بررسی تنوع آللی نشانگرهای ریزماهواره گروه پیوستگی ژنوم A در جمعیت‌های وحشی اینکورن و گندم هگزاپلوئید

Allelic Variation of Microsatellite Markers from Linkage Group A Genome in Wild Populations of *Einkorn* and Hexaploid Wheat

بهمن فاضلی‌نسب[1*]، محمدرضا نقوی[2] و علی‌اشرف مهرابی[3]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۴/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۹/۲۵

چکیده

به‌منظور بررسی تنوع آللی، هفت نشانگر ریزماهواره از گروه پیوستگی ژنوم A، ۲۱ رقم گندم هگزاپلوئید و ۲۱ جمعیت وحشی اینکورن مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع ۴۴ آلل با دامنه ۳ تا ۱۰ و میانگین ۶/۲ در گندم هگزاپلوئید و ۵۲ آلل در محدوده ۲ تا ۱۴ با میانگین ۷/۴ در جمعیت‌های اینکورن تکثیر شد. شاخص چندشکلی از ۰/۲۶ تا ۰/۸۱ و میانگین ۰/۵۸۸ برای گندم هگزاپلوئید و ۰/۳۷ تا ۰/۹۲ و میانگین ۰/۷۵ برای اینکورن به‌دست آمد. تجزیه خوشه‌ای با ترسیم خوشه بر اساس روش دورترین همسایه، مبتنی بر ماتریس تشابه جاکارد انجام که ارقام هگزاپلوئید و جمعیت‌ها وحشی اینکورن را به ۵ گروه منتسب کرد. در این گروه‌بندی ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید و اینکورن به‌خوبی از هم تفکیک شدند. میانگین بالای تعداد آلل و شاخص چندشکلی به‌دست آمده در جمعیت‌های وحشی اینکورن نشان‌دهنده تنوع بالا و مورد انتظار در جمعیت‌های وحشی گندم اینکورن موجود در ایران است.

واژه‌های کلیدی: گندم هگزاپلوئید، اینکورن، تنوع آللی، ژنوم A، ریزماهواره

۱. مدرس گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور ایلام، واحد بدره و دانش آموخته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تهران

۲. استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام، ایلام

*: نویسنده مسوول Email: Bfazelinasab@gmail.com

مقدمه

بر اساس طبقه‌بندی اخیر، اساساً ژنتیک‌دانان و اصلاح‌گران گندم، تمامی گونه‌هایی که در سه جنس طبقه‌بندی شده تریتیکوم، آژیلوپس و آمبلیوپایروم قرار می‌گیرند (به‌عبارتی گندم‌های زراعی و کلیه خویشاوندان نزدیک آنها) را گندم می‌نامند (Van-Slageren, 1994; Kafi *et al.*, 2005). در شجره گندم هگزاپلوئید، یکی از گونه‌های دیپلوئید، تریتیکوم و دو گونه نزدیک به هم (از لحاظ ژنومی) از جنس آژیلوپس مشارکت دارند (Katrin and Gale, 2000). جنس *Triticum* شامل ۴ گونه مجزا، اینکورن (۲x, AA)، امر(۴x, AABB)، تیموفیوی (۴x, AAGG) و گندم معمولی (۶x, AABBDD) می‌باشد که سه گونه *T. monococum*، *T. boeoticum* و *T. urartum* به گروه گندم اینکورن تعلق دارند (Mizumoto *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2010). گندم موسوم به اینکورن وحشی با نام علمی *T. boeoticum* عمومی‌ترین گندم خودروی موجود در ایران بوده که در حدود ۱۰۰۰۰ سال قبل از میلاد در خاور نزدیک کشت می‌شده‌اند (Keber and Dyck, 1990). گندم دارای سه گروه طبیعی ۱۴، ۲۸ و۴۲ کروموزوم با فرمول ژنومی AA، AABB و AABBDD بوده که کروموزوم‌ها در سه گروه همیولوگ A، B و D قرار دارند (Gupta *et al.*, 2008).

اگرچه ایران تنها مکان اصلی اهلی‌سازی گندم امر و معمولی نمی‌باشد، اما به‌عنوان یکی از مراکز اصلی توزیع گندم‌های وحشی به‌شمار می‌رود. بنابراین، رویشگاه‌های گندم‌های وحشی در غرب ایران (شرق قوس حاصلخیز (تپه‌های علی کوش در منطقه دهلران)) نواحی مناسبی جهت شناسایی ژن‌های مفید برای انتقال به گیاهان زراعی می‌باشد (Harlan and Zohary, 1966). با این حال اطلاعات ضروری درباره این رویشگاه‌ها با وجود توقعات و تأکیدات وسیع جهانی هنوز بسیار ناچیز است.

از جمله مطالعاتی که نقش مهمی در به‌کارگیری ذخایر ژنتیکی گندم دارند بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های خودرو گندم و مکان‌یابی ژن‌های آن‌ها می‌باشد (Brown, 1978). در این بین نشانگرهای مولکولی نیز بهترین تخمین را جهت تعیین تنوع ژنتیکی فراهم می‌کنند، زیرا تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند. انواع متنوعی از نشانگرهای مولکولی جهت بررسی تنوع ژنتیکی وجود دارد. این نشانگرها از نظر اصول، مقدار چندشکلی که نشان می‌دهند و همچنین از نظر دقت، تفاوت‌هایی با همدیگر دارند.

ریزماهواره‌ها توالی‌های تکراری ۶-۲ نوکلئوتیدی هستند که به تعداد فراوان و به‌صورت یکنواخت در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند و از تنوع بسیار بالای آللی برخوردارند و بر طبق قوانین مندل و به‌صورت هم‌بارز به نتاج منتقل می‌شوند. فناوری ریزماهواره بر پایه تکثیر قطعه DNA تکرار شونده با کمک PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از نواحی مجاور توالی‌های تکراری و تفکیک قطعات با کمک الکتروفورز می‌باشد که نتایج مربوط به آن در آزمایشگاه‌های مختلف نیز به‌راحتی قابل تکرار است (Roder *et al.*, 1995, 1998; Ablett *et al.*, 2006).

تاکنون مطالعات زیادی در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی توسط *پلاشک* و همکاران (Plaschke *et al.*, 1995)، *ماکافری و* همکاران (Maccaferri *et al.*, 2003)، *نقوی* و همکاران (Naghavi *et al.* 2007)، *سالم و* همکاران (Salem *et al.* 2008)، *فاضلی‌نسب* و همکاران (Fazeli nasab *et al.*, 2009) و *پراساد* و همکاران (Prasad *et al.*, 2009) صورت گرفته است.

با توجه به اینکه ایران به‌عنوان یکی از زیستگاه‌های اصلی گندم شناخته شده (Ozkan *et al.*, 2011) و گندم مرسوم به اینکورن وحشی، عمومی‌ترین گندم خودروی موجود در ایران (Keber and Dyck, 1990; Salimi *et al.* 2005) همچنین غنی از ژن‌های مقاومت به زنگ زرد می‌باشد (Ma *et al.*, 1997) و از طرفی دارای ژنوم AA است. در نتیجه در این تحقیق سعی شد تا تجزیه مقایسه‌ای بین ژنوم A در جمعیت‌های وحشی اینکورن و گندم هگزاپلوئید با کمک نشانگرهای ریزماهواره صورت گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعداد۲۱ رقم و لاین گندم هگزاپلوئید و ۲۱ جمعیت گندم وحشی اینکورن در این تحقیق استفاده گردید (جدول ۱).

استخراج و تکثیر DNA

استخراج DNAی ژنومی بر مبنای روش *دلاپورتا* و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1993) انجام شد. از میان تعداد زیادی آغازگر SSR گندم که توسط *رادر* و همکاران(Roder *et al.*, 1998) گزارش شده بود، تعداد ۷ جفت آغازگر (از هر گروه لینکاژی ژنوم A یک جفت) برای این تحقیق انتخاب شد (جدول۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس دستورالعمل *رادر* و همکاران (Roder *et al.*, 1995) انجام و الکتروفورز ژل

پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز استاندارد و رنگ آمیزی با استفاده از روش نیترات‌نقره (Bassam and Catano-Anolles, 1993) به قرار زیر انجام شد: جهت رنگ‌آمیزی، پس از جداسازی دو صفحه، صفحه شیشه‌ای حاوی ژل به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول ثابت‌کننده برروی شیکر با ۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد و پس از آن ۳ بار هرکدام به مدت ۲ دقیقه با آب‌مقطر آبشویی شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه (۳۰-۱۰ دقیقه) در محلول رنگ‌آمیزی قرار گرفت. در مرحله‌ی بعدی، به‌مدت ۱۰-۵ ثانیه در آب‌مقطر دوبار تقطیر سرد شستشو داده و سپس در محلول ظاهرکننده گذاشته و تکان داده شد (محلول خنک و دارای دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود). پس از ظاهرشدن نوارها، محلول متوقف‌کننده یا همان ثابت‌کننده، به محلول اضافه گردید تا باعث ظهور و در نتیجه از سیاه شدن زمینه ژل جلوگیری کند. سپس ژل با آب‌مقطر شستشو و در دمای آزمایشگاه خشک شد. پس از خشک‌شدن، ژل اسکن گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه داده‌های حاصل از ارزیابی نشانگرهای ریزماهواره، باید ماتریس تشابه یا ماتریس فاصله را تشکیل داد. داده‌های حاصل، نوارهایی هستند که در فواصل مختلف ژل از یک مبدأ مشترک و ثابت یعنی ته چاهک قرار گرفته‌اند در نتیجه فاصله‌ی هر نوار، یک صفت کمی محسوب می‌شود (فاصله بر حسب میلی‌متر) و برای تجزیه، نیاز است که به صفات کیفی تبدیل شوند. این تبدیل به‌صورت حضور و عدم‌حضور یک نوار در یک فاصله مشخص از ته چاهک انجام می‌گیرد که می‌توان به‌صورت قراردای به حضور عدد یک و عدم حضور عدد صفر اختصاص داد.

در این تحقیق امتیازبندی الگوهای نواری به‌صورت یک (وجود) و صفر(عدم‌وجود) برای هر نوار با استفاده از خط‌کش انجام و همچنین ماتریس تشابه نیز با استفاده از روش *جاکارد* (Jaccard, 1912) محاسبه گردید. شاخص چندشکلی (Diversity Index) که مقدار آن بین صفر تا یک است (Agrama and Tuinstra, 2003) با استفاده از فرمول $DI = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_j^2$ (Pj فراوانی آلل ژام در تمام ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی) محاسبه گردید(Anderson *et al.*, 1993). تجزیه خوشه‌ای با ترسیم خوشه بر اساس روش دورترین همسایه (Complete linkage) و با نرم‌افزار NTSYS-pc v.2.1 (Rohlf, 2002) مبتنی بر ماتریس تشابه جاکارد (Jaccard, 1912) انجام شد.

نتایج و بحث

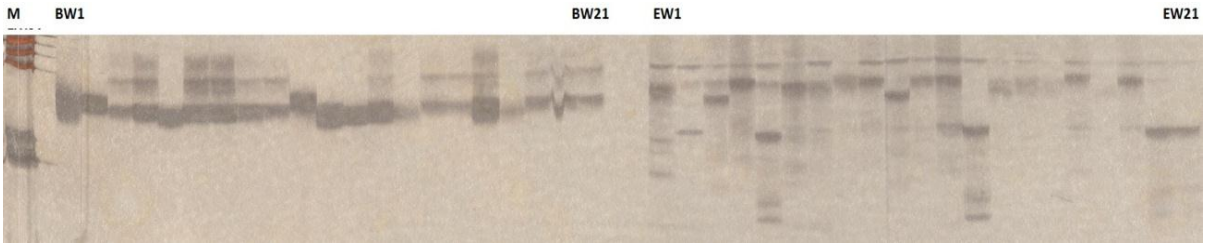
چندشکلی

با استفاده از ۷ جفت آغازگر ریزماهواره، در گندم هگزاپلوئید در مجموع ۴۴ آلل تکثیر شد که آغازگر *Xgwm*۱۳۰ -۷A با ۳ آلل کمترین تعداد و آغازگر *Xgwm*۳۳۴-۶A با ۱۰ آلل بیشترین تعداد آلل را داشتند (شکل ۱). میانگین تعداد آلل در کل مکان‌ها برابر ۶/۲۸ بود (جدول ۲). اما در گندم اینکورن با ۷ جفت آغازگر ریزماهواره در مجموع ۵۲ آلل تکثیر شد که آغازگر *Xgwm*۱۶۰ -۴A با ۲ آلل کمترین تعداد و آغازگر *Xgwm*۳۶۹-۳A با ۱۴ آلل بیشترین تعداد آلل را داشتند. میانگین تعداد آلل در کل مکان‌ها برابر ۷/۴۹ بود. با نتایج گزارش شده در مورد تعدا آلل تکثیری برای ریزماهواره در گندم توسط میر و همکاران (Mir *et al.*, 2012) با میانگین ۷/۰۲ آلل، *پراساد* و همکاران (Prasad *et al.*, 2009) از ۲ تا ۱۲آلل، *ماکافری* و همکاران (Maccaferri *et al.*, 2003) از ۲ تا ۱۲آلل، *پلاشک* و همکاران (Plaschek *et al.*, 1995) میانگین ۶/۲ آلل، مشابهت داشت. با توجه به اینکه آغازگرهای مورد استفاده از گندم هگزاپلوئید گرفته شده‌اند (Roder *et al.*, 1998) لذا تکثیر همه آنها در گندم‌های اینکورن بیانگر این است که ریزماهواره‌ها هم در گندم هگزاپلوئید و هم در گندم اینکورن موجود می‌باشند. از طرفی چون گندم‌های اینکورن به‌عنوان والددهنده ژنوم A گندم هگزاپلوئید شناخته شده‌اند (Gupta *et al.*, 2008) و همچنین ایران نیز غنی از گندم‌های اینکورن بوده (Waines, 1983; Naghavi *et al.*, 2007) و یکی از مراکز اصلی توزیع گندم‌های وحشی به‌شمار می‌رود به‌طوری‌که گزارش شده است (Harlan and Zohary, 1966) که زیستگاه اولیه *T. boeoticum* در بخش‌های مرکزی و شرقی قوس حاصلخیز از قبیل علی کوش (دهلران - ایران) و هاکیلار (ترکیه) می‌باشد بنابراین تلاش بیشتر را می‌رساند تا با مطالعه گسترده‌تر زیستگاه اصلی گندم‌های اینکورن را ایران قلمداد نماییم.

جدول۱: مشخصات ارقام گندم و جمعیت‌های وحشی اینکورن مورد استفاده در این آزمایش

Table1: Identification of Hexaploid and Einkorn landrace using in this research

علامت اختصاری Einkorn Wheat	Genotype/ Species ژنوتیپ/گونه	Origin	مبدا	ژنوتیپ/گونه	علامت اختصاری Bread Wheat	Genotype	ژنوتیپ
EW-1	*Triticum boeoticum*	Kermanshah	کرمانشاه	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-1	Tajan	تجن
EW-2	*Triticum boeoticum*	Azerbaijan sharghi	آذربایجان شرقی	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-2	Golestan	گلستان
EW-3	*Triticum boeoticum*	Kermanshah	کرمانشاه	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-3	Bolani	بولانی
EW-4	*Triticum boeoticum*	Lorestan	لرستان	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-4	Alvand	الوند
EW-5	*Triticum boeoticum*	Lorestan	لرستان	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-5	Sardari	سرداری
EW-6	*Triticum boeoticum*	Kermanshah	کرمانشاه	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-6	Ghafghaz	قفقاز
EW-7	*Triticum boeoticum*	Lorestan	لرستان	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-7	L. Shain	لاین شاین
EW-8	*Triticum boeoticum*	Kermanshah	کرمانشاه	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-8	Azar2	آذر۲
EW-9	*Triticum urartum*	Kurdistan	کردستان	تریتیکوم اورارتوم	BW-9	Tabasi	طبسی
EW-10	*Triticum urartum*	Kermanshah	کرمانشاه	تریتیکوم اورارتوم	BW-10	Omid	امید
EW-11	*Triticum boeoticum*	Kermanshah	کرمانشاه	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-11	Niknezhad	نیک نژاد
EW-12	*Triticum boeoticum*	Kurdistan	کردستان	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-12	Navid	نوید
EW-13	*Triticum boeoticum*	Azerbaijan sharghi	آذربایجان شرقی	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-13	Zarin	زرین
EW-14	*Triticum urartum*	Kermanshah	کرمانشاه	تریتیکوم اورارتوم	BW-14	Shoaleh	شعله
EW-15	*Triticum boeoticum*	Lorestan	لرستان	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-15	L. 518	لاین ۵۱۸
EW-16	*Triticum boeoticum*	Azerbaijan gharbi	آذربایجان غربی	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-16	Inea	اینیاء
EW-17	*Triticum boeoticum*	Lorestan	لرستان	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-17	Roshan	روشن
EW-18	*Triticum urartum*	Azerbaijan gharbi	آذربایجان غربی	تریتیکوم اورارتوم	BW-18	Bezostaya	بزوستایا
EW-19	*Triticum boeoticum*	Kermanshah	کرمانشاه	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-19	Falat	فلات
EW-20	*Triticum boeoticum*	Kermanshah	کرمانشاه	تریتیکوم بوئیتیکوم	BW-20	Ghods	قدس
EW-21	*Triticum urartum*	Kermanshah	کرمانشاه	تریتیکوم اورارتوم	BW-21	Mahdavi	مهدوی



شکل۱: الگوی نواری تولیدشده توسط آغازگر *Xgwm*۳۳۴ (شماره‌های BW1 تا BW21 و EW1 تا EW21 به‌ترتیب بیانگر گندم‌های هگزاپلوئید و گندم‌های اینکورن و M بیانگر نشانگر QX174 می‌باشد)

Fig. 1: Banding patterns produced by primer *Xgwm* 334 (No. BW1 to BW21 and EW1 to EW21 indicated hexaploid wheats and Einkorn wheats respectively, and M is indicated marker QX174)

شاخص چندشکلی

شاخص چندشکلی برای هر جایگاه ریزماهواره در تمام ارقام و جمعیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). بیشترین مقدار شاخص چندشکلی در ارقام گندم هگزاپلوئید با مقدار ۰/۸۱ مربوط به آغازگر *Xgwm*۳۷۲-۲A و کمترین مقدار شاخص چندشکلی با مقدار ۰/۲۶ مربوط به آغازگر *Xgwm*۳۳۴-۶A و میانگین کل ۰/۵۸۸ مشاهده گردید. با نتایج گزارش شده در مورد شاخص چندشکلی در ریزماهواره های گندم توسط *سالم* و همکاران (Salem *et al*., 2008) از ۰/۲۷ تا ۰/۸۱ و متوسط ۰/۵۴ و *آگراما و توینسترا* (Agarama and Tuinstra, 2003) از ۰/۲۳ تا ۰/۸۱ مشابهت داشت. ولی در جمعیت‌های گندم وحشی اینکورن، بیشترین مقدار چندشکلی با مقدار ۰/۹۲ برای آغازگر *Xgwm*۳۶۹-۳A و کمترین مقدار با مقدار۰/۳۷ برای آغازگر*Xgwm*۱۶۰-۴A و میانگین کل ۰/۷۵ بدست آمد. با نتایج *منیفستو* و همکاران (Manifesto *et al*., 2001) از ۰/۴ تا ۰/۸۴ با میانگین ۰/۷۲±۰/۱۴، *رادر* و همکاران (Roder *et al*., 2002) ۰/۳۹ تا ۰/۸۸ و میانیگن ۰/۶۷ و *میر* و همکاران (Mir *et al*., 2012) با میانگین ۰/۶۷ گزارش شده بود مشابهت داشت. شاخص چندشکلی(DI) می‌تواند به‌عنوان تخمینی از قدرت تمایز هر ریزماهواره با در نظرگرفتن تعداد و فراوانی نسبی آلل‌ها باشد (Agrama and Tuinstra, 2003; Fazeli nasab *et al*., 2006). بنابراین اگر چه برخی از ریزماهواره‌ها دارای تعداد آلل تکثیری مشابه می‌باشند، ولی به واسطه اینکه فراوانی این آلل‌ها در ارقام و جمعیت‌ها متفاوت است در نتیجه شاخص چندشکلی مختلفی را نشان داده‌اند. تفاوت در فراوانی آلل‌ها می‌تواند به‌عنوان یک معیار با ارزش برای هر ریزماهواره در ژنتیک جمعیت در نظر گرفته شود. در کل شاخص چندشکلی نمی‌تواند عدد ثابتی داشته باشد و بستگی به عواملی مثل تعداد باز گوانین و تیمین در نواحی تکرار شونده، تکرارهای دی نوکلئوتیدی (Roder *et al*., 1995; Fazeli nasab *et al*., 2009)، طول توالی تکراری (Bryan *et al*., 1997)، تعداد ژنوتیپ و تعداد آغازگر ریزماهواره (Roder *et al*., 1995) و تعداد آلل تولیدی توسط هر جایگاه که همبستگی مثبتی با میزان شاخص چندشکلی دارد (Maccaferri *et al*., 2003). در این تحقیق نیز رابطه بین تعداد آلل تکثیر شده برای هر آغازگر با میزان چندشکلی بررسی و مؤید مطالب بالا بود (شکل ۲).

با توجه به اینکه ایران به‌عنوان یکی از زیستگاه‌های اصلی گندم‌های اینکورن می‌باشد (Harlan and Zohary, 1966) پس انتظار می‌رود تنوع ژنتیکی در این گونه گیاهی زیاد باشد در نتیجه میزان بالای میانگین شاخص چندشکلی در جمعیت‌های وحشی اینکورن نسبت به گندم هگزاپلوئید مؤید مطلب بالا بوده و میانگین پایین شاخص چندشکلی در گندم هگزاپلوئید (اصلاح شده) می‌تواند به دلیل تلاش روزمره کشاورزان و محققین بخش کشاورزی در جهت بالا بردن میزان تولید در واحد سطح که نهایتاً منجر به کاهش تنوع ژنتیکی قابل انتظار شده توجیه نمود.

تجزیه خوشه‌ای

برای تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گندم از ماتریس تشابه حاصله، بر اساس ضریب تشابه جاکارد استفاده شد زیرا علت انتخاب این ضریب به‌عنوان ضریب مناسب برای تشکیل ماتریس تشابه آنست که اولاً ضریب همبستگی کوفنتیک مربوط به آن بالا بود (۸۷٪ =r_{coph}) و ثانیاً این ضریب از قابلیت بالایی برای تجزیه و تحلیل نشانگرهای هم‌بارز برخوردار است

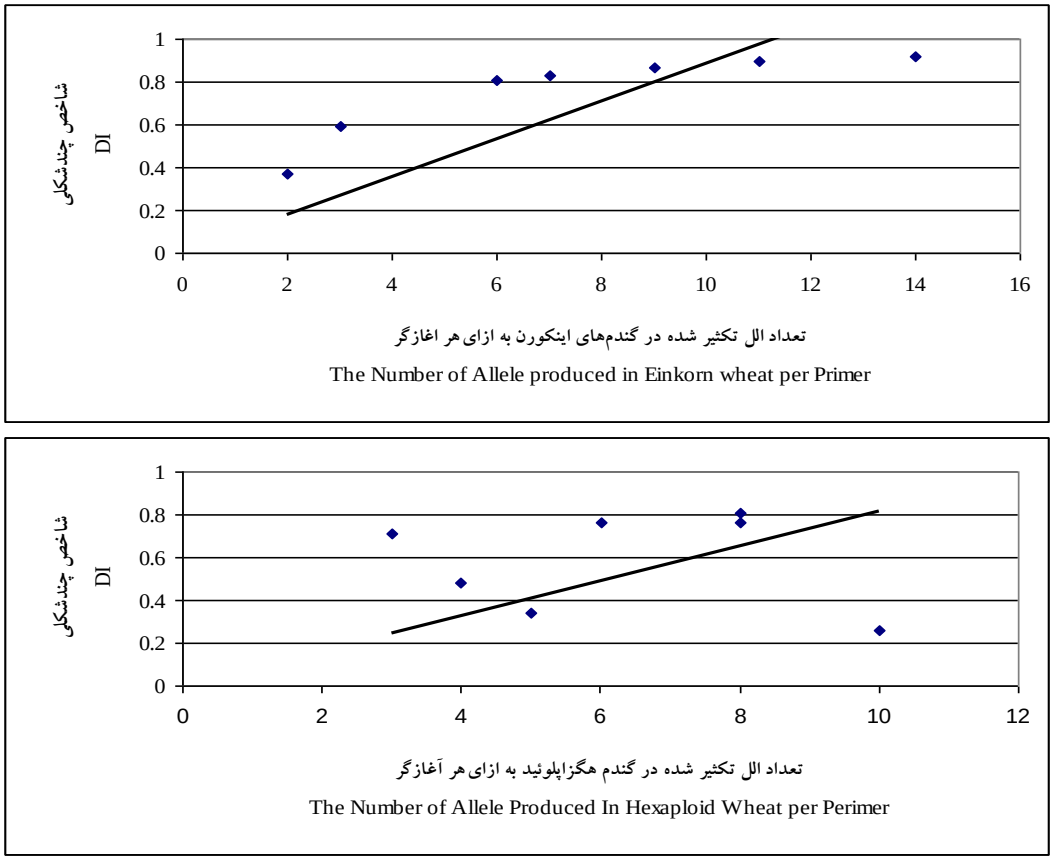
ژنوتیپ‌ها با استفاده از ماتریس تشابه *جاکارد* (Jaccard, 1912) با ترسیم خوشه و بر اساس روش تجزیه خوشه‌ای دورترین همسایه با نرم‌افزار NTSYS-pc v. 2.1 (Rohlf, 2002) خوشه‌بندی شدند و ۴۲ ژنوتیپ مورد استفاده در ۵ گروه مجزا (۳ گروه گندم هگزاپلوئید و ۲گروه گندم اینکورن) قرار گرفتند و در کل گندم‌های هگزاپلوئید و اینکورن کاملاً از هم جدا شدند (شکل۳).

در گندم‌های اینکورن بیشترین میزان تشابه (۱) بین ژنوتیپ‌های شماره EW-3 از کرمانشاه با EW-5 از لرستان و EW-19 از کرمانشاه با EW-20 از کرمانشاه و کمترین میزان تشابه (صفر) بین ژنوتیپ‌های EW-7 از لرستان با EW-13 از آذربایجان شرقی بدست آمد. میزان بسیار بالا و پایین تشابه مشاهده شده بین ژنوتیپ‌ها هر چند منطبق بر پراکنش جغرافیایی آنها می‌باشد اما بیانگر دلایل دیگری نیز خواهد بود مانند اینکه اولاً ریزماهواره‌های مورد استفاده محدوده‌ی کمی از ژنوم را پوشش دادند به همین دلیل ژنوتیپ‌های که دارای تشابه بسیار بالا هستند ممکن است در این محدوده از ژنوم ریزماهواره‌ها در آنها حفظ شده باشد که نتیجه خوبی است و برعکس عدم‌تشابه یا تشابه بسیار پایین فقط ممکن است به‌دلیل تکثیر نشدن ریزماهواره‌ای در آن محدوده‌ی خاص از ژنوم باشد که ممکن است دلایل دیگری جز عدم وجود ریزماهواره در آن محدوده باشد (پیدایش موتاسیون، نوترکیبی و غیره در مناطق حفاظت شده ریزماهواره یا ریزماهواره‌های این قسمت از ژنوم باشد (Gupta and Varshney, 2000; Poysa *et al*., 2002) که در هر حالت باعث تنوع شده است.

جدول۲: نام، مکان، تعداد آلل و شاخص چندشکلی آغازگرهای مورد استفاده در گندم‌های اینکورن و هگزاپلوئید

Table 2: name, site, number of Allele, DI of primers used in Hexaploid and Einkorn wheat's

نام آغازگر Primer name	جایگاه آغازگر Locus site	گندم اینکورن(Einkorn Wheat)		گندم هگزاپلوئید(Hexaploid Wheat)	
		تعداد آلل Number of Allele	شاخص چندشکلی Diversity Index	تعداد آلل Number of Allele	شاخص چندشکلی Diversity Index
*Xgwm*357	1A	2	0.59	6	0.76
*Xqwm*372	2A	9	0.87	8	0.81
*Xgwm*369	3A	14	0.92	8	0.76
*Xgwm*160	4A	2	0.37	5	0.34
*Xgwm*156	5A	11	0.9	4	0.48
*Xgwm*334	6A	5	0.81	10	0.26
*Xgwm*130	7A	7	0.83	3	0.71



شکل ۲: رابطه ساده بین تعداد آلل تکثیر شده در گندم‌های هگزاپلوئید و اینکورن با شاخص چندشکلی

Fig. 2: Relation of between the numbers of allele produced in hexaploid and einkorn wheat's with DI

تجزیه خوشه‌ای دو گونه *تریتیکم بوئتیکوم* و *تریتیکم اورارتو* را بسیار خوب تمایز داده (زیرخوشه 2B شکل ۳) و در ضمن زیر خوشه 2A شامل دو زیر خوشه دیگر است که جمعیت‌های EW-2، EW-13 و EW-16 متعلق به آذربایجان و کاملاً از زیرخوشه دیگر که جمعیت‌های EW-17 از لرستان، EW-19 و EW-20 از کرمانشاه قرار گرفته مجزا است.

از بررسی کلی خوشه مربوط به گندم‌های اینکورن مشاهده شد که گندم‌های دو استان لرستان و کردستان پراکندگی بیشتری در بین خوشه‌ها داشته که می‌تواند به‌علت تنوع بسیار بالا در این مناطق باشد و یا تعداد کم ریزماهواره‌ها نتوانسته آنها را از هم جدا کند که مطالعه بیشتر نیاز دارد.

در مورد گندم‌های هگزاپلوئید (نان یا اصلاح شده) چون تغییر و تحولات زیادی در بهبود خصوصیات کمی و کیفی داشته‌اند متأسفانه خصوصیت بارز، مشترک و مشخصی ندارند که بتوان از آن جهت تجزیه و تحلیل خوشه مربوطه استفاده کرد و هدف استفاده از آنها بیشتر بررسی وجود نقاط مشترک احتمالی (ریزماهواره‌ها) با گندم‌های اینکورن بود زیرا آغازگرها از گندم هگزاپلوئید طراحی شده بودند (Roder *et al.*, 1998) و تکثیر این آغازگرها در هر دو نوع گندم بیانگر وجود نقاط مشترک بسیار زیاد بین آنها می‌باشد.

تجزیه به مختصات اصلی

تجزیه به مختصات اصلی همواره نمی‌تواند تعداد زیادی از متغیرهای اولیه را به تعداد کمتری از متغیرهای تبدیل شده کاهش دهد. در واقع اگر متغیرهای اولیه همبستگی نداشته باشند این تجزیه بی‌ارزش خواهد بود و بهترین نتایج زمانی عاید می‌شود که متغیرهای اولیه همبستگی بسیار شدید مثبت و منفی داشته باشند. اگر این حالت مطلوب رخ دهد، مختصات اصلی مهم می‌توانند به‌عنوان معیارهای، جهت نشان‌دادن جنبه‌های متفاوتی از داده‌ها جالب توجه باشند.

با توجه به شباهت کروموزومی گندم، خودگشنی (که منجر به هموزیگوسی می‌شود) و هم‌بارز بودن ریزماهواره‌ها، تجزیه به مختصات اصلی بر روی داده‌ها صورت گرفت و نشان داد که مقادیر ویژه در روش جاکارد برای سه مؤلفه اول تنها ۳۷ درصد کل واریانس را توجیه کرد. با علم به اینکه فنوتیپ اثر و فرآورده نهایی ژن است که در محیط خاصی ظاهر می‌شود و با توجه به خاصیت پلیوتروپی ژن‌ها، در نتیجه انتظار می‌رود برخی صفات مورفولوژیک توسط یک ژن و یا ژن‌های که بر روی یک یا تعداد بیشتری کروموزوم قرار دارند کنترل شود در نتیجه در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انتظار می‌رود اکثر متغیرها توسط مؤلفه‌های کمتری توجیه شوند از طرفی با توجه به اثرات مستقل ژن‌ها و فاصله و میزان نوترکیبی آن‌ها انتظار می‌رود پیوستگی بین ژن‌هایی که روی کروموزوم‌های مختلفی قرار دارند فقط زمانی معنی داشته باشد که در سطح فنوتیپ (متغیرهای کمی) نمایان شوند در نتیجه تجزیه به مختصات اصلی بر روی این قسم از داده نبایستی منجر به کاهش متغیرها به ۲ یا ۳ مؤلفه شود چون متغیرها هر کدام اطلاعات متفاوتی را ارائه می‌دهند. در این تحقیق مقدار پایین مؤلفه‌های اصلی مؤید مطلب بالا بوده و نشان‌دهنده‌ی وجود چندشکلی در نقاط مختلف ژنوم می‌باشد. ترسیم دو بعدی و سه بعدی که در مجموع به‌ترتیب ۳۱ و ۳۷ درصد اطلاعات نوارهای نمره‌دهی شده را در برداشتند، ژنوتیپ‌ها به‌خوبی از هم جدا کردند (شکل ۴ و شکل ۵) در نتیجه با توجه به اینکه نشانگرهای ریزماهواره اختصاصی و دارای مناطق حفاظت شده می‌باشند چنین استنباط می‌شود که تعداد اندکی نشانگر ریزماهواره با پراکنش مناسب در سطح ژنوم مورد بررسی می‌تواند به‌خوبی در تفکیک ژنوتیپ‌ها بکار رود.

بحث کلی

با بررسی چندشکی، شاخص چندشکلی و خوشه‌بندی ریزماهواره‌های مورد استفاده در گندم‌های اینکورن و هگزاپلوئید می‌توان نتیجه گرفت که با این تعداد کم ریزماهواره دو گروه گندم به‌خوبی از هم جدا شده‌اند که می‌تواند از قدرت بالای ریزماهواره در جداسازی گونه‌های مختلف باشد (Powell *et al.*, 1996).

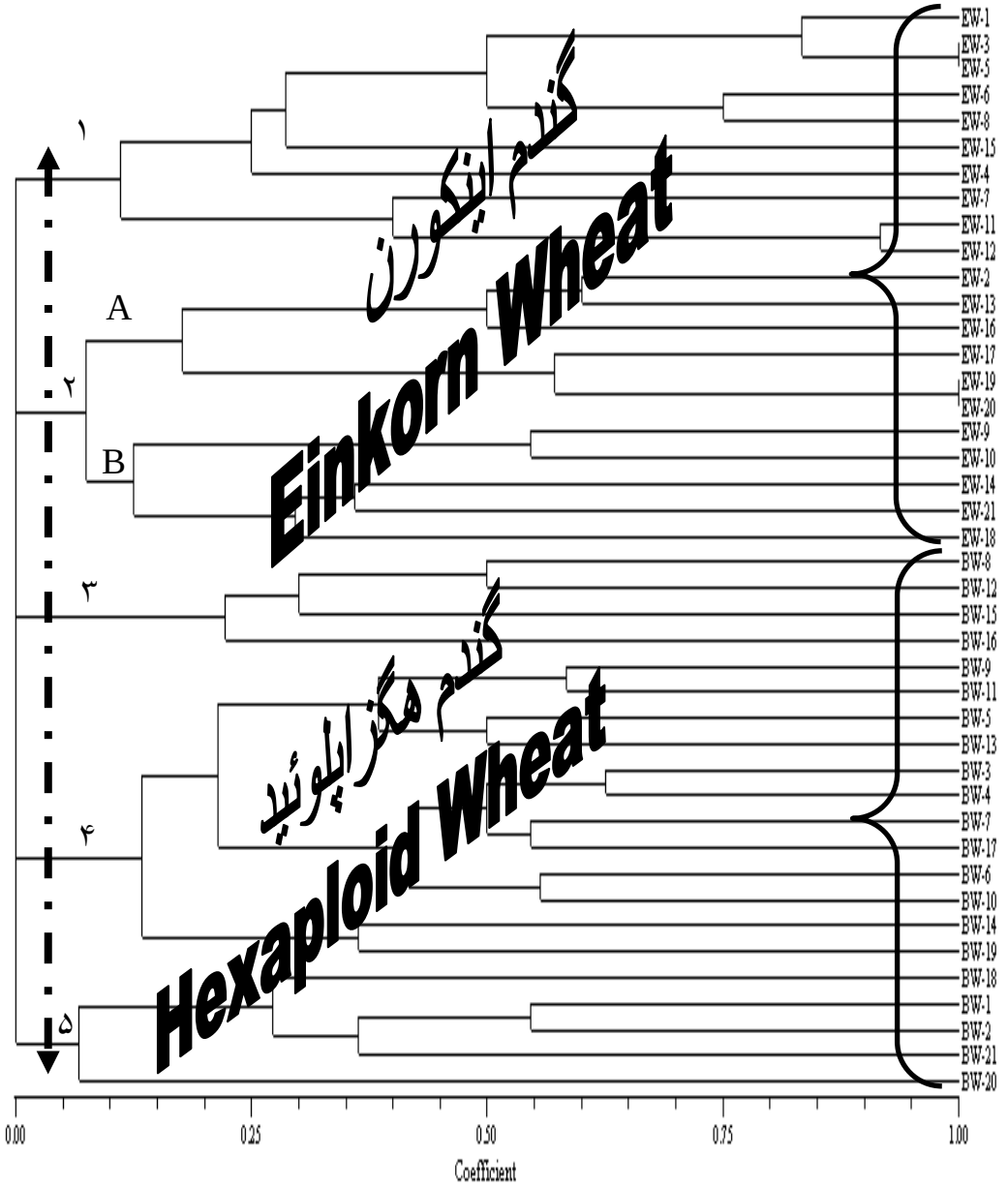
با توجه اینکه آغازگرهای ریزماهواره اختصاصی و از مناطق حفاظت شده کناری طراحی می‌شوند پس اختلاف بین ارقام و گونه‌های مختلف به دلیل تفاوت در ناحیه تکراری ژنوم می‌باشد (Rode *et al.*, 1995, 1998; Gupta and Varshney, 2000). از طرفی چون گندم‌های هگزاپلوئید بیشتر در جهت بهبود صفات کمی، کیفی، ریزش، ورس و غیره اصلاح شده‌اند در نتیجه باید تنوع بین آنها کمتر شده باشد. در این تحقیق نیز مشخص شد که انحراف معیار تنوع آللی گندم‌های اینکورن (۴/۵۲) بیشتر از گندم‌های هگزاپلوئید (۲/۴۹) می‌باشد. با توجه به اینکه در این تحقیق فقط ژنوم A بررسی شد و از طرفی گندم هگزاپلوئید دارای ژنوم B و D نیز می‌باشند در نتیجه مقدرای از تنوع آللی در گندم‌های هگزاپلوئید می‌تواند به‌دلیل تکثیر قسمت دیگری از DNA روی ژنوم‌های دیگر باشد و یا در جریان الحاق گندم های وحشی و تبدیل آنها به گندم‌های نان امروزی در اثر انتخاب و گزینش و نهایتاً

اصلاح این گندم ها، موتاسیون و نوترکیبات مختلفی در مناطق حفاظت شده ریزماهواره‌ها و یا توالی‌های تکراری پیش آمده باشد و منجر به ایجاد و یا حذف ریزماهواره جدیدی شده در نتیجه همین عوامل باعث شده که ریزماهواره‌ها در گندم‌های هگزاپلوئید و اینکورن از نظر تعداد آلل تکثیری، نواحی تکثیر شده و یا تعداد توالی‌های تکراری که به‌واسطه مکانیزم سرخوردن پلی‌مراز در جریان همانندسازی در نواحی تکرار شونده به‌وفور اتفاق می‌افتد (Naghavi *et al.*, 2004; Ablett *et al.*, 2006) با هم فرق داشته و باعث ایجاد تنوع ژنتیکی شده باشد که نیازمند تحقیقات کلی‌تری در این رابطه است.

تنوع در ریزماهواره‌ها زمانی مفهوم خواهد داشت که بتوان از آن بیشتر در جهت بهبود خصوصیات کمی و کیفی و تا حدودی نیز در شناسایی و تعیین ژنوتیپ استفاده نمود که جهت بهبود خصوصیات کمی و کیفی نیاز است ریزماهواره‌ها، می‌توانند یا ژن باشند و یا پیوستگی با ژن‌ها داشته باشند که در این رابطه نیز برخی از ریزماهواره‌ها از جمله *Xgwm*44، *Xgwm*120، *Xgwm*37، *Xgwm*570، *Xgwm*455، *Xgwm*122، *Xgwm*106، *Xgwm*443 و غیره در پیوسته با ژن‌های عامل مقاومت به زنگ مثل Lr19، Lr41، Lr52 و غیره شناسایی شده‌اند (Hiebert *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2009) و همچنین توالی برخی از ژن‌های گندم مانند آلفا آمیلاز۳(9(TA)12CA(TA))، آلفا آمیلاز۲(7(GCT))، آلفا، بتا گلیادین(n(CAA))، گاما گلیادین (n(CAG)n(CAA)) و گلوتنین با وزن مولکولی پایین(8(CAA)5(CAG)) به صورت توالی‌های تکراری (ریزماهواره‌ها) گزارش شده است (Devos *et al.*, 1995). در این تحقیق تنوع آللی و چندشکلی در گندم‌های اینکورن و هگزاپلوئیدها باعث شد که در دو گروه متفاوت قرار گیرند و اما جهت اینکه بتوان از این تنوع استفاده نمود بهتر است تحقیقاتی تکمیلی و بسته به هدف تحقیق از نشانگرهای ریزماهواره‌ای پیوسته با ژن‌های مفید و یا ژن‌های دارای توالی‌های تکراری استفاده کرد تا به‌طور دقیق از میزان تنوع اطلاع پیدا نمود و در صورت مفید بودن بتوان از آن استفاده کرد.

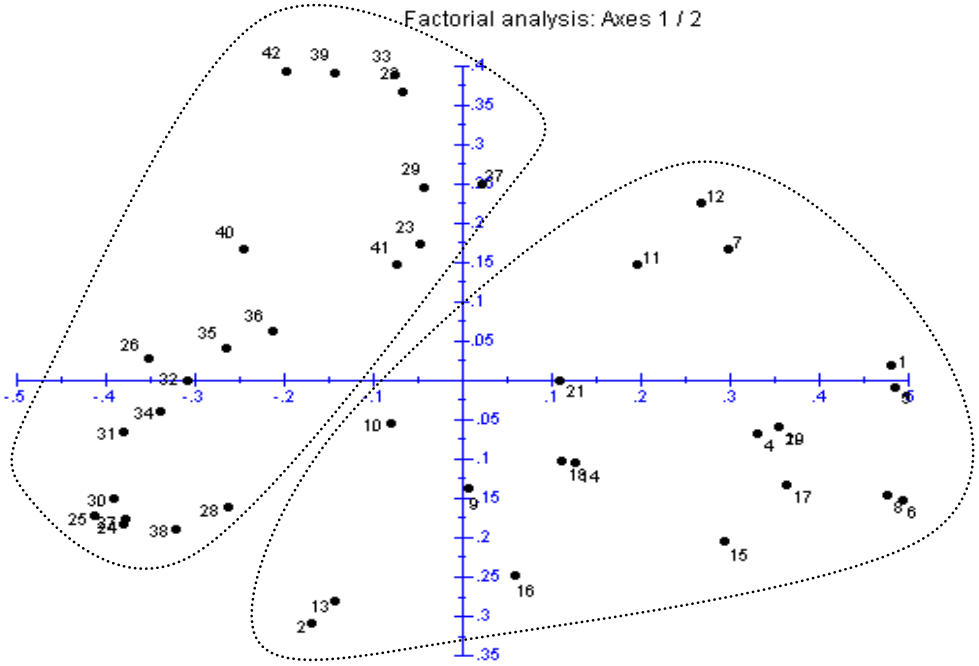
با توجه به گزارش *وینز* (Waines, 1983)، *وینز و پاین*(Waines and Payne, 1987)، *سلیمی* و همکاران (Salimi *et al.*, 2005) و *ازکان* و همکاران (Ozkan *et al.*, 2011) مبنی بر پراکنش گونه‌های *T. monococcum*، *T. urartu* و *T. boeoticum* (منشأ ژنوم‌های A) که غرب، شمال‌غرب و مرکز ایران را محل تمرکز این گونه‌ها معرفی کرده و نتایج این تحقیق، می‌توان شرق قوس حاصلخیز (غرب ایران) به‌عنوان مرکز تنوع گونه‌های اینکورن دانست.

در کل ارقام زراعی نیمه‌پاکوتاه مانند گندم عمدتاً در معرض فرسایش ژنتیکی هستند که نتیجه‌ی اولیه‌ی جایگزین شدن توده‌های بومی گونه‌های غلات در مناطق منشأ آنها است. ارائه ارقام زراعی مدرن برای تأمین مواد غذایی مورد نیاز مردم جهان لازم بوده و عدم پذیرش استفاده از ارقام زراعی پیشرفته منجر به گرسنگی و سوءتغذیه به دلیل کاهش تولید غلات می‌گردد (Skovmand *et al.*, 2002) اما انتخابی که در طی برنامه‌های اصلاحی صورت می‌گیرد، فراوانی آلل‌ها یا ترکیبات آللی دلخواه را به هزینه کاهش فراوانی دیگر آلل‌ها و نهایتاً حذف تعداد زیادی از آنها افزایش می‌دهد. در نتیجه امکان کاهش تنوع ژنتیکی در بسیاری از برنامه‌های اصلاحی وجود دارد و چاره منطقی فرسایش ژنتیکی، حفظ توده‌های بومی و خویشاوندان وحشی برای جلوگیری از دست رفتن این منابع طبیعی است (Chen *et al.*, 1994).



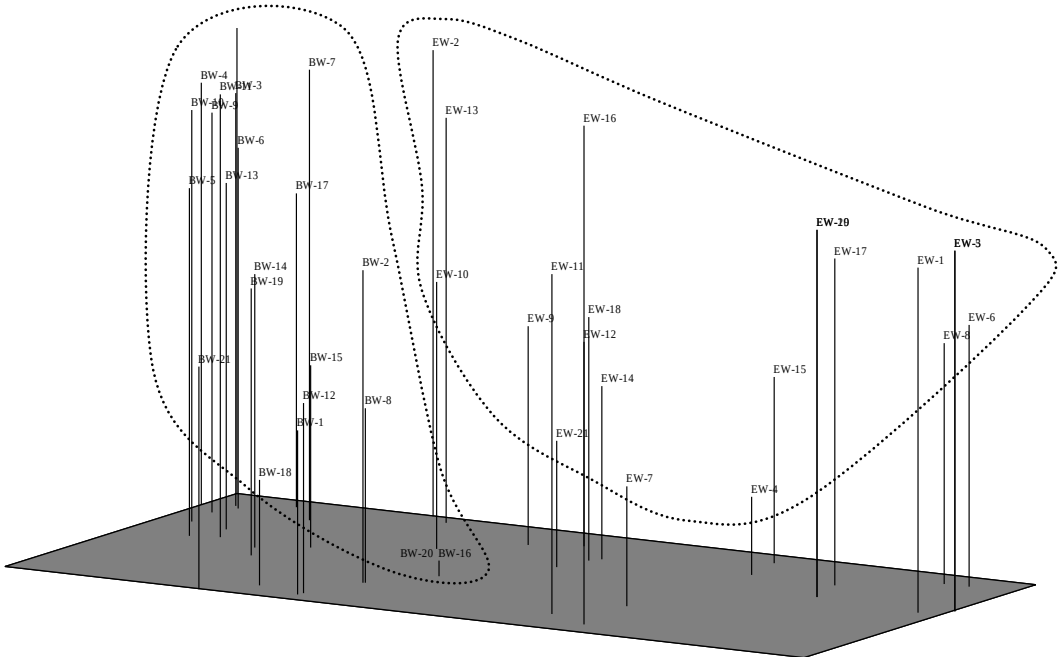
شکل ۳: خوشه‌بندی گندم‌های هگزاپلوئید و اینکورن مورد مطالعه بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و روش COMPLETE حاصل از اطلاعات نشانگرهای SSR ژنوم A (EW= einkorn wheat; BW=bread wheat)

Fig. 3: Cluster of hexaploid and einkorn wheat's has produced by Jaccard matrix and complete method using SSR data of a genome in einkorn wheat (EW) and bread wheat (BW)



شکل ۴: ترسیم دو بعدی ۴۲ ژنوتیپ مورد بررسی با استفاده از اطلاعات دو محور مختصات اصلی اول و دوم

Fig. 4: Biplot illustration of 42 genotypes using two fist principal coordinates



شکل ۵: ترسیم سه بعدی ۴۲ ژنوتیپ مورد بررسی با استفاده از اطلاعات سه محور مختصات اصلی اول، دوم و سوم

Fig. 5: Tree plot illustration of 42 genotypes using tree principal coordinates

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۷ - ۱۹ متن انگلیسی مراجعه شود.