مجله علوم گياهان زراعي ايران
دوره ۴۰، شماره ۲، ۱۳۸۸ (۸۳-۷۵)

بررسي تنوع ژنتيكي نمونه‌هاي گندم دوروم (*Triticum turgidum*) با استفاده از نشانگرهاي ريزماهواره

محمد امين اميدبخش فرد[1]*، محمدرضا نقوي[2]، محسن مردي[3]، محمدرضا بي‌همتا[4]، مهربانو كاظمي[5] و سيد مصطفي پيرسيدي[6]
۱, ۲, ۴، دانشجوي سابق كارشناس ارشد, دانشيار و استاد، پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران
۳، ۵، ۶، استاديار، كارشناس و كارشناس ارشد، پژوهشكده بيوتكنولوژي كشاورزي
(تاريخ دريافت: ۸۵/۱۰/۶- تاريخ تصويب: ۸۶/۱۲/۱)

چكيده

در اين تحقيق تنوع ژنتيكي ژرم پلاسم گندم دوروم (***Triticum turgidum* ssp. *durum***) با استفاده از توالي هاي ساده تكراري (ريزماهواره‌ها) ارزيابي شد. يكصد و چهل ژنوتيپ متعلق به مناطق مختلف (۱۰ كشور) با ٤٨ جفت نشانگر ريزماهواره (با پوشش يكنواخت ژنوم) مورد بررسي قرار گرفتند و از اين تعداد، ۳۷ جفت نشانگر چند شكلي نشان دادند. در مجموع از ۳۷ جفت نشانگر، ۲٤٥ آلل چند شكل متفاوت، در دامنه اي بين ۲ تا ۱۷ آلل و با متوسط ٦/۹ آلل در هر جايگاه ژني تكثير گرديد. ميزان اطلاعات چند شكل(**PIC**) از ۰/۰۰۷ (جايگاه ژني ***Xgwm274***) تا ۰/۷۹۹(جايگاه ژني ***Xgwm427***) متفاوت بود. ضريب شباهت ژنتيكي با استفاده از ضريب تطابق ساده محاسبه و مقدار آن در دامنه اي از ۵۸۳/. (بين دو ژنوتيپ از كرمانشاه و خرم آباد) تا ۹٤٦/. (بين دو ژنوتيپ از اهواز) قرار داشت. تجزيه خوشه اي با استفاده از روش دورترين همسايه ها ژنوتيپ ها را در دو گروه اصلي قرار داد. همچنين عمده ژنوتيپ هاي خارجي در يكي از زير گروه هاي گروه اصلي دوم قرار گرفتند و در نتيجه ارتباط نسبي بين تنوع ژنتيكي و منطقه جغرافيايي را تاييد نمود. ضمن اينكه جدا شدن ژرم پلاسم ايراني و خارجي نشان دهنده تكامل متمايز آنها مي باشد. تجزيه به مختصات اصلي نيز تا حد زيادي الگوي تنوع ژنتيكي حاصل از روش تجزيه خوشه اي را تاييد نمود. در اين تحقيق محدوده وسيعي از تنوع ژنتيكي در بين ژنوتيپ‌ها مشاهده شد، كه امكان استفاده از آنها را در برنامه هاي ويژه اصلاحي مقدور مي سازد.

واژه‌هاي كليدي:توالي‌هاي‌تكراري‌ساده(ريزماهواره‌ها)،گندم‌دوروم، تنوع ژنتيكي، تجزيه خوشه‌اي.

مقدمه

گندم دوروم (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) پس از گندم نان، مهم‌ترين گونة جنس تريتيكوم است و حدود ۶ تا ۸ درصد از كل گندم هاي توليدي در دنيا را در بر مي‌گيرد (Marshall et al., 2001). گندم‌هاي دوروم حدود ۳۰۰۰ سال پيش از ميلاد مسيح در مصر ظاهر شدند. ظاهراً گندم دوروم، از طريق تجمع چندين جهش ازگندم امر[1] به وجود آمده است (Kihara, 1944). از آنجائي كه آرد گندم دوروم داراي مقادير زيادي از گلوتن ضعيف است، براي مصارف نانوايي مناسب نمي‌باشد. اما در عوض دانه‌هاي سخت و شفاف اين گندم در تهيه ماكاروني، اسپاگتي، ورميشل و ساير مصارف كاربرد دارد (Marshall et al., 2001).

ايران يكي از مراكز مهم تنوع گونه هاي مختلف گياهي

1. Emmer

* نويسنده مسئول: محمد امين اميدبخش فرد تلفن: ۰۹۱۲-۲۷۷۹۵۶۲
E-mail: aminomid@yahoo.com

است که در آن گندم‌هاي دوروم بيشتر در غرب، شمال و جنوب توسعه يافته‌اند(Arzani et al., 2005). در سال‌هاي اخير بررسي‌هايي بر روي گندم دوروم در ايران صورت گرفته است، به طوريکه مؤسسه تحقيقات اصلاح و تهيه بذر و نهال کشور نيز در چند سال اخير بررسي‌هايي را به منظور امکان توليد آن به صورت تجاري آغاز نموده است.

تنوع ژنتيکي در ارقام در حال کشت گندم، به دليل کاربرد پايه‌هاي ژنتيکي محدود، کم شده است. همچنين تنوع موجود در ارقام بومي گندم نيز به علت کاهش جمعيت در حال زوال است. بنابراين بهره‌برداري از تنوع موجود در يك ژرم پلاسم مي تواند، منجر به انتخاب ارقام بهتر و همچنين استفاده از اين تنوع در جهت بهبود خصوصيات رقم زراعي گردد (Arzani, 1998).

جهت تعيين و برآورد تنوع ژنتيکي مي توان از انواع نشانگرها مانند نشانگرهاي مورفولوژيك، نشانگرهاي بيو شيميايي و نشاگرهاي DNA استفاده نمود. نشانگر هاي ريز ماهواره ها به علت دارا بودن خاصيت چند آللي، وراثت هم بارز، فراواني نسبي و پوشش وسيع ژنومي و همچنين سهولت آشکار سازي و تشخيص آنها کاربرد فراواني دارند (Theil et al., 2003). Maccaferri et al. (2003) با مطالعه ۵۸ نمونه گندم دوروم با ۷۰ نشانگر ريز ماهواره، به طور متوسط در هر مکان ژني ۵/۶ آلل مشخص کردند و ميانگين شاخص تنوع (DI) را ۰/۵۶ برآورد نمودند. Perry (2004) از يك مجموعه هفت نشانگري ريز ماهواره جهت شناسايي ۱۸ رقم گندم دوروم که در کانادا جهت مقاصد تجاري ايجاد شده بود، استفاده کردند و تنوع بالايي را در بين نمونه‌هاي مورد بررسي مشاهده نمودند. همچنين Kudryavtsev et al. (2004) ۴۵ رقم از انواع بهاره گندم دوروم را که توسط کشاورزان روسي کشت مي‌شد را با ۲۸ نشانگر ريز ماهواره مورد بررسي قرار دارند و نشان دادند که هر رقم ترکيب آللي منحصر به فردي را دارا است و در نتيجه اهميت نشانگرهاي ريزماهواره را براي شناسايي ارقام گندم دوروم تاييد نمودند. Medini et al. (2005) نيز با بررسي ارقام مختلف دوروم هاي تونس با استفاده از نشانگر هاي مولکولي توانست ارقام قديمي را از ارقام جديد تفکيک نمايد. با وجود اين، مطالعات کمي در خصوص تنوع ژنتيکي گندم‌هاي بومي ايران صورت گرفته است. اين تحقيق با هدف بررسي تنوع ژنتيکي ژنوتيپ‌هاي دوروم ايراني و همچنين مقايسه آنها با ارقام تهيه شده از ۹ کشور با استفاده از نشانگر ريزماهواره انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گياهي

در اين تحقيق از۱۴۰ ژنوتيپ گندم دوروم متشکل از ۱۱۷ ژنوتيپ ايراني (تهيه شده از کلکسيون غلات دانشکده کشاورزي دانشگاه تهران) به همراه ۲۳ ژنوتيپ از ۹ کشور خارجي (نگهداري شده در بانک ژن موسسه تحقيقات، اصلاح و تهيه نهال و بذر) استفاده گرديد. ژنوتيپ‌هاي ايراني خود شامل دو دسته ژنوتيپ هاي بومي ايراني (۷۴ نمونه) و ژنوتيپ‌هاي بومي (۴۳ نمونه) بود که بر اساس دو صفت استخواني بودن و مقاومت به جوانه‌زني در رطوبت زياد، در طول سه سال در دانشکده کشاورزي دانشگاه تهران انتخاب شده بودند (جدول۱).

آغازگرهاي ريزماهواره

در اين تحقيق از ۴۸ جفت آغازگر مطالعه شده توسط Roder et al. (1998) استفاده شد. نحوه پراکنش آغازگرها بر روي کروموزم ها به نحوي گزينش شد که بر روي هر کروموزوم حداقل سه نشانگر قرار گيرد.

استخراج و تکثير DNA

استخراج DNA از نمونه‌هاي برگي با استفاده از روش Saghai-Maroof et al. (1984) با اندکي تغيير انجام گرفت. واکنش زنجيره‌اي پليمراز در حجم ۱۵ ميکروليتر شامل ۳ ميکروليتر DNA ژنومي، ۱/۵ ميکروليتر بافر 10X، ۰/۵ ميکروليتر 1mM dNTPs، ۰/۳ ميکروليتراز هر کدام از آغازگرهاي رو به جلو[1] و رو به عقب[2]، ۱/۵ واحد آنزيم Taq پلي مراز، ۱/۹۲ ميکروليتراز کلريدمنيزيم ۱۵ ميلي مولار و در نهايت با ۷/۲۸ ميکروليتر آب دوبار تقطير انجام شد. چرخه حرارتي شامل يك مرحله واسرشت سازي اوليه در دماي ۹۴ درجه به مدت ۵ دقيقه، ۳۵ سيکل حرارتي که ۱۰ چرخه اول سيکل حرارتي به صورت Touch Down برنامه‌ريزي شده بود، به اين صورت که دماي اتصال آغازگر به رشته الگو۱۰ درجه سانتيگراد بالاتر از دماي اتصال واقعي در نظر گرفته شد و در هر چرخه دور اول با کاهش يك درجه دما، به دماي اتصال واقعي رسيد. در ۲۵ چرخه بعد دماي اتصال ثابت (بسته به دماي

1. Forward
2 . Reverse

اتصال آغازگر) و با زمان ۳۰ ثانيه انجام شد، در هر چرخه نيز، زمان و دماي واسرشت سازي به ترتيب ۳۰ ثانيه و ۹۴ درجه در نظر گرفته شد. همچنين زمان و دماي بسط رشته نيز به ترتيب ۳۰ ثانيه و ۷۲ درجه درجه در نظر گرفته شد. محصولات تكثير شده با استفاده از الكتروفورز ژل پلي اكريلاميد واسرشته‌ساز ۶ درصد تفكيک و رنگ‌آميزي به روش نيترات نقره بر اساس دستوركار Bassam et al. (1991) با كمي تغيير انجام گرفت.

جدول ۱- مشخصات ژنوتيپ‌هاي گندم دوروم مورد بررسي

شماره	محل جمع‌آوري	محل نگهداري	شماره	محل جمع‌آوري	محل نگهداري	شماره	محل جمع‌آوري	محل نگهداري	شماره	محل جمع‌آوري	محل نگهداري
۱	گلپايگان	A*	۳۶	شوش	A	۷۱	خوزستان	A	۱۰۶	بروجن	A
۲	بهبهان	A	۳۷	كرمانشاه	A	۷۲	تبريز	A	۱۰۷	رستم آباد	A
۳	بروجرد	A	۳۸	كرمانشاه	A	۷۳	مهاباد	A	۱۰۸	ايلام	A
٤	شوش	A	۳۹	خرم آباد	A	۷٤	خارجي	A	۱۰۹	------	A
۵	اهواز	A	٤۰	خرمشهر	A	۷۵	همدان	A	۱۱۰	بانک ژن	B
٦	اهواز	A	٤۱	شوش	A	۷٦	خارجي	A	۱۱۱	بانک ژن	B
۷	اردبيل	A	٤۲	شوش	A	۷۷	كرمانشاه	A	۱۱۲	بانک ژن	B
۸	شوش	A	٤۳	كرمانشاه	A	۷۸	خارجي	A	۱۱۳	بانک ژن	B
۹	كرمانشاه	A	٤٤	روسيه	B**	۷۹	كرمانشاه	A	۱۱٤	بانک ژن	B
۱۰	شيراز	A	٤۵	روسيه	B	۸۰	خارجي	A	۱۱۵	بانک ژن	B
۱۱	بروجرد	A	٤٦	مجارستان	B	۸۱	همدان	A	۱۱٦	بانک ژن	B
۱۲	اهواز	A	٤۷	سوريه	B	۸۲	رضائيه(اروميه)	A	۱۱۷	بانک ژن	B
۱۳	اهواز	A	٤۸	تركيه	B	۸۳	خوي	A	۱۱۸	بانک ژن	B
۱٤	كرمانشاه	A	٤۹	مجارستان	B	۸٤	منجيل	A	۱۱۹	بانک ژن	B
۱۵	خرمشهر	A	۵۰	مجارستان	B	۸۵	همدان	A	۱۲۰	بانک ژن	B
۱٦	بروجرد	A	۵۱	مجارستان	B	۸٦	نهاوند	A	۱۲۱	بانک ژن	B
۱۷	خرمشهر	A	۵۲	مجارستان	B	۸۷	شاه آباد	A	۱۲۲	اردبيل	A
۱۸	بروجرد	A	۵۳	مجارستان	B	۸۸	توبسركان	A	۱۲۳	اردبيل	A
۱۹	كرمانشاه	A	۵٤	مجارستان	B	۸۹	توبسركان	A	۱۲٤	اردبيل	A
۲۰	خرمشهر	A	۵۵	مجارستان	B	۹۰	خارجي	A	۱۲۵	كرمانشاه	A
۲۱	اهواز	A	۵٦	مصر	B	۹۱	خارجي	A	۱۲٦	كرمانشاه	A
۲۲	--------	A	۵۷	مصر	B	۹۲	مكزيك	A	۱۲۷	كرمانشاه	A
۲۳	شوش	A	۵۸	ليبي	B	۹۳	كرمانشاه	A	۱۲۸	نهاوند	A
۲٤	اهواز	A	۵۹	الجزاير	B	۹٤	شاه آباد	A	۱۲۹	كرمانشاه	A
۲۵	مهاباد	A	٦۰	مراكش	B	۹۵	خارجي	A	۱۳۰	ايلام	A
۲٦	خرم آباد	A	٦۱	مكزيك	B	۹٦	همدان	A	۱۳۱	كرمانشاه	A
۲۷	بروجرد	A	٦۲	هندي	B	۹۷	شاه آباد	A	۱۳۲	قصر شيرين	A
۲۸	بهبهان	A	٦۳	سوريه	B	۹۸	شاه آباد	A	۱۳۳	ايلام	A
۲۹	شيراز	A	٦٤	بانك ژن	B	۹۹	اردبيل	A	۱۳٤	ايلام	A
۳۰	بروجرد	A	٦۵	بانك ژن	B	۱۰۰	كرمان	A	۱۳۵	ايلام	A
۳۱	بروجرد	A	٦٦	بانك ژن	A	۱۰۱	همدان	A	۱۳٦	قصر شيرين	A
۳۲	اردبيل	A	٦۷	كرمانشاه	A	۱۰۲	آريا	A	۱۳۷	ايلام	A
۳۳	خرم آباد	A	٦۸	آريا	A	۱۰۳	مكزيك	A	۱۳۸	ايلام	A
۳٤	اهواز	A	٦۹	خارجي	A	۱۰٤	مهاباد	A	۱۳۹	ايلام	A
۳۵	شوش	A	۷۰	خارجي	A	۱۰۵	ميانه	A	۱٤۰	كرمانشاه	A

*A: بخش دوروم كلكسيون غلات دانشكده كشاورزي دانشگاه تهران

**B : بانک ژن موسسه اصلاح، تحقيقات و تهيه نهال و بذر ـ كرج

تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوهاي نواري به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازدهي شدند و ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تطابق ساده (به‌علت تفکیک بهتر ژنوتیپ‌ها) محاسبه گردید. براي رسم دندروگرام (با روش دورترین همسایه ها) و تجزیه به مختصات اصلي از نرم‌افزار NTSYSpc 2.02 استفاده شد. همچنین از نرم‌افزار Excel جهت محاسبه میزان اطلاعات چند شکل (PIC)، احتمال همساني (PI) و قدرت تفکیک (D) استفاده گردید.

میزان اطلاعات چندشکل (PIC)، نشان‌دهنده میزان چندشکلي یك نشانگر مي‌باشد و مي‌تواندازصفرتا یك متغیر باشد و با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2$ محاسبه گردید. بطوریکه Pi فراواني آللi ام و K تعداد آللها مي‌باشد. احتمال همساني (PI) نشاندهنده توانایي یک نشانگر در تفکیک دو رقم مستقل از هم است و از فرمول $PI = \sum p_i^4 + \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=i+1}^{n} (2PiPj)^2$ محاسبه گردید.

همچنین قدرت تفکیك (D) یک نشانگر هم از رابطه-D=1 PI به دست آمد و احتمال شناسایي رقم ها را توسط یك نشانگر نشان مي دهد.

جدول ۲- مشخصات، تعداد آلل و مقادیر PIC ، PI وD محاسبه شده براي ۳۷ نشانگرهاي ریزماهواره گندم

کد	مکان ژنی	موتیف	کروموزوم	دمای اتصال	تعداد آلل	PIC	PI	*D*
1	*Xgwm33*	(GA)19	*1A*	60	13	0.692	0.020	0.980
2	*Xgwm164*	(CT)16	*1A*	55	5	0.755	0.030	0.970
3	*Xgwm666*	(CA)13	*1A*	60	8	0.151	0.244	0.756
4	*Xgwm249*	(GA)11(GGA)8	*2A*	55	4	0.633	0.076	0.924
5	*Xgwm372*	(GA)>51	*2A*	60	5	0.708	0.048	0.952
6	*Xgwm155*	(CT)19	*3A*	60	7	0.766	0.027	0.973
7	*Xgwm674*	(CT)16CCC(GT)4	*3A*	60	6	0.681	0.065	0.935
8	*Xgwm160*	(GA)21	*4A*	60	5	0.460	0.189	0.811
9	*Xgwm165*	(GA)20	*4A*	60	2	0.183	0.643	0.357
10	*Xgwm397*	(CT)21	*4A*	55	11	0.150	0.101	0.899
11	*Xgwm156*	(GT)14	*5A*	60	4	0.160	0.477	0.523
12	*Xgwm304*	(CT)22	*5A*	55	6	0.586	0.072	0.928
13	*Xgwm639*	(GA)19	*5A*	55	6	0.709	0.026	0.974
14	*Xgwm169*	(GA)23	*6A*	60	6	0.730	0.035	0.965
15	*Xgwm334*	(GA)19	*6A*	50	9	0.451	0.046	0.954
16	*Xgwm427*	(CA)31(CA)22	*6A*	50	6	0.799	0.008	0.992
17	*Xgwm459*	(GA)>28	*6A*	55	7	0.788	0.015	0.985
18	*Xgwm130*	(GT)22	*7A*	60	4	0.655	0.055	0.945
19	*Xgwm573*	(CA)30	*7A*	50	10	0.141	0.130	0.870
20	*Xgwm153*	(GA)18	*1B*	60	7	0.142	0.191	0.809
21	*Xgwm264*	(CA)9A(CA)24	*1B*	60	3	0.524	0.137	0.863
22	*Xgwm274*	(GT)27	*1B*	50	6	0.007	0.328	0.672
23	*Xgwm120*	(CT)11(CA)18	*2B*	60	7	0.712	0.034	0.966
24	*Xgwm148*	(CA)22	*2B*	60	6	0.748	0.015	0.985
25	*Xgwm526*	(CT)16	*2B*	55	9	0.578	0.021	0.979
26	*Xgwm340*	(GA)26	*3B*	60	5	0.282	0.199	0.801
27	*Xgwm389*	(CT)14(GT)16	*3B*	60	6	0.789	0.012	0.988
28	*Xgwm493*	(CA)43	*3B*	60	7	0.794	0.009	0.991
29	*Xgwm149*	(GA)23	*4B*	55	7	0.420	0.246	0.754
30	*Xgwm251*	(CA)28	*4B*	55	4	0.431	0.195	0.805
31	*Xgwm371*	(CA)10(GA)32	*5B*	60	4	0.648	0.059	0.941
32	*Xgwm443*	(CA)20(GA)22	*5B*	55	17	0.513	0.030	0.970
33	*Xgwm540*	(CT)3(CC)(CT)16	*5B*	55	9	0.702	0.015	0.985
34	*Xgwm132*	(GA)24(GAA)6	*6B*	60	8	0.034	0.103	0.897
35	*Xgwm133*	(CT)39	*6B*	60	6	0.291	0.135	0.865
36	*Xgwm508*	(GT)19	*6B*	50	8	0.085	0.408	0.592
37	*Xgwm146*	(GA)5GG(GA)20	*7B*	60	9	0.612	0.032	0.968
		mean			6.9	0.500	0.120	0.879

نتايج و بحث

از ٤٨ نشانگر ريزماهواره مورد استفاده در اين تحقيق، ۳۷ نشانگر چند شكلي مناسبي را نشان دادند و امتيازدهي شدند. بطوري كه از اين ۳۷ نشانگر در مجموع ۲۴۵ آلل چند شكل مشاهده گرديد(جدول۲). بيشترين تعداد آلل‌ها مربوط به جايگاه ژني *Xgwm443* با ۱۷ آلل چندشكل و كمترين آنها مربوط به جايگاه ژني *Xgwm165* با ۲ آلل چندشكل بود. همچنين ميانگين تعداد آلل ۶/۹ براي هر نشانگر مشاهده شد. ميانگين تعداد آلل هر نشانگر ريزماهواره مناسب بودن هر مكان ژني را براي تخمين تنوع ژنتيكي نشان مي‌دهد(Sghai-Maroof et al., 1984).

با استفاده از فراواني آللي، آماره هاي PIC , PI و D براي هر نشانگر، به‌طور جداگانه محاسبه گرديد (جدول۲). جايگاه‌هاي ژني *Xgwm427* و *Xgwm493* به ترتيب بيشترين مقدار PIC برابر با ۰/۷۹۹ و ۰/۷۹٤ و جايگاه ژني *Xgwm274* كمترين PIC برابر با ۰/۰۰۷ را دارا بودند. با توجه به نتايج بدست آمده مي‌توان دريافت كه جايگاه‌هاي ژني *Xgwm427* و *Xgwm493* با بيشترين PIC بيشترين شاخص چندشكلي را نشان مي‌دهند و در نتيجه نشانگرهاي مناسبي براي بررسي تنوع ژنتيكي هستند. ميانگين PIC برابر ۰/۵ بدست آمد كه نسبت به مقدار PIC محاسبه شده (۰/۷۲) توسط مديني و همكاران (۲۰۰۵) براي ارقام دوروم تونسي با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر ريزماهواره مختلف مي‌باشد. دليل اين اختلاف را مي‌توان به تفاوت در ژنوتيپ‌هاي مورد استفاده و همچنين تفاوت در جفت آغازگرهاي مورد استفاده نسبت داد.

با استفاده از فراواني آللي، آماره PI براي هر نشانگر به طور جداگانه محاسبه گرديد (جدول۲). جايگاه‌ژني *Xgwm165* بيشترين مقدار PI برابر با ۰/۶۴۳ و جايگاه-هاي ژني *Xgwm427* و *Xgwm493* كمترين PI برابر با ۰/۰۰۸ و ۰/۰۰۹ را دارا بودند. همانطوري كه مشاهده مي‌شود، نشانگر *Xgwm165* با ۲ آلل، بيشترين احتمال يكساني را داراست، به اين معني كه با كمترين احتمال، توانايي جداسازي ژنوتيپ ها را داراست.

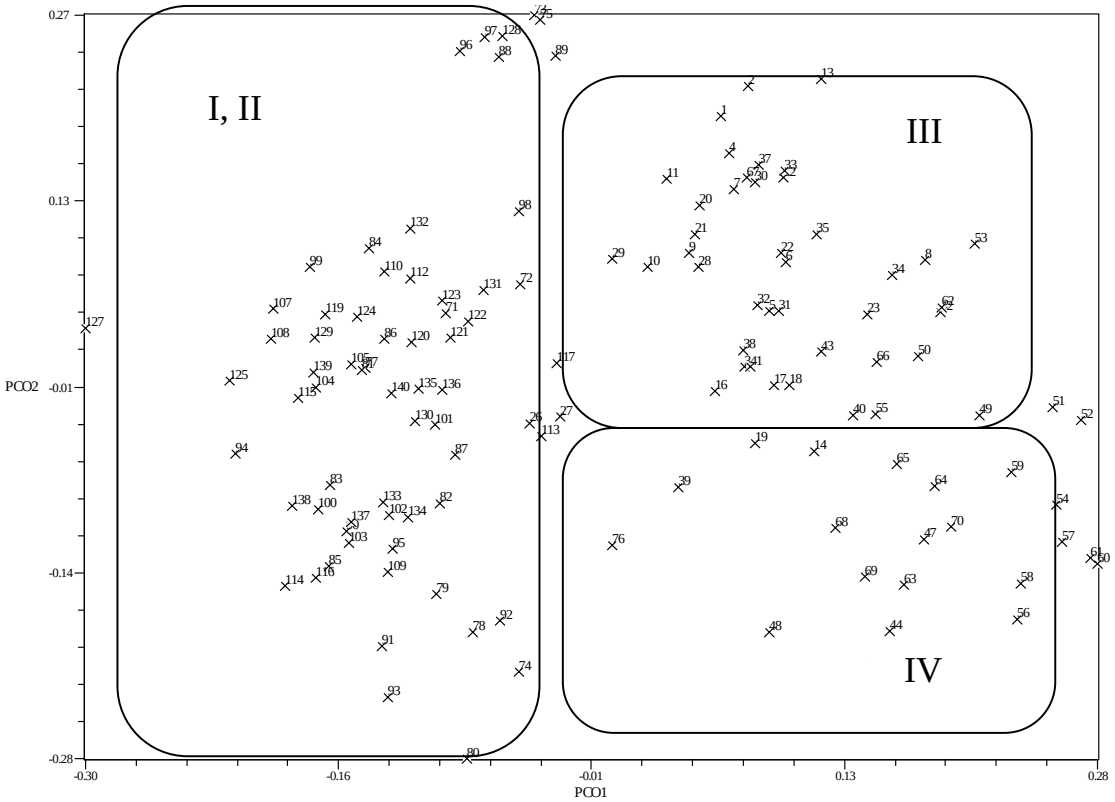
مقادير مربوط به آماره D (جدول۲) نشان مي‌دهد كه تقريبا نشانگرهايي كه بالاترين محتواي اطلاعاتي چند شكل را دارا هستند، يعني جايگاه‌هاي ژني *Xgwm427* و *Xgwm493* با بيشترين احتمال، ژنوتيپ‌ها را از هم جدا كرده‌اند. نتايج نشان مي‌دهد كه در برخي موارد با كاهش تعداد آلل‌هاي هر نشانگر مقدارD آن كاهش مي‌يابد، به طوري كه جايگاه ژني *Xgwm165* با ۲ آلل چند شكل كمترين D برابر با ۰/۳۵۷ و جايگاه‌هاي ژني *Xgwm427* و *Xgwm493* به ترتيب با ۶ و ۷ آلل بيشترين مقدار D به ترتيب برابر ۰/۹۹۲ و ۰/۹۹۱ را دارا بودند.

همچنين در اين تحقيق مشخص شد كه جايگاه‌هاي ژني*Xgwm427* ، *Xgwm493*، *Xgwm443* و *Xgwm33* به ترتيب و با توجه به موارد مختلفي چون ميزان شاخص‌هاي PIC، PI و D و همچنين تعداد آلل‌هايشان نسبت به ساير مكان‌هاي ژني بررسي شده در اين تحقيق، جهت مطالعه و بررسي تنوع ژنتيكي در گندم دوروم, مناسب‌تر هستند و پيشنهاد مي‌گردد تا اين مكان‌هاي ژني در مطالعات بعدي مورد توجه قرار گيرد.

نمودار دو بعدي حاصل از تجزيه به مختصات اصلي (PCoA) در شكل ۱ آورده شده است. مؤلفه‌هاي اول و دوم به ترتيب ۸/۱۴ و ۵/۲۷ درصد تغييرات را دربر مي‌گيرد، به طوري كه در نمودار دوبعدي در مجموع ۱۳/۴۱ درصد تغييرات توجيه مي‌شوند. با توجه به شكل ۱ مشاهده مي‌شود ارقام مناطق مختلف به طور نسبي، در دسته‌هايي مجزا قرار مي‌گيرند. به طوري كه دسته‌هاي، I, II شامل ژنوتيپ‌هاي ايراني مناطق شمال غرب و دسته III شامل ژنوتيپ‌هاي ايراني منطقه جنوب غرب و دسته IV هم شامل ژنوتيپ‌هاي خارجي است. با استفاده از روش PCoA، ارقام ايراني و خارجي كاملاً از هم متمايز شده‌اند.

به منظور تعيين ضريب تشابه و الگوريتم مناسب براي تجزيه كلاستر و تفسير نتايج، ضرايب كوفنتيک براي ضرايب تشابه جاكارد، دايس و تطابق ساده با استفاده از الگوريتم‌هاي دورترين و نزديک‌ترين همسايه محاسبه گرديد و در نهايت با توجه به اطلاعات جغرافيايي ژنوتيپ‌ها و قرارگيري اكثر قريب به اتفاق نمونه‌هاي خارجي در يک گروه، دندروگرام حاصل از روش دورترين همسايه بر اساس ضريب تطابق ساده جهت تفسير نهايي انتخاب گرديد. تجزيه كلاستر با روش دورترين همسايه ژنوتيپ ها را در دو گروه عمده (A و B) قرار داد (شكل۲).

با توجه به ماتريس تشابه تطابق ساده دو ژنوتيپ ۵ و ۶ از اهواز بيشترين شباهت ژنتيكي (۹۴۶/.) و دو ژنوتيپ ۷۹ و ۱۱۷ به ترتيب از كرمانشاه و خرم آباد كمترين شباهت ژنتيكي (۵۸۳/.) را نشان دادند. با توجه به وجود ژنوتيپ هاي خارجي در اين مطالعه، وجود كمترين شباهت بين دو ژنوتيپ ايراني را مي توان دال بر تنوع ژنتيكي بالاي گندم دوروم در ايران دانست.



شكل۱- نمودار دو بعدي تجزيه PCoA با استفاده از داده‌هاي مولكولي در گندم دوروم
I , II ژنوتيپ هاي ايراني منطقه شمال غرب، III ژنوتيپ هاي ايراني منطقه جنوب غرب، IV ارقام خارجي

گروه‌بندي كلي ژنوتيپ‌ها نشان داد كه گروه A فقط شامل ژنوتيپ‌هاي ايراني اما گروه B مخلوطي از ژنوتيپ-هاي ايراني و خارجي را در بر مي گرفت. تجزيه و تحليل گروه A نشان مي‌دهد كه بيش از ۶۳% ژنوتيپ‌ها در اين گروه قرار گرفته‌اند و اين ژنوتيپ‌ها عمدتاً از عرض جغرافيايي ۳۸ – ۳۴ درجه جمع‌آوري شده‌اند. ژنوتيپ‌هاي اين گروه عمدتاً شامل ژنوتيپ‌هايي از كرمانشاه، مهاباد، همدان، تويسركان، نهاوند، اردبيل، شاه‌آباد, منجيل، گلپايگان، بروجرد، رستم‌آباد رشت، ايلام، قصرشيرين و ميانه است،كه عمدتاً (بيش از ۷۰%) در شمال غرب وغرب ايران واقعند. البته دو زيرگروه اصلي (IA و IIA) نيز در گروه A وجود دارد. زير گروه IA كه عمدتاً (بيش از ۷۶%) در عرض‌هاي جغرافيايي ۳۴-۳۸ و طول جغرافيايي۴۸-۵۰ است و زيرگروه IIA كه عمدتاً پراكنده‌تر از ژنوتيپ‌هاي گروه IA هستند، به طوري كه بيش از ۸۰% آن‌ها در عرض‌هاي جغرافيايي ۳۲-۳۸ و همان طول جغرافيايي ۴۸-۵۰ درجه هستند. البته اين زيرگروه‌ها نيز زير گروههاي كوچك‌تر را در بر مي‌گيرند. در كل از گروه اصلي اول مي‌توان نتيجه‌گيري كرد تنوع زيادي در بين ژنوتيپ‌هاي ايراني وجود دارد.

در حالي كه گروه B مخلوطي از ژنوتيپ‌هاي ايراني و خارجي را درخود داشت. اين گروه نيز به دو زيرگروه اصلي (IB و IIB) تمايز گرديد. بررسي دقيق نشان مي‌دهد كه بيش از ۷۲% از زيرگروه اصلي IB شامل ژنوتيپ‌هاي ايراني است. اين ژنوتيپ‌ها عمدتاً از شهرهاي بهبهان, شوش، اهواز و خرمشهر است، كه در جنوب و جنوب غربي ايران واقعند. اين زيرگروه اصلي خود به دو زيرگروه فرعي IB-1 و IB-2 متمايز گرديد. زيرگروه فرعيIB-1 عمدتاً شامل ژنوتيپ‌هاي بومي جنوب غرب ايران (دشت خوزستان) بود. زير گروه IB-2 نيز عمدتاً حاوي لاين‌هاي ايراني و ارقام اصلاح شده خارجي بود. با توجه به عدم وجود فاصله ژنتيكي زياد بين دسته ژنوتيپ‌هاي بومي جنوب غرب ايران و ارقام اصلاح شده خارجي و با توجه به وجود درياي آزاد در منطقه امكان اختلاط و انتقال بذرها بين اين مناطق را نبايد از نظر دور داشت. بيش از ۷۵% ژنوتيپ‌هاي ايراني موجود در زيرگروه اصلي IB، نسبت به ساير ژنوتيپ‌هاي ايراني دسته بندي شده در گروه اصلي A در عرض‌هاي جغرافيايي پايين‌تري (۳۰-۳۴ درجه) قرار

دارند، كه عمدتاً شامل استان خوزستان است، هر چند كه بعضي استثناء هم در اين گروه قرار دارد. همچنين قرارگيري ارقام خارجي با ژنوتيپ‌هاي جنوبي ايران، احتمالاً مي‌تواند اين گونه تفسير شود كه جنوب ايران از لحاظ تكاملي و خاستگاهي، مشابه با مناطق بومي گندم دوروم در كشورهاي سوريه و تركيه است. پراكندگي جغرافيايي زياد نمونه هاي موجود در يك گروه را مي توان اينگونه تفسير كرد كه اين ارقام داراي نياي مشتركي هستند ولي در طول زمان و با انتقال آنها به مناطق مختلف و ايجاد سازگاري, كشت مي‌گردند.

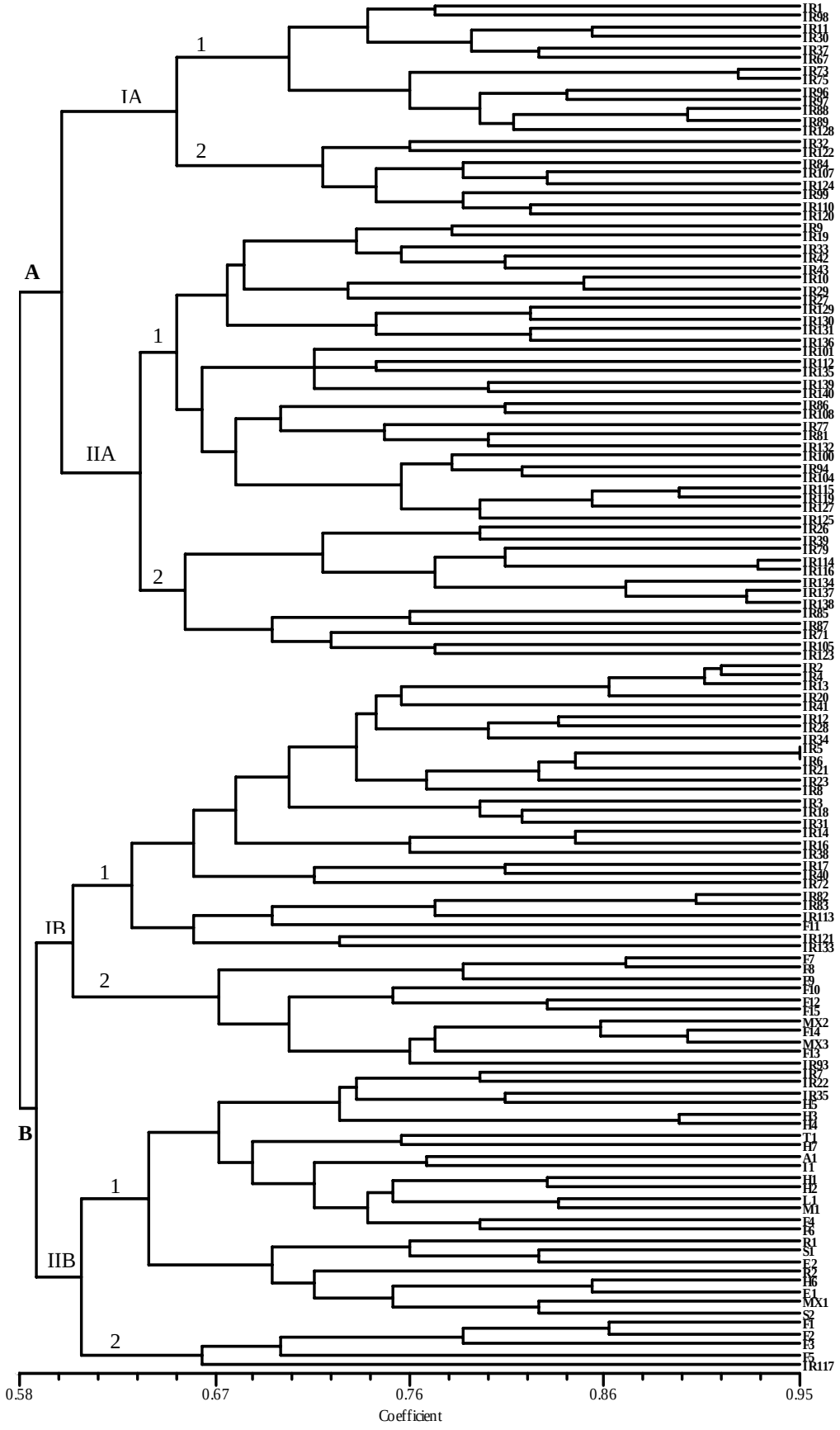
بررسي دقيق گروه IIB نشان مي‌دهد كه بيش از ۸۵% ژنوتيپ‌ها را ارقام خارجي دربرمي‌گيرد. ارقام قرار گرفته در اين دسته از كشورهاي مختلف و حتي از قاره هاي متفاوت هستند. ارقام بعضي كشورها مثل مجارستان در كنار هم قرار گرفتند، در حالي كه ارقام برخي ديگر از كشورها مانند روسيه و مكزيک در دسته‌بندي از هم فاصله داشتند، كه نشان دهنده شباهت و تفاوت زمينه ژنتيكي ارقام مورد مطالعه از كشورهاي مزبور است. به طور كلي شباهت ژنتيكي و به دنبال آن قرارگيري اكثر ارقام خارجي در يك دسته، مي تواند اين نكته را نشان دهد كه اين ارقام به احتمال زياد داراي زمينه ژنتيكي مشابه هستند و احتمالاً از يك منطقه جغرافيايي منشا گرفته‌اند و همچنين شايد بتوان گفت كه اين ارقام از جد مشتركي به وجود آمده‌اند. همچنين شباهت ژنتيكي ارقام اصلاح شده و در حال كشت در مناطق مختلف جهان با ژنوتيپهاي بومي مناطق جنوبي ايران، مي تواند ما را به اين نكته رهنمون سازد كه جنوب ايران به عنوان يكي از خزانه هاي ژني گندم دوروم و احتمالاً يكي از خاستگاههاي اين نوع گندم بايد مورد توجه قرار گيرد و يا اينكه احتمالاً اجداد دوروم‌هاي اين مناطق يكي بوده و شباهت‌هاي زيادي داشته‌اند و از منطقه‌اي خاص در خاستگاه دوروم در خاور نزديك منشاء گرفته اند. نتايج دسته‌بندي در اين بررسي حكايت از تنوع ژنتيكي بالاي ژنوتيپ‌هاي مورد بررسي دوروم در اين تحقيق را داشت. Ahmad et al. (2002) نيز با بررسي ۱۳۰ ژنوتيپ از مكان‌هاي مختلف و دسته‌بندي آنها در سه زير دسته تنوع بالاي ژنتيكي را در آنها نشان دادند. جدول ۳ گروه‌ها و زيرگروه‌هاي تجزيه خوشه‌اي را با نحوه پراكنش آن‌ها در طول و عرض‌هاي جغرافيايي متوسط نشان مي‌دهد.

Mantovani et al. (2004) پس از بررسي نمونه هايي از گندم هاي دوروم، با رسم دندروگرام بر اساس روش شناسايي شباهت ژنتيكي NBS، چند دسته را مشاهده كردند، كه هر كدام شامل ارقام خويشاوند ژنتيكي بودند. قرارگيري ژنوتيپ‌هاي مناطق شمالي ايران در دسته‌اي جداگانه، نسبت به ژنوتيپ‌هاي جنوبي ايران و ارقام خارجي، مي‌تواند نشان دهندة اين باشد كه به طور كلي تنوع دوروم در ايران در دو منطقة شمال غرب و جنوب غرب بوده است. البته منطقة تنوع جنوبي ايران گسترده‌تر از خود ايران است، يعني با مناطق تنوع ژنتيكي دوروم خاور نزديك شامل كشورهاي مصر، سوريه، تركيه مشترك است. لازم به ذكر است كه جدا بودن دسته ژنتيكي ژنوتيپهاي بومي جنوب و شمال غرب ايران, با توجه به يكي بودن دسته ژنتيكي ارقام خارجي و ژنوتيپهاي بومي جنوب ايران, مي تواند شمال و شمال غرب ايران را به عنوان يك خزانه ژنتيكي دست نخورده براي اصلاح ارقام خارجي و همچنين ژنوتيپ‌هاي جنوبي ايران معرفي كند. جدا شدن ژنوتيپ‌هاي جنوبي و شمالي ايران، مي‌توان به تنوع بسيار زياد دوروم در ايران اشاره داشته باشد، يعني دوروم در دو قسمت ايران، تنوع و گسترش يافته است. نتايج اين تحقيق در خصوص افزايش يافتن تفاوتهاي ژنتيكي بين جمعيت‌ها، با افزايش فاصله جغرافيايي، با نتايج Zhu et al. (2002) تطابق دارد.

از نكات جالب اين تحقيق، قرارگيري ژنوتيپ‌هاي بومي كرمانشاه در اكثر زيرگروه‌ها بود، كه نشان‌دهنده تنوع مناسب ژنوتيپ‌هاي بومي كرمانشاه است. در تحقيقي كه توسط Derisigacker et al. (2004) صورت گرفت مشاهده شد كه ارقام كشت شده در مناطق مختلف جغرافيايي، لزوماً در دسته‌هاي جداگانه قرار نمي‌گيرند و اين حالت مي‌تواند به دلايل: ۱) طولاني نبودن انتخاب بر اساس شرايط مختلف محيطي، آنقدر كه بتواند منجر به ايجاد تفاوت در ژرم پلاسم شود و ۲) كارايي كم و يا ناكافي بودن تعداد مكان‌هاي ژني مورد مطالعه باشد.

سپاسگزاري

كليه هزينه‌هاي اين تحقيق از محل اعتبارات طرح مصوب "شناسايي نشانگرهاي Informative براي صفات مهم زراعي در گندم دوروم" توسط پژوهشكده بيوتكنولوژي كشاورزي تأمين شده است كه بدين وسيله سپاسگزاري مي‌گردد.



شکل ۲- تجزیه خوشه‌اي نمونه‌هاي گندم دوروم

جدول۳- دسته‌بندي ژنوتيپ‌ها پس از تجزيه خوشه‌اي بر اساس مناطق جغرافيايي

گروه	زيرگروه اصلي	زير گروه فرعي	نوع و منطقه ژنوتيپ‌ها (عمدتاً)	عرض جغرافيايي	تعدادكل ژنوتيپ‌هاي زيرگروه	درصد فراواني ژنوتيپ‌ها در عرض جغرافيايي
A	AI	1	لاين- غرب	۳۴-۳۸	۱۳	۰/۷۷
		2	بومي- شمال غرب	۳۶-۳۸	۸	۰/۷۵
	AII	1	بومي- غرب	۳۴-۳۸	۲۸	۰/۶۱
		2	بومي- غرب	۳۲-۳۸	۱۳	۰/۹۱
B	BIII	1	بومي- جنوب غرب	۳۰-۳۴	۲۷	۰/۷۵
		2	لاين ورقم - مخلوط	-----	۱۱	----------
	BIV	1	رقم - خارجي	-----	۲۴	----------
		2	رقم - خارجي	-----	۵	----------

REFERENCES

1. Ahmad, M. (2002). Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats. *Genom*e, 45, 646-651.
2. Arzani, A. (1998). *Crop breeding*, Isfahan University and Technology. 606p. (In Farsi).
3. Bassam, B., Caetano-Anolles, J. G. & Gressho, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 19, 680-683.
4. Dreisigacker, S., Zhang, P., Warburton, M. L., Van Ginkel, M., Hoisington, D., Bohn, M. & Melchinger, A. E. (2004). SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines Targeted to different mega environments. *Crop Sci*, 4, 381-388.
5. Kihara, H. (1944). Discovery of the DD-analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare* (in Japanese). *Agric Hortic*, 19, 13-14.
6. Kudryavtsev, A. M., Martynov, S. P., Broggio, M. & Buiatti, M. (2004). Evaluation of polymorphism at microsatellite loci of spring durum wheat (*Triticum durum* Desf) varieties and the use of SSR- based analysis in phylogenetic studies. *Russian J Genetics*, 40, 1102-1110.
7. Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Donini, P. & Tuberosa, R. (2003). Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theor Appl Genet*, 107, 783-797.
8. Mantovani, P., Van Der Linden, G., Maccaferri, M., Sanguineti, M. C. & Tuberosa, R. (2004). Comparison between NBS profiling and AFLP and SSR profiling in a durum wheat collection. In: Proceedings of *the XLVIII Italian Society of Agricultural Genetics*.
9. Marshall, D. R., Langridge, P. & Appels, R. (2001). Wheat breeding in new century– preface. *Australian J Agric Res*, 52, 1-4.
10. Medini, M., Hamza, S., Rebai, A. & Baum, M. (2005). Analysis of genetic diversity in Tunisian durum wheat cultivars and related wild species by SSR and AFLP markers. *Genet Resour Crop Evol*, 52, 21–31.
11. Perry, D. J. (2004). Identification of Canadian durum wheat varieties using a single PCR. *Theor Appl Genet*, 109, 55-61.
12. Roder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P. & Ganal, M. W. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149, 2007-2023.
13. Rohlf, F. J. (1990). NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter Software. New York.
14. Saghai-Maroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. & Allad, R. W. (1984). DNA spacerlength polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 8014-8018.
15. Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R. K. & Graner, A. (2003). Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Theor Appl Genet*, 106, 411-422.
16. Zhu, Y., Strassmann, J. E. & Queller, D. C. (2002). Insertion, substitution and the origin of microsatellite. *Genet Res Camb*, 76, 227-236.