

بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های تریتی پیروم، تریتیکاله و گندم با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISJ

براتعلی سیاه سر^{۱*}، مریم اله دو^۲ و حسین شاهسوند حسنی^۳
 ۱، ۲، استادیار و محقق دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل
 ۳، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان
 (تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۳ - تاریخ تصویب: ۸۸/۱۲/۱۲)

چکیده

گیاهان ساخت دست بشر و گونه‌های وحشی گیاهان زراعی به عنوان منابع ژنتیکی با ارزش محسوب می‌شوند. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های تریتی پیروم، تریتیکاله و گندم، DNA ژنومی این سه آمفی پلوئید، به همراه گندم دوروم و علف شور ساحل با استفاده از ۳۲ آغازگر تصادفی و ۲۲ آغازگر نیمه تصادفی تکثیر شد. ۱۰ آغازگر تصادفی و ۸ آغازگر نیمه تصادفی که توانستند باندهای واضح، چند شکل و تکرارپذیر تولید کنند، برای ساخت ماتریس تشابه و نمودار درختی بر اساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA مورد استفاده قرار گرفتند. ضرایب تشابه برای آغازگرهای تصادفی، نیمه تصادفی و ترکیب آنها به ترتیب در دامنه‌های ۰/۵۵-۰/۰۱، ۰/۶۳-۰/۰۲ و ۰/۵۳-۰/۰۴ قرار داشت که حاکی از دامنه وسیع تنوع ژنتیکی در این سه آمفی پلوئید، گندم دوروم و علف شور ساحل بود. برای ترکیب آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی متوسط میزان تشابه ژنتیکی لاین‌های تریتیکاله، تریتی پیروم و علف شور ساحل ۰/۱۷۹، لاین‌های تریتی پیروم و ارقام اصلاح شده گندم ۰/۱۹۴ و ارقام اصلاح شده گندم و لاین‌های تریتیکاله ۰/۱۶۱ بود. رقم تراپلوئید گندم استوارد بیشترین فاصله ژنتیکی را با لاین تریتیکاله ۴۱۰۳ داشت. لاین‌های تریتیکاله ۴۱۰۳ و ۴۱۱۶ بیشترین تشابه ژنتیکی را داشتند. لاین La(4B)4D/b تریتی پیروم بیشترین تشابه ژنتیکی را با گندم رقم چینی بهاره داشت. لاین‌های تریتی پیروم St/b و Cr/b بیشترین تشابه ژنتیکی را با والد پدری شان (علف شور ساحل) داشتند. آغازگرهای نیمه تصادفی نسبت به تصادفی و ترکیب آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی نسبت به تک تک آنها در برآورد تنوع ژنتیکی از کارایی بیشتری برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، تریتی پیروم، تریتیکاله، گندم، RAPD، ISJ.

مقدمه

می‌گردد (Gawel et al., 2002; Iqbal et al., 2007). گونه‌های وحشی گیاهان زراعی به دلیل قدمت و سازگاری به شرایط متفاوت محیطی، حاوی ژن‌های مطلوب بوده و تنوع ژنتیکی مورد نیاز اصلاحگران را

آگاهی از میزان تنوع و فاصله ژنتیکی بین افراد، در اصلاح نبات از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است و تنوع ژنتیکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار محسوب

زراعی مختلف مطرح می‌باشد (Devos & Gale, 1992; Rafalski et al., 1997). در استفاده از آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی جهت برآورد فاصله ژنتیکی بین ارقام گندم و تریتیکاله، Gawel et al. (2002) بیان نمودند که آغازگرهای نیمه تصادفی نسبت به آغازگرهای تصادفی از تکرارپذیری و چند شکلی بیشتری برخوردارند. Rafalski et al. (1997)، در بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های اینبرد ذرت با استفاده از آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی، ضمن برآورد مناسب فاصله ژنتیکی برای تعیین بهترین هیبرید، بر کارایی بالای آغازگرهای نیمه تصادفی تأکید نمودند. Weining & Langridge (1991)، از آغازگرهای نیمه تصادفی برای شناسایی چند شکلی در غلات استفاده نموده و نشان دادند که این آغازگرها نسبت به آغازگرهای تصادفی از چندشکلی و الگوی باندهای بیشتری برخوردارند. Gawel et al. (2002)، از آغازگرهای نیمه تصادفی برای شناسایی چندشکلی ارقام گندم و تریتیکاله استفاده کرده و نشان دادند که در تریتیکاله آغازگرهای گروه ET و IT با ۱۸ نوکلئوتید طول و در گندم هر دو آغازگر گروه ET و IT صرفنظر از طول آنها از میزان چند شکلی بالایی برخوردارند. با توجه به این که اولین قدم در جهت استفاده از گیاهان ساخت دست بشر و گونه‌های وحشی گیاهان زراعی و اصلاح آنها، ارزیابی تنوع ژنتیکی ذخائر ژرم پلاسما موجود می‌باشد، این تحقیق با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی سه آمفی پلوئید ترییتی پایروم، تریتیکاله و گندم با استفاده از آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی طراحی شده است تا در تحقیقات آینده از ژنوتیپ‌های با حداکثر تنوع بهره‌برداری نمود و ژنهای مفید را از ترییتی پایروم و تریتیکاله به گندم انتقال داد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ارقام گندم هگزاپلوئید، تتراپلوئید، لاین‌های اولیه ترییتی پایروم، علف شور ساحل وحشی، لاین‌های امید بخش تریتیکاله بودند (جدول ۱). بذور ژنوتیپ‌های مورد بررسی از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی سیستان و دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان تهیه شدند.

تأمین می‌نمایند (Hassani et al., 2000; Richard et al., 2003). بعضی از گونه‌های وحشی تیره گندمیان، مانند گونه‌های مربوط به جنس تینوپایروم^۱ دارای خزانه ژنی با ارزشی برای مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی بوده و می‌توانند به آسانی با گندم تلاقی یابند (Hassani et al., 2003; Zhang et al., 2002). آمفی پلوئید هگزاپلوئید مصنوعی ترییتی پایروم (AABBE^{bE^b}) حاصل تلاقی گندم تتراپلوئید با فرمول ژنومی AABB و گونه‌ای از علف شور ساحل^۲ با فرمول ژنومی EbEb می‌باشد. گیاه ترییتی پایروم به منظور انتقال ژنهای مقاومت به شوری از علف شور ساحل به ارقام مختلف گندم ساخته شده است. این آمفی پلوئید مصنوعی می‌تواند در آب حاوی ۲۵۰ میلی مول نمک رشد کرده و مقاومت نشان دهد (Hassani et al., 2000).

ورود نشانگرهای مولکولی در اصلاح نباتات ابزار مفیدی را در شناسایی مواد ژنتیکی فراهم آورده است که در این بین، نشانگرهای مبتنی بر PCR به دلیل فواید زیاد آنها، به طور موفقیت‌آمیزی در ارزیابی ژرم پلاسما غلات استفاده شده است (Erlich, 1989; Kumar, 1999). در شناسایی چند شکلی ژنتیکی در غلات از دو نوع PCR استفاده می‌شود. در نوع اول، از آغازگرهای تخصصی که قادر به شناسایی ژنهای شناخته شده یا خانواده‌های ژنی خاص می‌باشند و در نوع دوم، از آغازگرهای تصادفی (RAPD)^۳ و نیمه تصادفی (ISJ)^۴ که تنوع وسیع ژنتیکی را بدون استفاده از اطلاعات اولیه ژنوم شناسایی می‌نمایند (Devos & Gale, 1992; Weining & Langridge, 1991). آغازگرهای نیمه تصادفی با توالی‌های ۱۰ تا ۱۸ نوکلئوتیدی، به دو دسته^۵ آغازگرهای مکان هدف اکسون (ET)^۵ و اینترون (IT)^۶ تقسیم می‌گردند (Devos & Gale, 1992; Gawel et al., 2002). استفاده از آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی به عنوان فن‌آوری جدید در برآورد تنوع ژنتیکی، انتخاب والدین و هیبریدهای مناسب گیاهان

1. *Thinopyrum*
2. *Thinopyrum bessarabicum*
3. Random amplified polymorphic DNA
4. Intron-exon splice junction
5. Exon targeting
6. Intron targeting

جدول ۱- مواد گیاهی مورد بررسی و علامت اختصاری آنها

شماره	علامت اختصاری	ژنوتیپ	نوع گیاه
۱	CS	رقم چینی بهاره	گندم
۲	DH	هاپلوئید مضاعف	
۳	Hi	رقم هیرمند	
۴	Ha	رقم هامون	
۵	Stt	تتراپلوئید رقم استوارد	
۶	La/b= La.b	لاین La/b	تربیتی پایروم
۷	Ma/b= Ma.b	لاین Ma/b	
۸	Az/b= Az.b	لاین Az/b	
۹	Ka/b= Ka.b	لاین Ka/b	
۱۰	St/b= St.b	لاین St/b	
۱۱	Cr/b= Cr.b	لاین Cr/b	
۱۲	La(4B)4D/b= La(4B)4D.b	لاین La(4B)4D/b	
۱۳	TNP	<i>Thinopyrum bessarabicum</i>	علف شور ساحل وحشی
۱۴	۴۱۰۳	لاین ۴۱۰۳	تربیتکاله
۱۵	۴۱۱۶	لاین ۴۱۱۶	
۱۶	۴۱۰۸	لاین ۴۱۰۸	
۱۷	M ₄₅	لاین M ₄₅	
۱۸	۴۱۱۵	لاین ۴۱۱۵	

واسرشته سازی اولیه در ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه و به دنبال آن ۴۲ سیکل؛ واسرشته سازی ثانویه در ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه با دمای اتصال ۳۶ درجه برای آغازگرهای تصادفی، ۶۰ درجه برای آغازگرهای نیمه تصادفی ۱۵ نوکلئوتیدی و ۶۳ درجه برای آغازگرهای نیمه تصادفی ۱۸ نوکلئوتیدی؛ بسط در دمای ۷۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه؛ بسط نهایی در دمای ۷۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه، بود. محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۸ درصد تفکیک، با اتیدیوم بروماید ۰/۱ درصد رنگ آمیزی و با دستگاه ژل خوان عکس برداری شدند. اندازه قطعات تکثیری توسط دو نشانگر وزنی 100bp^۱ و DNA فاز لامبدا برش داده شده با دو آنزیم *HinDIII* و *EcoRI*، تخمین زده شد. قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی بر اساس حضور و عدم حضور باند به ترتیب به صورت (۱) و (۰) رتبه‌بندی شدند. باندهای چند شکل، واضح و تکرارپذیر برای تشکیل ماتریس داده‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

DNA ژنومی ۱۸ ژنوتیپ، از مخلوط برگ جوان ۲۰ تک بوته تصادفی با روش مینی پروب با اندکی تغییر به صورت بالک استخراج شد (Chen & Ronald, 1999). کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA حاصله با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه بیوفتومتر انجام شد (Zidani et al., 2005). DNA ژنومی نمونه‌های برگ با استفاده از ۳۲ آغازگر تصادفی (10bp) طراحی شده توسط شرکت اپران (جدول ۲) و ۲۲ آغازگر نیمه تصادفی گروه ET و IT طراحی شده توسط Rafalski et al., (2002) و Weining & Langridge (1991)، (جدول ۳) تکثیر شد. ۱۰ آغازگر تصادفی و ۸ آغازگر نیمه تصادفی که توانستند باندهای چند شکل، واضح و تکرارپذیر تولید نمایند، برای مطالعات بیشتر استفاده شدند (جدول ۴ و ۵). تکثیر DNA با استفاده از آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی، در حجم ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل آب دو بار تقطیر استریل، بافر PCR با غلظت ۱x، کلرید منیزیم با غلظت ۳ میلی مولار، dNTP با غلظت ۲۰۰ میکرومول، آغازگر با غلظت ۰/۴ میکرومول، DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم و آنزیم تک پلی‌مراز ۱ واحد، در میکروتیوپ‌های ۰/۲ سی‌سی صورت گرفت. برنامه ترموسایکلر شامل:

1. 100bp DNA Ladder, GenCraft, Germany

استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA رسم شد. برای انجام آزمون نکویی برازش بین ماتریس تشابه و ماتریس کوفنتیک (ماتریس حاصل از نمودار درختی) همبستگی کوفنتیک محاسبه شد. همبستگی بین ماتریس های تشابه حاصل از دو نوع نشانگر RAPD و ISJ با استفاده از آزمون مانتل محاسبه شد. محاسبات آماری با نرم افزار NTSYS-PC نسخه ۲/۵ (Rohlf, 1992) انجام شد.

به منظور بررسی کارایی آغازگرهای مورد استفاده از فرمول $PIC = [\sum P_i(1-P_i)]$ استفاده شد، که در آن PIC میانگین اطلاعات چند شکل هر آغازگر و P_i فراوانی باندها می باشد (Mohammadi & Prasanna, 2003). شاخص نشانگری با فرمول $MI = PIC \times n \times \beta$ محاسبه گردید که در این فرمول n تعداد کل باندهای تولید شده و β درصد باندهای چند شکل تولید شده توسط هر آغازگر می باشد (Tams et al., 2005). نمودار درختی با

جدول ۲- آغازگرهای تصادفی مورد استفاده، توالی و دمای اتصال آنها

دمای اتصال	توالی آغازگر	آغازگر	دمای اتصال	توالی آغازگر	آغازگر
36	5' CCTGATCACC 3'	OPF03	36	5' TGCCGAGCTG 3'	No code 2
36	5' CAGCGACTGT 3'	OPN 15	36	5' ACTGAACGCC 3'	OPN 05
36	5' GAGACGCACA 3'	OPN 06	36	5' CTGACCAGCC 3'	OPH 19
36	5' GATGACCGCC 3'	OPC 05	36	5' ACGCGCATGT 3'	OPH-12
36	5' GGCGGTTGTC 3'	OPM 04	36	5' CTGCATCGTG 3'	OPH -7
36	5' CACAGACACC 3'	OPN 12	36	5' GGACCCTTAC 3'	OPB-20
36	5' AAGCGACCTG 3'	OPN 16	36	5' CCACAGCAGT 3'	OPB 18
36	5' CTGGGCAACT 3'	OPM 06	36	5' CAGGCCCTTC 3'	OPA-1
36	5' ACGGATCCTG 3'	OPF 01	36	5' AATCGGGCTG 3'	OPA-4
36	5' AAAGCTGCGG 3'	OPC 11	36	5' CAATCGCCGT 3'	OPA-11
36	5' GACCGACCCA 3'	no code 4	36	5' CAGCACCCAC 3'	OPA-13
36	5' GAATCGGCCA 3'	OPH 18	36	5' AGGTGACCGT 3'	OPA-18
36	5' CGAAGTCGCC 3'	OPH 04	36	5' GTTTCGCTCC 3'	OPB-1
36	5' GGACCTGCTG 3'	OPV 10	36	5' TCGTGCGGGT 3'	OPN 14
36	5' AAGGCGGCAG 3'	OPI 06	36	5' CTGATACGCC 3'	OPP-3
36	5' TTTGCCCGGT 3'	OPI 08	36	5' ACAACGCGAG 3'	OPI 10

جدول ۳- آغازگرهای نیمه تصادفی مورد استفاده، توالی و دمای اتصال آنها

دمای اتصال	توالی آغازگر	آغازگر	دمای اتصال	توالی آغازگر	آغازگر
63	5' ACTTACCTGAGGCGCGAC 3'	ET 1	63	5' ACTTACCTGGCCAGCTGC 3'	ET40
60	5' ACCTACCTGGCCGAT 3'	ET33	63	5' ACTTACCTGCCTGCCGAG 3'	ET41
60	5' ACCTACCTGGGCGAG 3'	ET34	63	5' ACTTACCTGCTGGCCGGA 3'	ET42
62	5' ACCTACCTGGGGCTC 3'	ET36	63	5' CCGGCAGGTCAGGTAAGT 3'	IT 1
63	5' ACTTACCTGAGGCGCGAC 3'	ET37	63	5' GCAGAGGGCCAGGTAAGT 3'	IT 3
63	5' ACTTACCTGCTGGCCGGA 3'	ET38	63	5' CTGCGGCCACAGGTAAGT 3'	IT 4
63	5' ACTTACCTGGCCAGCTGC 3'	ET39	63	5' GGCGGAGAGCAGGTAAGT 3'	IT 5
63	5' ACTTACCTGCCTACGCGG 3'	ET42	60	5' GAAGCCGCAGGTAAG 3'	IT 31
60	5' ACTTACCTGGGCACG 3'	ET32	60	5' GATGCCCCAGGTAAG 3'	IT 33
60	5' ACCTACCTGCCGAG 3'	ET35	60	5' GCGGCATCAGGTAAG 3'	IT34
63	5' ACTTACCTGCTGGCCGGA 3'	ET39	60	5' GACTCGCCAGGTAAG 3'	IT 32

به علت طول کم و مشابه بودن حرکت قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای تصادفی بر روی ژل آگارز در طی الکتروفورز، قطعات حاصل از آغازگرهای تصادفی نسبت به آغازگرهای نیمه تصادفی قابلیت امتیازدهی کمتری

نتایج و بحث

از ۳۲ آغازگر تصادفی ۱۰ آغازگر و از ۲۲ آغازگر نیمه تصادفی گروه ET و IT، ۸ آغازگر توانستند باند چندشکل، واضح و تکرارپذیر تولید کنند (جدول ۴ و ۵).

نتایج با نتایج Rafalski et al. (2002) و Weining & Langridge (1991) مطابقت داشت. مقایسه تکنیک RAPD و ISJ در گوجه فرنگی نشان داد که تعداد باندهای تکثیر شده در تکنیک ISJ بیشتر از RAPD است (Przetakiewicz et al., 2002). قطعات تکثیر شده با آغازگر نیمه تصادفی IT دارای چندشکلی بیشتر و اندازه قطعات بزرگ‌تر بودند. یک آغازگر با وجود نقاط اتصال بیشتر روی ژنوم، احتمال بیشتری برای تکثیر قطعات DNA خواهد داشت و هر چه طول قطعه‌ای از ژنوم که آغازگر به عنوان مکان هدف و تکثیر انتخاب می‌کند بزرگ‌تر باشد، شانس تکثیر قطعات بیشتر با طول بزرگ‌تر خواهد بود (Weining & Langridge, 1991). نواحی از ژنوم که قابلیت کد نمودن ژن‌ها را ندارند (اینترون‌ها) بیش از ۹۵ درصد کل ژنوم یک گیاه را تشکیل می‌دهند (Kumar, 1989; Erlich, 1989; Weining & Langridge, 1991) و با توجه به این که آغازگرهای IT این نواحی را مورد هدف و تکثیر قرار می‌دهند، شانس تکثیر قطعات بیشتر و با طول بزرگ‌تر در آنها بیشتر است. این نتایج مؤید این موضوع است که اندازه و تعداد قطعات بین ژنی (اینترون) در ژنوم تربیتی پایروم، تربیتکاله و گندم زیاد می‌باشد که همین عامل سبب اندازه بزرگ‌تر و قطعات بیشتر تولید شده توسط این دسته از آغازگرها شده است. علاوه بر این جهش‌ها مهمترین عامل ایجاد کننده چند شکلی در مطالعات تنوع ژنتیکی توسط نشانگرهای مولکولی می‌باشند. با توجه به این که نواحی اینترون از لحاظ تکاملی کمتر حفاظت شده‌اند و به بروز جهش‌های مختلف حساسیت بیشتری دارند (Erlich, 1989; Kumar, 1999)، لذا چند شکلی بیشتر در نواحی اینترون که توسط آغازگرهای IT بروز یافته است، دور از انتظار نمی‌باشد. نتایج مشابهی توسط Rafalski et al. (2002)، روی چاودار مشاهده شد. در مطالعه آنها آغازگرهای ۱۵ نوکلئوتیدی و عمدتاً آغازگرهای IT چند شکلی بیشتری داشتند. Przetakiewicz et al. (2002)، در مطالعه نشانگرهای RAPD و ISJ بیان نمودند که آغازگرهای ۱۸ نوکلئوتیدی الگوی باندهای پیچیده‌تری داشته ولی تفاوت عمده‌ای بین آغازگرهای ET و IT دیده نمی‌شود.

داشتند و در مراحل اولیه از آزمایش حذف شدند. آغازگرهای تصادفی در کل ۱۲۶ باند تولید کردند که ۹۶/۸۲ درصد (۱۲۲ باند) آنها چند شکل بودند. بیشترین تعداد باند، مربوط به آغازگر OPM06 با ۲۰ باند (شکل ۵) و کمترین تعداد باند مربوط به آغازگر OPN14 با ۶ باند بود. متوسط تعداد باند به ازای هر آغازگر تصادفی ۱۲/۶ بود. اندازه باندهای تکثیر یافته توسط هر آغازگر تصادفی در دامنه ۴۸۰۰-۲۰۰ جفت باز قرار داشت. آغازگرهای نیمه تصادفی در کل ۱۵۳ باند تولید کردند که همه آنها چند شکل بودند. بیشترین تعداد باند مربوط به آغازگر IT34 با ۴۲ باند (شکل ۶) و کمترین تعداد باند مربوط به آغازگر ET33 با ۸ باند بود. میانگین تعداد باند به ازای هر آغازگر ۱۹/۱۲ بود. اندازه باندهای تکثیر یافته توسط این آغازگرها در دامنه ۵۰۰۰-۲۰۰ جفت باز قرار داشت. Gawel et al. (2002)، در ارزیابی گندم و تربیتکاله با آغازگرهای نیمه تصادفی، میانگین تعداد قطعات تکثیر شده به ازای هر یک از آغازگرهای نیمه تصادفی را ۱۴ باند گزارش نمودند. نتایج مطالعه حاضر ضمن مشابهت با سایر مطالعات که از آغازگر تصادفی و نیمه تصادفی استفاده کرده بودند (Gawel et al., 2002; Iqbal et al., 2007; Przetakiewicz et al., 2002)، از میانگین تعداد باند بالاتری برخوردار بود که بیانگر کارایی بالای آغازگرهای مورد مطالعه در ایجاد چند شکلی می‌باشد. از ۲۷۹ باند تکثیر شده توسط آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی ۴۰ باند (۱۶/۸ درصد) بین علف شور ساحل (E^bE^b) و رقم چینی بهاره (AABBDD) مشترک بودند که نشان دهنده قرابت ژنتیکی ژنوم E^b با ژنوم های A، B و D می‌باشد. Hassani et al. (2003)، در تقسیم میوز این لاین‌ها مقادیر کمی مولتی‌والنت مشاهده کردند که ناشی از جفت شدن همیولوگی بین ژنوم‌های A، B و E^b بود.

میانگین میزان اطلاعات چند شکل (PIC) حاصل از آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی به ترتیب ۰/۳۰۸ و ۰/۳۱۵ و شاخص نشانگری (MI) به ترتیب ۳/۷۳ و ۶/۴۴ بود. میانگین PIC و MI در تکنیک ISJ بیشتر از میانگین آنها در تکنیک RAPD بود، لذا این نشانگرها در برآورد تنوع ژنتیکی بهتر از RAPD عمل می‌نمایند. این

جدول ۴- تعداد کل باندهای مشاهده شده، تعداد باند چند شکل، درصد چند شکلی، میانگین میزان اطلاعات چند شکلی و شاخص نشانگری DNA ژنومی حاصل از هر آغاز گر با آغازگرهای تصادفی (RAPD)

آغاز گر	تعداد کل باندها	باند های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC	MI
OPN15	۱۵	۱۵	۱۰۰/۰۰	۰/۳۴۶	۵/۱۹
OPM06	۲۰	۲۰	۱۰۰/۰۰	۰/۳۲۰	۶/۴۰
OPC05	۱۳	۱۳	۱۰۰/۰۰	۰/۳۵۰	۴/۵۵
OPM04	۱۶	۱۶	۱۰۰/۰۰	۰/۲۸۴	۴/۵۴
OPN12	۱۲	۱۲	۱۰۰/۰۰	۰/۲۷۸	۳/۳۳
OPN14	۶	۶	۱۰۰/۰۰	۰/۳۷۵	۲/۲۵
OPN02	۱۱	۱۱	۱۰۰/۰۰	۰/۳۵۸	۳/۹۳
OF01	۱۴	۱۱	۷۸/۵۷	۰/۲۱۸	۲/۳۹
OPC11	۸	۷	۸۷/۵۰	۰/۳۴۴	۲/۴۰
OPN05	۱۱	۱۱	۱۰۰/۰۰	۰/۲۱۰	۲/۳۱
میانگین	۱۲/۶	۱۲/۲	۹۶/۶۷	۰/۳۰۸	۳/۷۳

جدول ۵- تعداد کل باندهای مشاهده شده، تعداد باند چند شکل، درصد چند شکلی، میانگین میزان اطلاعات چند شکلی و شاخص نشانگری DNA ژنومی حاصل از هر آغاز گر با آغازگرهای نیمه تصادفی (ISJ)

آغاز گر	کل باندها	باند های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC	MI
IT34	۴۲	۴۲	۱۰۰	۰/۳۹۶	۱۶/۶۳
ET33	۸	۸	۱۰۰	۰/۲۸۱	۲/۲۴
ET34	۱۳	۱۳	۱۰۰	۰/۳۷۶	۴/۸۸
ET36	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۳۲۷	۳/۲۷
ET37	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۳۰۱	۴/۲۱
ET38	۱۹	۱۹	۱۰۰	۰/۲۴۴	۴/۶۳
ET39	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۲۹۹	۵/۶۸
ET42	۳۳	۳۳	۱۰۰	۰/۳۰۳	۱۰/۰۰
میانگین	۱۹/۱۲	۱۹/۱۲	۱۰۰	۰/۳۱۶	۶/۴۴

از نشانگر SSR و AFLP همبستگی متوسط و معنی دار مشاهده نمودند. این محققین بیان نمودند که نشانگرهای SSR و AFLP اطلاعات یکسانی را در شناسایی ژرم پلاسما فراهم می آورند. همبستگی پایین و غیرمعنی دار ماتریسهای تشابه RAPD و ISJ ممکن است ناشی از تنوع زیاد آغازگرهای نیمه تصادفی نسبت به آغازگرهای تصادفی و یا به دلیل فاصله ژنتیکی زیاد ژنومهای A، B، D، R، E^b با یکدیگر باشد. Powell et al. (1996)، بیان نمودند، زمانی که ژنوتیپ های خیلی نزدیک یا خیلی دور با هم مقایسه می شوند، همبستگی ماتریس تشابه نشانگر SSR با ماتریس تشابه دیگر نشانگرهای مولکولی ممکن است، کاهش یابد. دو رقم تریتیکاله ۴۱۰۳ و ۴۱۱۶ به ترتیب با ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۴۴، ۰/۶۳ و ۰/۵۳ برای آغازگرهای تصادفی،

ماتریس تشابه لاینهای اولیه تریتی پایروم، ارقام اصلاح شده گندم و لاینهای امید بخش تریتیکاله با استفاده از آغازگرهای تصادفی، نیمه تصادفی و ترکیب آنها به ترتیب در جداول ۶، ۷ و ۸ نشان داده شده است. ضرایب تشابه ژنتیکی حاصل از نشانگر RAPD در دامنه ۰/۵۵-۰/۰۱ با میانگین ۰/۲۱۳، از نشانگر ISJ در دامنه ۰/۶۳-۰/۰۲ با میانگین ۰/۱۸۸ و از ترکیب آنها در دامنه ۰/۵۵-۰/۰۴ با میانگین ۰/۲۰۰ قرار داشت. همبستگی بین ماتریس تشابه حاصل از آغازگرهای تصادفی و آغازگرهای نیمه تصادفی پایین و غیر معنی دار بود. بنابراین نشانگرهای RAPD و ISJ اطلاعات متفاوتی را در شناسایی ژرم پلاسما تریتی پایروم، تریتیکاله و گندم فراهم می آورند. Tams et al. (2005)، در تریتیکاله زمستانه بین ماتریس تشابه حاصل

می‌تواند نشان‌دهندهٔ زمینه ژنتیکی نسبتاً نزدیک رقم هامون و علف شور ساحل باشد. رقم هامون مقاوم به خشکی و شوری است و احتمالاً بین ژن‌های مقاومت به شوری و خشکی این رقم و علف شور ساحل قرابت ژنتیکی نزدیکی وجود دارد.

نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه ای لاین‌های اولیه تربیتی پایروم، ارقام اصلاح شده گندم و لاین‌های امید بخش تربیتیکاله با استفاده از آغازگرهای تصادفی، نیمه تصادفی و ترکیب آنها به ترتیب در اشکال ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. همبستگی کوفنتیک (همبستگی ماتریس تشابه با ماتریس کوفنتیک) نشانگرهای RAPD، ISJ و ترکیب آنها به ترتیب با مقادیر ۰/۸۳، ۰/۸۷ و ۰/۸۴ بالا و بسیار معنی‌دار بود.

نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها با آغازگرهای تصادفی به دو گروه بزرگ قابل تفکیک است. گروه اول شامل لاین‌ها و ارقام CS، La(4B)4D/b، Ha، DH، Ka/b، 4103، 4116، Ma/b، St/b، Cr/b، TNP، 4108، 4115، La/b، Az/b و Hi می‌باشد. در این گروه دو لاین St/b و Cr/b با داشتن بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۵۵) با هم در یک گروه قرار گرفته و رقم هیرمند بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۸) را با این گروه

نیمه تصادفی و ترکیب آنها بیشترین تشابه و گندم تتراپلوئید رقم استوارد با لاین تربیتیکاله ۴۱۰۳ با ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۰۴ برای هر سه حالت کمترین قرابت ژنتیکی را داشتند. لاین‌های St/b و Cr/b نسبت به سایر لاین‌های تربیتی پایروم بیشترین تشابه ژنتیکی را با والد پدری شان (علف شور ساحل) داشتند. لاین St/b نسبت به سایر لاین‌های اولیه تربیتی پایروم، خویشاوندی نزدیک تری با علف شور ساحل داشت. تشابه ژنتیکی لاین La(4B)4D/b با رقم چینی بهاره گندم بیشتر از سایر لاین‌های اولیه تربیتی پایروم (به ترتیب ۰/۴۱، ۰/۲۸ و ۰/۳۴ برای آغازگرهای تصادفی، نیمه تصادفی و ترکیب آنها) بود. میزان تشابه این لاین با علف شور ساحل (والد پدری) برای آغازگرهای تصادفی، نیمه تصادفی و ترکیب آنها به ترتیب ۰/۳۴، ۰/۲۵ و ۰/۳۰ بود. احتمالاً این لاین خصوصیات مفید رقم چینی بهاره و والد پدری (مقاومت به شوری و خشکی) را به ارث برده باشد. ضریب تشابه ژنتیکی بین رقم هامون و علف شور ساحل (به ترتیب ۰/۳۰، ۰/۲۱ و ۰/۲۴ برای آغازگرهای تصادفی، نیمه تصادفی و ترکیب آنها) بیشتر از رقم هیرمند و علف شور ساحل (به ترتیب ۰/۹۰، ۰/۰۷ و ۰/۱۳ برای آغازگرهای تصادفی، نیمه تصادفی و ترکیب آنها) بود. این مسئله

جدول ۶- ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد با استفاده از پرایمرهای تصادفی (RAPD)

ژنوتیپ	DH	CS	Ha	Hi	Stt	La/b	Ma/b	Az/b	Ka/b	St/b	Cr/b	La.../b	TNP	4103	4116	4108	MH5	4115		
DH	۰/۳۹																			
Hi		۰/۱۶																		
Ha			۰/۳۸																	
Stt				۰/۲۱																
La/b					۰/۱۶															
Ma/b						۰/۰۳														
Az/b							۰/۱۷													
Ka/b								۰/۱۷												
St/b									۰/۱۶											
Cr/b										۰/۳۷										
La(4B)4D/b											۰/۳۳									
TNP												۰/۳۳								
4103													۰/۳۴							
4116														۰/۲۵						
4108															۰/۴۴					
MH5																۰/۱۸				
4115																	۰/۲۳			

جدول ۷- ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد با استفاده از پرایمرهای نیمه تصادفی (ISJ)

ژنوتیپ	CS	DH	Hi	Ha	Stt	La/b	Ma/b	Az/b	Ka/b	St/b	Cr/b	La.../b	TNP	4103	4116	4108	MH5	4115
DH	۰/۲۱																	
Hi	۰/۲۷	۰/۴۴																
Ha	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۱۹															
Stt	۰/۱۱	۰/۳۵	۰/۲۶	۰/۱۴														
La/b	۰/۰۲	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۱۰	۰/۳۰													
Ma/b	۰/۲۵	۰/۲۳	۰/۳۱	۰/۱۷	۰/۲۲	۰/۰۹												
Az/b	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۷	۰/۰۹	۰/۱۲	۰/۱۸	۰/۱۵											
Ka/b	۰/۲۵	۰/۱۸	۰/۲۳	۰/۲۶	۰/۰۶	۰/۰۹	۰/۲۷	۰/۲۳										
St/b	۰/۲۲	۰/۱۱	۰/۲۵	۰/۱۱	۰/۰۵	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۲۴	۰/۱۴									
Cr/b	۰/۳۲	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۰۹	۰/۱۱	۰/۳۰	۰/۳۳									
La(4B)4D/b	۰/۲۸	۰/۱۹	۰/۲۱	۰/۱۸	۰/۱۴	۰/۰۷	۰/۳۰	۰/۱۱	۰/۱۸	۰/۲۰	۰/۳۰							
TNP	۰/۱۹	۰/۱۶	۰/۰۷	۰/۲۱	۰/۱۰	۰/۰۸	۰/۱۷	۰/۱۰	۰/۲۳	۰/۳۳	۰/۳۰	۰/۲۵						
4103	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۸	۰/۲۰	۰/۱۳	۰/۲۹	۰/۱۶					
4116	۰/۱۷	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۲۳	۰/۲۰	۰/۱۸	۰/۳۱	۰/۲۱	۰/۶۳				
4108	۰/۱۴	۰/۲۲	۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۰۲	۰/۱۰	۰/۱۶	۰/۱۵	۰/۱۹	۰/۲۳	۰/۱۷	۰/۲۳	۰/۱۹	۰/۴۲	۰/۵۱			
MH5	۰/۲۱	۰/۲۸	۰/۲۱	۰/۰۶	۰/۰۹	۰/۰۳	۰/۱۷	۰/۱۶	۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۱۶	۰/۲۳	۰/۱۸	۰/۲۶	۰/۳۰			
4115	۰/۳۲	۰/۱۲	۰/۲۳	۰/۱۵	۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۲۲	۰/۱۴	۰/۱۸	۰/۱۹	۰/۱۴	۰/۳۳	۰/۲۰	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۲۶		

جدول ۸- ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگرهای تصادفی (RAPD) و نیمه تصادفی (ISJ)

ژنوتیپ	CS	DH	Hi	Ha	St	La/b	Ma/b	Az/b	Ka/b	St/b	Cr/b	La.../b	TNP	4103	4116	4108	M45	4115
DH	۰/۲۹																	
Hi	۰/۲۲	۰/۳۰																
Ha	۰/۲۷	۰/۲۸	۰/۲۰															
St	۰/۰۹	۰/۲۶	۰/۱۸	۰/۱۵														
La/b	۰/۱۵	۰/۲۵	۰/۱۰	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۸	۰/۱۳											
Ma/b	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۷	۰/۲۶	۰/۱۸	۰/۲۶	۰/۱۳	۰/۱۶	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۳۱	۰/۲۴						
Az/b	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۰۹	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۱۶	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۳۱	۰/۲۴	۰/۲۰					
Ka/b	۰/۲۸	۰/۳۱	۰/۱۸	۰/۳۳	۰/۱۳	۰/۳۳	۰/۲۳	۰/۱۴	۰/۳۱	۰/۱۴	۰/۲۵	۰/۲۴	۰/۲۰					
St/b	۰/۲۷	۰/۱۹	۰/۲۱	۰/۲۳	۰/۰۶	۰/۱۵	۰/۲۳	۰/۱۵	۰/۳۱	۰/۲۳	۰/۳۳	۰/۲۶	۰/۳۱					
Cr/b	۰/۲۹	۰/۲۳	۰/۱۷	۰/۱۸	۰/۰۸	۰/۱۴	۰/۲۳	۰/۱۳	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۳۳	۰/۲۶	۰/۳۰					
La(4B)4D/b	۰/۳۴	۰/۲۶	۰/۱۷	۰/۲۸	۰/۰۷	۰/۲۱	۰/۲۳	۰/۱۵	۰/۲۶	۰/۳۰	۰/۳۳	۰/۳۰	۰/۲۶					
TNP	۰/۲۵	۰/۲۱	۰/۱۲	۰/۲۴	۰/۱۱	۰/۱۷	۰/۲۴	۰/۱۰	۰/۳۰	۰/۳۳	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۲۲					
4103	۰/۲۲	۰/۱۹	۰/۱۳	۰/۲۵	۰/۰۴	۰/۰۹	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۱۸	۰/۲۶	۰/۲۱	۰/۳۲	۰/۲۲					
4116	۰/۲۴	۰/۲۷	۰/۱۰	۰/۲۳	۰/۱۰	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۱۳	۰/۳۳	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۳۱	۰/۲۷	۰/۵۳				
4108	۰/۱۶	۰/۱۹	۰/۱۶	۰/۱۴	۰/۰۹	۰/۰۸	۰/۱۳	۰/۰۸	۰/۱۷	۰/۲۴	۰/۲۳	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۳۰	۰/۳۲			
M45	۰/۱۳	۰/۱۹	۰/۱۹	۰/۰۷	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۱۳	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۱۷	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲۶		
4115	۰/۲۳	۰/۱۷	۰/۱۸	۰/۱۴	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۱۵	۰/۰۷	۰/۲۰	۰/۲۲	۰/۲۳	۰/۲۶	۰/۲۲	۰/۳۳	۰/۳۴	۰/۳۷	۰/۲۱	

زیرگروه اول شامل ژنوتیپ‌های La(4B)4D/b, Ha, DH, Ka/b, 4103, 4116, Ma/b, St/b, Cr/b و علف شور ساحل (TNP)، زیرگروه دوم شامل لاین‌های امید بخش ترتیکاله ۴۱۰۸ و ۴۱۱۵، زیر گروه سوم شامل لاین‌های

داشت. شباهت ژنتیکی در این گروه در دامنه ۰/۰۸-۰/۵۵ قرار داشت که نشان‌دهنده پراکندگی وسیع ژنوتیپ‌ها و ارقام قرار گرفته در این گروه بود. بنابراین این گروه می‌تواند به چهار زیر گروه تقسیم گردد.

که این دو روش با هم به کار برده شوند، نسبت به کاربرد هر یک به تنهایی کارایی بهتری دارند. لاین $La(4B)4D/b$ نسبت به سایر لاین‌های تریتی پایروم تشابه ژنتیکی بیشتری با رقم چینی بهاره داشت. بنابراین ژنوم A و B در این لاین شباهت ژنتیکی بیشتری با ژنوم E^b دارد. این تشابه زیاد ممکن است مربوط به وجود کروموزوم D در این لاین باشد که در دیگر لاین‌های تریتی پایروم وجود ندارد (در والد مادری این لاین، کروموزوم 4D جایگزین کروموزوم 4B شده است). Hassani et al. (2006) نشان دادند که لاین $La(4B)4D/b$ نسبت به دیگر لاین‌های تریتی پایروم، برای صفات تعداد بوته سبز در مزرعه، باروری، ظهور خوشه، وزن هزار دانه، تعداد پنجه و میزان پروتئین بهترین نتیجه را از خود نشان داد که این خصوصیات می‌تواند به دلیل شباهت زیاد آن با رقم چینی بهاره و یا وجود کروموزوم D در این لاین باشد. زیر گروه دوم شامل لاین‌های اولیه تریتی پایروم St/b ، Cr/b و Cr/b و Cr/b شور ساحل (TNP) می‌باشد. در آغازگرهای تصادفی والد پدری لاین‌های تریتی پایروم با لاین‌های CS ، $La(4B)4D/b$ ، Cr/b ، St/b ، Ka/b ، Ma/b ، 4103 و 4116 در یک گروه قرار گرفتند. ولی در روش ISJ، علف شور ساحل با St/b و Cr/b با هم در یک گروه قرار گرفتند. در اینجا نیز اهمیت آغازگرهای نیمه تصادفی نسبت به آغازگرهای تصادفی در برآورد قرابت ژنتیکی ملاحظه می‌شود. بنابراین لاین‌های St/b و Cr/b نسبت به سایر لاین‌های تریتی پایروم بیشترین تشابه ژنتیکی را با والد پدری‌شان دارند. هیبریداسیون DNA فلورسنت در محل روی سلول‌های میکروسپور برخی لاین‌های اولیه تریتی پایروم نیز در تمایز کروموزوم‌های E^b از کروموزوم‌های A و B با مشکل مواجه بود که شاید دلیل این عدم تمایز کروموزومی، تشابه ژنتیکی زیاد ژنوم A، B و E^b در برخی لاین‌های اولیه تریتی پایروم باشد (King et al., 2005; Hassani et al., 2003). زیر گروه سوم شامل رقم هامون، Ka/b و Ma/b ، زیر گروه چهارم در برگزیده رقم هاپلوئید مضاعف و هیبرید و زیر گروه پنجم شامل چهار لاین امید بخش تریتی‌کاله (لاین‌های 4103 ، 4116 ، 4108 و 4115) می‌باشد. در این زیر گروه لاین‌های 4103 و 4116 با ضریب تشابه ژنتیکی $0/63$ با هم در یک گروه قرار گرفتند. لاین 4108 با ضریب تشابه $0/51$ به این گروه پیوست. دامنه تشابه ژنتیکی لاین‌های این گروه در دامنه $0/63-0/14$ قرار داشت که نشان‌دهنده پراکندگی لاین‌های قرار گرفته در این گروه بود. بنابراین این گروه می‌تواند به سه زیر گروه تقسیم گردد. زیر گروه اول شامل لاین‌های CS ، Ma/b و $La(4B)4D/b$ ، زیر گروه دوم شامل لاین‌های St/b ، Cr/b و والد پدری آنها علف شور ساحل (TNP) و زیر گروه سوم شامل پنج لاین امید بخش تریتی‌کاله (4103 ، 4116 ، 4108 ، 4115 و M_{45}) می‌باشد. گروه دوم شامل رقم هامون و لاین‌های تریتی پایروم Az/b و Ka/b و گروه سوم شامل لاین‌های DH، Hi، Stt و La/b می‌باشد.

اولیه تریتی پایروم La/b و Az/b و زیر گروه چهارم تنها شامل رقم هیبرید می‌باشد که به دلیل فاصله ژنتیکی زیاد با این لاین‌ها در هیچ کدام از زیر گروه‌ها قرار نگرفت. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های تتراپلوئید گندم (St) و لاین M_{45} تریتی‌کاله می‌باشد که این دو با میزان تشابه ژنتیکی $0/173$ با هم در یک گروه قرار گرفتند. نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها با آغازگرهای نیمه تصادفی به سه گروه بزرگ قابل تفکیک است. گروه اول شامل لاین‌های CS ، Ma/b ، $La(4B)4D/b$ ، 4103 ، 4116 ، 4108 ، TNP ، Cr/b ، St/b ، 4115 و M_{45} می‌باشد که دو لاین امید بخش تریتی‌کاله 4103 و 4116 با ضریب تشابه ژنتیکی $0/63$ با هم در یک گروه قرار گرفتند. لاین 4108 با ضریب تشابه $0/51$ به این گروه پیوست. دامنه تشابه ژنتیکی لاین‌های این گروه در دامنه $0/63-0/14$ قرار داشت که نشان‌دهنده پراکندگی لاین‌های قرار گرفته در این گروه بود. بنابراین این گروه می‌تواند به سه زیر گروه تقسیم گردد. زیر گروه اول شامل لاین‌های CS ، Ma/b و $La(4B)4D/b$ ، زیر گروه دوم شامل لاین‌های St/b ، Cr/b و والد پدری آنها علف شور ساحل (TNP) و زیر گروه سوم شامل پنج لاین امید بخش تریتی‌کاله (4103 ، 4116 ، 4108 ، 4115 و M_{45}) می‌باشد. گروه دوم شامل رقم هامون و لاین‌های تریتی پایروم Az/b و Ka/b و گروه سوم شامل لاین‌های DH، Hi، Stt و La/b می‌باشد. نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها با ترکیب آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی به سه گروه بزرگ قابل تفکیک است. گروه اول شامل رقم تتراپلوئید گندم استوارد و گروه دوم شامل لاین‌های تریتی پایروم Az/b و La/b می‌باشد. گروه سوم لاین‌ها و ارقام باقی مانده را شامل می‌شود که با توجه به دامنه زیاد تشابه ژنتیکی این لاین‌ها ($0/53-0/06$) می‌توان این گروه را به ۵ زیر گروه تقسیم نمود. زیرگروه اول شامل CS و $La(4B)4Db$ می‌باشد. در گروه‌بندی با آغازگرهای RAPD این دو با هم و با لاین‌های تریتی پایروم، علف شور ساحل و تریتی‌کاله در یک زیرگروه و در آغازگرهای نیمه تصادفی این دو با لاین Ma/b در یک زیر گروه قرار گرفتند. بنابراین روش ISJ بهتر از RAPD تفاوت‌های ژنتیکی لاین‌ها و ارقام را آشکار نموده و زمانی

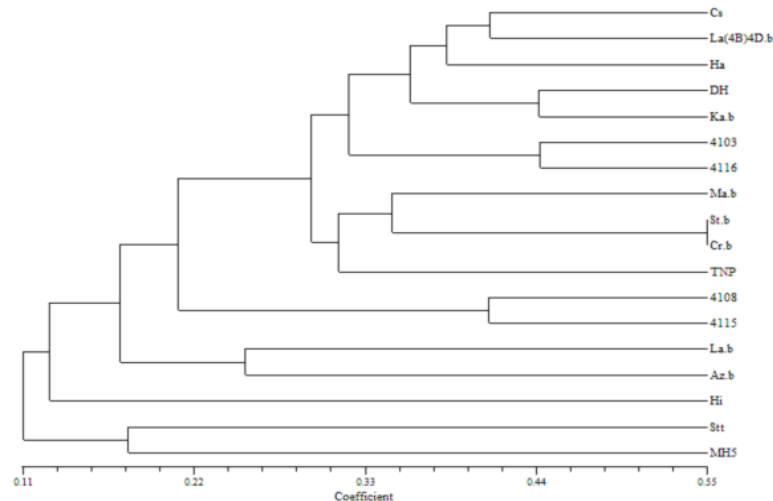
ریشه‌های مشخصه، نسبت واریانس توجیه شده و جمع کل واریانس توجیه شده در تجزیه مختصات اصلی لاین‌های اولیه تریتی پایروم، ارقام اصلاح شده گندم و لاین‌های امید بخش تریتیکاله با استفاده از ترکیب آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی در جدول ۹ نشان داده شده است. در این تحقیق سه مؤلفه اول حداکثر ۲۷/۷۳ درصد و ۱۳ مؤلفه اول حدود ۸۴/۴۷ درصد از تغییرات کل را توجیه نمودند. بنابراین تعداد صفات یا باندها به تعداد زیادی مؤلفه کاهش یافته و انتخاب آغازگرها به خوبی انجام گرفته است.

در داده‌های مورفولوژیک بر عکس داده‌های مولکولی بهترین حالت زمانی است که بیشترین واریانس توسط

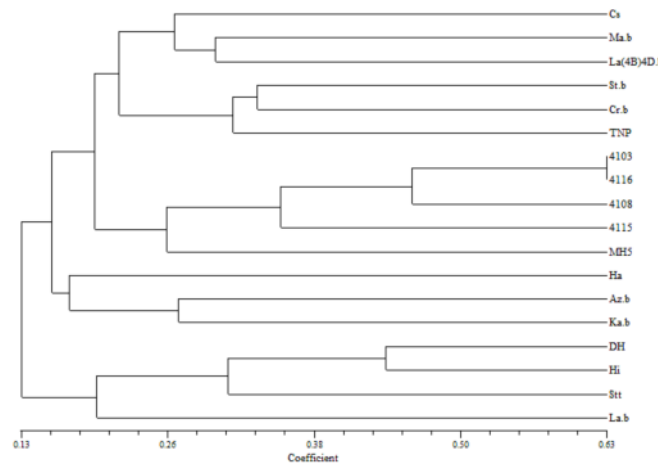
(۰/۵۳) با هم در یک گروه قرار گرفته و لاین‌های ۴۱۰۸ و ۴۱۱۵ در مراحل بعد به این گروه پیوستند. زیرگروه ششم شامل لاین M₄₅ تریتیکاله بود که بیشترین فاصله ژنتیکی را با سایر لاین‌ها و ارقامی که در گروه اول قرار گرفته‌اند، دارا بود. در گروه‌بندی با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی لاین M₄₅ با سایر لاین‌های تریتیکاله و در آغازگرهای تصادفی این لاین با رقم تتراپلوئید گندم (St) در یک گروه قرار گرفته بودند.

به منظور گروه‌بندی لاین‌ها و ارقام و تعیین کارایی نشانگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی، از تجزیه مختصات اصلی (PCO)^۱ استفاده گردید. بردارها،

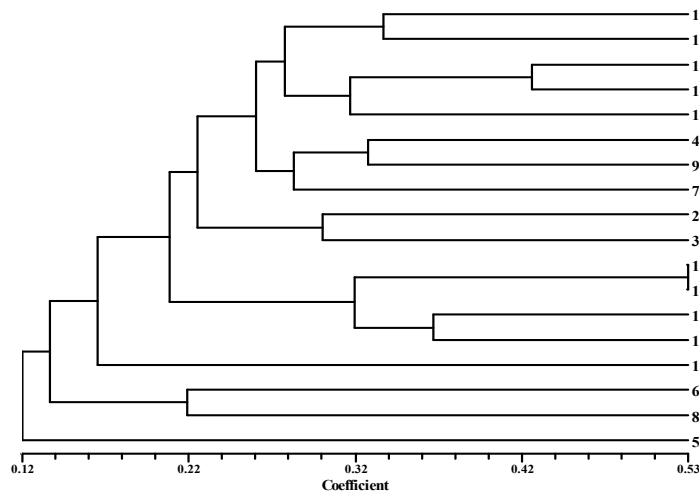
1. Principal Coordinate Analysis



شکل ۱- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه ای لاین‌های اولیه تریتی پایروم، ارقام اصلاح شده گندم و لاین‌های امید بخش تریتیکاله با استفاده از آغازگرهای تصادفی (RAPD)



شکل ۲- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه ای لاین‌های اولیه تریتی پایروم، ارقام اصلاح شده گندم و لاین‌های امید بخش تریتیکاله با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی (ISJ)



شکل ۳- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه ای لاین‌های اولیه تریتی پاپروم، ارقام اصلاح شده گندم و لاین‌های امید بخش تریتیکاله با استفاده از ترکیب آغازگرهای تصادفی (RAPD) و نیمه تصادفی (ISJ)

جدول ۹- بردار، مقادیر ویژه، سهم واریانس توجیه شده و سهم تجمعی واریانس توجیه شده در تجزیه مختصات اصلی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ترکیب آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی

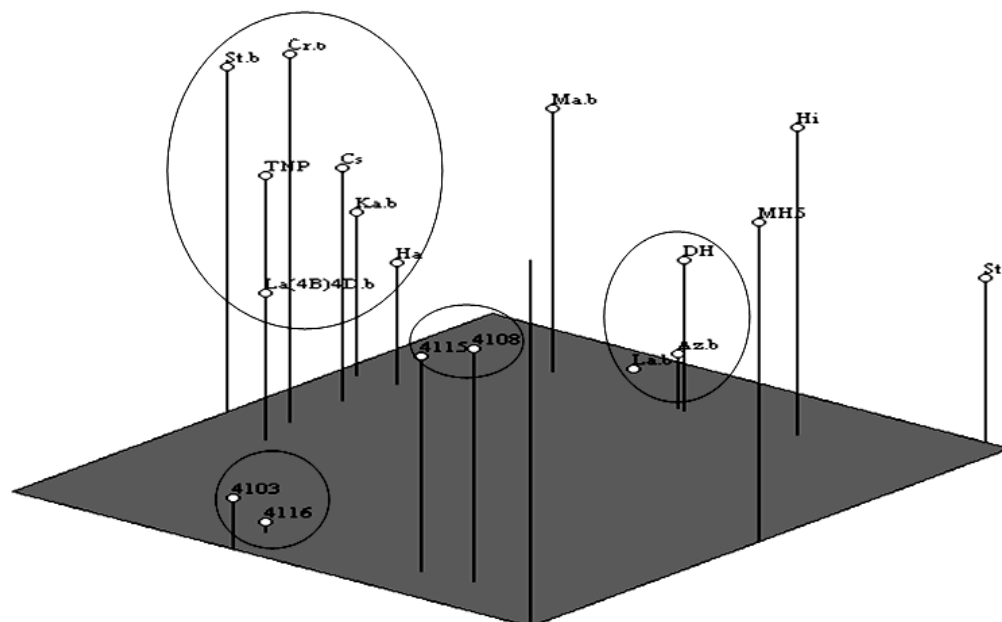
بردار	ریشه مشخصه	سهم واریانس توجیه شده	سهم تجمعی واریانس توجیه شده
۱	۱/۴۴	۱۰/۶۴	۱۰/۶۴
۲	۱/۲۳	۹/۰۶	۱۹/۷۰
۳	۱/۰۹	۸/۰۲	۲۷/۷۳
۴	۱/۰۵	۷/۷۲	۳۵/۴۶
۵	۰/۱۸۹۷	۶/۵۹	۴۲/۰۵
۶	۰/۱۸۴۳	۶/۰۹	۴۸/۱۵
۷	۰/۱۷۹۷	۵/۶۴	۵۳/۸۰
۸	۰/۱۷۵۵	۵/۵۵	۵۹/۳۵
۹	۰/۱۷۳۴	۵/۴۰	۶۴/۷۶
۱۰	۰/۱۷۰۴	۵/۱۸	۶۹/۹۴
۱۱	۰/۱۶۸۹	۵/۶۱	۷۵/۰۱
۱۲	۰/۱۶۵۸	۴/۸۴	۷۹/۸۵
۱۳	۰/۱۶۲۷	۴/۶۲	۸۴/۴۷

این تحقیق از جمله معدود گزارشات استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISJ در برآورد تنوع ژنتیکی، در لاین‌های اولیه تریتی پاپروم، لاین‌های امید بخش تریتیکاله و ارقام اصلاح شده گندم بود. نتایج حاصل از این تحقیق اهمیت آغازگرهای RAPD و ISJ را در شناسایی چند شکلی ژنتیکی در لاین‌های اولیه تریتی پاپروم، لاین‌های امید بخش تریتیکاله و ارقام اصلاح شده گندم نشان داد. آغازگرهای ISJ چند شکلی

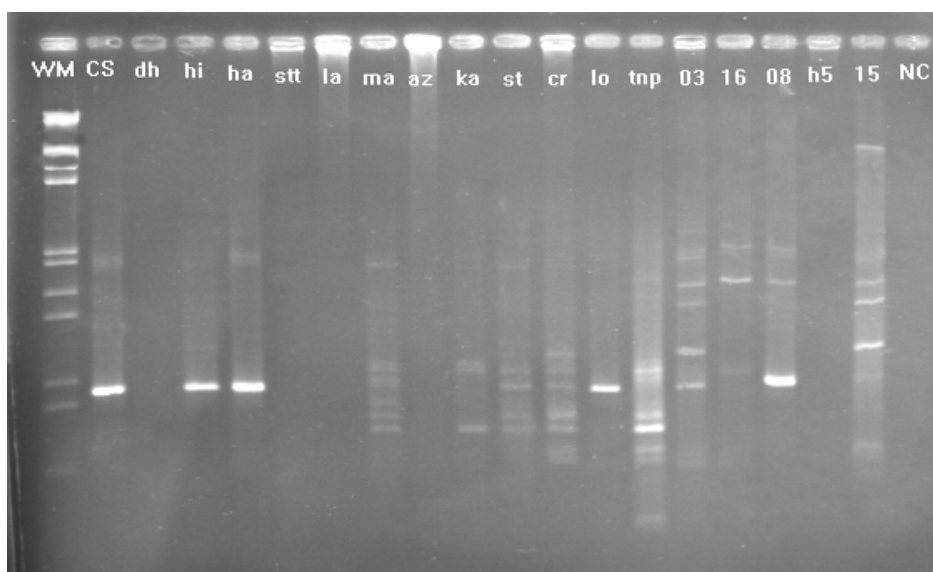
تعداد کمی مؤلفه توجیه گردد. در داده‌های مولکولی دو یا سه مولفه اول باید حدود ۲۰-۱۰ درصد از تغییرات مربوط به نشانگرها را توجیه نمایند که از نظر آماری ممکن است برای نمایش گرافیکی مناسب نباشد، ولی از نظر ژنتیکی نشان دهنده نمونه برداری مطلوب نشانگرها از کل ژنوم می‌باشد. به عبارت دیگر، زمانی که تعداد صفات یا باندها به تعداد کمی مؤلفه کاهش یابد، آغازگرهای مورد استفاده به طور صحیح انتخاب نشده و تعداد محدودی از کروموزوم‌ها را تحت پوشش قرار می‌دهند و در نتیجه نمی‌توانند افراد را از همدیگر به خوبی جدا نمایند. اما اگر تعداد مؤلفه‌ها زیاد باشد، آغازگرهای مورد استفاده، کروموزوم‌های بیشتری را تحت پوشش قرار داده و نشانگر به خوبی تنوع ژنتیکی افراد را تعیین می‌نماید. تجزیه به مختصات اصلی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمود (شکل ۴). گروه بندی بر اساس دو بردار اول تجزیه مختصات اصلی تا حد زیادی مشابه با گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای بود و تفاوت‌های اندک مشاهده شده، به دلیل این است که دو یا سه مولفه اول نمی‌تواند نشان‌دهنده تنوع کل متغیرهای اولیه (تعداد کل باندها) باشد. در نمودار سه بعدی لاین‌هایی که در یک نقطه متمرکز شده اند، در یک گروه قرار گرفته‌اند. فواصل عرضی بین افراد قرار گرفته در یک گروه، نشان دهنده فاصله بین گروه‌های مختلف و اختلاف در طول محورها نشان‌دهنده میزان تفاوت ژنتیکی دو یا چند لاینی است که با هم در یک گروه قرار گرفته‌اند.

بیشتری نسبت به آغازگرهای RAPD نشان دادند. رقم تتراپلوئید گندم استوارد بیشترین فاصله ژنتیکی را با لاین تریتیکاله ۴۱۰۳ داشت. لاین‌های تریتیکاله ۴۱۰۳ و ۴۱۱۶ کمترین فاصله ژنتیکی را داشتند. لاین

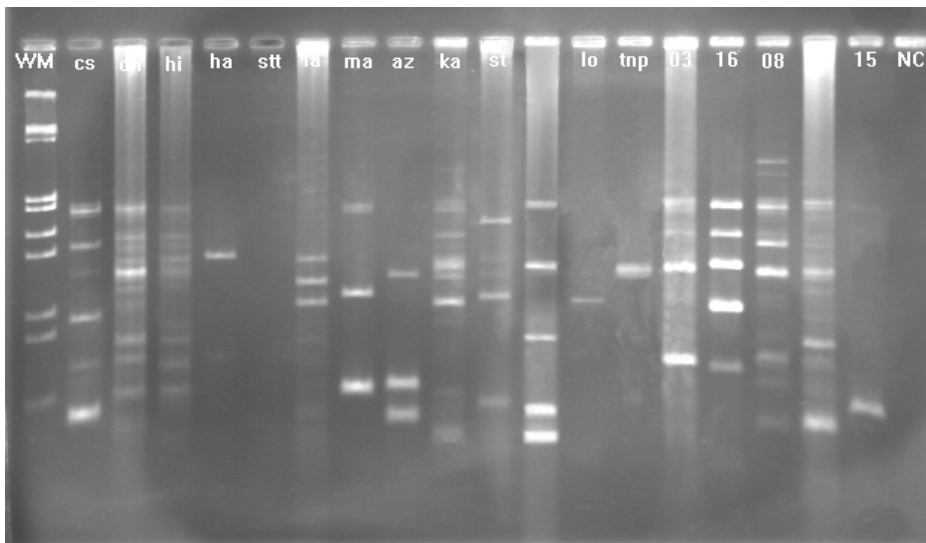
La(4B)4D/b تریتی پایروم بیشترین تشابه ژنتیکی را با گندم رقم چینی بهاره داشت. لاین‌های St/b و Cr/b تریتی پایروم بیشترین تشابه ژنتیکی را با والد پدری‌شان (علف شور ساحل) نشان دادند.



شکل ۴- نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه مختصات اصلی لاین‌های اولیه تریتی پایروم، ارقام اصلاح شده گندم و لاین‌های امید بخش تریتیکاله با استفاده از ترکیب آغازگرهای تصادفی (RAPD) و نیمه تصادفی (ISJ) (جدول ۱).



شکل ۵- تکثیر DNA لاین‌های اولیه تریتی پایروم، ارقام گندم و لاین‌های محتمل تریتیکاله با آغازگر OPM06.



شکل ۶- تکثیر DNA لاین‌های اولیه ترییتی پایروم، ارقام گندم و لاین‌های امید بخش تریتیکاله با استفاده از آغازگر IT34. (WM)، نشانگر وزنی؛ (CS)، گندم رقم چینی بهاره؛ (dh)، گندم هاپلوئید مضاعف؛ (hi)، گندم نان رقم هیرمند؛ (ha)، گندم نان رقم هامون؛ (stt)، گندم تتراپلوئید رقم استوارد، (la)، لاین ترییتی پایروم (La/b)؛ (ma)، لاین ترییتی پایروم (Ma/b)؛ (az)، لاین ترییتی پایروم (Az/b)؛ (ka)، لاین ترییتی پایروم (Ka/b)؛ (st)، لاین ترییتی پایروم (St/b)؛ (cr)، لاین ترییتی پایروم (Cr/b)؛ (lo)، لاین ترییتی پایروم (La (4B)4D/b)؛ (tnp)، علف شور ساحل؛ (03)، لاین امید بخش تریتیکاله ۴۱۰۳؛ (16)، لاین امید بخش تریتیکاله ۴۱۱۶؛ (08)، لاین امید بخش تریتیکاله ۴۱۰۸؛ (h5)، لاین امید بخش تریتیکاله M₄₅؛ (15)، لاین امید بخش تریتیکاله ۴۱۱۵؛ (NC)، نمونه کنترل منفی.

REFERENCES

- Chen, D. H., & Ronald, P. C. (1999). A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR application. *Plant Mol Bio Rep*, 17, 53-57.
- Devos, K. M. & Gale, M. D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet*, 84, 567-572.
- Erlich, H. A. (1989). *PCR technology: principle and applications for DNA amplification*. Stockton Press, New York, USA.
- Gawel, M., Wisniewska, I. & Rafalski, A. (2002). Semi-specific PCR for evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale. *Cell Mol Bio Lett*, 7, 577-582.
- Hassani, H. S., King, I. P., Reader, S. M., Caligari, P. D. S. & Miller, T. E. (2000). Can tritipyrum, a new salt tolerance amphiploid be a successful cereal like triticale? *J Agric Sci and Tech*, 2, 177-195.
- Hassani, S. H., Caligari, P. D. & Miller, T. E. (2003). The chromosomal assessment of salt tolerance substituted Tritipyrum using genomic Flurescent in situ hybridization (FISH). *Iranian of Biotech*. 1(3), 169-178.
- Hassani, H. S., Reader, S. M. & Miller, T. E. (2006). Agronomical and adaptation characters of tritipyrum lines in comparison with triticale and Iranian Wheat. *Asian J Plant Sci*, 5(3), 533-558.
- Iqbal, A., Khan, A. S., Khan, I. A., Awan, F. S., Ahmad, A. & Khan, A. A. (2007). Study of genetic divergence among wheat genotypes through random amplified polymorphic DNA. *Genet Mol Res*, 6(3), 476-481.
- King, I. P., Purdie, K. A., Rezanoor, H. N., Koebner, R. M. D. & Miller, T. E. (2005). Characterization of *Thinopyrum bessarabicum* chromosome segments in wheat using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and genomic *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet*, 86(8), 895-900.
- Kumar, L. S. (1999). DNA marker in plant improvement: An overview. *Biot Adv*, 17(2-3), 143-182.
- Mohammadi, S. A. & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and consideration. *Crop Sci*, 43, 1235-1248.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed*, 2(3), 225-238.
- Przetakiewicz, J., Nadolska-Orczyk, A. & Orczyk, W. (2002). The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. *Cell Mol Bio Lett*, 7, 671-676.
- Rafalski, A., Lucjan, L., Wisniewska, I. & Gawel, M. (2002). The genetic diversity of components of rye

- hybrids. *Cell Mol Bio Lett*, 7, 471-475.
15. Rafalski, A., Gizinska, M. & Wisniewska, I. (1997). PCR-based system for evolution of relationships among maize inbreds. PP. 106-111. In: Tsafarides, A. S. (Ed.), *Genetics and Biotechnology of Maize and Sorghum*. Royal Soc. Chem., Cambridge. UK.
 16. Richard R., Wang, C., Li, X. M., Hu, Z. M., Zhang, J. Y., Larson, S. R., Zhang, X. Y., Grieve, C. M. & Shannon, M. C. (2003). Development of salinity tolerant wheat recombinant lines from a wheat disomic addition line carrying a *Thinopyrum junceum* chromosome. *Int J Plant Sci*, 164(1), 25-33.
 17. Rohlf, F. J. (1992). *NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system*, version 2.02. New York State University, Stony Brook, New York.
 18. Tams, S. H., Melchinger, A. E. & Bauer, E. (2005). Genetic similarity among European winter triticales elite germplasm assessed with AFLP and comparisons with SSR and pedigree data. *Plant Breed*, 124, 154-160.
 19. Weining, S. & Langridge, P. (1991). Identification and mapping of polymorphism in cereals based on polymerase chain reaction. *Theor Appl Genet*, 82, 209-216.
 20. Zhang, J. Y., Li, X. M., Wang, R. R. C. & Cortes, A. (2002). Molecular cytogenetic characterization of E^b-genome chromosomes in *Thinopyrum bessarabicum* disomic addition lines of bread wheat. *Int J Plant Sci*, 163(1), 167-174.
 21. Zidani, S., Ferchich, A. & Chaieb, M. (2005). Genomic DNA extraction method from Pearl Millet (*Pennisetum glaucum*) leaves. *Afr J Biot*, 4(8), 862-866.