نشریه علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳ (ص ۱۹۰-۱۸۳)

بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌های وارداتی عدس موجود در کلکسیون دانشکدهٔ کشاورزی کرج با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

مرضیه نوری گوغری[1*]، حسین دشتی[2]، شهاب مداح حسینی[3] و الهام دهقان[4]
۱، دانشجوی کارشناسی ارشد، ۲، دانشیار، ۳، استادیار و ۴،مربی پژوهشی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان
(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۴ - تاریخ تصویب: ۹۳/۳/۱۴)

چکیده

تنوع ژنتیکی، اساس موفقیت در بهبود کمیت و کیفیت گیاهان زراعی است. شناخت تنوع و پتانسیل ژنتیکی هر گونهٔ گیاهی در اصلاح نباتات ضرورت دارد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۳۰ نمونه عدس متعلق به کلکسیون دانشکدهٔ کشاورزی کرج با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD بررسی شد. نوارهای باندی براساس وجود (۱) یا نبود باند (۰) کدگذاری شد. با استفاده از ۱۵ آغازگر از بین ۵۰ پرایمر، ۱۴۳ باند قابل امتیازدهی ایجاد شد که ۱۳۷ عدد از آنها چندشکل بودند. بیشترین تعداد باند چندشکل (۱۶ باند) متعلق به آغازگر UBC611 و کمترین تعداد باند چندشکل (۵ باند) متعلق به آغازگرهای (G، B ،UBC502 وJ) بودند. تجزیهٔ خوشه‌ای به‌روش WPGMA با ضریب تشابه Dice انجام گرفت و دندروگرام مربوط رسم شد. تجزیهٔ خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در تشابه (۰/۵۶) به چهار گروه اصلی طبقه‌بندی کرد. حد تشابه از ۰/۸۹ تا ۰/۴۴متغیر بود. بیشترین تشابه (۰/۸۹) بین دو ژنوتیپ یونان و شیلی۱۶ و کمترین تشابه (۰/۴۴) بین ژنوتیپ‌های شیلی ۲ و شیلی ۱۷ مشاهده شد. با توجه به نتایج می‌توان نتیجه گرفت که تنوع ژنتیکی زیادی بین ژنوتیپ‌های عدس وجود دارد و نشانگر مولکولی RAPD ابزار مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های عدس است.

واژه‌های کلیدی: تجزیهٔ کلاستر، تنوع ژنتیکی، عدس، نشانگرهای RAPD.

مقدمه

در کشورهای درحال توسعه به‌دلیل کمبود منابع پروتئین حیوانی و فقر اقتصادی، نیاز پروتئینی انسان‌ها از منابع گیاهی به‌ویژه حبوبات تأمین می‌شود. عدس از خانوادهٔ لگوم از قدیمی‌ترین محصولات زراعی است. عدس گیاهی است خودگشن، دیپلوئید یکساله با شاخ و برگ زیاد و انشعابات فراوان ساقه که به‌صورت بوته‌ای رشد می‌کند. متوسط پروتئین دانه ۲۶ درصد است. اهمیت عدس در تثبیت نیتروژن و بهبود فیزیک خاک در مناطق پرشیب است (Bamdad *et al.*, 2009). جمع‌آوری ژرم‌پلاسم اولین قدم در راه اصلاح گیاهان است. موفقیت اصلاحگر در برنامه‌های اصلاحی به انتخاب مواد ژنتیکی مناسب و تنوع کافی در آنها بستگی دارد. ارزیابی و تعیین حد تنوع ژنتیکی یکی از شاخص‌های مهم گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب و انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی است (Li *et al.*, 2006). مطالعهٔ تنوع ژنتیکی فرایندی است که تفاوت یا شباهت گونه‌ها، جمعیت‌ها یا افراد را با استفاده از روش‌ها و مدل‌های آماری خاص براساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره‌ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می‌کند (Mohammadi & Prasanna, 2003). در گذشته، تنوع ژنتیکی گیاهان از راه تجزیهٔ صفات مورفولوژیکی یا بیوشیمیایی بررسی می‌شد. ازآنجا که فنوتیپ تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرد، تعیین تنوع ژنتیکی به‌همراه روش‌های مولکولی چشم‌انداز نوینی را برای ارزیابی تنوع زیستی فراهم آورده است (Powell *et al.*, 1996). تنوع و روابط ژنتیکی بین گونه‌های مختلف عدس، اهمیت زیادی در حفاظت منابع ژنتیکی عدس و

تلفن: ۰۳۴۵۳۲۵۲۷۳۲ E-mail: norimarzyeh@gmail.com

پتانسیل اصلاح دارد. مطالعات نشانگرهای مولکولی سهم بزرگی در فهم ما از تنوع و ارتباط ژنتیکی در گیاهان مختلف داشتند (Abe *et al*., 2003). فناوری نشانگرهای مولکولی شامل PCR و مبتنی بر توالی‌های خاص DNA برای شناسایی گونه‌ها و ارقام به‌کار برده می‌شوند. یکی از نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع موجود بین ارقام، نشانگر RAPD است که قدرت مناسبی برای بررسی چندشکلی بین ارقام دارد (Graham *et al*., 1994). این تکنیک‌ها همچنین برای تخمین تنوع ژنتیکی درون و بین‌گونه‌ها و ارقام زراعی استفاده می‌شوند. مزیت اصلی استفاده از نشانگرهای مولکولی بر نشانگرهای مورفولوژی این است که آنها شاخص خوبی از فاصله و تنوع ژنتیکی در میان نمونه‌ها به‌دلیل نبود انتخاب به‌وجود می‌آورند (Winter & kahl, 1995). نشانگرهای RAPD که در آنها توالی‌های DNA ژنومی با آغازگرهای کوتاه و اختیاری تکثیر می‌شود، به‌علت مزایایی از قبیل نامحدود بودن تعداد نوارها، استفاده نکردن از مواد رادیواکتیو، سادگی و سرعت عمل، کاربرد زیادی در ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی پیدا کرده است (Naghavi *et al*., 2005).

شاخص تنوع یک باند (Di) به‌صورت $Di= 1-\sum pi^2$ تعریف می‌شود که در آن pi فراوانی i مین آلل (باند) است. شاخص تنوع برای هر پرایمر از جمع ِ Diهای باندهای آن آغازگر $D_P= \sum Di$ و DI متوسط شاخص تنوع برای هر آغازگر است که براساس $DI =(\sum Di/n)$ بوده و n تعداد لوکوس‌های هر آغازگر است (Milbourne *et al*.,1997). قدرت تفکیک براساس توزیع آلل درون ژنوتیپ‌های نمونه است. ارزش یک باند از طریق تطبیق آن با شرایط ایده‌آل (۵۰ درصد ژنوتیپ‌ها دارای آن باند باشند) محاسبه می‌شود.

این ارزش را میزان اطلاع‌رسانی باند (band informativeness) گویند (Ibi) که از صفر تا یک تغییر می‌کند و به‌صورت $Ibi=1-[2\times|0.5-Pi|]$ محاسبه می‌شودکه pi در آن نسبت افراد دارای باند مورد نظر است. توانایی یک پرایمر برای تشخیص و ممیزی بین تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها عبارت است از مجموع Ibiهای مربوط به لوکوس‌های مورد شناسایی آن پرایمر که به‌عنوان قدرت تفکیک (Resolving power) شناخته شده و به‌صورت $R_P=\sum Ibi$ محاسبه می‌شود (Prevost & Wilkinson,1999). و Ib متوسط میزان اطلاع‌رسانی برای هر آغازگر است. $Ib=(\sum Ibi)/n$ که n برابر است با تعداد لوکوس‌های تکثیرشدهٔ هر آغازگر. به‌نظر می‌رسد R_P و D_P هر دو یک مفهوم و کاربرد را داشته باشند. چنانچه رابطهٔ خطی معنادار و قوی بینR_P و D_P وجود داشته باشد، می‌توان ازD_P به‌جای R_P و برعکس استفاده کرد.

این پژوهش به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در کلکسیون عدس بانک ژن دانشکدهٔ کشاورزی کرج با استفاده از نشانگرهای RAPD اجرا شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در کلکسیون عدس، ۳۰ نمونه عدس به‌طور تصادفی انتخاب و در آزمایشگاه دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه ولی عصر(عج) کشت شد. نمونهٔ برگ از گیاهان (۰/۳-۰/۲گرم از هر نمونهٔ گیاهی) برداشت و DNA آنها به‌روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et. al*., 1983) استخراج و کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری (اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) تعیین شد. نمونه‌های به‌کاررفته شامل ۱۶ نمونه از شیلی، یک نمونه از لبنان، یک نمونه از سوریه، دو نمونه از ترکیه، یک نمونه از یونان، یک نمونه از افغانستان، یک نمونه از اردن، یک نمونه از الجزایر، یک نمونه از مجارستان، یک نمونه از قبرس، یک نمونه از کلمبیا و سه نمونهٔ ایرانی به نام شاهرود، قوچان و گچساران بود. ۱۵ آغازگر از بین ۵۰ آغازگر۱۰ نوکلئوتیدی استفاده شد که ۷ پرایمر ساخت سیناژن و ۸ پرایمر ساخت Generay Bio Tech آلمان بود. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۷۵ میکرولیتر از منیزیم کلرید (50mM)، ۰/۵ میکرولیترdNTP (10mM)، ۰/۲ میکرولیترآنزیم تک‌پلی‌مراز (۵µ/ul) و بافرPCR با غلظت 10X، ۱ میکرولیتر آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی (۱۰µg/ml) و ۵ میکرولیتر DNA الگو به‌علاوهٔ آب دوبار تقطیر تهیه شد و سپس PCR با برنامهٔ حرارتی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد و برای ۴۵ سیکل: ۱ دقیقه در ۹۲ درجهٔ سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۳۵ یا ۳۶ درجهٔ

سانتی‌گراد (با توجه به آغازگر)، ۲ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد انجام گرفت و سپس محصول واکنش بر روی ژل آگاروز ۱/۵درصد الکتروفورز شد و رنگ‌آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید انجام گرفت و با استفاده از ژل داک عکس‌برداری شد. تصاویر حاصل از ژل‌ها بررسی شد و باندها براساس حضور و نبود، به کد ۰ و ۱ تبدیل شد و توسط نرم‌افزار NTSYS,Ver.2.02e (Rohlf, 1998) ماتریس تشابه محاسبه شد و براساس تجزیهٔ خوشه‌ای به‌دست‌آمده به‌روش WPGMA تنوع ژنتیکی مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج و بحث

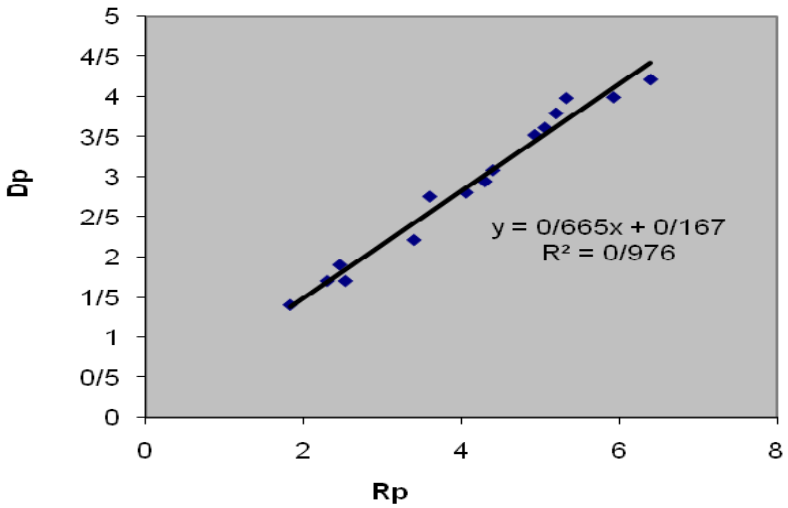
تجزیهٔ اطلاعات باندی پرایمرها

۱۵ آغازگر تصادفی در ۳۰ نمونه گیاه عدس، ۲۰۸۸ باند تولید کردند که از ۱۴۳ مکان ژنی تکثیر شدند (جدول ۱). ۱۳۷ مکان چندشکل بودند. (به‌طور متوسط هر آغازگر۱۰ مکان را شناسایی و تکثیر کرد که آغازگر UBC611 با ۱۶ مکان و بعد از آن، آغازگرهای UBC582 و UBC76 با ۱۳ مکان، بیشترین مکان؛ و آغازگرهای G و B با ۵ مکان، کمترین مکان را تکثیر کردند). همچنین میانگین تعداد مکان چندشکل ۹/۱۳ بود که ۱۶ مکان متعلق به آغازگر UBC611 و ۱۳ مکان مربوط به آغازگر UBC582 بود. کمترین تعداد باند برای آغازگرهای G ، B، UBC502 و J با ۵ باند مشاهده شد. میانگین تعداد باندهای چندشکلی مشاهده‌شده در این تحقیق (۹/۱۳) نسبت به میانگین تعداد باندهای چندشکل به‌دست‌آمده توسط فرد و همکاران (Ford *et al*., 1997) بیشتر است. درصد چندشکلی به‌دست‌آمده (جدول ۱) از ۷۱/۴ درصد برای (UBC502) تا ۱۰۰ درصد برای (UBC611 ، UBC66،UBC582، UBC77،I،F D ، E، B، G، UBC400) متغیر بود که آغازگرهایی که صددرصد چندشکلی نشان دادند بیانگر تنوع زیاد نمونه‌های عدس و قدرت زیاد این آغازگرها در تفکیک ژنوتیپ‌ها است. یوزباشی‌اوغلو و همکاران (Yüzbasıoğlu *et al*., 2006) در بررسی تنوع ژنتیکی برخی نمونه‌های عدس به‌وسیلهٔ RAPD، درصد چندشکلی را ۵۴ درصد گزارش کردند. فیکیرو و همکاران (Fikiru *et al*., 2011) در بررسی تنوع مورفولوژیکی و مولکولی توده‌های عدس به‌وسیلهٔ نشانگر ISSR، ۷۵/۹۳ درصد چندشکلی نشان دادند. متوسط شاخص تنوع (DI) یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها بوده و معیار دقیق‌تری نسبت به مقدار تنوع هر لوکوس است که مستقل از تعداد نمونهٔ تحت مطالعه است. کمترین مقدار DI برای آغازگر UBC84 با مقدار ۰/۱۵ و بیشترین مقدار آن برای آغازگر I معادل ۰/۴۲ به‌دست آمد و این در حالی بود که متوسط شاخص تنوع برای کل ارقام و نشانگرهای بررسی‌شده ۰/۳۰ برآورد شد (جدول ۲). در نتیجه می‌توان گفت آغازگرهای I با بیشترین مقدار DI، بهتر از بقیهٔ آغازگرهای استفاده‌شده، تفاوت ژنتیکی نمونه‌ها را تشخیص دادند و می‌توان در مطالعات بعدی به‌عنوان آغازگری که در تشخیص تنوع ژنتیکی مناسب است از آنها استفاده کرد. محاسبهٔ قدرت تفکیک (R_P) برای هر کدام از آغازگرهای استفاده‌شده، نشان داد که بیشترین حد قدرت تفکیک مربوط به آغازگر I و برابر با ۶/۴ و کمترین مقدار مربوط به آغازگر G ۱/۸۳ بود. آغازگرهای UBC84 و I به‌ترتیب دارای کمترین مقدار متوسط اطلاع‌رسانی (۰/۱۸) و بیشترین مقدار متوسط اطلاع‌رسانی (۰/۷۱) بودند. هرچه Ib و Rp مربوط به آغازگر بیشتر باشند، کارایی آغازگر در تفکیک و جداسازی ژنوتیپ‌های تحت مطالعه بیشتر است (Dhief *et al*, 2011). همچنین شاخص تنوع برای هر پرایمر (D_P) نشان داد که بیشترین شاخص تنوع مربوط به پرایمر I، و کمترین مربوط به پرایمر G (جدول ۲) است. برای بررسی شباهت و رابطهٔ بین D_P و Rp از همبستگی بین آنها استفاده شد و رسم رابطهٔ خطی آنها نشان داد که این دو شاخص یک مفهوم و کاربرد دارند که نشان‌دهندهٔ قدرت پرایمر در تفکیک ژنوتیپ‌هاست (شکل۱). در این میان پرایمر I دارای بیشترین D_P و Rp به‌ترتیب به‌مقدار ۴/۲ و ۶/۴ است. در درجهٔ بعد پرایمرهای UBC611 و UBC400 دارای بیشترین مقادیر D_P و Rp هستند که می‌توان از این پرایمرها بیشتر در مطالعهٔ پلی‌مورفیسم عدس استفاده کرد.

تجزیهٔ کلاستر

ماتریس تشابه بین نمونه‌های مطالعه‌شده براساس داده‌های نشانگر با استفاده از ضرایب تشابه Dice تشکیل

شد (جدول۳). استفاده از ماتریس تشابه می‌تواند به‌منظور شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌ها در میان توده‌های تحت بررسی بسیار مؤثر باشد. میانگین ضرایب تشابه برابر ۰/۷ و دامنهٔ آن از ۰/۴۴ تا ۰/۸۹ متغیر بود. بیشترین تشابه بین نمونه‌های یونان و شیلی ۱۶ (۰/۸۹) و کمترین تشابه بین نمونه‌های شیلی ۱۷ و شیلی ۲ (۰/۴۴) مشاهده شد که به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ حد نزدیکی و دوری ژنتیکی آنها نسبت به یکدیگر است. با توجه به مقادیر تشابه بین نمونه‌ها می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تلاقی بین نمونه‌هایی با کمترین تشابه (بیشترین فاصله) انجام‌پذیر است. در مطالعهٔ فرد و همکاران (Ford *et al*., 1997) دامنهٔ ضریب عدم تشابه از ۹ درصد تا ۴۶ درصد متغیر بود.



شکل۱. رگرسیون شاخص تنوع (D_P) بر روی قدرت تفکیک (R_P)

جدول۱. آغازگرهای استفاده‌شده، توالی، تعداد کل باند، تعداد مکان تکثیرشده، متوسط باند در مکان، تعداد مکان‌های چندشکل و درصدچندشکلی

نام	توالی پرایمر	تعداد کل باند	تعداد مکان تکثیرشده	متوسط باند در مکان	تعداد مکان‌های چندشکل	درصد چندشکلی
F	5′-CCCACTGACG-3′	۱۷۸	۹	۱۹/۷۷	۹	۱۰۰
I	5′-GCGGGAGACC-3′	۱۰۴	۹	۱۱/۵۵	۹	۱۰۰
UBC77	5′-GAGCACCAGG-3′	۱۷۴	۱۱	۱۵/۸۱	۱۱	۱۰۰
UBC582	5′-GGTATAGACG-3′	۱۴۴	۱۳	۱۱/۰۷	۱۳	۱۰۰
UBC66	5′ -GAGGGCGTGA-3′	۱۴۵	۹	۱۶/۱۱	۹	۱۰۰
UBC502	5′-GCATGGTAGC-3′	۱۶۴	۷	۲۳/۴	۵	۷۱/۴
UBC611	5′-CCATCGTACC-3′	۱۸۳	۱۶	۱۱/۴۳	۱۶	۱۰۰
UBC400	5′-GCCCTGATAT-3′	۱۲۳	۱۲	۱۰/۲۵	۱۲	۱۰۰
UBC76	5′ -GAGCACCAGT-3′	۱۵۷	۱۳	۱۲/۰۷	۱۲	۹۲/۳
UBC84	5′-GGGCGCGAGT-3′	۱۴۸	۱۰	۱۴/۸	۸	۸۰
G	5′-CTGAGGAGTG-3′	۸۶	۵	۱۷/۲	۵	۱۰۰
B	5′-GCGTCACAAG-3′	۹۷	۵	۱۹/۴	۵	۱۰۰
J	5′-CCTCACCTGT-3′	۷۰	۶	۱۱/۶۶	۵	۸۳/۳۳
E	5′-ACTTGTGCGG-3′	۱۰۵	۸	۱۳/۱۲	۸	۱۰۰
D	5′-TGGGCTCGCT-3′	۲۱۰	۱۰	۲۱	۱۰	۱۰۰
جمع کل		۲۰۸۸	۱۴۳		۱۳۷	

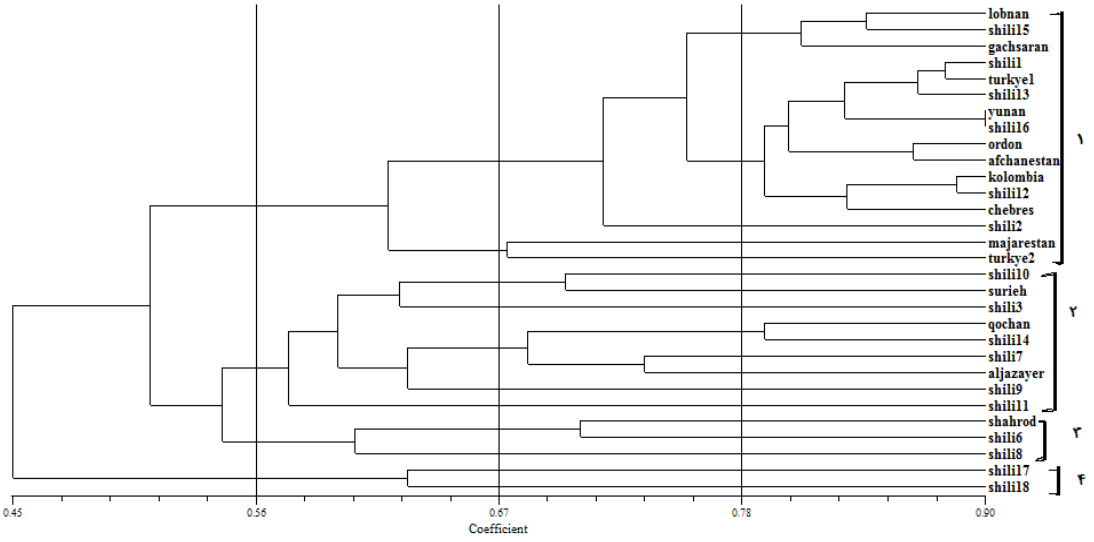
*آغازگرهای F, I, G, B, J, E و D ساخت شرکت سیناژن و آغازگرهای UBC ساخت شرکت Generay Bio Tech آلمان

تجزیهٔ خوشه‌ای براساس ماتریس تشابه به‌روش WPGMA انجام گرفت و دندروگرام آن رسم شد (شکل ۲). ضریب کوفنتیک به‌مقدار r_{coph}=0/87 بیانگر مطابقت بسیار خوب ماتریس تشابه و ماتریس حاصل از دندروگرام است (Mohammadi & Prasanna *et al*., 2003).

جدول ۲. آغازگرهای استفاده‌شده، شاخص تنوع برای هر پرایمر، متوسط شاخص تنوع برای هر پرایمر، قدرت تفکیک و متوسط میزان اطلاع‌رسانی برای هر آغازگر

پرایمر	شاخص تنوع برای هر پرایمر (D_P)	متوسط شاخص تنوع برای هر پرایمر(DI)	قدرت تفکیک (R_P)	متوسط میزان اطلاع‌رسانی برای هر آغازگر(Ib)
F	۳/۰۸	۰/۳۴	۴/۴	۰/۴۸
I	۴/۲۱	۰/۴۶	۶/۴	۰/۷۱
UBC77	۳/۵۲	۰/۳۲	۴/۹۳	۰/۴۴
UBC582	۳/۷۹	۰/۲۹	۵/۲	۰/۴
UBC66	۲/۸	۰/۳۱	۴/۰۶	۰/۴۵
UBC502	۱/۷	۰/۱۷	۲/۳	۰/۲۳
UBC611	۳/۹۸	۰/۲۴	۵/۳۳	۰/۳۲
UBC400	۳/۹۹	۰/۳۳	۵/۹۳	۰/۴۹
UBC76	۲/۷۵	۰/۲	۳/۶	۰/۲۴
UBC84	۱/۸۳	۰/۱۵	۲/۴۶	۰/۱۸
G	۱/۴	۰/۲۸	۱/۸۳	۰/۳۴
B	۲/۲۱	۰/۴۲	۳/۴	۰/۶۸
J	۱/۷	۰/۲۸	۲/۵۳	۰/۴۲
E	۲/۹۴	۰/۳۶	۴/۳	۰/۵۴
D	۳/۶۱	۰/۳۶	۵/۰۶	۰/۵
میانگین		۰/۳۰۲	۴/۰۹	۰/۴۲۸

براساس گروه‌بندی تجزیهٔ خوشه‌ای و با ترسیم خط برش در تشابه ۰/۵۶، ۳۰ نمونه عدس تحت مطالعه در چهار گروه قرار داده شد (شکل ۲). گروه‌های یک تا پنج شامل ۱۶ ،۹ ، ۳، ۲ نمونه بودند. در گروه یک بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های شیلی ۱۶ و یونان (۰/۸۹) وجود داشت. این دو ژنوتیپ، از لحاظ ژنتیکی بسیار شبیهند، ولی از مناطق جغرافیایی جداگانه‌ای‌اند که دلیل آن ممکن است معرفی از کشوری به کشور دیگر باشد.



شکل۲. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های عدس با استفاده از ضریب تشابه دایس به‌روش WPGMA براساس نشانگر RAPD

نکته‌ای که در دندروگرام مشاهده می‌شود این است که چهار گروه مشاهده‌شده در تشابه ۰/۵۶ همه در داخل خود چند نمونه از شیلی را دارند و با توجه به اینکه از این ۳۰ نمونه ۱۶ نمونه از شیلی است، به احتمال زیاد نمونه‌های کشورهای دیگر نمونه‌هایی‌اند که از شیلی به آنجا معرفی شده باشند یا در آنجا از داخل

نمونه‌های شیلی انتخاب شده‌اند و به‌نام کشور میزبان نامگذاری شده‌اند. کمترین تشابه (۰/۴۴) مربوط به شیلی ۱۷ و شیلی ۲ است (جدول۳) که شاید بتوان دلیل آن را این گونه توجیه کرد که اگرچه هر دو از شیلی‌اند، احتمالاً منشأ متفاوتی دارند و از درون توده‌های متفاوتی انتخاب شده‌اند. با توجه به نتایج بالا، تنوع مولکولی با تنوع جغرافیایی همخوانی ندارد و بین تنوع مولکولی و پراکنش جغرافیایی ارتباطی وجود ندارد که بیشتر بررسی‌ها در زمینهٔ تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی عدس، این نتیجه را بیان کرده‌اند.

جدول ۳. ماتریس تشابه ژنوتیپ‌های عدس مبتنی بر نشانگرهای RAPD

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰
۱	۱																													
۲	۰,۷۳	۱																												
۳	۰,۸۴	۰,۷۵	۱																											
۴	۰,۷۶	۰,۷۳	۰,۷۸	۱																										
۵	۰,۶۸	۰,۷	۰,۶۶	۰,۷۰	۱																									
۶	۰,۸۵	۰,۷۳	۰,۸۰	۰,۸۰	۰,۶۹	۱																								
۷	۰,۸۰	۰,۷۱	۰,۷۸	۰,۷۳	۰,۶۶	۰,۸۷	۱																							
۸	۰,۸۱	۰,۷۸	۰,۸۱	۰,۷۶	۰,۶۴	۰,۸	۰,۷۷	۱																						
۹	۰,۸۴	۰,۷۸	۰,۸۵	۰,۸۲	۰,۷۱	۰,۸۶	۰,۸۳	۰,۸۶	۱																					
۱۰	۰,۷۳	۰,۶۸	۰,۷۶	۰,۷۸	۰,۶۷	۰,۷۴	۰,۶۷	۰,۷۴	۰,۷۸	۱																				
۱۱	۰,۸۲	۰,۷۴	۰,۸۳	۰,۷۵	۰,۶۸	۰,۸۵	۰,۸۴	۰,۸۲	۰,۸۹	۰,۷۱	۱																			
۱۲	۰,۸۱	۰,۶۹	۰,۷۵	۰,۷۸	۰,۶۶	۰,۸۷	۰,۸۳	۰,۷۹	۰,۸۲	۰,۷۰	۰,۸۴	۱																		
۱۳	۰,۸۴	۰,۷۱	۰,۸۰	۰,۷۳	۰,۶۵	۰,۸۵	۰,۸۷	۰,۷۹	۰,۸۴	۰,۶۸	۰,۸۸	۰,۸۶	۱																	
۱۴	۰,۷۲	۰,۶۶	۰,۷۲	۰,۶۹	۰,۵۷	۰,۷۶	۰,۷۳	۰,۷۸	۰,۷۶	۰,۶۲	۰,۷۶	۰,۷۸	۰,۷۶	۱																
۱۵	۰,۸۳	۰,۷۵	۰,۸۱	۰,۷۳	۰,۶۸	۰,۸۴	۰,۸۶	۰,۸	۰,۸۷	۰,۷۰	۰,۸۵	۰,۸۲	۰,۸۵	۰,۷۹	۱															
۱۶	۰,۶۱	۰,۶۱	۰,۶۴	۰,۶۷	۰,۶۳	۰,۶۳	۰,۶۰	۰,۶۵	۰,۶۸	۰,۶۷	۰,۶۲	۰,۶۲	۰,۶۷	۰,۶۵	۰,۵۶	۰,۵۹	۱														
۱۷	۰,۸۱	۰,۶۹	۰,۷۷	۰,۷۴	۰,۶۲	۰,۸۲	۰,۸۳	۰,۸۱	۰,۸۴	۰,۶۸	۰,۸۲	۰,۸۰	۰,۸۵	۰,۷۳	۰,۸۸	۰,۵۸	۱														
۱۸	۰,۶۸	۰,۵۹	۰,۶۸	۰,۶۸	۰,۵۹	۰,۶۹	۰,۶۷	۰,۶۴	۰,۷۲	۰,۶۸	۰,۶۷	۰,۶۹	۰,۶۸	۰,۶۳	۰,۷۰	۰,۶۶	۰,۶۸	۱													
۱۹	۰,۷۶	۰,۶۸	۰,۷۶	۰,۶۹	۰,۶۵	۰,۷۱	۰,۷۰	۰,۷۲	۰,۶۹	۰,۷۲	۰,۶۸	۰,۶۷	۰,۶۸	۰,۶۱	۰,۷۱	۰,۶۲	۰,۶۹	۰,۷۳	۱												
۲۰	۰,۵۸	۰,۵۸	۰,۶۰	۰,۶۰	۰,۵۸	۰,۵۳	۰,۵۴	۰,۵۷	۰,۵۸	۰,۵۶	۰,۵۴	۰,۵۴	۰,۵۵	۰,۴۴	۰,۵۳	۰,۵۵	۰,۵۳	۰,۵۸	۰,۶۰	۱											
۲۱	۰,۵۶	۰,۵۴	۰,۵۲	۰,۵۳	۰,۵۵	۰,۵۲	۰,۵۴	۰,۵۲	۰,۵۵	۰,۴۹	۰,۵۷	۰,۵۴	۰,۵۵	۰,۴۵	۰,۵۶	۰,۵۶	۰,۵۷	۰,۶۰	۰,۵۳	۰,۶۱	۱										
۲۲	۰,۸	۰,۷۳	۰,۷۸	۰,۷۶	۰,۶۶	۰,۸۴	۰,۸۰	۰,۷۹	۰,۸۴	۰,۷۴	۰,۸۰	۰,۷۹	۰,۸۲	۰,۷۷	۰,۸۳	۰,۶۳	۰,۸۴	۰,۶۷	۰,۷۲	۰,۵۳	۰,۴۹	۱									
۲۳	۰,۶۲	۰,۵۵	۰,۶۴	۰,۵۸	۰,۵۵	۰,۷۰	۰,۶۷	۰,۶۸	۰,۶۷	۰,۵۳	۰,۶۸	۰,۶۳	۰,۶۵	۰,۶۷	۰,۶۸	۰,۵۲	۰,۶۷	۰,۵۷	۰,۵۸	۰,۵۴	۰,۴۸	۰,۶۸	۱								
۲۴	۰,۷۹	۰,۷۴	۰,۷۹	۰,۷۴	۰,۷۱	۰,۸۶	۰,۸۶	۰,۷۶	۰,۸۵	۰,۷۱	۰,۸۶	۰,۸۰	۰,۸۴	۰,۷۷	۰,۸۵	۰,۶۲	۰,۸۳	۰,۶۴	۰,۷۰	۰,۵۵	۰,۵۰	۰,۸۱	۰,۷۱	۱							
۲۵	۰,۶۳	۰,۵۸	۰,۶۳	۰,۶۸	۰,۵۳	۰,۶۶	۰,۶۵	۰,۶۷	۰,۶۶	۰,۶۰	۰,۶۳	۰,۶۶	۰,۶۲	۰,۶۷	۰,۶۴	۰,۶۴	۰,۵۷	۰,۶۷	۰,۵۳	۰,۴۵	۰,۷۱	۰,۶۷	۰,۶۵	۱						
۲۶	۰,۶۶	۰,۶۷	۰,۶۹	۰,۶۲	۰,۶۲	۰,۶۲	۰,۶۱	۰,۶۵	۰,۶۴	۰,۶۲	۰,۶۲	۰,۶۲	۰,۶۳	۰,۵۹	۰,۶۲	۰,۶۰	۰,۶۶	۰,۵۷	۰,۶۳	۰,۵۹	۰,۶۲	۰,۶۴	۰,۶۵	۰,۶۵	۰,۶۰	۰,۶۶	۰,۵۷	۰,۵۶	۰,۶۴	۰,۵۷	۰,۶۳	۱
۲۷	۰,۷۱	۰,۶۰	۰,۶۹	۰,۶۲	۰,۵۸	۰,۷۱	۰,۷۴	۰,۷۳	۰,۷۰	۰,۶۶	۰,۷۲	۰,۶۶	۰,۷۳	۰,۶۶	۰,۶۹	۰,۶۱	۰,۶۹	۰,۶۶	۰,۵۶	۰,۶۹	۰,۴۶	۰,۶۸	۰,۵۶	۰,۶۷	۰,۵۹	۰,۵۷	۱				
۲۸	۰,۶۱	۰,۵۹	۰,۶۴	۰,۵۸	۰,۶۴	۰,۶۱	۰,۶۰	۰,۶۰	۰,۶۱	۰,۸۹	۰,۵۶	۰,۵۸	۰,۵۸	۰,۵۷	۰,۵۶	۰,۵۴	۰,۵۶	۰,۶۵	۰,۴۹	۰,۴۷	۰,۶۲	۰,۵۱	۰,۵۶	۰,۵۳	۰,۵۹	۰,۶۰	۱				
۲۹	۰,۶۴	۰,۵۶	۰,۶۳	۰,۵۷	۰,۵۸	۰,۶۴	۰,۶۷	۰,۵۹	۰,۶۲	۰,۵۷	۰,۶۴	۰,۶۰	۰,۶۳	۰,۶۲	۰,۶۱	۰,۵۴	۰,۵۹	۰,۵۴	۰,۶۴	۰,۴۵	۰,۵۰	۰,۶۲	۰,۵۵	۰,۶۲	۰,۵۱	۰,۶۲	۰,۷۰	۰,۷۰	۱		
۳۰	۰,۶۲	۰,۶۴	۰,۶۴	۰,۵۹	۰,۵۹	۰,۶۵	۰,۶۰	۰,۶۸	۰,۵۷	۰,۶۶	۰,۶۰	۰,۶۸	۰,۶۵	۰,۶۷	۰,۶۲	۰,۵۷	۰,۶۸	۰,۶۲	۰,۶۵	۰,۴۹	۰,۶۳	۰,۵۶	۰,۶۳	۰,۵۵	۰,۵۸	۰,۵۹	۰,۵۹	۰,۵۸	۰,۵۷	۱	

لبنان (۱)، شیلی ۱۰(۲)، شیلی ۱۵(۳)، قوچان (۴)، سوریه (۵)، شیلی۱(۶)، ترکیه ۱(۷)، گچساران (۸)، یونان (۹)، شیلی ۱۴(۱۰)، شیلی ۱۶ (۱۱)، اردن (۱۲)، افغانستان (۱۳)، شیلی ۲ (۱۴)، کلمبیا (۱۵)، شیلی ۹(۱۶)، شیلی ۱۲(۱۷)، شیلی ۷(۱۸)، الجزایر (۱۹)، شیلی۱۷(۲۰)، شیلی ۱۸(۲۱)، قبرس (۲۲)، مجارستان (۲۳)، شیلی ۱۳ (۲۴)، ترکیه ۲(۲۵)، شیلی ۳(۲۶)، شاهرود (۲۷)، شیلی ۸ (۲۸)، شیلی ۶ (۲۹) و شیلی ۱۱(۳۰).

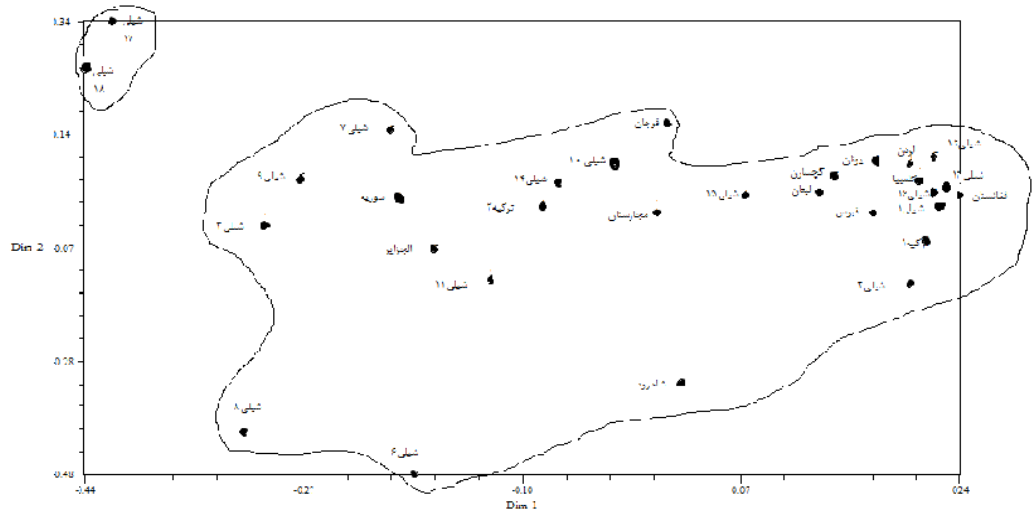
تجزیه به مختصات

تجزیهٔ مختصات اصلی در بیان تنوع ژنتیکی براساس صفات کیفی کاربرد زیادی دارد و با استفاده از آن می‌توان الگوهای تنوع را به‌صورت چندبعدی نشان داد و تفسیر بیشتر در مورد ارتباط بین افراد را ممکن کرد (Khayam Nekouei *et al*., 2009). بردارها، ریشه‌های مشخصه، نسبت واریانس توجیه‌شده و جمع کل واریانس توجیه‌شده در تجزیهٔ مختصات اصلی نمونه‌های عدس با استفاده از آغازگر RAPD در جدول ۴ نشان داده شده است. مقدار واریانس نسبی هر مؤلفه، نشان‌دهندهٔ اهمیت آن مؤلفه در واریانس کل است و به‌صورت درصد بیان می‌شود. در این تجزیه، ۱۲ مؤلفهٔ اول توانستند در مجموع ۷۱/۹۹ درصد از واریانس کل را توجیه کند (جدول۳). دو مؤلفهٔ اول در مجموع ۲۲/۹۰ درصد از

واریانس کل را توجیه کردند. مطابق انتظار مؤلفهٔ اول بیشترین سهم را در توجیه تغییرات دارد که ۱۴/۱۵ درصد بود و سهم مؤلفهٔ دوم ۸/۷۵ درصد بود. تعداد مؤلفه‌های زیاد در ماتریس تشابه را می‌توان انعکاسی از توزیع پراکنش لوکوس‌های شناسایی‌شده توسط پرایمرها در کل ژنوم عدس دانست که موجب بیان پلی‌مورفیسم بیشتر شده‌اند. این بهترین حالت در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی است، زیرا نشانگرهای مولکولی از کروموزوم‌های مختلف انتخاب شده است و توزیع مناسب و یکنواخت در ژنوم دارد (Hajmansoor *et al*, 2010). نتایج به‌دست‌آمده با یافته‌های فاضلی و چقامیرزا در نخود مشابه بود، به‌طوری‌که نتایج آنان نشان داد توجیه بخش کمتری از تنوع کل توسط چند مؤلفهٔ اول و توزیع واریانس بین مؤلفه‌ها، بیانگر توزیع مناسب نشانگرها در ژنوم است. تجزیه به مختصات اصلی نتایج حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای را تقریباً تأیید کرد (شکل ۳). گروه‌بندی براساس دو بردار اول تجزیهٔ مختصات اصلی، تا حد زیادی مشابه گروه‌بندی تجزیهٔ خوشه‌ای در تشابه ۰/۵۱ بود و تفاوت‌های مشاهده‌شده، به این دلیل است که دو مؤلفهٔ اول نشان‌دهندهٔ درصد واریانس کمی از واریانس کل هستند.

جدول۴. بردار، مقادیر ویژه، سهم واریانس توجیه‌شده و سهم تجمعی واریانس توجیه‌شده در تجزیهٔ مختصات اصلی ژنوتیپ‌ها با استفاده از آغازگر RAPD

بردار	ریشهٔ مشخصه	سهم واریانس توجیه‌شده	سهم تجمعی واریانس توجیه‌شده
۱	۱,۳۳	۱۴,۵	۱۴,۱۵
۲	۰,۸۲	۸,۷۵	۲۲,۹۰
۳	۰,۷۰	۷,۴۷	۳۰,۳۸
۴	۰,۶۴	۶,۸۸	۳۷,۲۷
۵	۰,۵۲	۵,۵۲	۴۲,۷۹
۶	۰,۴۹	۵,۲۴	۴۸,۰۴
۷	۰,۴۷	۵,۰۶	۵۳,۱۰
۸	۰,۴۱	۴,۴۴	۵۷,۵۵
۹	۰,۳۸	۴,۰۷	۶۱,۶۳
۱۰	۰,۳۴	۳,۶۸	۶۵,۳۱
۱۱	۰,۳۳	۳,۵۳	۶۸,۸۵
۱۲	۰,۲۹	۳,۱۴	۷۱,۹۹



شکل۳. نمودار دوبعدی تجزیه به مؤلفه‌ها برای ژنوتیپ‌های عدس براساس نشانگرهای RAPD

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی حاکی از تنوع زیاد در بین ژنوتیپ‌های عدس و مناسب بودن نشانگر مولکولی RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های عدس است. ژنوتیپ‌های شیلی ۱۷ و شیلی ۲ نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها فاصلهٔ ژنتیکی بیشتری نشان دادند، بنابراین می‌توان با مطالعات تکمیلی و شناسایی بیشتر این ژنوتیپ‌ها، از آنها به‌عنوان والدین در دورگ‌گیری برای تولید ارقام هیبرید

استفاده کرد. شاخص‌های R_P و D_P ابعاد یکسانی از یک پرایمر را در بیان پلی‌مورفیسم و تفکیک افراد یک گونه نشان می‌دهند و کاربرد یکسان دارند.

سپاسگزاری

از بانک ژن دانشکدهٔ کشاورزی کرج سپاسگزاریم.

REFERENCES

1. Abe, J., Xu, D. H., Suzuki, Y., Kanazawa, A. & Shimamoto, Y. (2003). Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 445–453.
2. Abo-Elwafa, A., Muraik, K. & Shimada, T. (1995). Intra- and inter-specific variation in Lens species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 33-340.
3. Alabboud, I., Lizica, Gh. & Roman, V. (2009). Assesment of genetic diversity in lentil as revealed by RAPD marker. *Plant Molecular Biology Reporter*, 7, 101-111.
4. Bamdad, F. Dokhani, S. & Keramat, J. (2009). Functional assessment and Subunit constitution of lentil (*lens culinaris*) protein during germination. *International Journal of Agriculture & Biology*, 6, 690-694.
5. Dellaporta, S. L. Wood, J. & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA mini-preparation. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19.
6. Dhief, A., Ferdaws, G., Tibra, T., Neffati, M. & Samir, A., (2011). Natural genetic variation in *Calligonum* Tunisian genus analyzed by RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, 10, pp. 9766-9778.
7. Fazely, F. & cheghamirza, K. (2011). Genetic variation in iranian Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Kabuli type based on agronomic traits and RAPD marker. *Seed and Plant Improvment Journal*, 1-27, 555-579 .(In Farsi)
8. Fikiru, E., Tesfaye, K. & Bekele, E. (2011). Morphological and molecular variation in Ethiopian lentil (*Lens culinaris* Medikus) varieties. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. 3, 60-67.
9. Ford, R. Pang, E. C. K. & Taylor, P. W. J. (1997). Diversity analysis and species identification in Lensusing PCR generated markers. *Euphytica*, 96, 247–255 .
10. Graham, G. C., Henry, R. J. & Redden, R. J. (1994). Identification of navy bean varieties using random amplification of polymorphic DNA . *Australian Journal of Exprimental Agriculture*, 34, 1173-1176.
11. Hajmansoor, Sh., Bihamta, M. R Nabipor, A. R A. Mohammadi, S. M. Persyediand H. R. Nickhah. (2010). Genetic Diversity in Barley Genotypes: II. Microsatellite Markers and Morphological Traits. *Seed and Plant Improvment Journal*, 26-1, 150-171.(In Farsi)
12. Khayam Nekouei, M., Jahantighi, R., Solouki, M. Mohammadi, R. & Emamjomeh, A. A. (2009). Study on genetic diversity of tall fescue (*Festucaarundinacea Schreb*.) genotypes using AFLP marker. *Journal Agricultural Sciences and Natural Resource*, 16, 1.(In Farsi)
13. Li, J. J., Pei, G. L., Pang, H. X., Bilderbeck, A., Chen, S. S. & Tao, S. H. (2006). A new method for RAPD primers selection based on primers bias in nucleotide sequence data. *Journal of Biotechnology*, 126, 415-423.
14. Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. & Waugh, R. (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3, 127-136.
15. Mohammadi, S. A. & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 1235-1248.
16. Naghavi, M. R., Gareyazi, B. & Hosseini Salekdeh, B. (2005). *Molecular Markers*. University of Tehran Press, Tehran, Iran. 334pp. (In farsi).
17. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for gerplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
18. Prevost, A. & Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR ptrimers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics,* 98, 107-112.
19. Rohlf, F. J. (1998). NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter Software, New York
20. Sharma, S. K. Knox, M. R. & Ellis, T. H. N. (1996). AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparasion with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 93, 751-758.
21. Winter, P. & Kahl, G. (1995). Molecular marker technologies for crop improvement. *World Journal of Biotechnology*, 11, 449–460**.**
22. Yüzbasıoğlu, E., Özcan, S. & Açık, L. (2006). Analysis of genetic relationships among Turkish cultivars and breeding lines of lens culinatis Mestile using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 507-514.