

ارزیابی تنوع مولکولی و روابط ژنتیکی و تعیین ساختار جمعیت ژرم‌پلاسِم نیشکر ایران با استفاده از نشانگر ریزماهوره

آتنا شادمهر^۱، حسین رامشینی^۲، مهرشاد زین‌العابدینی^{۳*}، مسعود پرویزی آلمانی^۴، محمدرضا غفاری^۵، علی ایزدی‌دربندی^۶، مریم فارسی^۶، محمود فولادوند^۶

۱. دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران
 ۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران
 ۳. استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
 ۴. استادیار گروه به‌نژادی، موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان، اهواز
 ۵. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران
 ۶. کارشناس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۲/۲۰)

Assessment of molecular diversity and genetic relationship and structure of Iranian sugarcane germplasm using microsatellite markers

Atena Shadmehr¹, Hossein Ramshini², Mehrshad Zeinalabedini^{3*}, Masoud Parvizi Almani⁴, Mohammad Reza Ghaffari⁵, Ali Izadi Darbandi⁵, Maryam Farsi⁶, Mahmoud Fooladvand⁶

1. Ph.D Student, Department of Agronomy & Plant Breeding, Agricultural College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, Agricultural College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Cane Development and Sidelong Industrial Research and Education Institute, Khuzestan, Ahvaz, Iran.
5. Associate Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, Agricultural College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran.
6. Laboratory Technician, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(Received: Dec. 18, 2016 - Accepted: Feb. 16, 2017)

Abstract

Considering the potential of sugarcane in terms of energy and sugar production the study of genetic diversity is the best way to use available genetic germplasm for breeding programs in this plant. Thirty microsatellite primer pairs were used to screen 160 varieties. In total 169 alleles were recorded with an average of 5.6 alleles per locus. The number of effective alleles per locus was ranged from 1.06 (locus AP-SSR03) to 1.921 (locus SMC119CG) with an average of 1.508. The PIC value was variable ranging from 0.06 (for AP-SSR03) to 0.5 (for SMC851MS). The principal coordinate analysis (PCoA) revealed six groups, so that the first three axes explained 15.20% of cumulative variation altogether. Clustering analysis was done using Neighbour-Joining algorithm and population structure analysis was performed using Bayesian method. The best number of sub-populations was identified as six. The grouping of genotypes in the sub-populations was not consistent with their geographic origins. The grouping obtained from Bayesian method, phylogenetic relatedness analysis results and principal coordinates analysis grouping showed good agreement with each other. Analysis of molecular variance revealed that variation within subgroups was significantly higher than that of among subgroups. So it will be better to do selection within populations in order to select suitable parents in sugarcane breeding programs. The knowledge obtained in this study would be useful for breeding programs to improve the conservation and management of this valuable genetic resource to meet the demand of sugarcane cultivation for sugar and bioenergy production.

Keywords: Cluster analysis, Microsatellite markers, Polymorphic information content, Population structure.

چکیده

با توجه به پتانسیل‌های موجود در گیاه نیشکر از لحاظ تولید انرژی و قند، بهترین راه برای استفاده از ظرفیت‌های موجود در گیاه نیشکر، بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط‌های موجود جهت به‌کارگیری در برنامه‌های به‌نژادی می‌باشد. با مطالعه ۳۰ جفت آغازگر ریزماهوره روی ۱۶۰ واریته نیشکر، ۱۶۹ آلل، با میانگین ۵/۶ آلل برای هر آغازگر حاصل شد. تعداد آلل مؤثر بین ۱/۰۶ برای مکان ژنی AP-SSR03 و ۱/۹۲۱ در مکان ژنی SMC119CG با میانگین ۱/۵۰۸ آلل برآورد شد. میزان محتوای چند شکلی آغازگرها بین ۰/۰۶ (برای جایگاه AP-SSR03) تا ۰/۵ (برای جایگاه SMC851MS) متغیر بود. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)، ۶ گروه را مشخص نمود، به طوری که سه مولفه اول ۱۴/۸۶ درصد از واریانس کل را توجیه می‌نمایند. تجزیه خوشه‌ای با روش مبتنی بر فاصله Neighbour-Joining و تجزیه ساختار جمعیت با روش مبتنی بر مدل Bayesian انجام شد. بهترین تعداد زیر جمعیت ۶ عدد شناسایی شد، که در اکثر زیرجمعیت‌ها افراد بر اساس مناطق جغرافیایی از یکدیگر تفکیک نشدند. نتایج گروه‌بندی حاصل از روش مبتنی بر مدل Bayesian، ارتباط فیلوژنی و تجزیه به مختصات اصلی با هم مطابقت زیادی نشان دادند. نتایج واریانس ژنتیکی نشان داد که تنوع افراد درون جمعیت‌ها بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها می‌باشد. بنابراین در برنامه‌های اصلاحی نیشکر به منظور انتخاب والدین مناسب، انتخاب درون جمعیت‌ها می‌تواند انجام شود. اطلاعات به دست آمده در مطالعه حاضر، در برنامه‌های به‌نژادی به منظور حفاظت و مدیریت چنین مجموعه ژنتیکی با ارزشی در جهت کشت نیشکر برای استفاده از قند و انرژی زیستی، مفید می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، ساختار جمعیت، محتوای اطلاعات چند شکل، نشانگر ریزماهوره.

مقدمه

نیشکر (*Saccharum spp*) گیاهی تک لپه و چند ساله متعلق به خانواده غلات (*Poaceae*) و قبیله (*Andropogonea*) بوده و از گیاهان مهم صنعتی و تولید کننده حدود ۷۵٪ شکر جهان می باشد (Henry and Kole 2010). این گیاه به دلیل قابلیت تولید بالای آن، (بیش از ۶۳ میلیون تن تولید جهانی شکر) در سال های اخیر نه تنها به عنوان منبع شکر بلکه در تولید سوخت های زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Tew and Cobill, 2008). نیشکر به عنوان گیاهی C₄ یکی از کارآمدترین گیاهان در تبدیل انرژی خورشیدی به انرژی شیمیایی در طی فتوسنتز می باشد (Aragón et al., 2009; Rae et al., 2009). ارقام زراعی جدید نیشکر حاصل تلاقی بین گونه ای گونه اهلی *Saccharum officinarum* (2n=80, X=10) (گونه ای با میزان قند بالا و فیبر کم) و گونه وحشی *Saccharum spontaneum* (2n=40-128, X=8) (دارای مقاومت به تنش های زنده و غیر زنده) می باشند (Daniels and Roach 1987). ژنوتیپ های جدید نیشکر به صورت پلی پلوئید و از نوع آنیوپلوئید بین گونه ای با آلل های متعدد در هر مکان ژنی می باشند، به طوریکه محدوده کروموزوم آنها بین ۱۰۰ تا ۱۳۰ عدد می باشد. علاوه بر این، جنس ساکاروم دارای شش گونه مجزا شامل دو گونه وحشی *S. spontaneum* و *S. robustum* و چهار گونه اهلی *S. officinarum*، *S. barberi*، *S. sinense* و *S. edule* می باشد که با شرکت در تلاقی بین گونه ای تشکیل کمپلکس ساکاروم را می دهند (Roach and Daniels, 1987). پیچیدگی ژنوم نیشکر، برنامه های اصلاحی آن را جهت تولید قند و انرژی مشکل ساخته است. با توجه به آنکه ارقام اصلاح شده حاصل تلاقی هستند، بنابراین ارزیابی و آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی در ذخایر توارثی این گیاه، به عنوان یکی از ابزارهای اساسی و بسیار دقیق در اصلاح ترکیب ژنتیکی ارقام اصلاحی و تجاری بسیار مهم است. ژنوتیپ هایی که تاکنون در برنامه های

اصلاحی استفاده شده اند، کلون های محدودی از گونه های فوق با پایه ژنتیکی محدود بوده اند (Lima et al., 2002). لذا تعیین تنوع ژنتیکی بین رقم های اهلی و منابع ژنتیکی موجود، به منظور بهره برداری و بهبود منابع تولید انرژی و قند، ضروری می باشد. در صورت دستیابی به مجموعه ژرم پلاسما با تنوع ژنتیکی زیاد، به نژادگران قادر به گسترش پایه ژنتیکی لاین های والدی بوده و سبب تسهیل یافته های ژنتیکی در ارقام زراعی تولید کننده انرژی و قند می شود.

مرکز ذخایر ژنتیکی نیشکر ایران واقع در موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی اهواز، حدوداً دارای ۳۶۰ واریته نیشکر می باشد که طی سالیان دراز از ۱۸ کشور مختلف جمع آوری شده اند. واریته های فوق ۱۱۰ تا ۱۲۰ کروموزوم دارند و به صورت اکتاپلوئید می باشند. مرکز فوق، می تواند حاوی تنوع ژنتیکی قابل توجه و آلل های با ارزش مرتبط با صفات متعدد مورفولوژیک، سازگاری با تنش های زیستی و غیر زیستی و بسیاری از صفات مرتبط با کیفیت عملکرد قند و ساقه باشد. تلاقی های بین والدی در نیشکر سبب بهبود عملکرد ساقه و میزان قند شده است، لذا آگاهی از تنوع ژنتیکی والدین در تلاقی ها نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه های اصلاحی نیشکر ایران دارد. علیرغم اهمیت زیاد کلکسیون موجود برای اصلاح گیاه نیشکر در ایران، تا کنون مطالعه جامعی در خصوص تنوع ژنتیکی و تعیین ساختار ژنتیکی این مجموعه انجام نشده است. هرچند می توان از صفات مورفولوژیک برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده کرد اما نشانگرهای مولکولی به دلیل وراثت پذیری صد درصد در این زمینه از دقت بالاتری برخوردار هستند. نشانگرهای مولکولی به طور گسترده ای به منظور بررسی تنوع، نقشه یابی صفات ژنتیکی، مطالعات پیوستگی و انتخاب به کمک نشانگر استفاده می شوند (Varshney et al., 2005). تنوع ژنتیکی ارقام زراعی نیشکر با استفاده از روش های مختلف

واریته از ژرمپلاسم نیشکر با استفاده از ۳۰ جفت نشانگر ریزماهواره به منظور آگاهی از تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت کلکسیون موجود و ۲- تعیین روابط ژنتیکی میان هیبریدهای نیشکر، به منظور حفاظت، مدیریت و استفاده بهینه از ژرمپلاسم موجود در برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

در مطالعه حاضر از ۱۶۰ واریته نیشکر واقع در مزرعه‌ی موزه ارقام نیشکر از موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی اهواز استفاده شد (جدول ۱). نمونه‌گیری از برگ‌های جوان صورت گرفت و بعد از قرار دادن در کیسه‌های پلاستیکی و بر روی یخ، به آزمایشگاه منتقل و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. DNA ژنومی از ۲۵۰ میلی‌گرم پودر برگ خرد شده در ازت مایع به روش CTAB تغییر یافته استخراج شد (Porebski *et al.*, 1997). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتر مدل ND-1000 بررسی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، نمونه‌های DNA به غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره از ۳۰ جفت آغازگر SSR استفاده شد (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی در حجم ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۱/۵ میکرولیتر بافر (NH₄)₂SO₄ بدون MgCl₂ با غلظت 10X (مواد داخل بافر شامل ۷۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C)، ۲۰۰ میلی‌مولار (NH₄)₂SO₄، ۰/۱ درصد Tween 20 بود)، ۰/۹ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۱/۲ میکرولیتر از

مولکولی همچون RFLP^۱ (Besse *et al.*,)
RAPD^۲ (Nair *et al.*, 2002)، AFLP^۳ (1997)
ISSR^۴ (Aitken *et al.*, 2005) Virupakshi)
SRAP^۵ (Li and Quiros) (and Naik, 2008)
TRAP^۶ (Alwala *et al.*, 2006) (2001)
GISH^۷ (D Hont *et al.*, 2002) (2002)
gSSR^۸ (D'Hont *et al.*, 1996) (Aitken *et al.*,)
EST-SSR^۹ (Cordeiro *et al.*,) (2005)
ارزیابی شده است. در بین تمام تکنیک‌های مولکولی، نشانگرهای ریزماهواره به دلیل داشتن خصوصیتی همچون وراثت همباز، فراوانی و تکرارپذیری بالا، چندشکلی زیاد، قابلیت انتقال به گونه‌های خویشاوند، توزیع در نواحی مختلف ژنوم (در هر دو نواحی رمزکننده^{۱۱} و غیر رمزکننده^{۱۲})، ماهیت چند آلی و پوشش وسیع ژنومی به‌طور گسترده‌ای به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی استفاده می‌شوند (Haq *et al.*, 2014). همچنین سهولت آشکارسازی و تشخیص آنها به وسیله کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با دو آغازگر اختصاصی که از روی نواحی مجاور ریزماهواره‌ها طراحی می‌گردد، از دیگر مزایای آنها می‌باشد (Sharma *et al.*, 2014). استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در نیشکر در مواردی همچون ارزیابی ژرمپلاسم (Liu *et al.*,) (2011)، نقشه‌یابی QTL و بهبود نقشه ژنتیکی (Andru *et al.*, 2011) گزارش شده است.

هدف از تحقیق حاضر ۱- ارزیابی ژنوتیپی ۱۶۰

1. Restriction fragment length polymorphism
2. Random amplified polymorphic DNA
3. Amplified fragment length polymorphism
4. Inter simple sequence repeats
5. Sequence-related amplified polymorphism
6. Target region amplification polymorphism
7. Genomic in situ hybridization
8. Fluorescence in situ hybridization
9. Genomic simple sequence repeats
10. Expressed sequence tag-SSR
11. Coding
12. Non-coding
13. Flanking region

هر کدام از آغازگرهای (۱۰ میکرومولار) رو به جلو و کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار و در نهایت با ۶/۴ عقب، ۱/۵ واحد آنزیم تک پلیمرز، ۰/۶ میکرولیتر از

جدول ۱. مشخصات ۱۶۰ واریته نیشکر استفاده شده در مطالعه حاضر

مرکز	نام	کد	مرکز	نام	کد	مرکز	نام	کد	مرکز	نام	کد	مرکز	نام	کد
اصلاح	واريته	اصلاح	اصلاح	واريته	اصلاح	اصلاح	واريته	اصلاح	اصلاح	واريته	اصلاح	اصلاح	واريته	اصلاح
USA	CP45-3	129	USA	CP62-58	97	India	CO-6305	65	Cuba	C266-70	33	Barbados	BL-4	1
USA	CP68-1026	130	USA	CP62-258	98	India	CO-997	66	Cuba	C86-456	34	Barbados	B44-227	2
USA	CP70-1133	131	USA	CP56-69	99	India	CO-785	67	Cuba	C111-79	35	Barbados	B80-250	3
USA	CP72-355	132	USA	CL26-80	100	India	B01-411	68	Cuba	C86-165	36	Barbados	B991-037	4
USA	CP72-370	133	USA	CP63-588	101	India	CO-842	69	Cuba	C89-147	37	Barbados	B41-27	5
USA	CP64-388	134	USA	CP72-1632	102	India	CO-6806	70	Cuba	C90-969	38	Barbados	B42-231	6
USA	CP68-1045	135	USA	CP67-411	103	India	COLK-8102	71	Cuba	C90-469	39	Belize	BBZ86-1886	7
USA	CP73-1225	136	USA	CP04 1566	104	India	CO-6415	72	Cuba	C323-68	40	Brazil	SP70-1143	8
USA	CP57-526	137	USA	CP66-346	105	India	COS-767	73	Cuba	C87-51	41	Cuba	C88-385	9
USA	CP69-373	138	USA	CP65-350	106	IRAN	IRC99-1	74	Cuba	C86-56	42	Cuba	C86-531	10
USA	CP70-194	139	USA	CL61-5	107	IRAN	IRC99-2	75	Cuba	C89-176	43	Cuba	C86-156	11
USA	CP61-84	140	USA	CP59-73	108	Jamaica	BJ82 100	76	Cuba	C88-389	44	Cuba	C90-530	12
USA	CP74-1119	141	USA	CP75-360	109	Jamaica	BJ97-19	77	Dominican Republic	BR98-006	45	Cuba	C85-102	13
USA	CP74-383	142	USA	CP65-1083	110	Jamaica	BJ93-15	78	Dominican Republic	BR98-006	46	Cuba	C89-176	14
USA	CP60-23	143	USA	CP67-424	111	Jamaica	BJ97-01	79	Dominican Republic	BR04-006	47	Cuba	C90-501	15
USA	CP61-37	144	USA	CP65-392	112	Jamaica	BJ97-29	80	Dominican Republic	BR97-1004	48	Cuba	C85-416	16
USA	CP72-1312	145	USA	CP63-306	113	Jamaica	BJ97-36	81	Dominican Republic	BR00-01	49	Cuba	C88-381	17
USA	CP74-2005	146	USA	CP70-401	114	Jamaica	BJ97-20	82	Dominican Republic	BR04-002	50	Cuba	C86-251	18
USA	CP71-1194	147	USA	CL35-76	115	South Africa	NCO-310	83	Dominican Republic	BR95-016	51	Cuba	C86-392	19
USA	CP36-105	148	USA	CP70-1134	116	USA	CL61-62	84	Dominican Republic	BR04-003	52	Cuba	C290-73	20
USA	CP74-385	149	USA	CP67-412	117	USA	CL58-37	85	India	B04-1020	53	Cuba	C88-393	21
USA	CP66-1079	150	USA	CP73-1030	118	USA	CP36-13	86	India	CO-1321	54	Cuba	C88-380	22
USA	CP69-1059	151	USA	CP56-63	119	USA	CP73-1547	87	India	CO-421	55	Cuba	C568-75	23
USA	CP65-357	152	USA	CP54-307	120	USA	CP71-1194	88	India	CO-285	56	Cuba	C85-403	24
USA	CP62-374	153	USA	CL54-336	121	USA	CL54-405	89	India	CO-853	57	Cuba	C86-12	25
USA	CP00-2180	154	USA	CP44-101	122	USA	CP66-491	90	India	CO-331	58	Cuba	C389-52	26
USA	CP68-1158	155	USA	CP55-30	123	USA	CP31-294	91	India	COK-32	59	Cuba	C88-357	27
USA	CP04-1935	156	USA	CP56-59	124	USA	CP61-64	92	India	CO-775	60	Cuba	C122-80	28
USA	CP48-103	157	USA	CP52-68	125	USA	CP70-1527	93	India	CO-407	61	Cuba	C86-503	29
USA	CP73-21	158	USA	CP43-306	126	USA	CP70-13	94	India	B01-424	62	Cuba	C132-81	30
USA	CP69-1062	159	USA	CL59-1052	127	USA	CL73-239	95	India	CO-740	63	Cuba	C2180-80	31
USA	CP57-614	160	USA	CP36-111	128	USA	CP68-1154	96	India	CO-975	64	Cuba	C85-102	32

نیز اضافه شد. دمای اتصال هر آغازگر به طور جداگانه و با استفاده از سایت IDT¹ با توجه به توالی رفت و برگشت هر آغازگر و غلظت dNTP و کلرید منیزیم استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر اساس میلی مولار، محاسبه شد. آشکارسازی باندها و تفکیک محصولات تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید^۲ و اسرشته‌ساز ۶ درصد انجام شد و رنگ‌آمیزی با استفاده از روش نیترات نقره بر اساس دستور کار Bassam و همکاران (۱۹۹۱) صورت گرفت.

چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی که به صورت Touchdown برنامه‌ریزی شده بود، به این صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و در هر چرخه دور اول با کاهش یک درجه دما، به دمای اتصال واقعی رسید. در ۲۵ چرخه بعد دمای اتصال ثابت (بسته به دمای اتصال آغازگر) و با زمان ۳۰ ثانیه انجام شد، در هر چرخه، زمان و دمای واسرشته‌سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه و همچنین زمان و دمای بسط رشته نیز به ترتیب ۱ دقیقه و ۷۲ درجه در نظر گرفته شد. یک مرحله تکثیر نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه

1. Integrated DNA Technologies
2. PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis)

جدول ۲. جفت آغازگرهای SSR و مشخصات آنها برای تعیین ساختار ژنتیکی واریته‌های نیشکر

نام آغازگر	توالی رفت 3' → 5'	توالی برگشت 3' → 5'	محل کروموزومی	موتیف
MSSCIR66	AGG TGA TTT AGC AGC ATA	CAC AAA TAA ACC CAA TGA	Not available	(GT)43GC (GT)6
MSSCIR43	ATT CAA CGA TTT TCA CGA G	AAC CTA GCA ATT TAC AAG AG	Chr 04	(GT)3(AT)2(GT)29
MSSCIR74	GCG CAA GCC ACA CTG AGA	ACG CAA CGC AAA ACA ACG	Not available	(CGC)9
SMC24DUQ	CGC AAC GAC ATA TAC ACT TCG G	CGA CAT CAC GGA GCA ATC AGT	Not available	(TG)13
SMC278CS	TTC TAG TGC CAA TCC ATC TCA GA	CAT GCC AAC TTC CAA ACA GAC T	Not available	(TG)19 (AG)25
SMC31CUQ	CAT GCC AAC TTC CAA TAC AGA CT	AGT GCC AAT CCA TCT CAG AGA	Not available	(TC)10 (AC)22
SMC851MS	ACT AAA ATG GCA AGG GTG GT	CGT GAG CCC ACA TAT CAT GC	Not available	(AG)29
SMC119CG	TTC ATC TCT AGC CTA CCC CAA	AGC AGC CAT TTA CCC AGG A	Chr 04	(TTG)12
SMC336BS	ATT CTA GTG CCA ATC CAT CTC A	CAT GCC AAC TTC CAA ACA GAC	Chr 09	(TG)23(AG)19
SMC1604SA	AGG GAA AAG GTA GCC TTG G	TTC CAA CAG ACT TGG GTG G	Chr 03	(TGC)7
SMC703BS	GCC TTT CTC CAA ACC AAT TAG T	GTT GTT TAT GGA ATG GTG AGG A	Chr 10	(CA)12
SOMS120	GCATCTATCGGCTCTCTGG	ATCCAATCCTTCATCTTCTTC	Chr 02	(GAG)6ctctga... (GTGA)6(GA)11
SOMS118	GAGGAAGCCAAGAAGGTG	TAGAGCGAGGAGCGAAGG	Chr 09	(AT)9cacca...(A)12
SCM18	GTGCGAGAGGAACCTGTGT	AGCCCTGCCTAACCAAGGA	Chr 06	(ATAC)3
SCM32	GATGAAGCCGACACCGAC	AGTTGCCTGTCCCATTT	Chr 07	(TCG)4
SCM4	CATGTTCTGTGCTTCTCT	CCGTTTCCCTTCCTTCCC	Chr 04	(CGGAT)4
SCM16	GTGCGAGAGGAACCTGTGT	AGCCCTGCCTAACCAAGGA	Chr 08	(TCCG)4
SCC82	CTATCCCATCCCGAATAA	CCGACTTGAACACCAACAG	Chr 07	CTC(10)
SCC89	AGTGTGCGAGAAGCAGCAG	CCCATGGATCAGATGACAGA	Chr 03	CCT(9)
SCC93	AATCCACGCCCGATGAT	AGCCACACCTTGACCTTGAC	Chr 03	GCA(9)
UGSM665	GTTACCATCCCATCCAC	TGTCCCTCGTTACAGAC	Chr 04	(CAC)6
UGSM575	CTGTTTCTCTCTCTCTCT	CAATCATAGCCAGACACC	Chr 09	(AGC)6
UGSM585	GAAGAGGAGGAGAGGAGAAG	TGGGATGTTGTTGACTG	Chr 02	(CGT)6
UGSM60	CGACTCCACACTCCACTC	CCGAACACCACCTTCTTG	Chr 02	(CGA)7
UGSM667	CTATCCTCTTGTGGGTCT	TCCGCACCTCGTTTACC	Not available	(CTC)6
UGSM574	GCTTCTCTCTCTCTCTCT	TACTTCTACCTCGTCTGCTTC	Not available	(ACG)6
UGSM193	AGATATAACACACACACACAAA	GGCCATCGAGGAGGTTCAAG	Chr 02	(GA)8
UGSM681	ACACATCGCTTTCCACA	GCATACCTGTCTGCTCT	Chr 01	(AC)8
UGSM542	ACCTCCACTCCACCTCAGTTC	CGTTCAGCTCAGGGTGTCTGAT	Chr 10	(GA)9
AP-SSR03	TGGAAGTATGTGAGCAATCTGG	CTAATCGAAGGACAATGGAACC	Not available	(GCT)4

تجزیه‌های آماری

میزان اطلاعات چندشکلی^۱ آغازگرها با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2$ محاسبه شد، به طوری که P_i فراوانی آلل i ام و n تعداد آلل‌ها در آن جایگاه ژنی می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای (کلاستر) با استفاده از نرم‌افزار DARwin 6.0 (Perrier *et al.*, 2003) انجام شد. برای این منظور ابتدا یک ماتریس فاصله (عدم شباهت: dissimilarity) با در نظر گرفتن ضریب تشابه Dice تشکیل شد و سپس ماتریس فاصله برای رسم درخت فیلوژنی با الگوریتم Neighbor-Joining با ۵۰۰ تکرار Bootstrap با استفاده از نرم‌افزار DARwin، استفاده شد. به علت مختلف بودن محل اصلاح واریته‌های مورد بررسی و تعداد نسبتاً زیاد آن‌ها (بیش از ۱۰۰ واریته)، از الگوریتم Neighbor-Joining با توجه به مزایای آن از قبیل انتخاب نزدیکترین و مناسبترین همسایه‌ها،

محصولات تکثیرشده حاصل از نشانگرهای ریزماهواره، بر اساس وجود باند (۱) و عدم وجود باند (۰) برای هر جفت آغازگر اختصاصی به منظور تشکیل ماتریس دوتایی کد گذاری شدند. به دلیل سطح پلی‌پلوئیدی گیاه نیشکر و هیبرید بودن واریته‌های مورد بررسی و دارا بودن سری‌های کروموزومی متعدد، باندهای مشاهده شده از نشانگرهای ریزماهواره به صورت یک نشانگر غالب امتیازدهی شدند. شاخص‌هایی همچون تعداد آلل‌ها در هر جایگاه ژنی، فراوانی آللی، درصد باندهای چندشکل، شاخص اطلاعات شانون و هتروزیگوسیتی مشاهده شده (تنوع ژنی) با استفاده از نرم‌افزارهای Popgene 1.32 (Yeh and Boyle, 1997) و GenA1Ex 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) محاسبه شدند.

1. PIC (Polymorphism Information Content)

(Cordeiro *et al.* 2000)، بنابراین آغازگرهای دارای تعداد آلل زیاد، برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب تر و کارآمدتر می باشند. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود، با توجه به میزان اطلاعات چند شکلی و تعداد آلل، آغازگرهای SMC119CG، MSSCIR43، SMC851MS، SMC278CS، MSSCIR66، SMC336BS، SCC82 و UGSM60 و UGSM574 به منظور بررسی تنوع ژنتیکی مناسب می باشند. همچنین از جدول ۳ نتیجه گیری می شود که ارتباط خاصی بین افزایش تعداد آلل و میزان اطلاعات چند شکلی وجود ندارد، به عنوان مثال بالاترین میزان اطلاعات چند شکلی (۰/۵۰۰)، مربوط به آغازگر SMC851MS با ۴ آلل شناسایی شده می باشد.

با توجه به میزان اطلاعات چند شکلی هر آغازگر مندرج در جدول ۳، مشاهده می شود که آغازگرهای SMC851MS، SMC119CG و UGSM574 و UGSM60 بهتر از سایر آغازگرهای استفاده شده، توانسته اند فاصله ژنتیکی واریته ها را مشخص کنند، در حالی که آغازگر AP-SSR03 با کمترین مقدار شاخص چندشکلی به خوبی توانایی جداسازی واریته ها را نداشته است. Nayak و همکاران (۲۰۱۴)، با مطالعه ۳۶ جفت آغازگر ریزماهوره بر روی کلکسیون نیشکر در میامی امریکا (۱۰۰۲ نمونه نیشکر)، ۲۰۹ آلل با میانگین ۵/۸ آلل برای هر آغازگر و میزان اطلاعات چند شکلی برابر با ۰/۲۵۶ را گزارش نمودند. در مطالعه دیگری You و همکاران (۲۰۱۳)، ۱۱۵ توده نیشکر را با ۵ آغازگر ریزماهوره بررسی و در مجموع ۸۸ آلل با میانگین ۱۷/۶ آلل در هر جایگاه ژنی و میزان اطلاعات چند شکلی برابر با ۰/۸۳۷ گزارش نمودند. دلیل متفاوت بودن میانگین میزان اطلاعات چند شکلی در مطالعات مختلف، می تواند به علت تفاوت در جفت آغازگرهای مورد استفاده (تفاوت در توالی نوکلئوتیدی و اندازه آغازگر) و نوع DNA الگو (متفاوت بودن واریته های استفاده

سرعت بالای آن در محاسبه با در نظر گرفتن تکرار Bootstrap برای داده های زیاد و عدم فرض نرخ تکاملی یکسان بین تبارهای مختلف، استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی^۱ (PCoA) بر اساس ماتریس فاصله با استفاده از نرم افزار GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) انجام شد. ساختار جمعیت و تعداد زیرجمعیت ها در نمونه های مورد بررسی با استفاده از آنالیز بایسین^۲ و نرم افزار 2.3.4 Structure (Pritchard *et al.*, 2000) تعیین شد. برنامه با فرض اینکه مدل تبار^۳ از نوع مخلوط^۴ و مدل فراوانی آللی از نوع پیوسته^۵ باشد، اجرا شد. تعداد زیر جمعیت ها (K) از ۱ تا ۱۰ و با ۳ تکرار در نظر گرفته شد، و در مجموع ۳۰ مرحله ران^۶ شد. صحیح ترین تعداد K بر مبنای $\ln P(D)$ (ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت ها) عدد ۶ به دست آمد (Evanno *et al.*, 2005).

نتایج و بحث

در مجموع ۱۶۹ آلل با میانگین ۵/۶ آلل برای هر آغازگر در این آزمایش تولید شد. تعداد آلل برای هر آغازگر از ۲ (برای آغازگرهای SOMS120، SMC4، AP-SSR03) تا ۸ (برای آغازگرهای MSSCIR 43، SMC31CUQ، SOMS118 (SCM32، SCM16، UGSM585، UGSM574) مشاهده شد (جدول ۳). محتوای اطلاعات چند شکلی آغازگرها از ۰/۰۶۰ (AP-SSR03) تا ۰/۵۰۰ (SMC851MS) با میانگین ۰/۳۱۵ به دست آمد (جدول ۳). با توجه به آنکه میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریزماهوره، توانایی هر مکان ژنی برای تخمین میزان تنوع ژنتیکی را نشان می دهد

1. Principal coordinate analysis
2. Bayesian
3. Ancestry model
4. Admixture
5. Correlated
6. Run

آغازگرهای مطالعه حاضر به ترتیب ۱/۵۶۵ و ۰/۳۲۹ و ۰/۴۹۴ برآورد شد. شاخص تنوع شانون، بیانگر میزان چند شکلی بین واریته‌هاست. نتایج به دست آمده (جدول ۳)، بیانگر آن است که آغازگرهای SMC119CG و UGSM574 و SMC851MS با دارا بودن بالاترین میزان تنوع ژنی، و با توجه به اهمیت سطح هتروزیگوسیتی ژنتیکی و تنوع ژنی در برنامه‌های اصلاحی نیشکر به منظور انتخاب والدین مناسب برای تلاقی، کارایی بالایی در بررسی های تنوع ژرم‌پلاسما نیشکر دارند.

شده) باشد. تعداد آلل مؤثر از ۱/۰۶۵ (AP-SSR03) (کمترین تعداد) تا ۱/۹۲۱ (SMC119CG) (بیشترین تعداد) متغیر بود. در مطالعه حاضر، بیشترین میزان تنوع ژنی (هتروزیگوسیتی مورد انتظار) برابر ۰/۴۷۹ و کمترین میزان آن ۰/۰۶۰ بود که به ترتیب در مکان‌های نشانگری SMC119CG و AP-SSR03 مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان شاخص تنوع شانون (۰/۶۷۲) نیز در مکان نشانگری SMC119CG دیده شد. به طور کلی میانگین تعداد آلل‌های مؤثر، تنوع ژنی و شاخص تنوع شانون برای

جدول ۳. شاخص‌های تنوع ۳۰ جفت آغازگر SSR استفاده شده به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶۰ واریته نیشکر موجود در مرکز ذخایر ژنتیکی اهواز

نام آغازگر	Major allele frequency	Alleles (NO.)	Na	Ne	h	I	Range of PIC Value	Mean of PIC Value
MSSCIR66	0.744	6	2	1.637	0.372	0.553	0.209-0.491	0.372
MSSCIR 43	0.931	8	2	1.669	0.383	0.563	0.128-0.496	0.383
MSSCIR 74	0.938	3	2	1.536	0.320	0.486	0.117-0.462	0.320
SMC24DUQ	0.963	6	2	1.594	0.343	0.512	0.072-0.500	0.343
SMC278CS	0.825	6	2	1.661	0.380	0.561	0.209-0.499	0.379
SMC31CUQ	0.794	8	2	1.518	0.310	0.471	0.037-0.499	0.310
SMC851MS	0.706	4	2	1.812	0.444	0.635	0.381-0.500	0.500
SMC119CG	0.550	6	2	1.921	0.479	0.672	0.443-0.495	0.479
SMC336BS	0.706	7	2	1.735	0.408	0.592	0.180-0.498	0.408
SMC1604SA	0.950	6	2	1.670	0.370	0.542	0.095-0.499	0.369
SMC703BS	0.756	4	2	1.519	0.340	0.522	0.297-0.381	0.340
SOMS120	0.981	2	2	1.455	0.251	0.376	0.037-0.466	0.251
SOMS118	0.988	8	2	1.454	0.259	0.395	0.025-0.499	0.259
SCM18	0.969	3	2	1.365	0.219	0.350	0.060-0.469	0.219
SCM32	0.700	8	2	1.564	0.333	0.499	0.049-0.499	0.333
SCM4	0.994	2	2	1.013	0.012	0.038	0.012	0.012
SCM16	0.513	8	2	1.408	0.269	0.430	0.117-0.500	0.269
SCC82	0.738	6	2	1.728	0.409	0.596	0.237-0.498	0.409
SCC89	0.925	4	2	1.470	0.294	0.457	0.139-0.451	0.294
SCC93	0.894	5	2	1.556	0.341	0.518	0.190-0.489	0.341
UGSM665	0.900	6	2	1.572	0.334	0.505	0.149-0.496	0.310
UGSM575	0.950	6	2	1.640	0.368	0.544	0.095-0.480	0.368
UGSM585	0.938	8	2	1.258	0.196	0.337	0.049-0.312	0.196
UGSM60	0.844	5	2	1.797	0.433	0.621	0.264-0.496	0.433
UGSM667	0.969	7	2	1.477	0.287	0.443	0.060-0.487	0.287
UGSM574	0.494	8	2	1.855	0.458	0.651	0.387-0.500	0.458
UGSM193	0.869	6	2	1.537	0.329	0.503	0.149-0.485	0.329
UGSM681	0.988	5	2	1.152	0.116	0.214	0.025-0.328	0.116
UGSM542	0.981	6	2	1.508	0.303	0.460	0.037-0.482	0.303
AP-SSR03	0.988	2	2	1.065	0.060	0.133	0.025-0.095	0.060

Allele frequency: فراوانی آلی، Allele No: تعداد آلل‌های مشاهده شده برای هر آغازگر، Na: تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر جایگاه ژنی (حضور و عدم حضور باند)، Ne: تعداد آلل‌های مؤثر، h: تنوع ژنی، I: شاخص اطلاعات شانون، Range of PIC Value: حدود محتوای اطلاعات چند شکلی آغازگر، Mean of PIC Value: میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی آغازگر.

ایالات متحد آمریکا، جامایکا، ایران، هندوستان، جمهوری دومینیک، کوبا و باربادوس به ترتیب ۰/۴۷۷، ۰/۴۴۲، ۰/۱۸۵، ۰/۴۵۸، ۰/۴۰۸، ۰/۴۸۷ و ۰/۳۸۸ به دست آمد که نشان می‌دهد نمونه‌های

بیشترین درصد باندهای چند شکل به ترتیب در نمونه‌های جمعیت ایالات متحد آمریکا (۹۷/۰۴٪)، کوبا (۹۵/۲۷٪) و هندوستان (۹۰/۵۳٪) دیده شد (جدول ۴). میانگین شاخص شانون برای جمعیت‌های

بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۹۷۹) میان دو جمعیت کوبا و هندوستان دیده شد که کمترین فاصله ژنتیکی را داشتند. به همین ترتیب دو جمعیت ایالات متحد آمریکا و هندوستان نیز میزان شباهت ژنتیکی زیادی (۰/۹۷۸) را نشان دادند. کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۹۱۴) مربوط به جمعیت‌های جمهوری دومینیکن و باربادوس می‌باشد. به‌طور کلی هر دو شاخص شباهت و فاصله ژنتیکی از معیارهای مهم اندازه‌گیری میزان تنوع ژنتیکی می‌باشند که هر دو شاخص بر وجود اختلاف یا شباهت در سطح ژنتیکی دلالت می‌کنند (Weir, 1989). برآورد فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف نیشکر اعم از گونه‌های مختلف ژنوتیپ‌ها و گروه‌های جغرافیایی مختلف گزارش شده است (Liu et al., 2011; Pandey et al., 2011; Hameed et al., 2012; Nayak et al., 2014; Sharma et al., 2014).

داده‌های حاصل از ۱۶۹ آلل به دست آمده بر روی ۱۶۰ وارته‌ی نیشکر، به منظور تجزیه و تحلیل فاصله ژنتیکی بین وارته‌ها به کار رفتند. درخت فیلوژنی شش گروه را در میان نمونه‌ها مشخص نمود (شکل ۱). گروه ۱ و ۳ بیشترین تعداد وارته‌ها را نسبت به سایر گروه‌ها دارا بودند و کمترین تعداد وارته‌ها در گروه ۶ قرار گرفتند. شماره‌های روی شکل بیانگر کد هر وارته می‌باشد که به ترتیب مراکز اصلاح در جدول یک تشریح شده است. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، گروه‌ها شامل وارته‌هایی از مناطق جغرافیایی مختلف می‌باشند، با این وجود در هر گروه کشورهایی که بیشترین شباهت ژنتیکی را داشتند در کنار هم واقع شده‌اند. در گروه ۲، وارته‌ها از سه کشور آمریکا، کوبا و هند قرار گرفته‌اند که نشان از قرابت ژنتیکی وارته‌های این سه کشور دارد، همان‌طور که در جدول ۵ شباهت ژنتیکی زیاد میان کوبا و هند و سپس آمریکا و هند تایید شد. وارته‌های IRC99-1 و IRC99-2 محل اصلاح و گزینش آن‌ها ایران است

جمعیت کوبا از نظر ژنتیکی متنوع‌تر از سایر جمعیت‌هاست. همان‌طور که در جدول ۴ ملاحظه می‌شود، گروه ایران با کمترین تعداد افراد یعنی ۲، کمترین میزان شاخص شانون (۰/۱۸۵) را داشته است. بین ۷ جمعیت مورد مطالعه، بیشترین میزان تنوع ژنی (h) در افراد جمعیت کوبا (۰/۳۲۷) و سپس جمعیت ایالات متحد آمریکا (۰/۳۱۶) مشاهده شده است. در مطالعه Nayak و همکاران (۲۰۱۴) و You و همکاران (۲۰۱۳)، بیشترین میزان تنوع ژنی (h)، به ترتیب ۰/۳۰۳ و ۰/۲۲۳ گزارش شده است.

جدول ۴. چند شکلی، آلل‌های مشاهده شده و مؤثر، تنوع ژنتیکی و شاخص اطلاعات شانون برای گروه‌های مختلف وارته‌های نیشکر با استفاده از جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه

گروه	اندازه گروه	NPB	PPB (%)	h	I
Barbados	6	112	66.27	0.265	0.388
Cuba	36	161	95.27	0.327	0.487
Dominican Republic	8	128	75.74	0.273	0.408
India	21	153	90.53	0.305	0.458
Iran	2	45	26.63	0.133	0.185
Jamaica	7	131	77.51	0.299	0.442
USA	77	164	97.04	0.316	0.477

تعداد باندهای چند شکل: NPB، درصد باندهای چند شکل: PPB. ۳ جمعیت (Brazil و Belize و South Africa) تنها ۱ فرد دارند، لذا در جدول ذکر نشده‌اند، به دلیل صفر بودن شاخص‌های h و I آنها.

بر اساس نتایج حاصل از برآورد فاصله ژنتیکی نی، بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۹۱) بین جمعیت جمهوری دومینیکن و باربادوس و کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۲۱) بین جمعیت کوبا و هندوستان مشاهده شد (جدول ۵). بیشترین فاصله و یا شباهت ژنتیکی برای جمعیت‌های دارای بیش از ۲ فرد در نظر گرفته شد (جمعیت‌های بلیز و آفریقای جنوبی و برزیل یک فرد دارند) و جمعیت ایران نیز با تعداد افراد کم (۲ فرد) در نتایج فاصله یا شباهت ژنتیکی بحث نشده است. همچنین در جدول ۵ میزان شباهت ژنتیکی میان جمعیت‌های مورد بررسی نیز نمایش داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود،

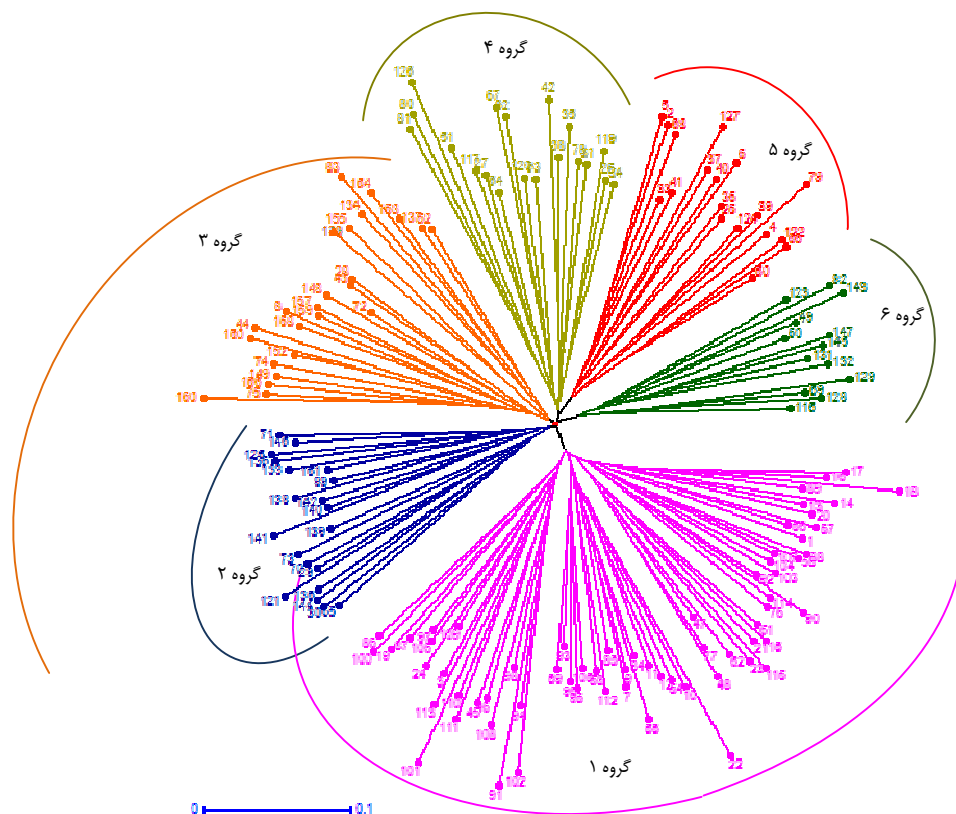
کوبا. با توجه به اهمیت فاصله ژنتیکی واریته‌ها در برنامه‌های اصلاحی نیشکر و با توجه به نتایج گروه‌بندی (شکل ۱)، برای انتخاب والدین مناسب در تلاقی، استفاده از واریته‌هایی با فاصله ژنتیکی زیاد و از گروه‌های مختلف حائز اهمیت می‌باشد.

ولی منشا بذر آن‌ها از کشور کوبا می‌باشد، که طی سالیان در ایران کشت و گزینش شده‌اند. واریته‌های فوق با کدهای ۷۴ و ۷۵، در گروه ۳ در کنار واریته‌های کوبا و هند و آمریکا قرار گرفته‌اند که تاییدی است بر شباهت ژنتیکی آن‌ها با کشورهای نامبرده، مخصوصاً

جدول ۵. فاصله ژنتیکی (قسمت پایین ماتریس) و شباهت ژنتیکی (قسمت بالای ماتریس) بین جمعیت‌های موجود در واریته‌های

نیشکر مورد مطالعه

	Barbados	Cuba	Dominican Republic	India	IRAN	Jamaica	USA
Barbados	****	0.932	0.914	0.938	0.812	0.924	0.923
Cuba	0.071	****	0.953	0.979	0.854	0.952	0.970
Dominican Republic	0.091	0.049	****	0.963	0.844	0.943	0.966
India	0.064	0.021	0.038	****	0.853	0.951	0.978
IRAN	0.208	0.158	0.170	0.159	****	0.827	0.870
Jamaica	0.079	0.049	0.059	0.050	0.190	****	0.950
USA	0.080	0.030	0.035	0.022	0.139	0.051	****



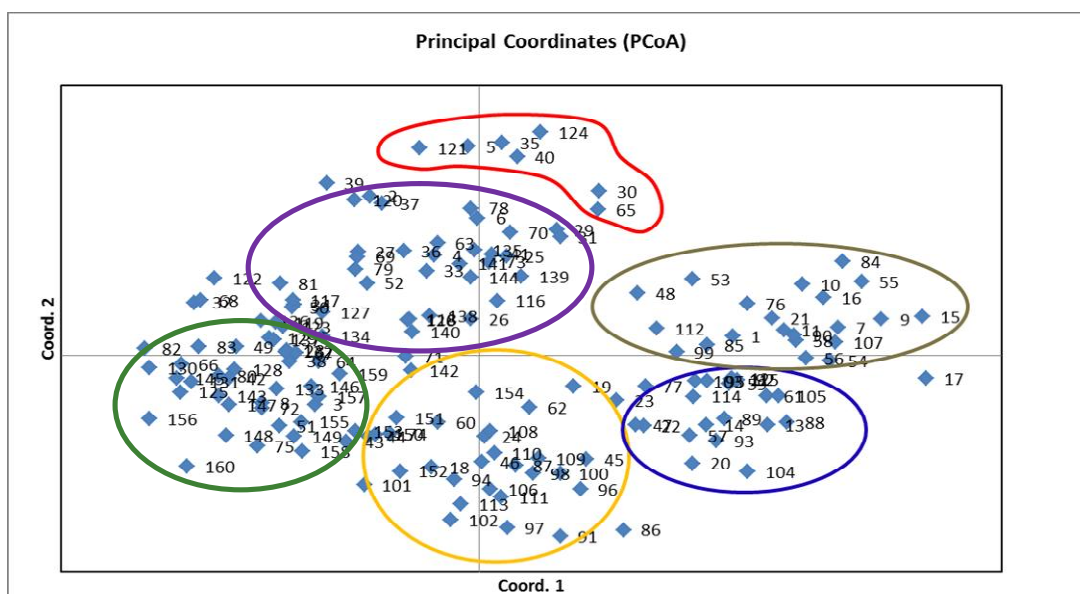
شکل ۱. درخت فیلوژنتیک نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از تجزیه neighbor-joining

مطابقت دارد (شکل ۱). نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که سه مولفه اول ۱۴/۸۶ درصد از واریانس کل را توجیه می‌نماید. در پلات PCoA،

در تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز، واریته‌ها در ۶ گروه مجزا قرار گرفتند (شکل ۲)، که با نتایج گروه‌بندی به روش Neighbour-Joining

نتایج تجزیه خوشه‌ای دقیق‌تر و معتبرتر از نتیجه حاصل از PCoA می‌باشد (Mohammadi and Prasanna 2003). با این وجود همان‌طور که نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی در تحقیق حاضر نشان دادند (شکل‌های ۱ و ۲)، مطابقت زیادی در گروه‌بندی واریته‌ها در هر دو روش دیده شد، همانند مطالعه Nayak و همکاران (۲۰۱۴) که نتایج روش‌های گروه‌بندی آنها (نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی) یکسان بود. نکته حائز اهمیت در نتایج هر دو تجزیه فوق (خوشه‌ای و PCoA) آن است که واریته‌های آمریکا و کوبا به علت تعداد زیاد و نیز تنوع اقلیمی در اکثر خوشه‌ها پخش بودند، که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بسیار بالای درون این مناطق می‌باشد.

مولفه اول و دوم به ترتیب ۶/۵۷ و ۴/۷۴ درصد از واریانس کل را توجیه می‌کنند. در ارزیابی ژرمپلاسم نیشکر میامی آمریکا، سه مولفه اول ۱۵/۲۰ درصد از واریانس کل را نشان دادند (Nayak et al., 2014)، که تقریباً مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. در مطالعه دیگری Pocovi و Mariotti (۲۰۱۵)، در ارزیابی ۶۳ توده نیشکر با ۱۰۷ نشانگر ریزماهوره، مولفه اول و دوم آنها ۳۵٪ و ۱۱٪ از تغییرات کل را توجیه نمود. به‌طور کلی با توجه به اهمیت تجزیه به مختصات اصلی در تعیین رابطه ژنتیکی بین واریته‌ها و همچنین اهمیت بالا بودن میزان واریانس هر مولفه، که نشان‌دهنده اهمیت آن مولفه در واریانس کل می‌باشد، هنگامی که دو یا سه مولفه کمتر از ۲۵٪ از تغییرات کل را توجیه کنند، در این حالت



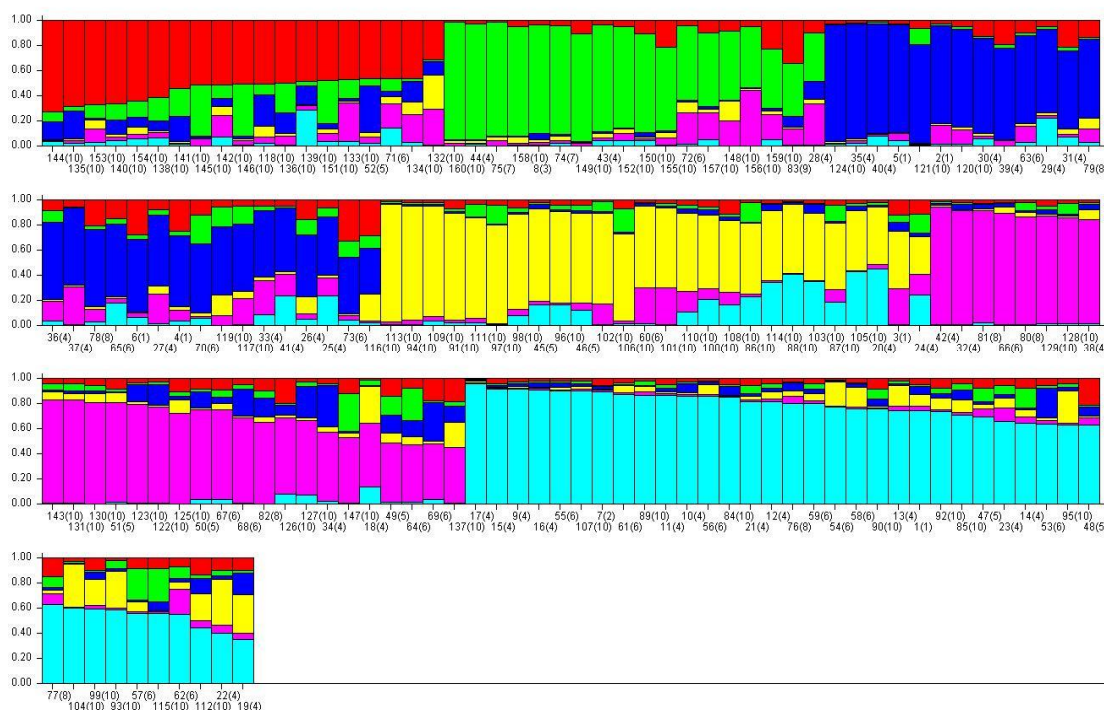
شکل ۲. پلات دو بعدی (تجزیه به مختصات اصلی) حاصل توزیع واریته‌های نیشکر بر اساس فاصله ژنتیکی به دست آمده از ۱۶۹ آلل. گروه‌های مختلف با دایره‌های رنگی تفکیک شده‌اند.

گرفته یا جمع‌آوری شده بودند (مراکز اصلاح نمونه‌ها)، به‌طور کامل از هم تفکیک نشدند (شکل ۳). همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، هر فرد و کد مربوط به آن، توسط ستون رنگی عمودی مشخص شده است و وجود بیش از یک رنگ که مبین ساختار ژنتیکی مختلط

در تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم‌افزار Structure V 2.3.4، با توجه به پایین‌ترین مقدار $\ln P(D)$ و بالاترین مقدار عددی ΔK جمعیت مورد مطالعه به ۶ زیر جمعیت تفکیک شد، که هیچ یک از آنها بر مبنای کشوری که این نمونه‌ها از آنجا منشا

فرد با یک نوار و کد و شماره جمعیت (شماره داخل پرانتز) آن مشخص شده است (جمعیت‌ها از ۱ تا ۱۰ به ترتیب عبارتند از: باربادوس، بلیز، برزیل، کوبا، جمهوری دومینکن، هند، ایران، جامایکا، افریقای جنوبی و آمریکا). نوارها نسبت افراد عضو هر یک از ۶ جمعیت را نشان می‌دهند که توسط رنگ‌های مختلف نمایش داده شده‌اند. نوارهایی با رنگ‌های چندگانه، نمایشگر افراد با اختلاط ژنتیکی می‌باشد.

می‌باشد، در بین نمونه‌های مورد بررسی مشهود است. به عبارتی ساختار ژنتیکی مختلط نمونه‌ها، بیانگر شباهت ژنتیکی آنها با زیر جمعیت‌های دیگر و اختلاط ژنتیکی افراد می‌باشد. اختلاط شدید مشاهده شده در این ژرمپلاسم، این فرض را که تبار نمونه‌های مورد مطالعه از نوع مخلوط باشد را به اثبات می‌رساند. یعنی فرد i ممکن است بخش‌هایی از ژنوم خود را از تبار خود در جمعیت K ، به ارث برده باشد. همچنین هر



شکل ۳. تجزیه ساختار جمعیت نمونه‌های مورد مطالعه بر اساس مدل Bayesian، با استفاده از مکان‌های ژنی نشانگر ریزماهوره

تجزیه خوشه‌ای بر مبنای فاصله و تجزیه به مختصات اصلی افراد را در ۶ زیر گروه قرار داد، ولیکن به دلیل اختلاط ژنتیکی که مشاهده می‌شود، افراد هر گروه به‌طور کامل (صد در صد) منطبق با گروه‌های تشکیل شده دو روش قبلی نمی‌باشد. با این حال، در مجموع نتایج حاصل از گروه‌بندی افراد با روش مبتنی بر مدل مطابقت زیادی با دو روش تجزیه خوشه‌ای بر مبنای فاصله و تجزیه به مختصات اصلی نشان داد. در زیر گروه اول (نوارهای قرمز)، ۱۹ فرد قرار داده شدند

احتمالاً فراوانی آلی نیز در جمعیت‌های مختلف به علت مهاجرت و یا تبار مشترک، مشابه است. یکی دیگر از دلایل اختلاط ژنتیکی مشاهده شده این است که بسیاری از این وارپته‌ها از نتایج برنامه‌های اصلاحی نیشکر و به‌صورت هیبرید هستند و با توجه به اهداف مشترکی که در اکثر برنامه‌ها مورد توجه محقق قرار دارد، احتمال اشتراک والدین آنها زیاد است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با توجه به معیارهای ΔK و $\ln P(D)$ ، تجزیه ساختار جمعیت نیز همانند دو روش

گرفته باشد. مقدار کم آماره \square (۰/۰۳۰) نشان‌دهنده تمایز کم بین جمعیت‌هاست، همانند نتایج به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای (هم مبتنی بر فاصله و هم مبتنی بر مدل)، که در آن افراد از لحاظ مناطق جغرافیایی (مراکز اصلاح) از یکدیگر تفکیک نشده‌اند.

مطالعه حاضر نشان داد که تنوع بسیار بالایی در میان واریته‌های نیشکر درون جمعیت‌ها وجود دارد که بخشی از تنوع موجود به علت هیبریداسیون و بخشی نیز به دلیل هتروزیگوس بودن و سطح پلوئیدی بالای این گیاه است. این نتایج نشان می‌دهد که منظور یافتن منابع تنوع در برنامه‌های به‌نژادی نیشکر، می‌تواند انتخاب را درون جمعیت‌ها انجام داد. نتایج به‌دست آمده، منابع اصلاحی با ارزشی را برای استفاده بهینه از قند و بیوماس گیاه نیشکر فراهم می‌کند. کلون‌های ارزیابی شده برای تهیه نقشه‌های ارتباطی و آگاهی از پایه ژنتیکی واریته‌ها می‌توانند استفاده شوند، آن‌گاه اطلاعات به دست آمده از نقشه‌یابی ژن‌ها و مکان‌های صفات کمی، می‌توانند به منظور انتقال^۲ صفات به لاین‌های اصلاحی الیت استفاده شوند. در واقع ژرمپلاسم حاضر، به‌طور موفقیت‌آمیزی می‌تواند به‌عنوان یک پانل مناسب برای مطالعات تجزیه ارتباطی برای صفاتی چون عملکرد قند و ساقه استفاده شود. در مجموع، با توجه به تنوع شناسایی شده بین واریته‌ها در مطالعه حاضر، به‌نژادگران می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی نیشکر از چنین ذخایر ژنتیکی متنوعی به‌منظور بهینه‌سازی و ایجاد واریته‌هایی با انرژی بالا و میزان قند بالا، بهره‌گیرند.

که به غیر از دو فرد (هند و جمهوری دومینکن)، بقیه افراد از آمریکا بودند. بیشترین تعداد افراد (۴۰ فرد) در زیر گروه ۶ (نوارهای آبی کم‌رنگ) مشاهده شد و بیشتر ژنوتیپ‌ها در این گروه از آمریکا و کوبا بودند. در واقع مطالعه حاضر نشان داد که نمونه‌های نیشکر مورد مطالعه مستقل از مکان‌های جغرافیایی گروه‌بندی شدند. با توجه به استفاده از مدل بایسین در تجزیه ساختار جمعیت، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که روش فوق نسبت به گروه‌بندی بر مبنای فاصله اطلاعات جامع‌تری را در مورد تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به جمعیت‌های مناسب در اختیار قرار داده و تشخیص افراد مختلط را امکان‌پذیر می‌نماید (Pritchard *et al.*, 2000).

نتایج تجزیه واریانس مولکولی نمونه‌ها در جدول ۶ ارائه شده است. جدول فوق، واریانس ژنتیکی بسیار معنی‌دار ($P < 0.001$) مربوط به تفاوت بین افراد درون جمعیت‌ها را بیان می‌کند، به‌طوری‌که واریانس درون جمعیت‌ها (۹۷٪) بسیار بزرگ‌تر از واریانس بین جمعیت‌ها (۳٪) می‌باشد. نتیجه حاصل بیانگر سطح بالایی تنوع میان افراد هر گروه می‌باشد. این نتیجه مشابه نتیجه Shanthi و همکاران (۲۰۱۳) است که در ارزیابی ۲۴ کلون نیشکر با ۲۱ آغازگر ریزماهواره genic^۱، میزان واریانس و تنوع درون گروه‌ها را ۹۶/۰۸ درصد و تنوع بین گروه‌ها را ۳/۹۱ درصد گزارش نمودند. به نظر می‌رسد که سطح بالایی تنوع بین افراد داخل جمعیت‌ها، به دلیل هیبریداسیون و انتخاب‌های والدین متنوع در برنامه‌های اصلاحی نیشکر صورت

جدول ۶ سطوح تمایز ژنتیکی (PhiPT) بین و درون جمعیت‌های نیشکر مورد مطالعه

منبع	Degrees of freedom (df)	Sum of squares	Mean sum of squares	Estimated variance	Percentage of variation (%)	Value (\square)	P (rand \geq data)
بین جمعیت‌ها	6	255.708	42.618	0.852	3%	0.030	0.001
درون جمعیت‌ها	150	4108.967	27.393	27.393	97%		
کل	156	4364.675	-	28.245	100%		

صنایع جانبی اهواز به دلیل در اختیار قرار دادن نمونه‌های گیاهی و از راهنمایی‌های علمی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به دلیل فراهم آوردن امکانات اجرایی این پروژه، از مؤسسه تحقیقات و آموزش نیشکر و

REFERENCES

- Aitken KS, Jackson PA, McIntyre CL (2005) A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo (eo) logous linkage groups in a sugarcane cultivar. *Theor. Appl. Gene.* 110: 789–801.
- Alwala S, Suman A, Arro JA, et al (2006) Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Sci.* 46: 448–455.
- Andru S, Pan Y-B, Thongthawee S, Burner DM, Kimbeng CA (2011) Genetic analysis of the sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar “LCP 85-384”. I. Linkage mapping using AFLP, SSR, and TRAP markers. *Theor. Appl. Genet.* 123: 77–93.
- Aragón C, Carvalho LC, González J, Escalona M, Amanicio S (2009) Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrid) propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develops improved anti-oxidative response. *Trop. Plant. Biol.* 2: 38–50.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80–83.
- Besse P, McIntyre CL, Berding N (1997) Characterisation of *Erianthus* sect. *Ripidium* and *Saccharum* germplasm (*Andropogoneae* - *Saccharinae*) using RFLP markers. *Euphytica.* 93:283–292.
- Chen PH, Pan Y-B, Chen RK, et al (2009) SSR marker-based analysis of genetic relatedness among sugarcane cultivars (*Saccharum* spp. hybrids) from breeding programs in China and other countries. *Sugar Tech.* 11:347–354.
- Cordeiro GM, Casu R, McIntyre CL, Manners JM, Henry RJ (2001) Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. *Plant. Sci.* 160: 1115–1123.
- Cordeiro GM, Taylor GO, Henry RJ (2000) Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. *Plant. Sci.* 155: 161–168.
- D’Hont A, Grivet L, Feldmann P, Glaszmann JC, Rao S, Beding N (1996) Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* 250: 405–413.
- D Hont A lique, Paulet F, Glaszmann JC (2002) Oligoclonal interspecific origin of “North Indian” and “Chinese” sugarcane. *Chromosome. Res.* 10:253–262.
- Daniels J, Roach B (1987) Taxonomy and evolution. In: *Sugarcane improvement through breeding.* Elsevier, pp 7–84.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611–2620.
- Hameed U, Pan Y-B, Muhammad K, Afghan S, Iqbal J (2012) Use of simple sequence repeat markers for DNA fingerprinting and diversity analysis of sugarcane (*Saccharum* spp) cultivars resistant and susceptible to red rot. *Genet. Mol. Res.* 11:1195–1204.

- Haq S, Jain R, Sharma M, Kachhwaha S, Kothari SL (2014) Identification and Characterization of Microsatellites in Expressed Sequence Tags and Their Cross Transferability in Different Plants. *Int. J. Genom.* 1-12.
- Henry RJ, Kole C (2010) Genetics, genomics and breeding of sugarcane. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Huckett BI, Botha FC (1995) Stability and potential use of RAPD markers in a sugarcane genealogy. *Euphytica.* 86: 117-125.
- Li G, Quiros CF (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 103: 455-461.
- Lima MLA, Garcia AAF, Oliveira KM, Matsuoka S, Arizono H, DeSouza CL, DeSouza AP (2002) Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.) *Theor. Appl. Genet.* 104: 30-38.
- Liu P, Que Y, Pan Y-B (2011) Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing. *Sugar Tech.* 13:129-136.
- Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools. *Crop Sci.* 43: 1235-1248.
- Nair NV, Selvi A, Sreenivasan TV, Pushpalatha KN (2002) Molecular diversity in Indian sugarcane cultivars as revealed by randomly amplified DNA polymorphisms. *Euphytica.* 127:219-225.
- Nayak SN, Song J, Villa A, Villa A, Pathak B, Ayala-Silva T, Yang J, Todd J, Glynn NC, Kuhn DN, Glaz B, Gilbert RA, Comstock JC, Wang J (2014) Promoting utilization of *Saccharum* spp. genetic resources through genetic diversity analysis and core collection construction. *PLoS ONE.* 9:e110856.
- Pan Y-B, Cordeiro GM, Richard Jr EP, Henry R (2003) Molecular genotyping of sugarcane clones with microsatellite DNA markers. *Maydica.* 48:319-329.
- Pandey A, Mishra RK, Mishra S, Singh YP, Pathak S (2011) Assessment of Genetic Diversity among Sugarcane Cultivars (*Saccharum officinarum* L.) using Simple Sequence Repeats Markers. *J. Biol. Sci.* 11:105-111.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Perrier X., Flori A, Bonnot F (2003) Data analysis methods. In: Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield Science Publishers, Montpellier, pp 43-76.
- Pocovi MI, Mariotti JA (2015) A bayesian approach to inferring the genetic population structure of sugarcane accessions from INTA (Argentina). *Chil. J. Agr. Rese.* 75: 152-159.
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant. Mol. Biol.* 15: 8-15.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 156:945-959.
- Rae AL, Jackson MA, Nguyen CH, Bonnett GD (2009) Functional specialization of vacuoles in sugarcane leaf and stem. *Trop. Plant. Biol.* 2: 13-22.
- Roach B, Daniels J (1987) A review of the origin and improvement of sugarcane. In: Copersucar international sugarcane breeding. Workshop. pp 1-31.
- Shanthi RM, Kumar R, Nimmakayala P, Reddy O (2013) Genic SSRs From *Saccharum officinarum* in Wrky and stress transcription factors to use them

- as markers in Sugarcane. *J. Sugarcane. Res.* 3:118–129.
- Sharma MD, Dobhal U, Singh P, Kumar S, Gaur AK, Singh SP, Jeena AS, Koshy EP, Kumar S (2014) Assessment of genetic diversity among sugarcane cultivars using novel microsatellite markers. *Afr. J. Biotechnol.* 13: 1444–1451.
- Singh RK, Mishra SK, Singh SP, Mishra N, Sharma ML (2010) Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. *Aust. J. Crop. Sci.* 4:116–125.
- Tew T, Cobill R (2008) Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum* spp.) as an energy crop. In: Genetic improvement of bioenergy crops. Springer. p 273–294.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends. Biotechnol.* 23: 48–55.
- Virupakshi S, Naik GR (2008) ISSR analysis of chloroplast and mitochondrial genome can indicate the diversity in sugarcane genotypes for red rot resistance. *Sugar Tech.* 10: 65–70.
- Weir B (1989) Sampling properties of gene diversity. In: Plant population genetics breeding and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts., pp 23–42
- Yeh F, Boyle T (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg. J. Bot.* 129:157–163.
- You Q, Xu L, Zheng Y, Que Y (2013) Genetic diversity analysis of sugarcane parents in Chinese breeding programmes using gSSR markers. *The Scientific World J.* 1–11.