Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Distinguishing of bread wheat cultivars using RAPD marker based on DNA fingerprinting

Behnoosh Bahrami

*Corresponding author .MSc Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Zanjan University, Zanjan, Iran. E-mail address: be.bahrami97@gmail.com

Bahram Maleki Zanjani

Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran. E-mail address: bmalekiz@znu.ac.ir

Roghaeh Azimkhani

Ph.D Student Plant Breeding, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran. E-mail address: rh_azimkhani@znu.ac.ir

Abstract

Objective

Wheat is the most important cereal crops; it is a stable diet for more than one third of the world population. DNA markers play the most important role in diversity due to the relative ease in their generation and elimination of the influence of environment. The objective of this research were study of genetic diversity of bread wheat cultivars using RAPD markers and efficiency of these markers in grouping and distinguishing wheat cultivars based DNA fingerprint.

Materials and methods

In this study 42 wheat cultivar was evaluated with using 20 RAPD markers. The amplified fragment profiles were visually scored for presence (1) and absence (0) of bands and entered in a binary matrix.

Results

The results showed that, RAPD primers detected 132 fragments and 88 of them (66/67%) were polymorphic. The amplified DNA fragments varied in size from <100bp to 3000bp. The number of polymorphic fragments primer ranged from 2-7 with an average of 4/4. RAPD68 and RAPD28 each whit 7 polymorphic bands showed the highest amount of polymorphism. Primer RAPD68

were able to distinguish the cultivars omid and azadi, primer OPB08 cultivars Chenab. Sepahan, Salyasonez and primers TIBMBD17 and TIBMBB09 cultivar Atrac from other cultivars. Cluster analysis using Jaccard matrix and UPGMA method was performed, wheat genotype clustered in seven distinct groups, and the genetic similarity values ranged from 0.74 to 0.94. sistan and gasparo showed the most genetic similarity (94%). Atrac, Azadi and vrinac were clustered as outliers. Analysis of molecular variance (AMOVA) determined 1% inter group diversity and 99% intra group diversity for studied genotypes.

Conclusions

The results of this research showed that there was not genetic variation among bread wheat cultivars, that can be due to the low number of primers and cultivars under investigation. Suggested to use other primers such as SSR, which shows more diversity.

Keywords: DNA fingerprinting, Diversity, Wheat, Polymorphism, Molecular marker

Paper Type: Research Paper.

Citation: Bahrami B, Maleki Zanjani B, Azimkhani R (2023) Distinguishing of Bread Wheat cultivars using RAPD marker Based DNA fingerprint. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (2), 181-198.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (2), 181-198. DOI: 10.22103/jab.2023.21401.1478

Received: March 11, 2023. Received in revised form: May 13, 2023.

Accepted: May 14, 2023. Published online: June 10, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

تشخیص ارقام گندم نان براساس انگشت نگاری DNA با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

بهنوش بهرامی

*نویسنده مسئول: کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: be.bahrami97@gmail.com

بهرام ملکی زنجانی

دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: bmalekiz@znu.ac.ir

رقیه عظیم خانی

دانشجوی دکتری اصلاح نباتات بیومتری، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: rh_azimkhani@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۴

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی میزان تنوع ژنتیکی در ارقام گندم با استفاده از نشانگر RAPD و بررسی کارایی این نشانگر در تفکیک و گروه‌بندی ارقام و نیز تشخیص ارقام بر اساس انگشت نگاری DNA می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۴۲ رقم گندم نان بوسیله ۲۰ آغازگر RAPD مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس مشاهدات به صورت حضور نوار (۱) و عدم حضور (۰) اسکور بندی شده و ماتریس تشابه تشکیل شد.

نتایج: براساس نتایج حاصل از آزمایش از ۱۳۲ نوار تولید شده ۸۸ نوار (۶۶/۶۷) درصد چند شکلی نشان دادند. سایز قطعات DNA چند شکل بین کمتر از ۱۰۰ جفت باز تا ۳۰۰۰ جفت باز می‌باشد و همچنین محدوده‌ی تولید نوارهای چند شکل ۲-۷ قطعه با متوسط ۴/۴ قطعه چند شکل، برای هر آغازگر است. RAPD58 و RAPD28 هر کدام با تولید هفت نوار چند شکل، بیشترین میزان چند شکلی را نشان دادند، RAPD68 توانست ارقام امید و آزادی، OPB08 ارقام چناب، سپاهان و سالیاسونز و TIBMBB09 و TIBMBD 17 رقم اترک را از سایر ارقام تشخیص دهد. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر به روش UPGMA میزان ضریب تشابه را بین ۰/۷۴ تا ۰/۹۴ محاسبه نمود و در خط برش ۰/۷۹درصد، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در هفت گروه قرار

داد. ارقام سیستان و گاسپارو دارای بیشترین شباهت بودند و ارقام اترک، ویریناک و آزادی در کلاسترهای مجزا جای گرفتند. همچنین تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که ۱درصد از واریانس بین جمعیت و ۹۹ درصد درون جمعیت می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که تنوع قابل توجهی در بین ارقام گندم نان مشاهده نشد، که می‌تواند به دلیل تعداد کم آغازگر و نیز ارقام مورد بررسی باشد. پیشنهاد می شود که از نشانگرهای دیگری همانند SSR که توان بیشتری در بروز تنوع ژنتیکی گندم را دارد استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: انگشت نگاری DNA، تنوع ژنتیکی ، گندم ، چند شکلی ، نشانگر مولکولی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: بهرامی بهنوش، ملکی‌زنجانی بهرام، عظیم‌خانی رقیه (۱۴۰۲) تشخیص ارقام گندم نان بر اساس انگشت نگاریDNA با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۲)، ۱۸۱-۱۹۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

گندم مهمترین محصول غله و رژیم غذایی ثابت، برای بیش از یک سوم جمعیت جهان می‌باشد و سهم عمده‌ای را در تامین پروتیین وکالری مورد نیاز دارد (Hallem et al. 2009). گندم (*Triticum aestivum*) یک ششم از اراضی زیر کشت در جهان را به خود اختصاص داده‌است، گندم هم از نظر سطح زیر کشت و هم از نظر مصرف، گسترده‌ترین محصول زراعی در جهان می باشد (Rajaram 2000). گندم هگزاپلویید از یک سری تلاقی‌های طبیعی بین دیپلوییدهای وحشی گندم اورارتو با ژنوم A، یک گونه بسیار نزدیک به (*Aegilops speltoiedes*) با ژنوم B و گونه (*Aegilops tauschii*) با ژنوم D حاصل شده است . اضافه شدن ژنوم D، اثر مهمی بر اهلی شدن گندم، سازگاری و کیفیت نهایی محصول داشته است (Aghaei 2007). گزینش والدی یکی از حیاتی‌ترین جنبه‌های به‌نژادی می‌باشد. به طور کلی هر چه والدین از نظر ژنتیکی ناهمگون‌تر باشند احتمال دستیابی به تفکیک متجاوز حاصل از یک تلاقی یا حداکثر هتروزیس در هیبرید F1 افزایش می‌یابد (Shahnejat Bushehri 2002). برای تشخیص و شناسایی ارقام از تکنیکی بنام انگشت نگاری DNA استفاده می‌شود که شامل استفاده از نشانگرهای مولکولی یا توالی‌های تکراری DNA برای ایجاد یک الگوی منحصر به فرد می‌باشد. این تکنیک اولین بار در سال ۱۹۸۴ توسط پروفسور سر الک جفری از دانشگاه لستر انگلیس ابداع شده‌است. وی در حین تحقیق بر روی ژن میوگلوبین دریافت که نواحی از ژن نقشی در سنتز پروتئین میوگلوبین ندارد و شامل نواحی غیر عادی از لحاظ بازهای نوکلئوتیدی بود که در آن این بازها چندین بار پشت سر

هم تکرار می‌شـوند وی این توالی‌ها را ماهوارک نامید. عجیب‌تر اینکه این توالی‌ها در هر فرد منحصـر به آن فرد بوده و با نسـبت مساوی از والدین به فرزندان منتقل می‌شود (Gupta and Varshney 2000). از کاربردهای انگشت نگاری DNA می‌توان به خالص سازی واریته‌ها، حفاظت از حقوق مالکیت ملی گیاهان بومی، بررسی تنوع ژنتیکی، طبقه بندی گیاهان، استفاده در بانک ژ ن و جلوگیری از تقلب در کارخانجات آرد و ماکارونی اشـاره نمود. بعد از شـناسـایی افراد می‌توان تنوع ژنتیکی آنها را محاسـبه نمود. آگاهی از میزان تنوع و فاصله ژنتیکی بین افراد در اصلاح نباتات از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است و از ارکان کشاورزی پایدار محسـوب می‌شـود (Mortazavian et al. 2005). به علاوه، اسـتفاده از تکنیک‌های مولکولی در سـال‌های اخیر جهت مطالعه موجودات بومی و حفاظت‌شـده، کاربرد گسـترده‌ای یافته اسـت (Askari et al. 2010; Mohammadabadi 2017). میزان اطلاعات به‌دسـت‌آمده از این تکنیک‌های ژنتیکی یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفـاوت‌هـای ژنتیکی بین جمعیـت‌هـاسـت (Alinaghizadeh et al. 2007; Mohammadifar et al. 2014; Mohammadifar and Mohammadabadi 2018). همچنین، مطالعه نژادهای مختلف با اسـتفاده از تکنیک‌های ملکولی بسـیار مهم و برای طبقه‌بندی آن‌ها مفید اسـت (Mohammadabadi et al. 2017; Gholamhoseini et al. 2018). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص با شد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای مختلف بسیار اهمیت دارد (Ghasemi et al. 2010; Gooki et al. 2019) تنوع ژنتیکی یک عنصر اساسی برای پیشـرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سـازگاری به شـرایط محیطی متغییر و مختلف می‌باشـد (Askari et al. 2008; Mohammadifar and Mohammadabadi 2011). فناوری RAPD یکی از روش‌هایی اسـت که به طور گسـترده در بررسی‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا قادر است اختلافات موجود بین گیاهان را در سطح DNA شناسایی نموده و در عین حال نیاز به اطلاعات قبلی از ژنوم مورد مطالعه ندارد. آغازگرهای RAPD به طور عمده از ده نوکلئوتید با توالی تصـادفی سـاخته شـده‌اند و به کمک واکنش PCR قطعاتی از ژنوم را تکثیر می‌نماید (Garcia et al. 2002). اسـتفاده از نشـانگرهای DNA برای توصـیف و شـناخت ژنوتیپ‌ها، برای کشـف راحت‌تر و صـحیح هیبریدهای داخل و بین گونه‌ای و نیز ایجاد حفظ انحصاری ارقام ضروری می‌باشد (Benedetti et al. 2000). می‌توان از نشانگر RAPD با وجود غیر اختصاصی بودن به دلیل سرعت و چند شکلی بالا در مطالعات بررسی تنوع ژنی در گندم دوروم بهره جست (Bousba et al. 2020).

مطالعات مشابهی در این زمینه صورت گرفته است از جمله در پاکستان انگشت نگاری DNA برخی ارقام گندم نان به منظور برآورد تنوع و تشـابه ژنتیکی بین ۹ ژنوتیپ گندم از ۲۵ آغازگر RAPD اسـتفاده شـده که ۱۸ آغازگر چند شـکلی نشـان داده و ۷ آغازگر الگوی تک شکلی نشان دادند. از ۱۷۵ نوار تشکیل شده ۶۰/۵۷ درصد چندشکلی نشان دادند و توانستند ژنوتیپ‌های گندم را در ۲ گروه طبقه‌بندی کنند (Asef 2005). در مطالعه دیگر ۱۰رقم دیپلوویید و تتراپلوویید گندم به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بوسیله آغازگر RAPD مورد آزمایش قرار گرفتند. در این مطالعه از بین ۸۷ آغازگر ۱۵ آغازگر که بیشـترین چند شـکلی را نشـان دادند انتخاب گردید. آغازگرها در مجموع ۱۴۰نوار تولید نمودند که ۱۰۴ نوار چند شـکل بودند (Aliyev et al. 2007). در پژوهشـی

دیگر، به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گندم نان از ۴ آغازگر RAPD و ۱۰ آغازگر ISSR و ۴۰ رقم گندم استفاده شده و نشان داده‌اند که میزان چند شکلی در ISSR با تشکیل ۹۲ نوار ۸۶/۷۹ درصد و در آغازگرهای RAPD با ۱۹نوار ۶۷/۸۵ درصد است. تجزیه واریانس مولکولی به خوبی تنوع بین گروه‌ها و درون گروه‌ها را نشان داده است. با توجه به این که بر اساس ماتریس تشابه هر دو نشانگر تنوع بسیار خوبی را نشان داده‌اند، این امر را نوید می‌دهد که بتوان با تلاقی ارقامی که شباهت کمی با هم دارند و انتخاب در نسل‌های در حال تفرق و انتخاب با روش‌های صحیح اصلاحی، انتخاب لاین‌های مناسب در جهت بهبود کمیت و کیفیت گندم را انجام داد (Rahmani et al. 2021). به علاوه، در مطالعه‌ای میزان تنوع ژنتیکی بدست آمده بین ارقام مختلف نان بوسیله دو نشانگر SSR و RAPD مقایسه شدند، که بر اساس نتایج به دست آمده میزان چند شکلی در آغازگرهای RAPD ۸۸ درصد و آغازگرهای SSR ۱۰۰درصد نشان داده شد، و میزان تشابه ژنتیکی بوسیله آغازگرهای RAPD ۸۸ درصد و آغازگرهای SSR ۸۵ درصد به دست آمد (Naghavi et al. 2004).

در مطالعه دیگری به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان از طریق صفات مورفولوژیک و نشانگر مولکولی SSR ۴۰ رقم گندم بوسیله ۱۰ آغازگر انتخابی بررسی شدند و نتایج بیانگر این بود که ۹ آغازگر چند شکلی قابل توجهی نشان دادند. برای مجموع ژنوتیپ‌ها ۳۱ نوار چند شکل با میانگین ۴/۳ نوار به ازای هر آغازگر مشاهده شد (Nazari and Abdolshahi 2013). در پژوهشی دیگر به منظور گروه‌بندی ارقام گندم نان و بررسی تطابق نتایج حاصل از داده‌های مورفولوژیک و نشانگر RAPD، آزمایشی بر روی ۱۳ ژنوتیپ گندم نان صورت گرفته است و داده‌های مورفولوژیک بر اساس ۱۶ صفت مرتبط با عملکرد از نتایج حاصل از آزمایشات مزرعه‌ای حاصل از ۱۰ بوته‌ی تصادفی بدست آمده است در بررسی RAPD با استفاده از ۱۷ آغازگر تصادفی ۴۵ نوار چند شکل به دست آمده است. تجزیه‌های آماری چند متغیره مولفه‌ها و مختصات اصلی و همچنین تجزیه کلاستر بر مبنای دورترین همسایه‌ها برای هر دو آزمایش انجام شده و مقایسه دو کلاستر بر اساس ضریب کوفنتیک، عدم همبستگی داده‌های مورفولوژیک و مولکولی را نشان داده است که علت آن می‌تواند تکثیر تصادفی نواحی هتروکروماتینی ژنوم در بررسی‌های مولکولی باشد. (Mortazavian et al. 2005). در پژوهش حاضر فرض بر این است که توالی های DNA قادر به تشخیص ارقام مختلف گندم از همدیگر می‌باشد و کارایی تشخیص هویت ارقام با استفاده از توالی DNA بیشتر از سایرین است. لذا، هدف از انجام این تحقیق شناسایی ارقام گندم ایرانی و قابلیت استفاده از نشانگر مولکولی RAPD در تعیین تنوع ژنتیکی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، استخراج، تعیین کیفیت و غلظت DNA: در این پژوهش ۴۲ رقم گندم نان در گلدان‌های پلاستیکی در محیط عاری از بیماری در گلخانه کاشته شدند و نمونه برداری در مرحله چند برگی و در شرایط استریل صورت گرفت. برگ‌های نمونه برداری شده بوسیله الکل۷۰ درصد استریل شدند و بعد از انتقال به فالکن‌های استریل به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز

درایرمدل SUBLIMATOR-VACO5 کمپانی ZIRBUS ساخت کشور آلمان قرار داده شدند و در دمای ۸۰ – درجه سلسیوس قرار گرفتند. پودر شدن نمونه‌ها بوسیله ازت مایع صورت گرفت و در نهایت استخراج DNA به روش (Prabhu et al. 1998) انجام شد. تعیین غلظت DNA استخراجی بوسیله نانو دراپ و تعیین کیفیت DNA استخراجی بر روی ژل آگارز صورت گرفت. به منظور هم غلظت نمودن تمام DNAهای استخراجی رقیق سازی نمونه‌ها انجام و غلظت نمونه‌ها به ۲۵ نانو گرم در میکرولیتر رسانده شد. در این مطالعه ۳۸ آغازگر RAPD استفاده گردید که بعد از آزمایشات اولیه ۲۰ آغازگر که الگوی نواربندی و چند شکلی بیشتری نشان دادند انتخاب شدند (جدول ۱). الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۵ و به مدت یک ساعت صورت گرفت. جهت رنگ آمیزی از اتیدیوم برماید استفاده گردید و نیز آشکارسازی ژل‌ها توسط دستگاه Gel Documentation انجام شد.

جدول ۱. لیست آغازگرهای RAPD منتخب در این پژوهش

Table 1. The list of selected RAPD primers in this research

Primer sequence توالی آغازگر	Primer name نام آغازگر
AGG GAA CGA G	RAPD57
CCA CAG CAG T	RAPD58
CCT GGG CCT A	RAPD63
GAG GGC GTG A	RAPD68
CAA TCG CCG T	RAPD11
AGC GAG CAA G	RAPD27
GTC CAC ACG G	OPB-08
CCT TGA CGC A	RAPD52
GGG TCG CAT C	TIBMBA07
CTT CGG TGT G	TIBMBB13
AGC GTG TCT G	OP-G04
CTG AGA CGG A	OP-G05
AGT CGT CCC C	OP-H05
GAA CAC TGG G	RAPD28
GAG CAC CAG G	RAPD69
GGT CTT CCC T	TIBMBC08
CCC AGT CAC T	OPO-05
AGG CCG GTC A	TIBMBB09
GTT CGC TCCC C	TIBMBD17
GTG GGA CCT G	TTBMBB14

اجزای PCR همراه با آغازگرهای RAPD: ۲۳ میکرولیتر Master mix، شـــامل ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer (۱x)، ۰/۵ میکرولیتر DNTP (۲۰۰µm)، ۱ میکرولیتر Primer (۲۰ng)، ۷۵ /۰ میکرولیتر $Mgcl_2$ (۱/۵Mm)، ۰/۱ میکرولیتر Taq polymerase (۰/۵U)، ۲ میکرولیتر DNA genomic (۲۵ ng)، ۱۸/۱۵ میکرولیتر آب بود.

تجزیه داده‌ها: به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (جدول ۲) پس از امتیازدهی نوارها به صـــورت صـــفر و یک، ماتریس تشابه به کمک ضریب تشابه جاکارد تشکیل و سپس تجزیه کلاستر به روش UPGMA با نرم افزار NTYSIS انجام شـد. تجزیه واریانس مولکولی (OMOVA) با اسـتفاده از نرم افزار GENALEX محاسـبه شـد. همچنین تجزیه به مختصـات اصلی (PCOA) برای نمایش فواصل بین نمونه‌ها بر اساس معیارهای فاصله و به حداکثر رساندن همبستگی خطی بین فواصل نمونه‌ای با استفاده از نرم افزار NTYSIS صورت گرفت.

جدول ۲ . اسامی و کد ارقام ایرانی و خارجی گندم

Table 2. The name and code of Iranian and foreign wheat cultivars

کد Code	نام رقم Cultivars name	کد Code	نام رقم Cultivars name
1	اترک atrac	42	خزر1 Khazar1
2	نیک نژاد niknezhad	43	ویریناک verinac
3	شهریار shahreyar	44	هامون hamoon
5	کویر kaver	45	پیشگام pishgam
6	روشن roushan	47	مغان2 Moghan2
8	هیرمند hyrmand	50	سبلان sabalan
9	شیرودی sheroudi	51	سپاهان sepahan
10	گلستان golestan	52	داراب2 Darab2
11	چناب chenab	53	کاوه kaveh
12	سایسون sayson	54	مهدوی mahdave
16	گاسکوژن gascogen	55	گاسپارو gasparo
19	آزادی azadi	56	دریا darya
20	الوند alvand	57	سیستان sistan
22	امید omid	58	آرتا arta
25	زاگرس zagros	59	اکبری akbari
29	فلات falat	60	بم bam
30	شاه پسند shahpasand	62	سالیاسون salyasonez
32	سرداری sardari	63	زرین zarrin
36	کرج3 Karaj3	66	بک کراس روشن بهاره Bac.roshan.sp
37	مغان1 Moghan1	67	بک کراس روشن زمستانه bc.roshan.winter
40	کرج1 Karaj1	68	آذر2 Azar2

نتایج و بحث

تجزیه واریانس مولکولی(AMOVA): نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (جدول۳) نشان داد که یک درصد از واریانس مربوط به واریانس بین جمعیت‌ها و ۹۹ درصد مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد، که نشان دهنده تنوع بالای بین ارقام مورد مطالعه می‌باشد. شایان ذکر است که هر دو جمعیت ایرانی و خارجی از گندم‌های هگزاپلوئید بودند و نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی تفاوت معنی داری را بین دو جمعیت نشان نداد که قابل انتظار بود. میانگین درجه تمایز ژنی نشان داد که درصد بالایی از تنوع کل مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها می‌باشد. نشانگر RAPD با وجود تکرار پذیری کم یکی از روش‌های مهم در تعیین تنوع ژنتیکی است (Simmons et al. 2007).

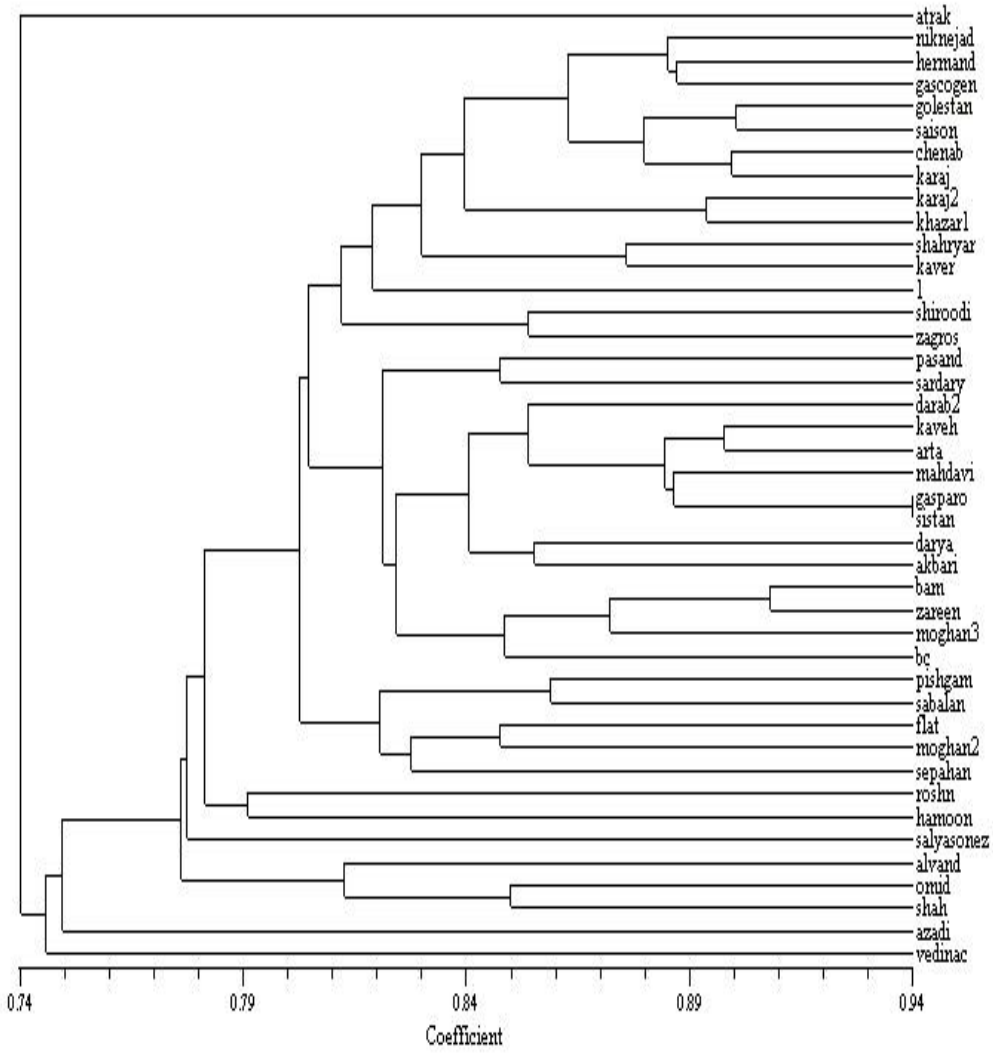
جدول۳. تجزیه واریانس مولکولی(AMOVA) ارقام گندم ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرRAPD

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) of Iranian and foreign wheat cultivars using RAPD marker

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	واریانس تخمینی Estimated variance	درصد واریانس Variation%
بین گروه‌ها (among groups)	1	15/582	15/582	0/158	1
درون گروه‌ها (within groups)	40	491/680	12/292	12/292	99
کل total	41	507/262		12/45	100

تجزیه خوشه ای: نتایج حاصل از تجزیه کلاستر (شکل۱) نشان داد که در خط برش ۰/۷۹ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در هفت گروه قرار گرفتند و هر کدام به زیر گروه‌هایی تقسیم شدند. ارقام سیستان و گاسپارو دارای بیشترین شباهت بودند و ارقام اترک، ویریناک، آزادی در گروه‌های جدا از هم قرار گرفتند. گروه اول (ویریناک) و دوم (آزادی) که هر دو جزو ارقام خارجی هستند و گروه سوم (بک‌کراس روشن زمستانه، امید، الوند) هر سه ارقام ایرانی هستند. گروه چهارم (سالیاسونز) که در گروه ارقام خارجی قرار دارد به تنهایی در یک گروه قرار گرفت. گروه پنجم هم شامل دو رقم ایرانی (هامون و روشن) بود. رقم هامون حاصل دورگ گیری روشن و فلات می‌باشد که به درستی در گروه پنجم قرار گرفت. گروه ششم که بزرگترین شاخه گروه را شامل می شود ۳۲ رقم (خارجی و ایرانی) را در بر می‌گیرد و اترک هم به تنهایی در گروه هفتم قرار گرفت. میزان تشابه بین ارقام گندم‌های نان در این بررسی بین ۰/۷۴ تا ۰/۹۴ درصد متغیر بود که نشان دهنده‌ی پایه ضعیف تنوع ژنتیکی در گندم‌های ایرانی می‌باشد. در بررسی مشابه میزان تشابه گندم‌های نان بین ۰/۷ تا ۰/۸۷ در صد متغیر بود که این میزان بالای تشابه با توجه به خودگشنی بالای گندم

توجیه پذیر است (Dashti et al. 2009). این نتایج با بررسی‌های (Abdollahi et al. 2003) و (Seyed Tabatabaei et al. 2001) و (Sofaliean et al. 2008) مطابقت دارد. با توجه به اینکه در نتایج حاصل از تجزیه کلاستر دو رقم سیستان و گاسپارو، با منشا جغرافیایی متفاوت بیشترین تشابه را داشتند می‌توان نتیجه گرفت که لزوما منشا جغرافیایی یکسان باعث ایجاد تشابه ژنتیکی بیشتر نمی‌شود که این با نتایج (Tagheizadeh 2011) مطابقت دارد.



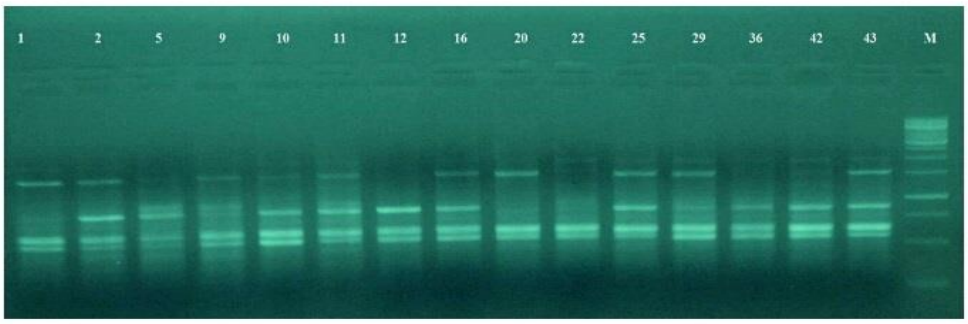
شکل ۱. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد برای ارقام ایرانی و خارجی گندم نان با استفاده از نشانگرRAPD

Figure 1. Cluster analysis with UPGMA method and Jaccard similarity coefficient for Iranian and foreign wheat cultivars using RAPD markers

توانایی تکثیر، چند شکلی و قدرت شناسایی و تفکیک نشانگر RAPD: از ۱۳۲ نوار تولید شده، ۸۸ نوار (۶۶/۶۷ درصد) چند شکلی نشان دادند که از ۲ تا ۸ نوار چند شکل برای هر آغازگر متغیر بود. تعدادی ازآغازگرها (,RAPD28

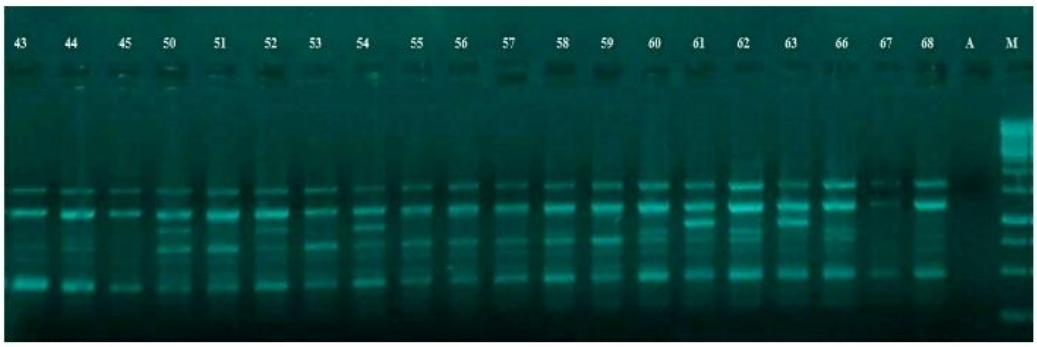
Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

(RAPD57, RAPD68, RAPD27, OPG04 توانستند صد در صد الگوی چند شکلی ایجاد نمایند و آغازگر OPG05 الگوی یک شکل نشان داد. از بین نوارهای چند شکل چندین الگوی منحصر به فرد به دست آمد که باعث شناسایی ارقام از بین سایرین شد. آغازگرهای TIBMBD17 و TIBMBB09 توانستند رقم اترک را از سایر ارقام تشخیص دهند. آغازگر RAPD68 توانست ارقام امید و آزادی را از سایر ارقام تشخیص دهد و آغازگر OPB08 توانست برای سه رقم چناب، سپاهان و سالیا سونز الگوی منحصر به فرد در بین ارقام ایجاد نماید. احتمالا می‌توان از نشانگر RAPD بر اساس انگشت نگاری DNA با درجه اطمینان بالا در تخمین تنوع ژنتیکی و تمایز ارقام استفاده نمود (Thomas et al. 2006).



شکل۲. الگوی باندی تکثیر شده توسط آغازگر RAPD63 برای برخی ارقام گندم ایرانی و خارجی

Figure 2. Banding pattern amplified by RAPD63 primer for some Iranian and foreign cultivars wheat

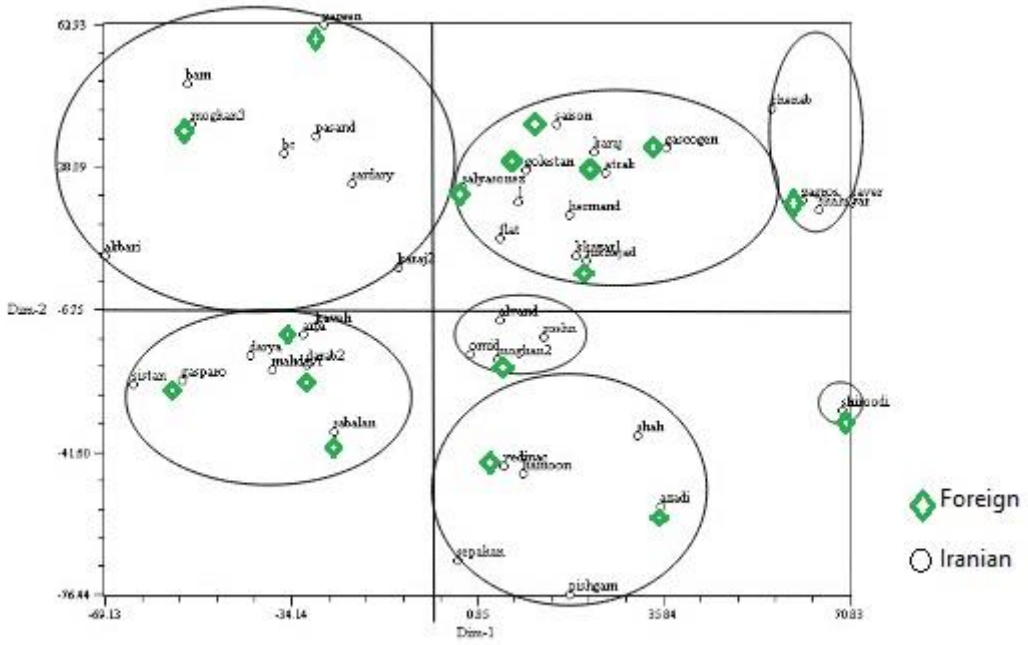


شکل ۳ . الگوی باندی تکثیر شده توسط آغازگر OPO05 برای برخی ارقام گندم ایرانی و خارجی M: نشانگر اندازه مولکولی 1kb(sinaclon) و A: کنترل منفی

Figure 3. Banding pattern amplified by OPO05 primer for some Iranian and foreign cultivars wheat. M:1kb ladder, A: Negative control

تجزیه به مختصات اصلی(PCoA): نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی (شکل۴) همانند تجزیه خوشه‌ای ارقام را در هفت گروه قرار داد. نتایج حاصل از مولفه‌های سه بعدی بیشتر شبیه نتایج تجزیه کلاستر بوده و آن را تایید نمود. در این تجزیه نیز دو رقم اترک و ویریناک در بیشترین فاصله نسبت به هم قرار گرفتند و ارقام ایرانی بیشتر به سمت چپ نمودار تمایل

دا شتند و باز هم ارقام ایرانی و خارجی در جمعیت‌های مخالف وارد شدند. چون ایران از مراکز تنوع گندم ا ست (Ozkan 2005) انتظار می‌رود تنوع بیشتر از آنچه در این پژوهش به د ست آمده در ژرم‌پلا سم گندم نان ایران وجود دا شته با شد. تنوع کم م شاهده شده احتمالا به دلیل کم بودن تعداد ارقام و نشانگرهای مورد بررسی می‌باشد. حفاظت و استفاده پایدار از منابع ژنتیکی، جهت تامین امنیت غذایی آینده، یک ضـرورت اسـت. در این بین، تکنیک‌های مولکولی توانسـته اند حفاظت و مدیریت منابع ژنتیکی گیاهی را خصوصا در زمینه اطلاعات مربوط به تنوع ژنتیکی، بهبود بخشند (Kmeswara 2004).



شکل ٤. تجزیه به مختصات اصلی(PCoA) ارقام ایرانی و خارجی گندم نان با استفاده از نشانگرهای RAPD
Figure 4. Principal Coordinate analysis (PCoA) for Iranian and foreign wheat cultivars using RAPD markers

نتیجه‌گیری: آغازگرهای TIBMBB09 و TIBMBD17 قادر به شنا سایی رقم اترک، آغازگر RAPD68 ارقام امید و آزادی و آغازگر OPB08 ارقام چناب، سـپاهان و سـالیاسـونز بود. با توجه به تجزیه واریانس مولکولی ۹۹ درصـد از واریانس کل مربوط به واریانس درون گروهی بود که تجزیه کلا ستر و تجزیه به مختصات ا صلی آن را تایید نمود. تجزیه به مختصات ا صلی و تجزیه کلا ستر نتوان ست به طور کامل ارقام ایرانی و خارجی را از هم تفکیک کند که این امر با توجه به قدمت ک شت ارقام خارجی در کنار ارقام ایرانی قابل توجیه می‌باشد. با توجه به میزان چند شکلی بالا و توانایی تفکیک ارقام در نشانگر RAPD می‌توان از آن در بررسـی‌های میزان تنوع ژنتیکی و تعیین هویت ارقام گندم اسـتفاده نمود. از گروه‌بندی‌های حاصـل از این پژوهش می‌توان در برنامه‌های تلاقی آینده به منظور بهره‌گیری از پدیده هتروزیس یا تفکیک متجاوز ا ستفاده نمود. می‌توان از جمعیت‌هایی که فا صله

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

ژنتیکی کمی با جمعیت مطلوب داشته باشند و واجد صفت مورد نظر نیز باشند به عنوان والد در تلاقی استفاده نمود. برای دستیابی به تنوع بیشـــتر می‌توان از تعداد بیشـــتری آغازگر RAPD اســـتفاده نمود و همچنین از آغازگرهای دیگری مثل SSR که توانایی تشخیص و چند شکلی بیشتری دارد استفاده کرد. از آنجایی که همه‌ی ارقام استفاده شده در این مطالعه هگزاپلوییید بودند، پیشنهاد می‌شـــود که برای بررســـی میزان توانایی نشـــانگر RAPD در تشـــخیص ارقام و تنوع بین آنها از ارقامی با پایه‌ی ژنتیکی متفاوت (تتراپلوییید و دیپلوییید) مثل گندم‌های دوروم هم اســـتفاده شـــود. از ارقام ویریناک، اترک و آزادی به عنوان والد در تهیه هیبریدها، در برنامه‌های اصلاحی استفاده گردد.

سپاسگزاری: از دانشگاه زنجان برای مساعدت های مالی و معنوی و از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

آقایی محمد جعفر، نقوی محمدرضا، امیدی منصور (۱۳۸۶) ارزیابی ژنوم D در توسعه سازگاری گندم نان. ژنتیک در هزاره سوم ۵، ۱۱۴۲-۱۱۳۴.

تقی‌زاده رضا (۱۳۹۰) بررسی تنوع ژنتیکی در دو گونه *Agropyron cristatum* و *Agropyron desertorum* بر اساس نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی RAPD . نشریه تحقیقات و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۱۹(۱)،۱۰۰-۸۵.

دشتی حسین، نقوی محمدرضا، شاه نجات بوشهری علی اکبر، شیرانی حسین (۱۳۸۸) بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم گندم با استفاده از نشانگرهای RAPD. مجله ژنتیک نوین ۴(۳)، ۵۵-۶۲.

سید طباطبایی بدرالدین ابراهیم، شاه نجات بوشهری علی اکبر (۱۳۸۰) ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گندم با نشانگرهایAFLP . مجله علوم کشاورزی ایران ۳۲(۲)، ۶۱۴-۶۰۷.

شاه نجات بوشهری علی اکبر (۱۳۸۲) مطالعه تنوع ژنتیکی سویا از طریق تجزیه و تحلیل RAPD وDAF. مجله علوم کشاورزی ایران ۳۴(۳)، ۶۳۳-۶۲۵.

عبداللهی مندولکانی بابک، سید طباطبایی بدرالدین ابراهیم، شاه نجات بوشهری علی اکبر و همکاران(۱۳۸۲) مطالعه روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های گندم (*T.aestivum*) با نشانگر RAPD . مجله علوم کشاورزی ایران ۳۴(۲)، ۴۵۴-۴۴۷.

عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۵۶-۴۹.

عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۷). تجزیه ژنتیکی جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره . مجله بیو تکنولوژی کشاورزی ۲ (۳)، ۴-۱.

محمدی فر آمنه، فقیه ایمانی سید علی، محمدآبادی محمد رضا، سفلایی محمد (۱۳۹۲) تأثیر ژن ۳TGFβ بر ارزش های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس. مجله بیو تکنولوژی کشاورزی ۵(۴)، ۱۳۶-۱۲۵.

محمدی فر آمنه، محمدآبادی محمد رضا (۱۳۹۰). کاربرد نشانگرهای ریزماهواره برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی. مجله علوم دامی ایران ۴۲(۴)، ۳۴۴-۳۳۷.

مرتضویان سید محمد مهدی، رامشینی حسینعلی، نقوی محمدرضا (۱۳۸۴) گروه‌بندی ارقام گندم نان بر اساس داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی نشانگر RAPD. چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، کرمان.

نظری مریم، عبدالشاهی روح اله (۱۳۹۳). بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان (*Triticum aestivum*) از طریق صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولیSSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱(۶)، ۲۳۱-۲۱۵.

References

Abdollahi Mandoulakani B, Sayed Tabatabaei BE, Shahnejat Bushehry AA et al (2003) study of relationships and genetic diversity of wheat (*T.aestivum*) cultivars and lines whit RAPD Markers. Iran J Agric 34 (2), 447-454 (In Persian).

Aghaei MJ, Naghavi MR, Omidi M (2007) Evaluation of D genome bread wheat in adaptation development. Genet 3rd Millenn 5, 1134-1142 (In Persian).

Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S (2007) Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (Bos indicus) using PCR-RFLP. Pakistan J Biol Sci 10 (23), 4291-4294.

Aliyev R, Aliabbasov M, Mammadov A (2007) Genetic Identification of Diploid and tetraploid Wheat species with RAPD markers. Genetic Resources Institute, and Institute of Botany, Azerbaijan Natl Acad Sci 31, 173-180.

Asif M, Rahman M, Zafar Y (2005) DNA fingerprinting studies of some wheat (*Triticum aestivum L)* genotypes using random amplified polymorphic and RAPD analysis. Natl Inst Biotech Genet Eng (2)37, 271-27.

Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2008) Analysis Of The Genetic Structure Of Iranian Indigenous Raeni Cashmere Goat Populations Using Microsatellite Markers. Biotech J 2 (3), 1-4. (In Persian).

Askari N, Baghizadeh A, MR Mohammadabadi (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 5 (2), 49-56 (In Persian).

Benedetti D, Burchi G, Mercuri A et al. (2000) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for the verification of hybridity in inter specific crosses of *Alstroemeria* Plant.Breed 119, 443-445.

Bousba R, Gueraiche S, Kanouni MR et al. (2020) Genotypic diversity assessment of some durum wheat (*Triticum durum*) genotype using RAPD analysis. Biodivers J Biol Divers (6), e21.

Dashti H, Naghavi MR, Shahnejat Bushehry AA, Shirani H (2009) Genetic diversity in a Germplasm of wheat using RAPD Marker. Modern Genet J 4 (3), 55-62 (In Persian).

Garcia MG, Ontivero M, Diaz Ricci JC, Castagnaro A (2002) Morphological Traits and highresolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties Cultivated in Argentina. Plant Breed 121, 76-80.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Abadi MRM (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Aust J Basic Appl Sci 4 (12), 5758-5760.

Gholamhoseini F, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M (2018) Polymorphism of the growth hormone gene and its effect on production and reproduction traits in goat. Iran J Appl Anim Sci 8 (4), 653-659.

Gooki FG, Mohammadabadi M, Fozi MA, Soflaei M (2019) Association of Biometric Traits with Growth Hormone Gene Diversity in Raini Cashmere Goats. Walailak J Sci Technol 16 (7), 499-508.

Gupta PK, Varshney RK (2000) The Development and use of microsatellite markers geneticanalysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica 113, 116-185.

Hallem SHM, Reham MA, Mohamed SMS (2009) Genetic analysis and RAPD polymorphism in some Durum wheat genotypes. Glob J Biotech and Biochem 4 (1), 1-9.

Kameswara Rao N (2004) Plant genetic resources advancing conservation and use through biotechnology. Afric J Biotech 3 (2), 136-145.

Mohammadabadi MR (2017) Inter-Simple Sequence Repeat loci Associations with Predicted Breeding Values of Body Weight in Kermani Sheep. Genet 3rd Millennium 14 (4), 4383-4390.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. J Res Develop 5 (2), e154.

Mohammadifar A, Faghih Imani SA, Mohammadabadi MR, Soflaei M (2014) The effect of TGFb3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. Agric Biotech J 5 (4), 125-136 (In Persian).

Mohammadifar A, Mohammadabadi M (2018) Melanocortin-3 receptor (MC3R) gene association with growth and egg production traits in fars indigenous chicken. Malays Appl Biol 47 (3), 85-90.

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. Iran J Anim Sci 42 (4), 337-344 (In Persian).

Mortazavian SMM, Ramshini HA, Naghavi MR (2005) Grouping bread cultivars based on Morphological and Molecular RAPD Markers. 4th interna Biotec congr of Islamic Republic of Iran kerman (In Persian).

Naghavi M, Mardi M, Ramshini H, Fazelinasab B (2004) Comparative analysis of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. Iran J Biotech 3 (2), 195-202.

Nazari M, Abdolshahi R (2013) Evaluation of genetic diversity in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum L.*) using morpho-physiological traits and SSR markers. Agric Biotech J 1 (6), 215-231 (In Persian).

Ozkan H, Brandolini A, Pozzi C et al. (2005) A reconsideration of the domestication of tetraploid wheats. Theor Appl Genet 110, 1052-1060.

Prabhu KV, Somers DS, Rakow G, Gugel RK (1998) Molecular marker linked to wheat rust resistance in mustard. Theor Appl Genet 97, 865-870.

Rahmani M, Rahimi M, Abdolinasab M, Maleki M (2021) Evaluation of genetic diversity of different bread wheat (*Triticum aestivum L*) varieties using molecular markers ISSR and RAPD. Iran J Biotech 34 (2), 248-262.

Rajaram S (2000) Adaptive traits related to terminal drought tolerance in hexaploid wheat (*tTriticum aestivum L.*) genotypes under field conditions. Crop Breed J 1(1), 57-65.

Sayed Tabatabaei BE, Shahnejat Bushehry AA (2001) Evaluation of Genetic variation among wheat cultivars using AFLP Markers. Iran J Agric 32 (2), 607-614 (In Persian).

Shahnejat Bushehry AA (2003) genetic diversity in soybean as determined by RAPD and DAF markers. Iran J Agric 34 (3), 625-633 (In Persian).

Simmons MP, Zang LB, Webb CT, Muller K (2007) A penalty of using anonymous markers (AFLP, ISSRs, RAPD) for phylogenetic inference. Mol Phylogenet Evol 42 (2), 528-542.

Sofalian O, Chaparzadeh N, Dolati M (2009) Genetic diversity in spring wheat landraces from northwest of Iran assessed by ISSR markers. Notulae Botanicae Horti Agrobotan Cluj-Napaco 37(2), 252-256.

Tagheizadeh R (2011) genetic diversity in two species *Agropyron cristatum* and *desertorum Agropyron* based on morphological and molecular RAPD markers. Iran J Rangel For Plant Breed Genet Res 19(1), 85-100.

Thomas G, Mohapatra T, Rao AR, Sharma RP (2006) Distinguishing Indian commercial wheat varieties using RAPD based DNA fingerprinting. Indian J Biotech 5(2), 200-206.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500