grass pea, as important forage plant, which is hoped to be effective in the development of molecular breeding programs of this plant.

Keywords: *classification, grass pea, markers ISJ, principle coordinates.*

* Corresponding Author: Ismaili A. Tel: 06633400012

Email: ismaili.a@lu.ac.ir