نشریه علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳ (ص۹۳-۸۵)

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های *Aegilops triuncialis* L. در مناطق غربی ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

طاهره فتحی[۱]، محمدمهدی سوهانی[۲*]، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی[۳] و علی‌اشرف مهرابی[۴]
۱، ۲ و۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه گیلان، ایران
۴. استادیار، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۵ ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۱/۳۰)

چکیده

گونهٔ *Aegilops triuncialis* L. دامنهٔ توزیع وسیعی از شرق اطلس تا نزدیک غرب و مرکز آسیا دارد؛ بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی این گونه در این نواحی اهمیت اصلاحی و تکاملی بسزایی دارد. در این راستا تنوع ژنتیکی ۴۰ توده از گونهٔ *Ae. triuncialis*، جمع‌آوری شده از مناطق غربی ایران بررسی شد. پس از استخراج DNA و یکسان‌سازی غلظت آنها، پنج نمونه از هر توده به‌صورت بالک درآمد و تنوع ژنتیکی با روش ISSR-PCR بررسی شد. با استفاده از ۱۱ آغازگر و ۱۱۸ نوار چندشکل به‌دست آمد که از بین آغازگرها، گونهٔ UBC817 با ۱۶ نوار و آغازگرهای UBC811 و UBC823 با ۱۴ نوار بیشترین و آغازگر UBC825 با ۴ نوار کمترین تعداد نوار چندشکل را تشکیل دادند. اطلاعات چندشکلی نشانگرها بین ۰/۲۳ تا ۰/۴۰ و شاخص نشانگری از ۱/۱ تا ۴/۶ متغیر بود. تجزیهٔ بردارهای اصلی نشان داد که دو مؤلفهٔ اول درمجموع ۲۳/۷۲ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. تجزیهٔ خوشه‌ای براساس ماتریس فقدان تشابه شاخص سوکال و الگوریتم(Neighbor Joining (NJ، ۴۰ تودهٔ بررسی‌شده را در سه گروه طبقه‌بندی کرد که هر گروه به‌ترتیب شامل ۱۳، ۹ و ۱۸ توده بود. درستی گروه‌بندی حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای با تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر با ۹۵ درصد تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: تجزیهٔ تابع تشخیص، تجزیهٔ واریانس مولکولی، شاخص نشانگر، میزان اطلاعات چندشکلی.

مقدمه

برخی از دانشمندان ژنتیک و اصلاحگران گندم، سایر گونه‌های منتج از سه جنس تاکسونومیکی تریتیکوم، آژیلوپس و آمبلیوپایروم (به‌عبارتی گندم‌های زراعی و سایر خویشاوندان نزدیک آنها) را گندم می‌نامند (Van Slageren, 1994). گندم نان (*Triticum aestivum*) اولین غله و مهم‌ترین گیاه زراعی دنیاست. تنوع محصولات و کیفیت‌های انباری گندم، آن را به غذای اصلی بیش از یک‌سوم مردم جهان تبدیل کرده است (Ibro Vjollca *et al*., 2010). گندم نیای وحشی *Ae.triuncialis* L. گیاه آلوتتراپلویید با ژنوم UUCC است که گونه‌های اجدادی و دهندهٔ ژنوم آن *Ae.umbellulata* (با ژنوم CC) و *Ae. Caudate* (با ژنوم UU) و با ژنوم‌های موجود در گندم نان (با ژنوم AABBCC) همیولوگ است (Martin-Sanchez *et al*., 2003; Van Slagren, 1994). خویشاوندان وحشی محصولات مختلف زراعی بخش مهمی از نمونه‌های گیاهی ارزندهٔ فلور هر کشور را تشکیل می‌دهند. همچنین به دلیل برخورداری از سازش بالا با محیط و تنش‌های مختلف، حاوی ژن‌های بسیار ارزنده برای بروز خصوصیات مهم گیاهی شده‌اند به‌ویژه مقاومت به تنش‌هایی از قبیل خشکی، شوری، سرما، گرما و مقاومت به آفات و امراض. این خزانهٔ ژنی معمولاً دست‌افزار به‌نژادگران گیاهی است. ایران از نظر موقعیت جغرافیایی در منطقهٔ بسیار مناسبی قرار دارد و یکی از مناطق مهم تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی و زراعی گندم است

تلفن: ۰۹۱۲۴۲۲۷۹۶۰
E-mail: msohani@guilan.ac.ir

(Vojdani & Meybodi, 1993). تنوع بین گونه‌ها رکن اصلی بیشتر برنامه‌های اصلاحی بوده و انجام گزینش منوط به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب از لحاظ صفت بررسی‌شده است؛ همچنین به دانشمندان ژنتیک در درک بهتر تکامل کمک می‌کند. علاوه‌بر این، اطلاع از سطح تنوع موجود در ژرم‌پلاسم‌ها برای تشخیص نمونه‌های تکراری در بانک‌های ژنی، غنی‌سازی ذخایر ژنتیکی با اینتروگرسیون ژن‌های مطلوب و شناسایی ژن‌های مناسب ضروری به نظر می‌رسد (Saeidi *et al*., 2008). تنوع مورفولوژیکی و اکولوژیکی بالایی بین خویشاوندان وحشی گندم در ایران به‌عنوان بخشی از مرکز پیدایش گندم (هلال حاصلخیزی) گزارش شده است (Ritschel *et al*., 2004). ۳۱ ژنوتیپ گندم را با استفاده از ماتریس حاصل از شاخص دایس و الگوریتم UPGMA در ۳ گروه قرار دادند که به‌ترتیب شامل ۱۱، ۱۶ و ۴ ژنوتیپ شدند. نشانگرهای مولکولی از ابزارهای مهم و ارزشمندی هستند که در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف کاربرد دارند (Arzani *et al*., 2005). نشانگرهای ISSR از نشانگرهای مبتنی‌بر PCR است که تنوع ژنتیکی میان نمونه‌های یک گونه را نشان می‌دهند. در این روش برای انگشت‌نگاری DNA از آغازگرهای مبتنی‌بر نواحی SSR (توالی‌های ریزماهواره‌ها) استفاده می‌شود که در سراسر ژنوم پراکنده‌اند (Yang *et al*., 2007). این روش نیازی به توالی‌یابی DNA ندارد و به‌راحتی برای هر گونه گیاهی استفاده می‌شود (Aga *et al*., 2005). تنوع ژنتیکی ۳۸ جمعیت از ۷ گونهٔ آژیلوپس در مصر با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR و ۹ آغازگر RAPD بررسی و درمجموع ۱۷۰ باند چندشکل ایجاد شد (Thomas & Bebli, 2010). برمبنای این پژوهش، گروه‌بندی براساس شباهت ژنتیکی برای این گونه‌ها بر دسته‌بندی براساس ریخت‌شناسی گیاهی منطبق است. ۱۲ گونهٔ وحشی آژیلوپس و تریتیکوم، ۶ گونهٔ گندم نان و ۴ گونهٔ گندم دوروم در ترکیه با استفاده از ۱۴ آغازگر RAPD بررسی شد (Cenkci *et al*., 2008). در این پژوهش مجموعاً ۳۲۸ باند پلی‌مورفیسم مشاهده شد. دندروگرام ترسیم‌شده با استفاده از ماتریس، فاصلهٔ جاکارد و الگوریتم NJ این گونه‌ها را در دو گروه اصلی دسته‌بندی کرد. دامنهٔ فاصلهٔ ژنتیکی بین گونه‌های وحشی گندم و آژیلوپس (۰/۹۴۹-۰/۴۶۳) بالاتر از گونه‌های گندم نان (۰/۷۲۵-۰/۴۴۴) و گونه‌های گندم دوروم (۰/۶۱۸-۰/۴۲۰) بود.

با وجود جمع‌آوری تعدادی از گونه‌های بومی ایران هنوز بسیاری از ژرم‌پلاسم‌های گندم و آژیلوپس در ایران ناشناخته مانده است. براساس مشاهدات نویسندگان در جمع‌آوری نمونه‌ها، این گونه در گسترهٔ وسیعی از جنوب غرب تا شمال غرب کشور با اقلیم‌های گوناگون پراکنده و با این اقلیم‌های گوناگون سازگار شده است. ایدهٔ این پژوهش در راستای جمع‌آوری، ساماندهی و مشخص کردن مناطقی با حداقل تنوع ژنتیکی برای حفاظت ژنتیکی خارج از محل، بررسی مورفولوژیکی و ارزیابی بیوماس تولیدی اکوتیپ‌های مختلف است؛ و درنهایت به بررسی قابلیت هضم و خوش‌خوراکی آن به منظور اهلی‌سازی این گونه برای معرفی در راستای حفاظت از مراتع کم‌بازده با توجه به سازگاری بالا و نیازهای محدود این گونه منجر می‌شود. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۴۰ توده *Ae.triuncialis* از ۱۳ استان در مناطق غربی ایران، با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR، بررسی شد.

مواد و روش

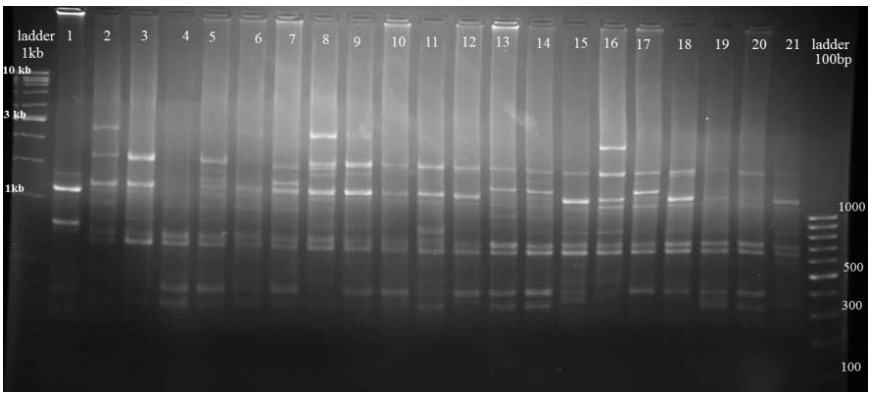
در این تحقیق از ۴۰ تودهٔ *Ae. triuncialis* جمع‌آوری‌شده از ۱۳ استان در مناطق غربی ایران استفاده شد. نمونه‌های بذری ۲۰۰ ژنوتیپ (از هر توده ۵ ژنوتیپ) در خاک پیت‌ماس با شرایط آزمایشگاه (دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و ۱۰ ساعت روشنایی) کاشته شد(جدول۱). نمونه‌گیری از برگ‌های جوان آژیلوپس در مرحلهٔ ۳ تا ۴ برگی انجام شد. استخراج DNA با استفاده از روش (Doyle & Doyle 1990) با اندکی تغییر انجام و کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با روش الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتری تعیین شد. پس از یکسان‌سازی غلظت‌ها، DNA هر جمعیت به‌صورت بالک درآمد.

در این تحقیق از ۱۲ آغازگر ISSR (جدول۲) استفاده شد (Yang *et al*., 2008). واکنش PCR در حجم ۲۰ مایکرولیتر شامل ۳۰ تا ۴۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۴ میلی‌مول dNTP، ۰/۸ پیکومول آغازگر، ۲

میلی‌مول MgCl2، بافر PCR1X و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystems انجام گرفت. چرخهٔ حرارتی به‌صورت ۴ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، سپس ۳۵ سیکل به‌صورت ۴۰ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۴،۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد مرحلهٔ اتصال

جدول ۱. اسامی توده‌های *Aegilops triuncialis* L. آزمایشی و محل جمع‌آوری آنها

رد	محل جمع‌آوری	استان	ردیف	محل جمع‌آوری	استان
۱	کاکا رضا-ایواندره (نمونه رنگ روشن)	کردستان	۲۱	جادهٔ شیراز-بوشهر	فارس
۲	کاکا رضا-ایواندره (نمونه رنگ مشکی)	کردستان	۲۲	جادهٔ دهدز-اردل-چهارمحال	چهارمحال‌وبختیاری
۳	کرمانشاه -اسلام آباد غرب	کرمانشاه	۲۳	جادهٔ آذرشهر-بناب	آذربایجان شرقی
۴	جاده هرسین-نورآباد- روستای چغا	کرمانشاه	۲۴	۱۰کیلومتری اهر-کلیبر	آذربایجان شرقی
۵	مریوان	کردستان	۲۵	نورآباد	لرستان
۶	جاده کرمانشاه-کامیاران	کردستان	۲۶	۳۰کیلومتری خرم‌آباد-سپید	لرستان
۷	جاده خرم‌آباد-اندیمشک-منطقه شوراب	لرستان	۲۷	جادهٔ شیراز-مهارلو	شیراز
۸	بردج شیراز	فارس	۲۸	جادهٔ هرسین-کرمانشاه	کرمانشاه
۹	۱۰کیلومتری جاده اهر-تبریز	آذربایجان شرقی	۲۹	جادهٔ کاه فیروز-سپیدان-فارس	فارس
۱۰	جاده سی سخت بروجن-۱۱۵ تا بروجن	چهارمحال‌وبختیاری	۳۰	جادهٔ سنندج- دیواندره	کردستان
۱۱	جاده مشکین شهر-اهر	آذربایجان شرقی	۳۱	لرستان-جادهٔ خرم‌آباد-سپید	لرستان
۱۲	کیلومتر ۱۰ جاده شیراز سپیدان- کلتان	فارس	۳۲	ابتدای جادهٔ الیگودرز-دورود	لرستان
۱۳	جاده سپیدان-یاسوج	کهگیلویه و بویراحمد	۳۳	تهران-سعادت‌آباد	تهران
۱۴	جاده اردبیل-سرعین-۱۵ کیلومتری	اردبیل	۳۴	ورودی جادهٔ زنجان-تهران	زنجان
۱۵	خوزستان جاده دهدز	خوزستان	۳۵	اردبیل-روستای حیران	اردبیل
۱۶	شهر یاسوج	کهگیلویه و بویراحمد	۳۶	کهگیلویه و بویراحمد	کهگیلویه وبویراحمد
۱۷	جاده اردبیل-سرعین-۱۵ کیلومتری	اردبیل	۳۷	سرآبله-دامنهٔ مانشت کوه	ایلام
۱۸	میاندوآب-محمدیار	آذربایجان شرقی	۳۸	جادهٔ اسدآباد-همدان	همدان
۱۹	ورودی جاده زنجان-تهران	زنجان	۳۹	سرآبله دامنهٔ مانشت کوه	ایلام
۲۰	خرم‌آباد-الشتر-۳۰ تا الشتر	لرستان	۴۰	ارتفاعات مشرف به شهر سرآبله	ایلام



شکل ۱. الگوی نواری ISSR حاصل از تکثیر توده‌های *Aegilops triuncialis*L. با استفاده از آغازگرUBC817

آغازگر بسته به دمای اتصال (Tm) آغازگر (جدول۲)، ۲ دقیقه مرحلهٔ بسط در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد و یک چرخهٔ نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد، سپس نگهداری در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد بود. محصول تکثیرشده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم‌بروماید و آشکارسازی نوارها زیر نور UV انجام گرفت. الگوی نواری براساس وجود (یک) یا فقدان (صفر) نوارها نمره‌دهی شدند (شکل۱). داده‌های حاصل به‌صورت یک ماتریس ۱۴۴×۴۰ وارد نرم‌افزار Excel شد.

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی از چندین شاخص استفاده شد: الف) میزان اطلاعات چندشکلی (Polymorphism Information Content) که براساس رابطهٔ ($PIC= 1-\sum_{i}^{n}=1 \quad Pi^2$) محاسبه شد. در این رابطه Pi، فراوانی آلل iام و n تعداد آلل است. ب)شاخص نشانگری (MI=Marker Index) که بیانگر میزان چندشکلی بوده و می‌تواند شاخصی برای برآورد کارآیی یک نشانگر در یک ژرم‌پلاسم ناشناخته استفاده شود، با استفاده از رابطهٔ MI=PIC×EMR به‌دست آمد.

ج) نسبت چندگانهٔ مؤثر(EMR: Effective Multiplex Ratio) که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکلی موجود در یک ژرم‌پلاسم است. براساس رابطهٔ EMR= np×β محاسبه شد که در این رابطه، np تعداد کل نوارهای چندشکل وβ نسبت تعداد نوار چندشکل به تعداد کل نوار است (Powell *et al*., 1996). ماتریس فقدان تشابه با استفاده از شاخص‌های Dice، Jaccard، Ochiai و Sokal & Sneath با استفاده از نرم‌افزار DARwin 5(Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006)، محاسبه شد. ضریب همبستگی کوفنتیک با استفاده از نرم‌افزار XLSTAT 2008(Addinsoft USA, New York, NY)، محاسبه شد. دندروگرام حاصل از الگوریتم NeighborJoining با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5(Tamura *et al*., 2007)، بازسازی شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش از ۱۲ آغازگر ISSR در گیاه توتون استفاده شد (Yang *et al*., 2007). از مجموع ۱۲ آغازگر، ۱۱ آغازگر الگوی نواری واضح و تفکیک‌پذیر تشکیل دادند (شکل۱) که احتمالاً نشان‌دهندهٔ فراوانی توالی‌های این آغازگرها در ژنوم گونهٔ گیاهی *Ae. triuncialis* است. همچنین مشخص شد که جانشینی میکروستلایت‌ها از خانواده‌های متفاوت به جای یکدیگر در مطالعات ژنتیکی امکان‌پذیر است. نکتهٔ دیگر اینکه ساختار و توالی حفاظت‌شده میکروستلایت‌ها در گونه‌های مختلف گیاهی مشابه‌اند. آغازگر UBC814 هیچ الگوی نواری ایجاد نکرد که گمان می‌رود به دلیل فقدان توالی این آغازگر (CTCTCTCTCTCTCTCTA) در ژنوم این گونهٔ گیاهی باشد. اندازهٔ نوارهای تولیدشده از آغازگرهای ISSR از ۳۰۰۰-۳۰۰ جفت باز متغیر بود.

بین آغازگرهای به‌کار رفته، آغازگر UBC817 با تعداد ۱۹ نوار و بعد از آن، آغازگرهای UBC812 و UBC823 با تعداد ۱۷ نوار بیشترین تعداد نوار و آغازگر UBC813 با تعداد ۷ نوار کمترین تعداد را داشتند (جدول۲). همچنین تعداد ۱۶ نوار چندشکل برای آغازگر UBC817 و ۱۴ نوار چندشکل برای آغازگرهای UBC811 و UBC823 دیده شد؛ کمترین تعداد نوار برای آغازگر UBC825 با ۴ نوار مشاهده شد. میانگین مکان‌های چندشکل به‌ازای هر آغازگر ISSR، ۱۰/۷۲ به‌دست آمد. درصد چندشکلی به‌دست‌آمده (جدول۲) در جمعیت‌هااز ۳۰/۷۶ درصد برای (UBC825)، تا ۱۰۰ درصد برای (UBC811, UBC813, UBC824, UBC826) متغیر بود. میانگین درصد چندشکلی به‌دست آمده در این تحقیق ۸۳/۷۵ درصد به‌دست آمد.

محتوی اطلاعات چندشکل (PIC) در این تحقیق بین ۰/۲۳ تا ۰/۴۰ و میانگین محتوی اطلاعات چندشکل ۰/۳۳ بود (جدول۳). بالاترین مقدار PIC در آغازگر UBC816 ۰/۴۰ و بعد از آنها UBC824 و UBC873 ۰/۳۹ تعیین شد؛ که احتمالاً نشان‌دهندهٔ این است که آغازگرهای نامبرده می‌توانند تنوع ژنتیکی بین توده‌ای را بهتر توجیه کنند.

به منظور تعیین کارآیی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) نیز محاسبه شد (جدول۳). اندازهٔ MI بین ۱/۱۲ تا ۴/۶ متغیر بود. آغازگرهای UBC817، UBC823، UBC811 و UBC873 به‌ترتیب با ۳/۴،۸/۶، ۳/۲و ۳/۱۸ واحد بیشترین شاخص نشانگری (MI) را داشتند (جدول۳) که کارایی نسبتاً زیاد این آغازگرها را نسبت به سایر آغازگرهای به‌کاررفته در بروز چندشکلی نشان می‌دهد. در شناسایی هیبریدهای بین تریتیکاله و Aegilops juvenalis و اندازه‌گیری شباهت بین آنها، درمجموع از ۱۴ آغازگر ISSR استفاده شد که از آنها ۱۳ آغازگر الگوی واضح تشکیل دادند (Gradzielewska *et al*, 2012). میانگین پلی‌مورفیسم برای هر آغازگر ۵/۱ به‌دست آمد. در صد پلی‌مورفیسم ایجاد شده توسط آغازگرها ۳۰ درصد بود.

جدول ۲.آغازگرهای به‌کاررفته، توالی، دمای اتصال (TM)، درصد چندشکلی، تعداد نوار، تعداد نوار چندشکلی آنها

ردیف	نام آغازگر	دمای TM	درصد چند شکلی	تعداد نوار	تعداد نوار چندشکلی	توالی
۱	UBC811	۵۱/۳۵	۱۰۰	۱۴	۱۴	GAGAGAGAGAGAGAGAC
۲	UBC812	۵۱/۳۳	۷۶/۴۷	۱۷	۱۳	GAGAGAGAGAGAGAGAA
۳	UBC813	۵۱/۳۰	۱۰۰	۷	۷	CTCTCTCTCTCTCTCTT
۴	UBC815	۵۱/۳۳	۸۸/۸	۹	۸	CTCTCTCTCTCTCTCTG
۵	UBC816	۵۵/۳۷	۷۵	۱۲	۹	CACACACACACACACAT
۶	UBC817	۵۵/۶۴	۸۴/۲۱	۱۹	۱۶	CACACACACACACACAA
۷	UBC823	۵۲/۵۲	۸۲/۳۵	۱۷	۱۴	TCTCTCTCTCTCTCTCC
۸	UBC824	۵۳/۰۸	۱۰۰	۱۰	۱۰	TCTCTCTCTCTCTCTCG
۹	UBC825	۵۶/۵۶	۳۰/۷۶	۱۳	۴	ACACACACACACACACT
۱۰	UBC826	۵۷/۷۸	۱۰۰	۱۳	۱۳	ACACACACACACACACC
۱۱	UBC873	۵۱/۴۲	۸۳/۳۳	۱۲	۱۰	GACAGACAGACAGACA
کل			۸۳/۷۵	۱۴۴	۱۱۸	

جدول۳. اطلاعات چندشکل (PIC)، نسبت چندگانهٔ مؤثر (EMR)، شاخص نشانگری (MI)در جایگاه ISSR در توده‌های *Aegilops triuncialis* L. آزمایشی

ردیف	نام آغازگر	PIC	EMR	MI
آغازگر ۱	UBC ۸۱۱	۰/۲۸	۱۱/۳۷	۳/۲
آغازگر ۲	UBC ۸۱۲	۰/۲۴	۱۰/۵۶	۲/۶
آغازگر ۳	UBC ۸۱۳	۰/۳۵	۵/۶	۱/۹
آغازگر ۴	UBC ۸۱۵	۰/۳۱	۶/۵	۲
آغازگر ۵	UBC ۸۱۶	۰/۴۰	۷/۳	۲/۹
آغازگر ۶	UBC ۸۱۷	۰/۳۵	۱۳	۴/۶
آغازگر ۷	UBC ۸۲۳	۰/۳۳	۱۱/۳	۳/۸
آغازگر ۸	UBC ۸۲۴	۰/۳۸	۸/۱	۳/۱۳
آغازگر ۹	UBC ۸۲۵	۰/۳۴	۳/۲	۱/۱۲
آغازگر ۱۰	UBC ۸۲۶	۰/۲۳	۱۰/۵۶	۲/۵
آغازگر ۱۱	UBC ۸۷۳	۰/۳۹	۸/۱	۳/۱۸
میانگین		۰/۳۳		۲/۸۳

در تجزیه به بردارهای اصلی، ۱۰ مؤلفهٔ اول مجموعاً ۶۳/۷۲ درصد از واریانس کل (جدول۴) و دو مؤلفهٔ اول مجموعاً ۲۳/۷۲ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. مطابق انتظار مؤلفهٔ اول بیشترین سهم را در توجیه تغییرات داشت. از این میان سهم مؤلفهٔ اول ۱۴/۷۱ درصد و مؤلفهٔ دوم ۹/۰۱ درصد بود. بنابراین تعداد صفات یا نوارها به تعداد زیادی مؤلفه کاهش یافت و انتخاب آغازگرها به‌خوبی انجام شد. بنابراین نتیجه می‌گیریم که نشانگرهای ISSR بررسی‌شده در قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده‌اند و این بهترین حالت در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی است، زیرا نشانگرهای مولکولی از کروموزوم‌های گوناگون انتخاب و در ژنوم مناسب و یکنواخت توزیع شده‌اند (Hajmansoor *et al*., 2010).

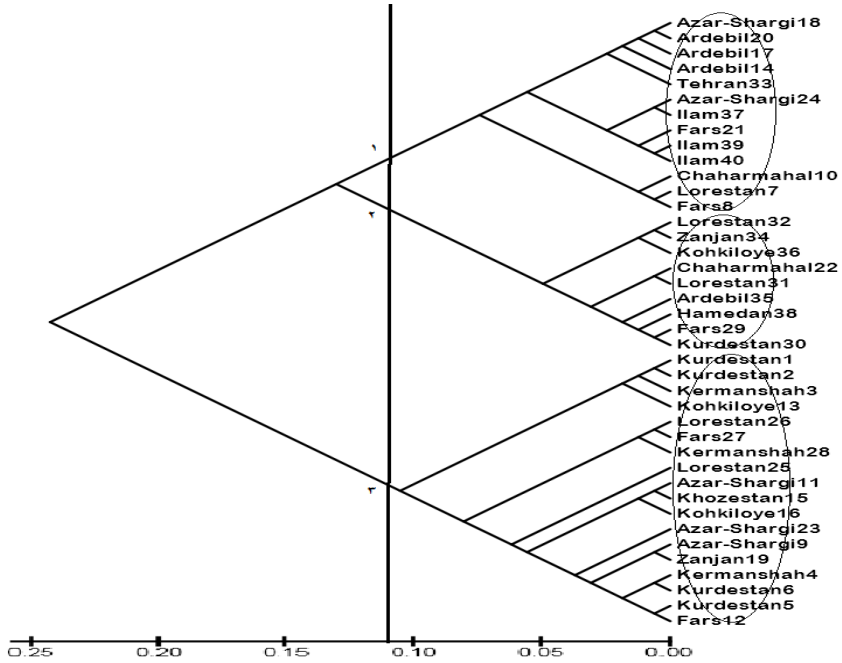
فاصلهٔ ژنتیکی بین دو موجود نمایان‌گر تفاوت توجیه‌پذیر بین آن دو موجود با استفاده از تنوع آللی است. به عبارت دیگر فاصلهٔ ژنتیکی بیانگر میزان تفاوت‌های ژنی بین جمعیت‌ها یا گونه‌هاست که با استفاده از برخی کمیت‌های عددی اندازه‌گیری می‌شود. گروه‌بندی جمعیت‌ها براساس نمره‌دهی صفر و یک انجام شد.

تجزیهٔ خوشه‌ای با اندازه‌گیری ماتریس فقدان تشابه ژنتیکی براساس چهار شاخص Dice، Jaccard، Ochiai و Sokal & Sneath و دو الگوریتم UPGMA و NJ نشان

داد که ماتریس به‌دست آمده از شاخص Sokal & Sneath و الگوریتم NJ با ضریب کوفنتیک ۰/۸۳۸ نسبت به سایر گروه‌بندی‌ها، گروه‌بندی بهتری را انجام داد. گروه‌بندی براساس ماتریس فقدان تشابه شاخص Sokal & Sneath جمعیت‌های بررسی‌شده را در سه کلاستر قرار داد (شکل۳).

جدول۴. درصد واریانس و درصد تجمعی برای ۱۰ مؤلفهٔ اول

مؤلفه اصلی	درصد مقادیر ویژه	درصد واریانس	درصد تجمعی
۱	۱/۸	۱۴/۷۱	۱۴/۷۱
۲	۱/۱	۹/۰۱	۲۳/۷۲
۳	۰/۸۰	۶/۵۴	۳۰/۲۶
۴	۰/۷۸	۶/۳۶	۳۶/۶۲
۵	۰/۶۸	۵/۵۴	۴۲/۱۶
۶	۰/۶۰	۴/۹۵	۴۷/۱۱
۷	۰/۵۹	۴/۸۵	۵۱/۹۶
۸	۰/۵۱	۴/۲۱	۵۶/۱۷
۹	۰/۴۸	۳/۹۴	۶۰/۱۱
۱۰	۰/۴۴	۳/۶۱	۶۳/۷۲



شکل۲. دندروگرام ترسیم‌شده براساس روش Neighbor joining و ماتریس فاصله Sokal & Sneath با استفاده از ۱۱ آغازگر ISSR برای ۴۰ توده *Ae. Triuncialis* آزمایشی

گروه‌های یک تا سه به‌ترتیب شامل ۱۳، ۹ و۱۸ توده بودند. درستی گروه‌بندی حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای با تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۹۵ درصد برآورد شد. بدین ترتیب نتیجه می‌گیریم که تابع تشخیص، تقسیم توده‌ها در سه گروه با تجزیهٔ خوشه‌ای را تأیید می‌کند. نتایج حاصل از گروه‌بندی‌ها با دندروگرام ترسیم‌شده نشان داد که بین واگرایی ژنتیکی و منشأ جغرافیایی این گونه ارتباط کمی وجود دارد. طوری که توده‌های موجود در یک استان (مانند آذربایجان شرقی ۱۸ و آذربایجان شرقی ۹ یا لرستان ۳۱، لرستان ۷ و لرستان ۲۵) در دو یا سه کلاستر جدا از هم قرار گرفتند که احتمالاً به دلیل تنوع بالای این گونه در داخل استان (وجود توده‌های متفاوت از هم در یک استان) و تنوع تقریباً یکنواخت آن (قرار گرفتن توده‌های یک استان در کلاسترهای جدا از هم) در نواحی بررسی‌شده است. بدین معنا که احتمالاً این گونه

با تنوع بالایی و تقریباً یکنواخت در شمال غرب، غرب و جنوب غرب ایران وجود دارد.

ضریب فاصلهٔ ژنتیکی بین توده‌ها از ۰/۶۷-۰/۲۵ متغیر و میانگین فاصلهٔ ژنتیکی بین توده‌ها ۰/۳۸ بود که بیانگر تنوع نسبتاً خوب بین توده‌های این گونه است. این نتایج با نتایج گزارش شده از Arzani *et al.* (2005) مبنی‌بر تنوع مورفولوژیکی و اکولوژیکی بالا بین خویشاوندان وحشی گندم در ایران هم‌خوانی داشت. همچنین گونه‌های به‌دست آمده از فاصلهٔ ژنتیکی نشان می‌دهند که فاصلهٔ ژنتیکی بین توده‌های بررسی‌شده در این پژوهش منطبق با فاصلهٔ مسافتی بین توده‌ها نیست. برای نمونه توده‌های موجود در یک استان مانند آذربایجان ۹ و آذربایجان ۱۸ بیشترین فاصلهٔ ژنتیکی را از هم دارند.

با توجه به اینکه ایران بخشی از مرکز پیدایش گندم (هلال اخضر) است(Arzani *et al*., 2005)، این نتیجه دور از انتظار نبود زیرا معمولاً با وجود تنوع بالا در جمعیت‌های یک گونه یا بومی بودن آن در یک کشور، بین آنها اشتقاق ژنتیکی خاصی رخ نمی‌دهد. به همین دلیل تقسیم‌بندی‌های جغرافیایی بر تنوع ژنتیکی منطبق نخواهد بود. همچنین ممکن است این گیاه به دلیل وجود در مراتع و داشتن ریشک به وسیلهٔ چهارپایان جابه‌جا شود. اولین‌بار نیز با واردات گاوهای مکزیکی به کالیفرنیا منتقل شد (Davy *et al*., 2008). احتمالاً قابلیت جابه‌جایی به وسیلهٔ چهارپایان نیز یکی از عواملی است که تطابق کم بین تنوع ژنتیکی و منشأ جغرافیایی را باعث می‌شود. برای بررسی بیشتر، توده‌های جمع‌آوری‌شده از ۱۳ استان براساس فاصلهٔ جغرافیایی استان‌ها به ۶ گروه مجزا تفکیک شدند.

طوری‌که استان‌های مجاور در یک گروه قرار گرفتند. دو استان آذربایجان شرقی و فارس به دلیل تعداد تودهٔ زیادی جمع‌آوری شده از آنها، در یک گروه قرار گرفتند (جدول۵). آنالیز واریانس مولکولی (Analysis Molecular Variance) با استفاده از نرم‌افزار (Peakall & Smouse,2012) GenAlex، روی آنها انجام شد. نتایج حاصل از این آنالیز در جدول ۶ آمده است. براساس نتایج تنوع درون گروه‌ها (۹۱ درصد) از تنوع بین گروه‌ها (۹ درصد) بیشتر است. درصد بالای واریانس درون گروه‌ها می‌تواند به دلیل وجود توده‌هایی با فاصلهٔ ژنتیکی زیاد (نتایج حاصل از ماتریس فقدان تشابه) در گروه‌های بررسی‌شده باشد.

Frakhari *et al*. (2007) تنوع ژنتیکی ۲۸ جمعیت *Aegilops cylindrica* Host.، جمع‌آوری‌شده از ۱۰ استان ایران را با استفاده از ۱۵ پرایمر RAPD بررسی کردند. ۵ ژنوتیپ از هر جمعیت به صورت بالک درآمد. تجزیهٔ خوشه‌ای با استفاده از شاخص دایس و الگوریتم UPGMA جمعیت‌ها را در دو کلاستر قرار داد. میانگین تشابه ژنتیکی در این پژوهش ۰/۶۳ به‌دست آمد. نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که بین واگرایی ژنتیکی و منشأ جغرافیایی این گونه ارتباط کمی وجود دارد که از این حیث با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. به طوری که جمعیت‌های موجود در یک استان AC1 و AC11 در دو کلاستر جدا از هم قرار گرفتند. یکی از دلایل این تفاوت را وجود *Ae. cylindrica* در مزارع گندم در نقش علف هرز بیان کردند. زیرا دانه‌های این گیاه همراه محصول برداشت می‌شود و این عمل در جابه‌جایی آن نقش دارد.

جدول۵. ۴۰ تودهٔ *Ae.triuncialis* جمع‌آوری‌شده از ۱۳ استان کشور قرارگرفته در شش گروه

تعداد توده	استان‌ها	گروه
۵	آذربایجان شرقی	۱
۶	اردبیل (۴) –زنجان (۲) –تهران (۱)	۲
۶	کردستان (۵) –همدان(۱)	۳
۱۲	کرمانشاه (۳) –لرستان (۷) –ایلام (۳)	۴
۶	خوزستان (۱) –چهارمحال (۲) -کهکلویه (۳)	۵
۵	فارس (۵)	۶

جدول۶. تجزیهٔ واریانس مولکولی برای ۴۰ تودهٔ *Ae. Triuncialis* از ۱۳ استان تفکیک شده به شش ناحیهٔ مختلف در کشور با استفاده از نشانگر ISSR

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	٪ واریانس مشاهده شده	آماره Phi PT	سطح معنی داری
بین گروه	۵	۱۴۶/۶۹	۲۹/۳۳	٪۹	۰/۰۸۸	۰/۰۱
درون گروه	۳۴	۶۱۴/۶۸	۱۸/۰۷	٪۹۱		
کل	۳۹	۷۶۱/۳۷		٪۱۰۰		

نتیجه‌گیری کلی

به‌علت اهمیت گونهٔ *Ae. triuncialis*، درک ساختار ژنتیکی این گونه برای استفادهٔ کامل از ژرم‌پلاسم گستردهٔ آن برای اجرای برنامه‌های اصلاحی، ضروری است. در این پژوهش از ۱۱ آغازگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۴۰ توده *Ae. triuncialis* استفاده شد. نتایج نشان دادند که تنوع بین توده‌های بررسی‌شده وجود دارد. بنابر نتایج به‌دست آمده، چندشکلی بسیار بالایی معادل ۸۳/۷۵ درصد در آغازگرهای ISSR دیده شد. آغازگرهای UBC817، UBC823، UBC811 و UBC873 به‌ترتیب با ۳/۴،۸/۶، ۳/۲ و ۳/۱۸ واحد بیشترین شاخص نشانگری (MI) را داشتند که نشان‌دهندهٔ قدرت تفکیک بالاتر این آغازگرها در مقایسه با آغازگرهای دیگر به‌کار رفته در بررسی این گونه بود. بنابراین در بررسی تنوع ژنتیکی سایر گونه‌های آژیلوپس می‌توان استفاده از این آغازگرها در اولویت قرار داد. پراکنش مناسب آغازگرهای به‌کاررفته در سطح ژنوم این گونه نیز نشان‌دهندهٔ کارآیی آنهاست. یکی از اهداف اولیه برای حفظ طبیعت، نگهداری تنوع ژنتیکی است. نظر به بالا بودن تنوع ژنتیکی بین توده‌های *Ae. triuncialis*، استراتژی حفاظت بیشتر شامل حفاظت در محل است. برای توده‌های با سطوح بالا تنوع ژنتیکی در مناطق شمال غرب، غرب، و جنوب غرب کشور پیشنهاد می‌شود که رویشگاه‌های آنها حفاظت‌شده و بهره‌برداری از منابع وحشی ممنوع شود.

REFERENCES

1. Aga, E., Bekele, E. & Bryngelsson, T. (2005). Inter_simple sequence repeats (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. *Genetica*, 124, 213–221.
2. Arzani, A., Khalighi, M.,Shiran, B. & Kharazian, N. (2005). Evaluation of diversity in wild relative of wheat. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 41, 112-117.
3. Cenksi, S., Yildiz, M., Konuk,M. & Eren, Y. (2008). RAPD analysis of some wild *Triticum* L. and *Aegilops* L. species and wheat cultivars in Turkey. *ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 50(1), 35–42.
4. Davy, J. S., Ditomaso, J. M. & Laca, E. A. (2008). Barb Goatgrass. *University of California Division of Agriculture and natural Resources. http://anrcatalog.Ucdavis.edu*.
5. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1998). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12,13-15.
6. Farkhari, M., Naghavi, M. R., Pyghambari, S. A. & Sabokdast, M. (2007). Genetic variation of *Aegilops cylindrica* Host. from Iran, based on RAPD-PCR and HMW glutenin subunits diversity. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(17), 2868-2873.
7. Gradzielewska, A., Gruszecka, D., Lesniowska Nowak, J. & Paczos Grzeda, E. (2012). Identification of hybrids between triticale and *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig and determination of genetic similaritywith ISSRs. *Genetic and Molecular Research*, 11 (3), 2147-2155.
8. Hajmansoor Sh., Bihamta, M. R., Nabipor, A. R., Mohammadi, A., Persyedi, S. M. & Nickhah, H. R. (2010). Genetic Diversity in Barley Genotypes: II. Microsatellite Markers and Morphological Traits. *Seed and Plant Improvment Journal*, 26-1(2), 150-171. (In Farsi).
9. Ibro, V. Salillari, A. Suna, R. & Grifsha, B. (2010). A comparative study of some *Aegilops* L. (Poaceae) collected at different regions of albania. *Natura Montenegrlna Podgorica*, 9 (3), 927-935
10. Martin-Sanchez, J. A.Gomez-Colmenarejo,M.,Del Moral, J., Sin, E. Montes, M. J.,Gonzalez-Belinchon,C., Lopez-Brana, I. & Delibes, A. (2003). A new Hessian fly resistance gene (H30) transferred from the wild grass *Aegilops triuncialis* to hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 106,1248–1255

11. Peakall R. & Smouse, P. E. (2012) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Bioinformatics Advance Access*.
12. Perrier, X. & J. P. Jacquemoud-Collet. (2006). DARwin software. *http*://darwin.cirad.fr/darwin.
13. Powell W., Morgante, M., Andre,C.,Vogel, J., Tingey, S. & Rafalski, A. (1996). The comparison ofRFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsattlite) markers forgermplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
14. Ritschel, P. S., Lima Lins, T. C., Tristan, R. L., Buso, G. S. C., Buso, A. & Ferreira, M. E. (2004). Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*, 4, 1-14.
15. Saeidi, H., Rahimnejad, M. R. & Heslop-harrison, J. S. (2008). Retroelement insertionalpolymorphism, diversity and phylogeogeraphy within diploid, D-genome *Aegilopstauschii* (Triticeae, Poaceae) subtaxa in Iran. *Annals of Botany*, 101, 855–861
16. Tamura K, Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599
17. Thomas, K. G., Bebli, P. J. (2010). Genetic diversity of Greek *Aegilops* species using different types of nuclear genome markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution Journal*, 56, 951-961
18. Van Slageren, M. W. (1994). Wild wheat: a monograph of *Aegilops* L. and Amblyopyrum (jaub. & Spach) Eig (Poaceae). *Wageningen Agriculture University*.
19. Vojdani, P. & Meybodi, M. (1993). Distribution and genetic diversity of primitive bread wheat on Iran. In: *Damanina AB* (Ed) *Biodiversity and wheat improvement*. Wiley, *Chichester, UK*, pp 409-415.
20. Yang, B. C., Xiao, B. G.,Chenl, X. J. & Shi, C. H. (2007). Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using inter simple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. *Annals of Applied Biology Journal*, 150, 393–401.