



بررسی تنوع ژنتیکی گندم‌های اینکورن با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

* هادی خارستانی^۱، علی اصغر نصراله نژادقمی^۲ و علی اشرف مهربانی^۳

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه ایلام، آستادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، آستادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه ایلام
تاریخ دریافت: ۹۱/۰۳/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۱/۱۴

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ جمعیت گندم اینکورن که شامل ۱۳ جمعیت *Triticum boeoticum*، ۴ جمعیت *T. monococcum* و ۵ جمعیت *T. urartu* بود، از ۲۴ جفت آغازگر ریزماهواره ژنوم AA گندم نان استفاده شد که در نهایت ۲۰ نشانگر چندشکلی مناسب از خود نشان دادند. در مجموع ۸۶ آلل برای تمامی مکان‌های ژنی مشاهده گردید. میزان چندشکلی در مکان‌های ژنی، دامنه‌ای بین ۹-۲ آلل و میانگین ۴/۱ آلل برای هر مکان ژنی بود. محتوای اطلاعات چندشکلی از ۰/۰۹ برای نشانگر Xgwm99-1A تا ۰/۸۶ برای نشانگر Xgwm165-4A متفاوت بود. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به دست آمده با استفاده از ماتریس نبود تشابه دایس و الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه، جمعیت‌ها را در ۳ گروه قرار داد که گندم‌های *T. monococcum* تهیه شده از Triticarte P/L استرالیا و دو جمعیت *T. urartu* در یک گروه قرار گرفتند اما جمعیت‌های *T. boeoticum* و *T. urartu* به خوبی از یکدیگر تفکیک نشدند. همچنین در این جمعیت‌ها هیچ‌گونه تفکیکی از نظر جغرافیایی و مولکولی مشاهده نشد که نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های مربوط به دو گونه می‌باشد. اما جمعیت‌های جمع‌آوری شده از شمال غرب ایران تنوع بیشتری نسبت به جمعیت‌های جمع‌آوری شده از غرب کشور نشان دادند. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی در غرب و شمال غرب کشور بالا بود و می‌توان از این تنوع برای پیدا کردن ژن‌های مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اینکورن، تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، ژنوم AA، گندم.

* مسئول مکاتبه: kharestanihadi982@gmail.com

مقدمه

جنس *Triticum* را از نظر سیتوژنتیکی می‌توان به ۴ گروه تقسیم کرد که شامل گندم‌های اینکورن^۱ (AA, $2n=2x=14$)، امر^۲ (AABB, $2n=4x=28$)، تیموفوی^۳ (AAGG, $2n=4x=28$) و گندم نان (AABBDD, $2n=6x=42$) می‌باشند. ۳ گونه *T. boeoticum*، *T. monococcum* و *T. urartu* جزء گندم‌های اینکورن محسوب می‌شوند (میزوموتو و همکاران، ۲۰۰۲). گونه زراعی *T. monococcum* از گونه وحشی *T. boeoticum* منشأ گرفته است. اگرچه هر ۳ گونه دارای ژنوم AA می‌باشند، اما منشأ ژنوم AA گندم نان، *T. urartu* می‌باشد (دووراک و همکاران، ۱۹۹۳). خاورمیانه زیستگاه اولیه گندم‌های اینکورن می‌باشد که در قسمت‌های شمال و شرق هلال حاصل‌خیزی قرار دارند (هارلن و زوهاری، ۱۹۹۶). ایران یکی از مراکز اصلی توزیع گندم‌های وحشی می‌باشد (کیمبر و فلدمن، ۱۹۸۷) اما اطلاعات کمی از تنوع ژنتیکی و نحوه پراکنش جمعیت گندم‌های وحشی در این منطقه در دسترس می‌باشد. این نشان می‌دهد که جمعیت‌های وحشی جنس *Triticum* در این منطقه دارای سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی هستند و از آنجا که این گندم‌ها به‌عنوان اجداد گندم شناخته می‌شوند، بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها می‌تواند اطلاعات زیادی برای استفاده از این منابع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی در اختیار ما قرار دهد. روش‌هایی که برای تخمین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند متفاوت می‌باشند. از جمله آن‌ها می‌توان ثبت شجره، خصوصیات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی را نام برد (کاکس و همکاران، ۱۹۸۵). آگاهی از تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌ها معیاری مناسب برای استفاده از آن‌ها در شناسایی و انتقال ژن‌ها در بهبود گیاهان زراعی می‌باشد. جنس *Triticum* به‌عنوان ذخایر مطلوب مقاومت به تنش‌های زیستی از جمله حشرات و پاتوژن‌ها و تنش‌های غیرزنده مانند مقاومت به خشکی و شوری مطرح می‌باشد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۷). برای بررسی تنوع ژنتیکی گندم نشانگرهای زیادی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در ابتدا خصوصیات مورفولوژیکی به‌عنوان نشانگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گرفت اما این نشانگرها بیش‌تر تحت تأثیر محیط بوده و قابل اطمینان نیستند. به هر حال نشانگرهای مبتنی بر DNA^۴ برای اصلاح گیاهان زراعی روند رو به رشدی داشته‌اند (میلر و همکاران، ۱۹۸۹). نشانگرهای مبتنی بر PCR^۵ از جمله RAPD^۶، AFLP^۷ و

-
- 1- Einkorn
 - 2- Emmer
 - 3- Timophevi
 - 4- Deoxyribo Nucleic Acid
 - 5- Polymerase Chain Reaction
 - 6- Random Amplified Polymorphism DNA
 - 7- Amplified Fragment Length Polymorphism

ریزماهواره‌ها^۱ ابزاری قدرتمند برای مطالعه تنوع ژنتیکی گندم‌های زراعی و وحشی محسوب می‌شوند (سلیمانی و همکاران، ۲۰۰۲). ریزماهواره‌ها نشانگرهای مبتنی بر PCR هستند که به‌خاطر سطوح بالای چندشکلی، چنداللی بودن، وراثت هم‌باز، پوشش وسیع ژنوم و سهولت در آشکارسازی می‌توان از آن‌ها برای بررسی تنوع بین گونه‌های وحشی و زراعی استفاده کرد (پلاشکه و همکاران، ۱۹۹۵). به هر حال ریزماهواره‌ها به‌صورت گسترده در مطالعات مختلف گندم از جمله نقشه لینکاژ، نقشه‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده خصوصیات کمی، انتخاب به کمک نشانگر و بررسی فیلوژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند (سومرس و همکاران، ۲۰۰۴؛ پیلارد و همکاران، ۲۰۰۳؛ تکلو و همکاران، ۲۰۰۶؛ للی و همکاران، ۲۰۰۰). در حقیقت ریزماهواره‌ها به‌خاطر وراثت هم‌باز، چندشکلی بالا و چنداللی بودن برای پی بردن به تنوع ژنتیکی از اهمیت بالایی برخوردار هستند. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی گندم‌های اینکورن با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و به‌دست آوردن تنوع موجود در بین این گندم‌ها برای اهداف اصلاحی و همچنین تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌های مختلف گندم اینکورن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذرهای ۲۲ جمعیت از ۳ گونه مختلف گندم اینکورن شامل سیزده جمعیت *T. boeoticum*، ۴ جمعیت *T. monococcum* و ۵ جمعیت *T. urartu* از استان‌های غربی، شمال‌غربی و Triticarte P/L استرالیا جمع‌آوری و تهیه شد (جدول ۱). از ۳-۴ گیاهچه دو هفته‌ای به‌دست آمده از کشت بذرها با روش CTAB^۲ (دویول و همکاران، ۱۹۸۷) و به‌صورت توده‌ای DNA استخراج شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۰/۸۰ درصد استفاده شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۲۴ جفت آغازگر ریزماهواره مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود که شامل ۲/۵۰ میکرولیتر بافر 1x، ۲ میکرولیتر آنزیم تک‌پلی‌مراز، ۲۰۰ میکرومول از انواع dNTP^۳، ۰/۵۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم و ۸۰ نانوگرم DNA بود.

- 1- Microsatellites
- 2- Cetyltrimethyl Ammonium Bromide
- 3- Deoxyribonucleotide Triphosphate

جدول ۱- اطلاعات محل جمع آوری نمونه‌های گندم‌های اینکورن مورد استفاده در این پژوهش.

ردیف	جنس	گونه	محل جمع آوری	ردیف	جنس	گونه	محل جمع آوری
۱	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۱	قروه	۱۲	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۱۲	جونقان- چهارمحال بختیاری
۲	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۲	کرمانشاه	۱۳	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۱۳	سفیددشت
۳	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۳	اهر	۱۴	تریتیکوم	اورارتو ۱	مریوان
۴	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۴	خرم‌آباد	۱۵	تریتیکوم	اورارتو ۲	شهرکرد
۵	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۵	تبریز	۱۶	تریتیکوم	اورارتو ۳	ناغان
۶	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۶	مریوان	۱۷	تریتیکوم	اورارتو ۴	کرمانشاه
۷	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۷	کرمانشاه	۱۸	تریتیکوم	اورارتو ۵	کرمانشاه
۸	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۸	طالقان	۱۹	تریتیکوم	مونوکوکوم ۱	Triticarte P/L استرالیا
۹	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۹	اسلام‌آباد	۲۰	تریتیکوم	مونوکوکوم ۲	Triticarte P/L استرالیا
۱۰	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۱۰	ناغان	۲۱	تریتیکوم	مونوکوکوم ۳	Triticarte P/L استرالیا
۱۱	تریتیکوم	بوئتی‌کوم ۱۱	سفیددشت	۲۲	تریتیکوم	مونوکوکوم ۴	Triticarte P/L استرالیا

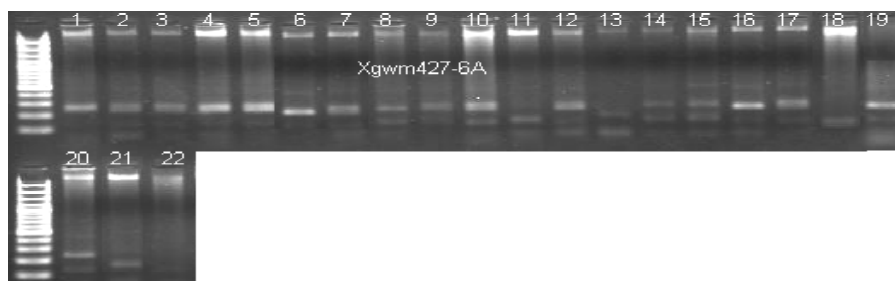
جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده به همراه میزان اطلاعات چندشکلی آن‌ها.

مکان ژنی	آغازگر چپ	آغازگر راست	موتیف	دمای اتصال
Xgwm164-1A	ACA TTT CTC CCC CAT CGTC	TTG TAA ACAAAT CGC ATG CG	GA (37)	۵۵
Xgwm99-1A	AAG ATG GAC GTA TGC ATCACA	GCC ATA TTTGAT GAC GCA TA	CA (21)	۶۰
Xgwm497-1A	GTA GTG AAG ACA AGG GCATT	CCG AAA GTTGGG TGA TAT AC	GT (29)	۵۵
Xgwm357-1A	GGT CAA AGT TGG ACC TCG TAT	AGG CTG CAG CTC TTC TTC AG	GA (18)	۵۵
Xgwm10-2A	CGC ACC ATC TGT ATC ATTCTG	TGG TCG TACCAA AGT ATA CGG	AT (5) GT (15)	۵۰
Xgwm249-2A	CAA ATG GAT CGA GAA AGGGA	CTG CCA TTTTTC TGG ATCTAC C	GA (11) GGA (8)	۵۵
Xgwm95-2A	GAT CAA ACA CAC ACC CCTCC	AAT GCA AAGTGA AAA ACC CG	GA (11)	۶۰
Xgwm312-2A	GCA TGA TGC ACG TAG AG ATC	ACA TGC ATG CCT ACC TAA TGG	GA (37)	۶۰
Xgwm372-2A	AGA GCC CTG GGA CTG GG AAT	GAA GGA CGA CAT TCC ACC TG	GA<51	۶۰
Xgwm2-3A	CTG CAA GCC TGT GAT CAACT	CAT TCT CAAATG ATC GAA CA	AC (16)	۵۰
Xgwm369-3A	CTG CAG GCC ATG ATGATG	ACC GTG GGIGTT GTG AGC	CT(11)T(2)CT(21)	۵۵
Xgwm32-3A	TAT GCC GAA TTT GTG GACAA	TGC TTG GTCTTG AGC ATC AC	GA (19)	۶۰
Xgwm162-3A	AGT GGA TCG ACA AGG CTCTG	AGA AGA AGCAA GCC TTC CC	CA (14) AACA (4)	۵۵
Xgwm4-4A	GCT GAT GCA TAT AAT GCTGT	CAC TGT CTGTAT CAC TCT GCT	CA (13) TA (26)	۶۰
Xgwm165-4A	TGC AGT GGT CAG ATG TTTCC	CTT TTC TTTCAG ATT GCG CC	GA (60)	۶۰
Xgwm397-4A	TGT CAT GGA TTA TTT GGTCGG	CTG CAC TCTCGG TAT ACC AGC	CT (55)	۵۵

ادامه جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده به همراه میزان اطلاعات چندشکلی آن‌ها.

مکان ژنی	آغازگر چپ	آغازگر راست	موتیف	دمای اتصال
Xgwm126-5A	CAC ACG CTC CAC CAT GAC	GTT GAG TTGATG CGG GAG G	CA (15)	۶۰
Xgwm156-5A	CCA ACC GTG CTA TTA GTCATT C	CAA TGC AGGCC TCC TAA C	GT (14)	۶۰
Xgwm334-6A	AAT TTC AAA AAG GAG AGAGA	AAC ATG TGTTTT TAG CTA TC	GA (19)	۵۰
Xgwm427-6A	AAA CTT AGA ACT GTA ATTCA GA	AGT GTG TTCATT TGA CAG TT	CA (31) CA (22)	۵۰
Xgwm169-6A	ACC ACT GCA GAG AAC ACATAC G	GTG CTC TGCTCT AAG TGT GGG	GA (23)	۶۰
Xgwm570-6A	CCT TTT ACA GTC GGC TCG	ATG GGT AGC TGA GAG CCA AA	GT (14) GT (18)	۶۰
Xgwm130-7A	AGC TCT GCT TCA CGA GGAAG	CTC CTC TTTATA TCG CGT CCC	GT (22)	۶۰
Xgwm99-7A	ACA TTT CTC CCC CAT CGTC	TTG TAA ACAAAT CGC ATG CG	CA (21)	۶۰

چرخه‌های PCR به صورت، ۴ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه (۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه دمای ۵۵، ۶۰ یا ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در نهایت ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. محصولات PCR به مدت ۷۵ دقیقه بر روی ژل آگارز ۱/۵۰ درصد تفکیک و با استفاده از اتدیوم بروماید^۱ رنگ‌آمیزی شدند (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی نواری تولید شده توسط آغازگر xgwm427-6A بر روی آگارز ۱/۵۰ درصد.

برای امتیازبندی باندها برای حضور باندها عدد ۱ و حضور نداشتن صفر داده شد. در نهایت با استفاده از نرم‌افزار DARwin5.0.146، ماتریس نبود تشابه دایس با الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه^۲ و دندروگرام^۳ با استفاده از نرم‌افزار Mega3.1 ترسیم شد. برای تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گندم از

- 1- Etidium Bromide
- 2- Neighbor Joining
- 3- Dendrogram

ماتریس نبود تشابه به دست آمده براساس ضریب تشابه دایس استفاده شد. علت انتخاب این ضریب به عنوان ضریب مناسب برای تشکیل ماتریس نبود تشابه آن است که اولاً ضریب کوفنتیک مربوط به آن بالا بود ($r=0/84$) و ثانیاً این ضریب از قابلیت بالایی برای تجزیه و تحلیل نشانگرهای هم‌بارز برخوردار است. برای انجام این محاسبات از نرم‌افزار XLSTAT2010 استفاده شد. برای بررسی قدرت تفکیک نشانگرها، محتوای اطلاعاتی پلی مورفیک^۱ هر نشانگر با استفاده از نرم‌افزار Excel و روش اندرسون و همکاران (۱۹۹۳) محاسبه شد:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad \text{معادله (۱)}$$

که در آن، P_i : فراوانی هر الل در مکان i ام، i : تعداد الل و n : تعداد نمونه‌ها می‌باشد. تجزیه به مختصات اصلی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از محاسبه ماتریس نبود تشابه دایس^۲، در نرم‌افزار DARwin5.0.146 انجام گرفت. برای محاسبه تنوع درون‌گروهی و بین‌گروهی جمعیت مربوط به هر گونه تفکیک شده سپس با استفاده از نرم‌افزار Mega3.1 تنوع مربوط به درون هر گروه و بین هر گروه محاسبه شد.

نتایج و بحث

از ۲۴ جفت آغازگر ریزماهواره مورد استفاده در این پژوهش ۲۰ نشانگر چندشکلی مناسب مورد استفاده قرار گرفت. از این ۲۰ نشانگر در مجموع ۸۶ الل به دست آمد. تعداد الل‌ها در مکان‌های چندشکل بین ۹-۲ الل متغیر بود و میانگین الل در هر مکان برابر با ۴/۱۰ الل بود (جدول ۳). بیش‌ترین تعداد الل مربوط به نشانگر Xgwm165-4A با ۹ الل بود. از آنجا که مناسب بودن هر مکان ژنی برای تخمین تنوع ژنتیکی براساس میانگین تعداد الل هر نشانگر ریزماهواره می‌باشد نشانگرهایی که تعداد الل زیادی داشته باشند برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب‌تر می‌باشد (رودر و همکاران، ۱۹۹۸). از طرف دیگر وجود تعداد الل بالا در جمعیت نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای جمعیت مورد بررسی می‌باشد.

1- Polymorphic Information Content

2- Dice

هادی خابستانی و همکاران

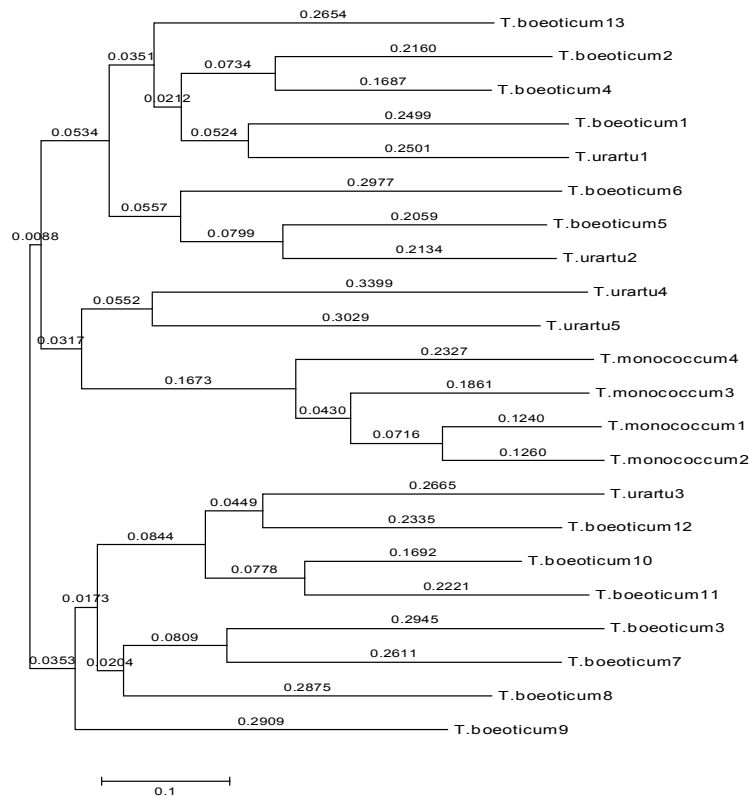
جدول ۳- تعداد الل، تعداد الل‌های چند شکل و میزان اطلاعات چندشکل آغازگرهای مورد استفاده.

PIC value	تعداد الل‌های چندشکل	تعداد الل	مکان ژنی
۰/۴۹	۲	۲	Xgwm164-1A
۰/۰۹	۲	۲	Xgwm99-1A
۰/۶۷	۳	۳	Xgwm497-1A
--	--	۱	Xgwm357-1A
۰/۵۲	۳	۳	Xgwm10-2A
۰/۶۹	۴	۴	Xgwm249-2A
۰/۶۴	۳	۳	Xgwm95-2A
--	--	۱	Xgwm312-2A
--	--	۱	Xgwm372-2A
۰/۸۴	۷	۷	Xgwm2-3A
۰/۶۷	۳	۳	Xgwm369-3A
۰/۶۳	۴	۴	Xgwm32-3A
۰/۴۹	۳	۳	Xgwm162-3A
۰/۷۸	۵	۵	Xgwm4-4A
۰/۸۶	۹	۹	Xgwm165-4A
۰/۷۵	۵	۵	Xgwm397-4A
۰/۶۷	۵	۵	Xgwm126-5A
۰/۷۶	۵	۵	Xgwm156-5A
۰/۷۲	۴	۴	Xgwm334-6A
۰/۷۶	۷	۷	Xgwm427-6A
۰/۱۵	۲	۲	Xgwm169-6A
--	--	۱	Xgwm570-6A
۰/۶۶	۴	۴	Xgwm130-7A
۰/۴۴	۲	۲	Xgwm99-7A
	۴/۱۰	۳/۵۸	میانگین
۰/۵۱	۸۲	۸۶	تعداد کل

محتوای اطلاعات چندشکلی محاسبه شده نیز نشان داد که بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به نشانگر Xgwm165-4A می‌باشد. براساس نتایج وایمن و همکاران (۱۹۹۴) در صورتی که محتوای اطلاعات چندشکلی بیش‌تر از ۰/۵۰ باشد آن مکان دارای چندشکلی بالا، در صورتی که بین ۰/۵۰ < PIC < ۰/۲۵ باشد متوسط و اگر کم‌تر از ۰/۲۵ باشد محتوای اطلاعات چندشکلی کم می‌باشد. بر این اساس تمام آغازگرهای مورد بررسی به‌جز Xgwm169-6A و Xgwm99-1A دارای تنوع بالا یا متوسط بوده‌اند که می‌توان از اطلاعات این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی و ژنتیکی استفاده کرد. براساس تنوع ژنتیکی درون‌گروهی و بین‌گروهی به‌دست آمده بین این ۳ گونه بیش‌ترین تنوع مربوط به *T. urartu* و کم‌ترین تنوع مربوط به *T. monococcum* بود (جدول ۴). این نتایج با نتایج به‌دست آمده به‌وسیله هامر و همکاران (۲۰۰۰) بر روی گندم‌های اینکورن مطابقت دارد به‌طوری‌که آن‌ها با بررسی گونه‌های مختلف اینکورن تنوع ژنتیکی بیش‌تری در *T. urartu* و *T. boeoticum* نسبت به *T. monococcum* مشاهده کردند. از طرف دیگر این دو گونه کم‌ترین فاصله بین گونه‌ای را به خود اختصاص دادند. از این‌رو در دندروگرام ترسیم شده نیز این دو گونه در کنار هم قرار گرفته‌اند (شکل ۲).

جدول ۴- فاصله درون‌گروهی و بین‌گروهی نمونه‌های مورد بررسی.

فاصله بین‌گروهی		فاصله درون‌گروهی		
<i>T. urartu</i>	<i>T. boeoticum</i>	<i>T. urartu</i>	<i>T. urartu</i>	<i>T. urartu</i>
	۰/۷۷	<i>T. monococcum</i>	۰/۴۰	<i>T. monococcum</i>
۰/۷۹	۰/۸۵		۰/۷۱	<i>T. boeoticum</i>



شکل ۲- گروه‌بندی ۲۲ نمونه گندم اینکورن با استفاده از روش دایس و الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه (NJ).

جمعیت‌ها با استفاده از ماتریس نبود تشابه دایس و الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه گروه‌بندی شدند. نتایج به‌دست آمده از این گروه‌بندی جمعیت‌ها را در ۳ گروه عمده قرار داد. در گروه اول ۲ جمعیت *T. urartu* و ۶ جمعیت *T. boeoticum*، در گروه دوم، ۲ جمعیت *T. urartu* و ۴ جمعیت *T. monococcum* و در گروه سوم ۱ جمعیت *T. urartu* و ۷ جمعیت *T. boeoticum* قرار گرفتند (شکل ۲). دو گونه *T. boeoticum* و *T. urartu* اگرچه از نظر ژنتیکی به‌عنوان دو گونه متفاوت شناخته می‌شوند اما از نظر مورفولوژیکی به یکدیگر بسیار شبیه می‌باشند و میوز طبیعی دارند به‌طوری‌که کروموزوم‌های آنها با یکدیگر جفت می‌شوند اما نتایج آنها عقیم می‌باشد. اگرچه نتایج آنها عقیم می‌باشد اما شباهت در ژنوم آنها و در موتیف‌های مورد بررسی با این آغازگرها به اندازه‌ای می‌باشد که کروموزوم‌های آنها با یکدیگر جفت شود. شباهت در ژن‌ها و موتیف‌های دو گونه می‌تواند از

دلایل اصلی قرار گرفتن این دو گونه در یک گروه باشد. دلیل دیگر کم بودن تعداد نشانگرهای مورد استفاده برای ژنوم A می‌باشد به‌خاطر شباهت بالایی که بین این دو گونه در سطح ژنوم وجود دارد این تعداد آغازگر نتوانسته است آن‌ها را از یکدیگر جدا کند. شباهتی که بین این دو گونه در غرب و شمال‌غرب ایران مشاهده می‌شود نشان‌دهنده این مطلب است که این منطقه از کشور که به‌عنوان شرق هلال حاصل‌خیزی مطرح است، مرکز پیدایش این دو گونه می‌باشد. از این‌رو پژوهش در این منطقه از هلال حاصل‌خیزی برای پی بردن به تنوع ژنتیکی و پیدا کردن ژن‌های مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده و همچنین بهبود کیفیت و عملکرد نان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. براساس ماتریس نبود تشابه دایس دو جمعیت گندم *T. monococcum* کمترین فاصله را از یکدیگر داشتند. همچنین بیش‌ترین فاصله مربوط به *T. boeoticum* جمع‌آوری شده از اهر و *T. urartu* جمع‌آوری شده از کرمانشاه و همچنین *T. boeoticum* های جمع‌آوری شده از اهر و سفید دشت لرستان بود (جدول ۵). آگاهی از تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم گیاهان وحشی اهمیت زیادی در شناسایی و انتقال ژن‌های مطلوب از این گیاهان به گیاهان زراعی دارد. ضریب کوفنتیک به‌دست آمده از ماتریس نبود تشابه اولیه و ماتریس به‌دست آمده از درخت فیلوژنتیکی ۰/۸۴ بود که نشان می‌دهد ۸۴ درصد اطلاعات اولیه ماتریس در ترسیم درخت فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفته است. در گروه‌بندی انجام شده جمعیت‌های جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی متفاوت در کنار یکدیگر قرار گرفتند مثلاً *T. boeoticum* های جمع‌آوری شده از کرمانشاه و ناغان در یک گروه قرار گرفتند. به‌نظر می‌رسد بین مناطق جغرافیایی و روابط ژنتیکی رابطه‌ای وجود نداشته باشد. این موضوع به‌وسیله ساسانوما و همکاران (۲۰۰۲) مورد تأیید قرار گرفت. از طرف دیگر مقدم و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند مناطق جغرافیایی نزدیک به هم ممکن است از نظر اکولوژیکی با یکدیگر کاملاً متفاوت باشند همچنین مناطقی که از نظر جغرافیایی با یکدیگر فاصله دارند ممکن است از نظر فیزیولوژیکی به یکدیگر شبیه باشند که به‌خاطر قرار گرفتن جمعیت‌ها در مناطق میکروکلیمات مشابه می‌باشد. در ضمن چون مناطق غرب و شمال‌غربی ایران مراکز پیدایش گندم می‌باشند (هارلن و زوهاری، ۱۹۹۶) ممکن است بین گونه‌های وحشی شباهت زیادی از نظر ژنتیکی مشاهده شود. در درخت فیلوژنتیکی جمعیت‌های جمع‌آوری شده از مکان‌های مشابه در گروه‌های مختلف قرار گرفتند که احتمالاً به‌خاطر جهش‌هایی می‌باشد که در موتیف‌ها رخ داده و یا ممکن است به‌خاطر تلاقی محدودی باشد که بین آن‌ها اتفاق افتاده است (حاج‌منصور و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین جمعیت‌هایی که در کنار یکدیگر و در یک گروه قرار گرفتند مربوط به مناطق یکسان نبودند که در این مورد تشابه شرایط میکروکلیمایی و همچنین تبادل فیزیکی مواد

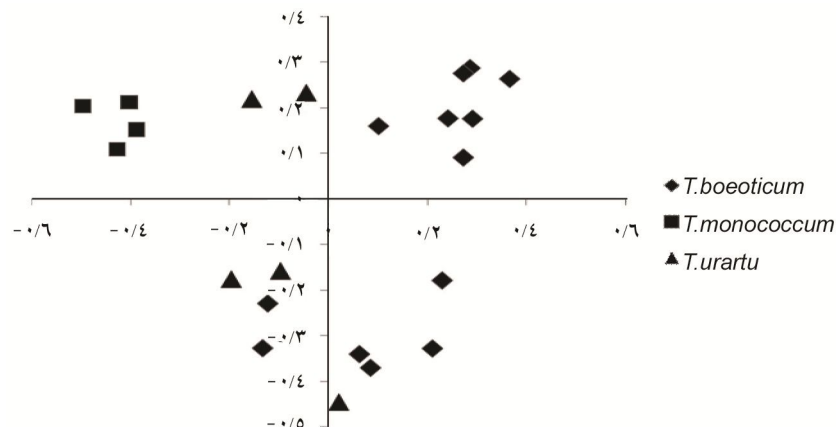
ژنتیکی بین این مکان‌ها مؤثر بوده است. در تجزیه خوشه‌ای انجام گرفته هیچ گروه‌بندی براساس منطقه جمع‌آوری جمعیت‌های مختلف نیز مشاهده نشد (شکل ۲). در مطالعه قبلی که بر روی گندم‌های اینکورن انجام گرفته است جمعیت‌ها از نظر جغرافیایی از یکدیگر جدا شدند (هامر و همکاران، ۲۰۰۰). از عوامل مؤثر بر این موضوع می‌توان تفاوت در نشانگرهای مورد استفاده، تفاوت در جمعیت‌های مورد استفاده که از مناطق مختلف هلال حاصل‌خیزی بوده‌اند و سوم اندازه جمعیت را نام برد. بالا بودن محتوای اطلاعات چندشکلی نشان‌دهنده تنوع بالای بین جمعیت‌های مورد بررسی بود (جدول ۳). در گونه‌های *T. boeoticum* و *T. urartu* ۲۲ آغازگر تکثیر شدند که از میان آن‌ها به ترتیب تنها ۱۶ و ۱۱ آغازگر چندشکلی مناسب از خود نشان داد. اما در گونه *T. monococcum* ۲۰ آغازگر تکثیر شد که تنها ۵ آغازگر چندشکلی مناسب از خود نشان داد. میانگین تعداد الل در سه گونه *T. boeoticum*، *T. urartu* و *T. monococcum* به ترتیب ۶/۳۶، ۲/۹۵ و ۳/۱۰ بود (جدول ۶). فاصله ژنتیکی در سه گونه به صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفت که نشان داد در گونه *T. monococcum* بیش‌ترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های شماره ۱۷ و ۲۰ و کم‌ترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های شماره ۱۷ و ۱۸ می‌باشد. در گونه *T. boeoticum* بیش‌ترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های شماره ۳ و ۸ کم‌ترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های شماره ۲ و ۶ بود. در گونه *T. urartu* نیز بیش‌ترین فواصل ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های شماره ۴ و ۱۶ و کم‌ترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های شماره ۲۱ و ۲۲ بود (جدول ۵). این موضوع نشان می‌دهد که جمعیت‌های جمع‌آوری شده از شمال غرب ایران تنوع بیشتری نسبت به جمعیت‌های جمع‌آوری شده از غرب کشور دارند. تجزیه به مختصات اصلی کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. میزان واریانس نسبی هر مؤلفه نشان‌دهنده اهمیت آن مؤلفه در واریانس کل است و به صورت درصد بیان می‌شود. در این تجزیه، دو مؤلفه اصلی ۴۴/۴۲ درصد تغییرات را توجیه می‌کرد که ۲۲/۱۰ درصد توسط بعد اول و ۲۰/۳۴ توسط بعد دوم توجیه گردید که نشان می‌دهد آغازگرهای مورد استفاده به خوبی بر روی کل ژنوم پراکنده شده‌اند (شکل ۳). از آن‌جا که در ابتدای پژوهش نیز از هر کروموزوم حداقل سه آغازگر انتخاب شده بود نشان داد آغازگرهای انتخابی به صورت مناسبی در کل ژنوم پراکنده شده‌اند نتایج تجزیه به مختصات اصلی نیز تا حدودی نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد. گرچه هر دو روش تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه خوشه‌ای، گروه‌بندی را انجام می‌دهند، اما تجزیه خوشه‌ای براساس ۱۰۰ درصد اطلاعات نشانگری ولی تجزیه به مختصات اصلی براساس ۴۴/۴۲ درصد گروه‌بندی را انجام داد، بنابراین انتظار نمی‌رود ۱۰۰ درصد هم‌خوانی بین آن‌ها وجود داشته باشد.

جدول ۵- ضرایب نمود تشابه برآورد شده بین جمعیت‌های مختلف گندم اینکورد.

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	
۱	۱۰۰٪																					
۲	۳۳٪	۱۰۰٪																				
۳	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪																			
۴	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪																		
۵	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪																	
۶	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪																
۷	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪															
۸	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪														
۹	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪													
۱۰	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪												
۱۱	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪											
۱۲	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪										
۱۳	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪									
۱۴	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪								
۱۵	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪							
۱۶	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪						
۱۷	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪					
۱۸	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪				
۱۹	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪			
۲۰	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪		
۲۱	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۳۳٪	۱۰۰٪	

جدول ۶- میانگین تعداد الل در گندم‌های اینکورن.

میانگین تعداد الل	گونه
۶/۳۶	<i>T. boeoticum</i>
۲/۹۵	<i>T. urartu</i>
۳/۱۰	<i>T. monococcum</i>



شکل ۳- تجزیه به مختصات اصلی دویبعی در گونه‌های مختلف گندم اینکورن.

نتیجه‌گیری

در نهایت نتایج نشان داد با توجه به این‌که انتخاب براساس نشانگرهای مولکولی یک روش سریع در برنامه‌های اصلاحی است و اطلاعات ژنتیکی به‌دست آمده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی نقش مهمی را ایفا می‌کنند، بنابراین برای انتخاب ژنوتیپ برتر در بین ارقامی که وابستگی زیادی به هم دارند، انتخاب والدین مناسب، بررسی مخازن ژنی، ژن‌های مقاوم به بیماری و تنش‌های محیطی، کاهش هزینه‌های نقشه‌های پیوستگی و تلفیقی نشانگر ریزماهواره بسیار ارزشمند است (لند و تامسون، ۱۹۹۰). انتخاب و استفاده از تعداد بیش‌تری آغازگر ریزماهواره با پراکنش کروموزومی بالاتر که بتوانند مکان‌های ژنی مختلف را با تعداد آلل‌های بیش‌تر بر روی کروموزوم‌های مختلف تکثیر تا همه تفاوت‌ها و شباهت‌ها را آشکار کنند، پیشنهاد می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد تنوع بسیار بالایی بین جمعیت‌های وحشی گندم اینکورن در غرب ایران وجود دارد که از این منابع ارزشمند ژنتیکی می‌توان برای شناسایی ژن‌های مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده و همچنین ژن‌های بهبود پروتئین و آمینو اسید و انتقال آن‌ها به گندم‌های زراعی استفاده کرد.

منابع

1. Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D., and Sorrells, M.E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*. 36: 181-186.
2. Cox, T.S., Lookhart, G.L., Walker, D., Harrell, E.G., Albers, L.D., and Rodgers, M.D. 1985. Genetic relationships among hard red winter wheat cultivars as evaluated by pedigree analysis and gliadin polyacrylamide-gel electrophoretic patterns. *Crop Sci*. 25: 1058-1063.
3. Dvorak, J., Terlizzi, P.D., Zhang, H.B., and Resta, P. 1993. The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*. 36: 21-31.
4. Doyle, J.J., and Dickson, E.E. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*. 36: 715-722.
5. Haj Mansoor, Sh., Bihamta, M.R., Nabipour, A.R., Mohammadi, A., Pirsedi, M., and Nikkhah, H.R. 2011. Genetic diversity in barley genotypes: II. Microsatellite markers and morphological traits. *Seed and Plant Breed. J*. 26: 150-171.
6. Hammer, K., Filatenko, A.A., and Korzun, V. 2000. Microsatellite markers-a new tool for distinguishing diploid wheat species. *Genet. Resour. Crop Evol*. 47: 497-505.
7. Harlan, J.R., and Zohary, D. 1996. Cultivated einkorn=*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum* (*Triticum mono monococcum*); wild einkorn=T. m. *boeoticum*; and *Triticum monococcum* L. subsp. *aegilopoides* (*Triticum mono aegilopoides*). *Science*. 153: 1074-1080.
8. Kimber, G., and Feldman, M. 1987. Wild Wheat: An Introduction. University of Missouri, Columbia. Special Report. 353p.
9. Lande, R., and Thomson, R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*. 124: 743-750.
10. Lelley, T., Stachel, M., Grausgruber, H., and Vollmann, J. 2000. Analysis of relationships between *Aegilops tauschii* and the D genome of wheat utilizing microsatellites. *Genome*. 43: 661-668.
11. Miller, P.J., Parfitt, D.E., and Weinbaum, S.A. 1989. Out crossing in peach. *Hort. Sci*. 24: 359-360.
12. Mizumoto, K., Hirose, S., Nakamura, C., and Takumi, S. 2002. Nuclear and chloroplast genome genetic diversity in the wild einkorn wheat (*Triticum urartu*), revealed by AFLP and SSLP analyses. *Hereditas*. 137: 208-214.
13. Moghaddam, M., Ehdaie, B., and Waines, G. 2000 Genetic diversity in populations of wild diploid wheat (*Triticum urartu* Thum. ex. Gandil). Revealed by Isozymes markers. *Genet. Resour. Crop Evol*. 47: 323-334.

14. Paillard, S., Schnurbusch, T., Winzeler, M., Messmer, M., Sourdille, P., Abderhalden, O., Keller, B., and Schachermayr, G. 2003. An integrative genetic linkage map of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 1235-1242.
15. Plaschke, J., Ganal, M.W., and Roder, M.S. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1001-1007.
16. Roder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., and Ganal, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 149: 2007-2023.
17. Sasanuma, T., Chabane, K., Endo, T.R., and Valkoun, J. 2002. genetic diversity of wild wheat relatives in the near east detected by AFLP. *Euphytica.* 127: 81-93.
18. Soleimani, V.D., Baum, B.R., and Johnson, D.A. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf.) Husn.]. *Theor. Appl. Genet.* 104: 350-357.
19. Somers, D.J., Isaac, P., and Edwards, K. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109: 1105-1114.
20. Teklu, Y., Hammer, K., Huang, X.Q., and Roder, M.S. 2006. Analysis of microsatellite diversity in Ethiopian tetraploid wheat landraces. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53: 1115-1126.
21. Vaiman, D., Mercier, D., and Moazai, G. 1994. A set of 99 cattle microsatellite, characterization, synteny mapping and polymorphism, *Mamm. Genome.* 5: 288-297.
22. Wang, H., Wang, X., Chen, P., and Liu, D. 2007. Assessment of genetic diversity of Yunnan, Tibetan and Xinjiang wheat using SSR markers. *J. Genet. and Genom.* 34: 623-633.



Genetic diversity assessment of Einkorn wheat by using microsatellite markers

***H. Kharestani¹, A.A. Nasrolah Nejad Qomi² and A.A. Mehrabi³**

¹Former Graduate, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Ilam, ²Assistant Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ³Assistant Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Ilam

Received: 06/11/2012; Accepted: 03/24/2013

Abstract

Genetic diversity in 22 accessions of Einkorn wheat including thirteen accessions of *T. boeoticum*, four accessions of *T. monococcum* and five accessions of *T. urartu*, evaluated by 24 microsatellite markers originated from AA genome of bread wheat. Twenty of these SSRs amplified showed adequate amplification. Overall 86 alleles were observed for all locus. Polymorphism in locus ranged from 2-9 and with average of 4.1 in each locus. Polymorphism information content was varied from 0.09 (Xgwm99-1A) to 0.86 (Xgwm165-4A). Dendrogram constructed on dice dissimilarity coefficients by Neighbor-Joining algorithm separated accessions in three distinct groups. *T. monococcum* with two of *T. urartu* accessions made group I. but *T. boeoticum* and *T. urartu* species join together could not be separated and scattered in the other groups, Also these two einkorn wheat species had not genetically and geographically differentiation. The collected accessions from northwestern regions of Iran had too much more diversity than the western regions of country that we could use from this diversity for finding resistant genes about biotic (pest) and abiotic (drought and salt) stress.

Keywords: AA Genome, Einkorn, Genetic diversity, Microsatellite, wheat.

* Corresponding author; Email: kharestanihadi982@gmail.com