

تبارزایی مولکولی ژنگان A در برخی از گونه های *Triticum L.* با استفاده از توالی های بین رونوشت های ریبوزومی (ITS)

زینب صفری^۱ و علی اشرف مهرابی^{۲*}

۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۱۹)

چکیده

در گیاهان خانواده غلات (Poaceae) جنس *Triticum L.* شامل گندم نان و دیگر گونه های مهم زراعی است که اهمیت اقتصادی بسیار بالایی در تغذیه انسان دارند. در این پژوهش، تبارزایی مولکولی گونه های جنس *Triticum L.* دارای ژنگان (ژنوم) A (*T. aestivum*، *T. turgidum*، *T. urartu* و *T. boeoticum*) بررسی شد. برای این منظور توالی های بین رونوشت های ریبوزومی (ITS) با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی از روی DNA ژنگانی استخراج شده از ۲۶ ژنوتیپ از گونه های بالا، افزایش و توالی یابی شد. توالی ها با استفاده از نرم افزار MEGA 5.0 و با الگوریتم ClustalW هم ردیف شدند. ماتریس فاصله ها محاسبه و درخت واره ژنی ترسیم شد. نتایج نشان داد، طول توالی های ITS1 و ITS2 به ترتیب ۶۵۰ جفت باز و ۷۰۰ جفت باز و محتوای G+C به ترتیب ۶۰/۲۵ و ۶۰/۵۰ بود. حفاظت شدگی بالایی در نواحی ITS جمعیت ها مشاهده شد (۶۳ و ۸۸ درصد، به ترتیب). تحلیل تبارزایی (فیلوژنتیکی) انجام شده با استفاده از توالی های افزایش شده، به خوبی گندم های دیپلوئید و پلی پلوئید را در دو گروه جداگانه قرار داد. نتایج نشان داد، رابطه های نزدیکی بین *T. aestivum* و *T. turgidum* و همچنین بین *T. urartu* و *T. boeoticum* وجود دارد. به طور کلی، این بررسی نشان داد، نشانگرهای مولکولی ITS برای بررسی های تبارزایی بسیار مناسب هستند.

واژه های کلیدی: تبارزایی مولکولی، درخت واره ژنی، رونوشت های ریبوزومی (ITS)، ژنگان A.

Molecular phylogeny of the A genome using internal transcribed sequences (ITS) of ribosomal genes in some *Triticum L.* species

Zeinab Safari¹ and Ali-Ashraf Mehrabi^{2*}

1, 2. Ph.D. Candidate and Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

(Received: May 11, 2016 - Accepted: Aug. 9, 2016)

ABSTRACT

The genus *Triticum L.* includes bread wheat and other important cultivated species, which are economically important for large parts of the human food. In this study, we conducted a phylogenetic analysis of A genome-possessing species of genus *Triticum L.* (*T. aestivum*, *T. turgidum*, *T. urartu* and *T. boeoticum*). Here, the internal transcribed sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA were amplified by two pairs of primers in 26 genotypes from the above species. Sequenced amplicons were aligned by ClustalW. Divergence matrices and phylogenetic dendrogram were made by MEGA 5.0. Results revealed the full length of sequences of ITS1 and ITS2 were 650 bp and 700bp, respectively and G+C content were 60.25 and 60.50 in them. High levels of conservation in sequences were found among genotypes (%63 and %88). Phylogenetic analysis using amplified sequences were successfully divided diploid and polyploid wheats into individual groups. Regarding to the results, there were close relationships within *T. aestivum* and *T. turgidum* and also within *T. urartu* and *T. boeoticum*. However, our analysis suggests that the ITS molecular markers seem to be proper tools for plant phylogenetic studies.

Keywords: A genome, dendrogram, molecular phylogeny, ribosomal DNA.

* Corresponding author E-mail: alia.mehrabi@yahoo.com

مقدمه

گندم به‌عنوان یک محصول راهبردی، اهمیت ویژه‌ای در تأمین نیاز غذایی انسان دارد. جنس *Triticum* L. از طایفه *Triticeae* و متعلق به خانواده *Poaceae* است. گونه‌های مختلفی از جنس گندم (*Triticum* L.) دارای سطوح مختلف پلوئیدی (دی، تترا و هگزا)، با عدد پایه هفت وجود دارند. چهار ژنگان (ژنوم) پایه A، B، D و G در ژنگان همه گونه‌های گندم وجود دارند (Golovnina et al., 2007; Mammdouh-Alnaddaf et al., 2013).

گندم‌های دیپلوئید ژنگان A و شامل سه گونه *T. monococcum*، *T. urartu* و *T. boeoticum* و گندم‌های تتراپلوئید شامل ژنگان‌های AB (*T. durum*)، *T. persicum*، *T. dicoccum* و *T. turgidum* و AG (*T. timopheevi*) دارند. درحالی‌که گندم‌های هگزاپلوئید نیز شامل گونه‌های *T. aestivum*، *T. spelta* و *T. petropavlovskiyi* هستند (Belgerami, 2009; Mammdouh-Alnaddaf et al., 2013).

ژن‌های ریبوزومی هسته‌ای^۱ (rDNA) به‌صورت خوشه‌های ژنی تکراری و متوالی روی مناطق کروموزومی موسوم به مناطق سازمان هسته‌ای^۲ (NOR) واقع شده‌اند. هر واحد تکراری شامل یک ناحیه رونویسی شونده است که متشکل از یک ETS (فاصله‌اندازهای خارجی رونوشت^۳)، ژن ۱۸s و به دنبال آن ITS1 (توالی‌های بین رونوشت‌های ریبوزومی^۴)، ژن ۵/۱۸s، ITS2 و درنهایت ژن ۲۸s هستند. هر ناحیه تکرارشونده از ناحیه تکرارشونده پس از خود، با یک فاصله‌انداز بین ژنی^۵ (IGS) جدا می‌شود (Baghaee-Ravari et al., 2007; Calonje et al., 2009; Mammdouh-Alnaddaf et al., 2013).

نواحی کدکننده به‌شدت محافظت‌شده مانند ۱۸s و ۲۸s، در سطح خانواده و بالاتر سودمند هستند، درحالی‌که نواحی ITS تکامل سریعی را پشت سر گذاشته‌اند و بین گونه‌ها و جنس‌ها تنوع نشان

می‌دهند. بنابراین برای بررسی‌های تبارزایی (فیلوژنی) و مقایسه گونه‌ها و جنس‌های بسیار نزدیک به یکدیگر، مناسب هستند (Mostafavi, 2013).

در سده گذشته نشانگرها و روش‌های مولکولی چندی برای بررسی‌های تکاملی و وجود رابطه بین گونه‌های گندم استفاده شده است. نخستین استفاده از ITS در بررسی تکامل گونه‌های گندم به اوایل ۱۹۸۰ برمی‌گردد (Dvorák & Appels, 1982; Peacock et al., 1981). امروزه نیز بررسی‌های چندی روی مناطق ITS به‌منظور بررسی رابطه‌های تبارزایی و خویشاوندی گونه‌های مختلف گندم انجام شده است.

در یک تحقیق به‌منظور بررسی رابطه‌های تبارزایی و چندشکلی نوکلئوتیدی میان ۱۹ گونه *Aegilops* و *Triticum* از توالی‌یابی مناطق ITS استفاده شد. طول منطقه ITS ۶۰۲-۶۰۰ جفت باز و محتوای G+C در ITS1 در همه گونه‌های *Triticum* و *Aegilops* ۶۳/۹-۶۳/۳٪ بود و در ITS2 در محدوده ۶۳/۵-۵۹/۹٪ بود (Mammdouh-Alnaddaf et al., 2013).

در یک بررسی روی ۴۸ رقم قدیمی گندم نان، ۹ الگوی ITS در RFLP-PCR با آنزیم‌های *HpaII*، *AluI* و *TaqI* (سه الگو در هر آنزیم) مشاهده شد. این نشانگرها در مقایسه با دیگر نشانگرهای DNA مانند ISSR، درصد پایین‌تری از چندشکلی (پلی‌مورفیسم) را نشان دادند (Carvalho et al., 2009).

در بررسی دیگر، توالی نوکلئوتیدی ITS در ۲۲ جمعیت از پنج گونه *Aegilops* بررسی شد. جایگزینی‌های مختص گونه‌ای در توالی نوکلئوتیدی ITS گونه‌های مختلف مشاهده شد. در توالی نوکلئوتیدی ITS نمونه‌های همسان، چندشکلی مشاهده شد که ممکن است به دلیل تفاوت‌های بین ژنگان‌های گیاهان و یا به خاطر حضور انواع مختلفی از ژن‌های ریبوزومی در ژنگان یک گیاه باشد. به‌طور کلی، هم تنوع درون‌گونه‌ای و هم بین‌گونه‌ای توالی‌های نوکلئوتیدی ITS rDNA بسیار کم بود (Goryunova et al., 2005).

هدف از این تحقیق، بررسی رابطه‌های تکاملی و تبارزایی بین گونه‌های گندم دارای ژنگان A شامل گندم‌های وحشی و دیپلوئید یا اینکورن (*T. urartu*)

1. Ribosomal DNA
2. Nucleolar Organizer Region
3. External Transcribed Spacers
4. Internal Transcribed Spacer
5. Intergenic Spacer

سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و اتصال آغازگر به الگو در دمای ۴۸ یا ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در نهایت یک مرحله دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه به منظور بسط نهایی در نظر گرفته شد. نگهداری نیز در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز و ژل آگارز ۱/۵ درصد تحت ولتاژ ۹۰ و به مدت ۱۱۰ دقیقه و با استفاده از بافر TAE IX جداسازی شدند. قطعه‌های افزایش شده با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، به میزان ۲۵ تا ۳۵ میکرولیتر از نمونه‌های تکثیر شده دارای کیفیت مناسب، برای تخلیص و تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند.

داده‌های به دست آمده از توالی‌یابی محصولات PCR با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.0 و به روش ClustalW ردیف و تنظیم شدند. همچنین درصد چندشکلی، محتوای نوکلئوتیدی و جفت‌بازها در آن‌ها بررسی شد. ماتریس فاصله برای هر کدام از آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار DARwin 6.0 و بر پایه ضریب‌های نبود همسانی، محاسبه شد. به منظور بررسی رابطه بین گونه‌های مختلف و آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی درون و بین چهار گونه مورد بررسی، با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.0 هر کدام از گونه‌ها به عنوان یک گروه در نظر گرفته شدند و فاصله‌های ژنتیکی درون و بین هر گروه محاسبه و با یکدیگر مقایسه شد. نمودار شجره‌ای یا دندروگرام (درخت تبارزایی) ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف توسط نرم‌افزار MEGA 5.0 ترسیم شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) گونه‌ها توسط نرم‌افزار DARwin 6.0 محاسبه و نمودار دوبعدی آن با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) داده‌های به دست آمده از آغازگرهای ITS، توسط نرم‌افزار GeneAlex و بر پایه چهار گونه مختلف، انجام شد.

(A^uA^u) و (A^bA^b) (*T. boeiticum*)، گندم‌های زراعی و پلی‌پلوئید (A^uA^uBBDD) (*T. aestivum*) و (A^uA^uBB) (*T. turgidum*)، با استفاده از آغازگر ITS است.

مواد و روش‌ها

بذر ۲۶ نمونه از ژنوتیپ‌های مختلف گندم‌های وحشی و زراعی دارای ژنگان A در سطوح مختلف پلوئیدی و همچنین یک ژنوتیپ از گونه جو وحشی (*H. spontaneum*) (به عنوان خارج گروه و برای تعیین ریشه درخت تبارزایی) از بانک ژن دانشگاه ایلام (جدول ۱)، تهیه شد و به میزان ۷ تا ۱۰ بذر از هر ژنوتیپ در گلدان‌های کوچک در گلخانه کشت شد. دو تا سه هفته پس از کشت بذرها، DNA ژنگانی از گیاهچه‌های دو برگه به صورت تک بذر و با روش CTAB (Doyle & Doyle, 1987) تغییر یافته استخراج شد. کیفیت نمونه‌های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد.

پس از استخراج DNA و تعیین کیفیت آن، نواحی ITS با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و دو جفت آغازگر مختلف تکثیر شدند. واکنش PCR با حجم ۵۰ میکرولیتر و شامل ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس^۱ حاوی رنگ بارگذاری، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت و ۲ میکرولیتر DNA تهیه شد. در نهایت حجم واکنش با آب سترون (استریل) دیونیزه (۲۱ میکرولیتر) به ۵۰ میکرولیتر رسید. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biorad C1000TM) و با یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه آغاز شد. آنگاه ۳۸ چرخه شامل سه مرحله متوالی واسرشت‌سازی در دمای ۹۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به الگو در دمای ۴۸ درجه سلسیوس (برای آغازگر اول) و یا ۳۵ درجه سلسیوس (برای آغازگر دوم) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه تکرار شدند. سپس دوباره یک مرحله واسرشت

جدول ۱. مشخصات ژنوتیپ‌های مورد استفاده در تحقیق

Table 1. Information of genotypes used in the study

Row	Species	Genome		Origin
1	<i>T. aestivum</i>	A ^u BD	6x	Azərbayjanegharbi (Naghadeh)
2	<i>T. aestivum</i>	A ^u BD	6x	Golestan(Gonbad)
3	<i>T. aestivum</i>	A ^u BD	6x	Qazvin
4	<i>T. aestivum</i>	A ^u BD	6x	Esfahan(Shahr Reza)
5	<i>T. aestivum</i>	A ^u BD	6x	Khuzestan (Izeh)
6	<i>T. aestivum</i>	A ^u BD	6x	Ilam (Salehabad)
7	<i>T. boeoticum</i>	A ^b	2x	Lorestan (Sepid dasht)
8	<i>T. boeoticum</i>	A ^b	2x	Alborz (Taleghan)
9	<i>T. boeoticum</i>	A ^b	2x	Kermanshah (Javanrood)
10	<i>T. boeoticum</i>	A ^b	2x	Azərbayjanegharbi (Silvana)
11	<i>T. boeoticum</i>	A ^b	2x	Ilam (Sarableh)
12	<i>T. turgidum</i>	A ^u B	4x	Khuzestan(Ahvaza)
13	<i>T. turgidum</i>	A ^u B	4x	Ardabil
14	<i>T. turgidum</i>	A ^u B	4x	Kohkiluye va boyerahmad (Yasooj)
15	<i>T. turgidum</i>	A ^u B	4x	Kordestan
16	<i>T. turgidum</i>	A ^u B	4x	Khorasan (Mashhad)
17	<i>T. turgidum</i>	A ^u B	4x	Ilam (Mehran)
18	<i>T. urartu</i>	A ^u	2x	Kermanshah (Kerand Gharb)
19	<i>T. urartu</i>	A ^u	2x	Kordestan (Saghez)
20	<i>T. urartu</i>	A ^u	2x	Kordestan (Marivan1)
21	<i>T. urartu</i>	A ^u	2x	Chaharmahale Bakhtiari (Sisakht)
22	<i>T. urartu</i>	A ^u	2x	Chaharmahale Bakhtiari (Farokh Shahr)
23	<i>T. urartu</i>	A ^u	2x	Kermanshah (Songhor)
24	<i>T. urartu</i>	A ^u	2x	Kermanshah (Biston)
25	<i>T. urartu</i>	A ^u	2x	Kermanshah
26	<i>T. urartu</i>	A ^u	2x	Kordestan (Marivan2)
27	<i>H. spontaneum</i>	H	2x	Ilam (Golzar)

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای ITS مورد استفاده در تحقیق

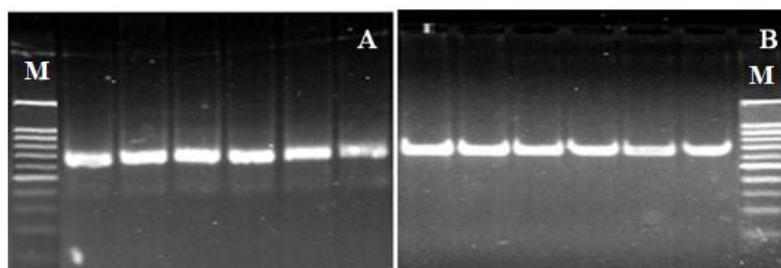
Table 2. ITS primers information used in the study

Row	Strand	Primer Sequence	TM (°C)
1	Forward	5-GAGGAAGGAGAAGTGGAAC-3'	52.8
	Reverse	5-CTGGGTCGCGGTCGA-3'	58.4
2	Forward	5-TATCTTTAGAGGAAGGA-3'	38.1
	Reverse	5-GATATGCTTAAACTCAGC-3'	38.6

به اندازه ۷۰۰ جفت تکثیر کرد و در ژنوتیپ‌های ۱، ۱۸، ۱۹، ۲۱ و ۲۲ باندی مشاهده نشد (شکل ۱). Mammdouh-Alnaddaf *et al.* (2013) نیز در بررسی‌های خود و ضمن بررسی رابطه‌های *Triticum* L. و *Aegilops* L. با استفاده از توالی‌های ITS، قطعه‌ای به طول ۷۰۰ جفت باز را مشاهده کردند.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در هر دو آغازگر، نشان‌دهنده وجود چندشکلی در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. به طوری که آغازگر اول موجب تکثیر یک باند به طول ۶۵۰ جفت باز در بیست ژنوتیپ شد و ژنوتیپ‌های ۷، ۱۵، ۱۸، ۱۹، ۲۱ و ۲۳ باندی تولید نکردند. آغازگر دوم نیز باندی



شکل ۱. نتایج به دست آمده از افزایش آغازگرهای ITS، (A): آغازگر اول (۶۵۰ جفت باز)، (B): آغازگر دوم (۷۰۰ جفت باز)، (M): سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی

Figure 1. Results of amplification of ITS primers, (A): the first primer (650 bp), the second primer (700 bp), (M): 100 bp DNA ladder

همسان^۳ (یکی پورین و دیگری پیریمیدین) در آغازگر اول به ترتیب برابر با ۹۲/۴۸، ۳/۶۳، ۳/۹۵ و برای آغازگر دوم برابر با ۹۵/۵۸، ۲/۶۳ و ۱/۷۶ بود. بنابر نتایج به دست آمده قطعه‌های تکثیر شده توسط هر دو آغازگر شامل میزان بالایی از دی نوکلئوتیدهای یکسان بود (جدول ۳).

سازگاری ماتریس‌های فاصله هر دو آغازگر توسط نرم‌افزار XLSTAT و آزمون مانتل^۴ بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده سازگاری و همبستگی بالای داده‌های آغازگرهای مختلف بود، به گونه‌ای که همبستگی آن‌ها در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ برابر با ۰/۵۳ بود. بنابراین داده‌های آن‌ها با هم تلفیق و نتایج به صورت تلفیقی بررسی شد. بر پایه ضریب‌های ناهمسانی، کمترین فاصله بین گونه‌های *T. aestivum* (ژنوتیپ شماره ۲، گلستان (گنبد)) و *T. turgidum* (ژنوتیپ شماره ۱۲، خوزستان (اهواز)) و برابر با ۰/۰۱۳ و بیشترین فاصله بین گونه‌های *T. turgidum* (ژنوتیپ شماره ۱۳، اردبیل) و *T. boeoticum* (ژنوتیپ شماره ۹، کرمانشاه (جوانرود)) و برابر با ۰/۱۷۸ به دست آمد. میانگین فاصله و تنوع کل به دست آمده برابر با ۰/۰۶۴ بود (جدول ۴).

تنوع درون و بین گونه‌های مختلف

کمترین و بیشترین تنوع درون گروهی، به ترتیب مربوط به گونه‌های *T. aestivum* (۰/۰۱۸) و *T. boeoticum* (۰/۰۹۱) بود (جدول ۵). بنابراین می‌توان گفت گندم‌های دیپلوئید یا اینکورن بیشترین تنوع درون گونه‌ای را دارند. این نتایج با نتایج تحقیقات پیشین همخوانی داشت (Hammer et al., 2000; Kharestani et al., 2013).

فاصله دوه‌دوی گونه‌های مختلف نیز در محدوده بین ۰/۰۲۶ (فاصله بین گونه *T. aestivum* و *T. turgidum*) و ۰/۰۹۹ (فاصله بین گونه *T. boeoticum* و *T. aestivum*) محاسبه شد. نتایج به دست آمده بین گروه‌ها نشان‌دهنده قابلیت بالای این نشانگر در جداسازی گونه‌های مختلف است، به طوری که بیشترین فاصله بین گونه‌های با ژنگان‌های متفاوت به دست آمد (جدول ۵).

بنابر نتایج به دست آمده، میزان چندشکلی قطعه‌های افزایش شده برای آغازگر اول ۳۷ درصد و برای آغازگر دوم تنها ۱۲ درصد بود. بنابراین حفاظت‌شدگی بالایی در نواحی ITS برای هر دو آغازگر (۶۳ و ۸۸ درصد) مشاهده شد. در هر دو آغازگر بیشترین و کمترین درصد نوکلئوتید به ترتیب مربوط به نوکلئوتیدهای C (۳۲/۵ و ۳۲) و T (۱۷/۷۵ و ۱۷/۵) بود. همچنین محتوای G+C برای هر دو آغازگر به ترتیب برابر با ۶۰/۲۵ و ۶۰/۵۰ محاسبه شد (جدول ۳). این نتایج به میزان زیادی با نتایج Goryunova et al. (2005) همخوانی داشت، آن‌ها ضمن بررسی رابطه‌های تکاملی گونه‌های گندم‌نما یا آگیلوپس (*Aegilops*) با استفاده از توالی‌های ITS، به این نتیجه رسیدند که در هر سه آغازگر مورد بررسی بیشترین محتوای بازی مربوط به نوکلئوتید C (۳۴/۱، ۳۱/۱ و ۳۲/۸) و کمترین محتوای بازی مربوط به نوکلئوتید T (۱۷/۸، ۱۷/۷ و ۱۷/۳) است. میزان چندشکلی نیز پایین و برابر با ۲۶ درصد بود. از سوی دیگر، Mammdouh-Alnaddaf et al. (2013) به منظور بررسی رابطه‌های تبارزایی و چندشکلی نوکلئوتیدی میان ۱۹ گونه *Aegilops* و *Triticum* از توالی‌یابی مناطق ITS استفاده کردند. محتوای G+C در همه گونه‌های *Aegilops* و *Triticum* در حدود ۶۰ درصد و میزان چندشکلی ۱۱/۱۲ درصد بود که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. دیگر محققان نیز به نتایج همسانی در زمینه محتوای G+C (Nalini et al., 2007; Wang et al., 2002; Zhang et al., 2000; al., 2009; Hsiao et al., 2009; Carvalho et al., 2009) و میزان پایین چندشکلی (1995) دست یافته‌اند.

در هر دو آغازگر بیشترین محتوای دی‌نوکلئوتیدی مربوط به دی‌نوکلئوتید CC بود، در حالی که کمترین آن‌ها در هر یک از آغازگرها متفاوت بود. در آغازگر اول کمترین محتوا (۰/۳۲) مربوط به دی‌نوکلئوتیدهای TA و AT و در آغازگر دوم (۰/۱۵) مربوط به CA، CG و AC بود. از سوی دیگر، نسبت دی‌نوکلئوتیدهای یکسان^۱، همسان^۲ (هر دو پورین یا هر دو پیریمیدین) و غیر

3. Transversonal Pairs
4. Mantel test

1. Identical Pairs
2. Transitionsal Pairs

جدول ۳. میانگین محتوای نوکلئوتیدی توالی‌های تکثیر شده
 Table 3. Mean content of nucleotides in amplified sequences

Primer	Nucleotid Content (%)				Dinucleotid Content (%)						*ii	**si	***sv	R (si/sv)											
	T	C	A	G	TT	TC	TA	TG	CT	CC					CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG	
ITS1	T	17.5			TT	15.78			CT	0.95			AT	0.32			GT	0.63							
	C	32.5			TC	0.95			CC	30.62			AC	0.47			GC	0.63				92.48	3.63	3.95	0.92
	A	21.75			TA	0.32			CA	0.63			AA	20.04			GA	0.79							
	G	27.75			TG	0.47			CG	0.63			AG	0.95			GG	26.04							
ITS2	T	17.75			TT	16.54			CT	0.73			AT	0.29			GT	0.44							
	C	32			TC	0.73			CC	30.89			AC	0.15			GC	0.15				95.58	2.63	1.76	1.50
	A	21.75			TA	0.29			CA	0.15			AA	20.49			GA	0.59							
	G	28.50			TG	0.29			CG	0.15			AG	0.59			GG	27.67							

* Identical Pairs, ** Transitional Pairs, *** Transversonal Pairs.

** جفت‌های یکسان، *** جفت‌های همسان، ** جفت‌های غیر همسان.

جدول ۴. ضرایب عدم تشابه بین ژنوتیپ‌های مختلف
 Table 4. Issimilarity coefficients between various genotypes

	T.aestivum					T.boeiticum					T.turgidum					T.urartu			
	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	16	17	20	24	25	26	
T.aestivum	2	-																	
	3	0.019	-																
	4	0.018	0.014	-															
	5	0.022	0.016	0.019	-														
	6	0.022	0.017	0.022	0.016	-													
	8	0.077	0.080	0.079	0.078	0.076	-												
T.boeiticum	9	0.173	0.174	0.171	0.173	0.177	0.131	-											
	10	0.077	0.077	0.079	0.082	0.084	0.045	0.131	-										
	11	0.067	0.064	0.065	0.066	0.066	0.043	0.147	0.047	-									
	12	0.013	0.017	0.018	0.024	0.022	0.076	0.171	0.077	0.067	-								
T.turgidum	13	0.028	0.025	0.025	0.025	0.022	0.078	0.178	0.082	0.074	0.029	-							
	14	0.028	0.027	0.031	0.032	0.031	0.074	0.170	0.074	0.065	0.026	0.027	-						
	16	0.030	0.029	0.031	0.032	0.033	0.073	0.172	0.074	0.066	0.029	0.024	0.013	-					
	17	0.026	0.023	0.022	0.025	0.023	0.071	0.171	0.075	0.061	0.022	0.030	0.025	0.029	-				
	20	0.067	0.070	0.069	0.072	0.069	0.044	0.151	0.048	0.020	0.068	0.071	0.062	0.067	0.058	-			
T.urartu	24	0.068	0.068	0.065	0.068	0.065	0.040	0.147	0.048	0.013	0.065	0.072	0.063	0.063	0.056	0.020	-		
	25	0.064	0.066	0.060	0.067	0.068	0.039	0.144	0.045	0.016	0.063	0.069	0.063	0.063	0.059	0.018	0.017	-	
	26	0.096	0.100	0.099	0.093	0.094	0.043	0.138	0.069	0.063	0.096	0.101	0.097	0.095	0.091	0.063	0.062	0.066	-

جدول ۵. فاصله ژنتیکی درون و بین گونه‌های مورد بررسی
 Table 5. Genetic distance within and between species

Groups	Within Groups	Between Groups			
		T. aestivum	T. boeiticum	T. turgidum	T.urartu
T. aestivum	0.018	-			
T. boeiticum	0.091	0.099	-		
T. turgidum	0.025	0.026	0.097	-	
T. urartu	0.041	0.074	0.067	0.072	-

اصلی تقسیم شدند. گونه‌های پلی‌پلوئید و زراعی (*T. turgidum* و *T. aestivum*) در یک گروه و گونه‌های دیپلوئید (اینکورن)، وحشی (*T. boeiticum* و *T. urartu*) در یک گروه دیگر قرار گرفتند. در بررسی Bandopadhyay *et al.* (2004) نیز ضمن بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه‌های تبارزایی گونه‌های آجیلوپس و گندم، با استفاده از توالی‌های EST-SSRs به نتایج همسانی با این تحقیق دست یافتند. همچنین در بررسی‌های Kharestani *et al.* (2013) نیز دو گونه *T. boeiticum* و *T. urartu* در یک گروه قرار گرفتند. این محققان همسانی در ژن‌ها و ناحیه (موتیف)‌های دو گونه را از دلایل این پدیده بیان کردند.

ترسیم درخت تبارزایی

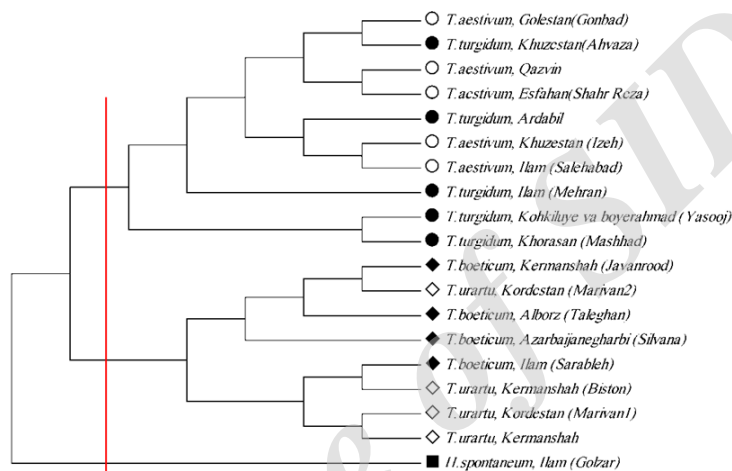
به‌منظور بررسی خویشاوندی ژنوتیپ‌ها و همچنین گونه‌های مختلف، با استفاده از ماتریس فاصله داده‌های تلفیقی هر دو آغازگر و با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایه^۱ (NJ) نمودار شجره‌ای (درخت تبارزایی) ژنوتیپ‌های مختلف توسط نرم‌افزار MEGA 5.0 ترسیم شد (شکل‌های ۲ و ۳). هر دو نمودار شجره‌ای حاصل از آغازگرها، ژنوتیپ‌ها (شکل ۲) و گونه‌ها (شکل ۳) را به‌دقت هماهنگ با ژنگان و سطح پلوئیدی جداسازی کردند. به‌طوری‌که نمودار شجره‌ای ژنوتیپ‌ها به دو گروه

1. Neighbor joining

بای پلات) آن‌ها با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و بر پایه دو مؤلفه اول برای ماتریس عدم تشابه گونه‌ها (جدول ۴)، با استفاده از نرم‌افزار DARwin 6.0 ترسیم شد.

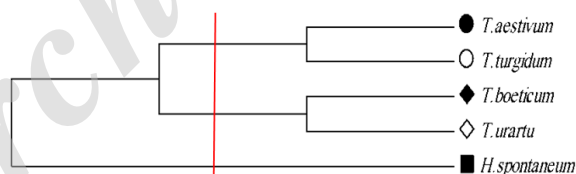
سهام دو مؤلفه اول و دوم، به ترتیب برابر ۵۱/۰۷ و ۳۷/۶۵ درصد و در مجموع ۸۸/۷۲ درصد از کل داده‌ها بود. این مقادیر نشان می‌دهد که دو مؤلفه اول و دوم به خوبی توانسته‌اند میزان بالایی از درصد تنوع را محاسبه کند.

بررسی رابطه‌های تبارزایی گندم‌های دارای ژنگان A با استفاده از ویژگی‌های کاربوتیپی نیز مؤید همین مطلب است (Ehtemam *et al.*, 2014). چراکه در این بررسی نیز گندم‌های اینکورن (*T. monococcum*)، *T. urartu* و *T. boeoticum* در یک گروه و گندم‌های پلی‌پلوئید (*T. aestivum*، *T. turgidum*) در یک گروه مستقل دیگر قرار گرفتند. به‌منظور بررسی پراکنندگی، فاصله و رابطه‌های تکاملی بین گونه‌های مورد بررسی، نمودار دووجهی



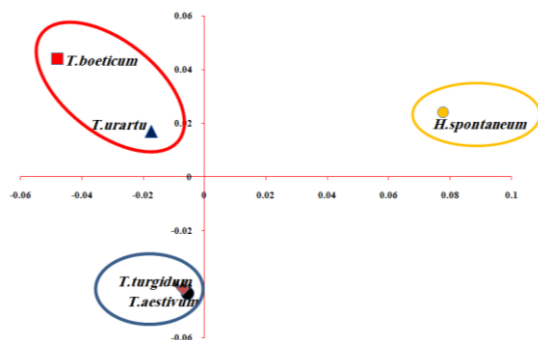
شکل ۲. نمودار شجره‌ای به‌دست‌آمده از آغازگرهای ITS در گونه‌های وحشی و زراعی گندم و یک گونه بیرون از گروه (جو وحشی) *H. spontaneum*

Figure 2. Dendrogram obtained by ITS primers in cultivated and wild species of *Triticum* L. and wild barely (*H. spontaneum*)



شکل ۳. نمودار شجره‌ای به‌دست‌آمده از آغازگرهای ITS در گونه‌های مختلف *Triticum* L. و یک گونه جو وحشی *H. spontaneum*

Figure 3. Dendrogram obtained by ITS primers in various species of *Triticum* L. and wild barely (*H. spontaneum*)



شکل ۴. نمودار دووجهی به‌دست‌آمده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی گونه‌های وحشی و زراعی گندم *Triticum* L.

Figure 4. The chart of Biplot obtained from principal component analysis in wild and cultivated *Triticum* L.

استفاده در این تحقیق، به میزان بالایی ردیف بازی همسان داشتند که نشان‌دهنده حفاظت‌شدگی بالایی این توالی‌ها در طی تکامل و توان بالایی آن‌ها در بررسی رابطه‌های تبارزایی و شناسایی منشأ ژنگان‌های مختلف است. از سوی دیگر، اگرچه همه گونه‌های گندم دارای ژنگان A در یک گروه کلی و گونه جو وحشی در یک گروه مستقل قرار گرفت، اما این گروه کلی شامل دو زیرگروه دیپلوئیدها و پلی‌پلوئیدها بود و این آغازگرها به‌خوبی قادر به جداسازی گونه‌های با سطوح پلوئیدی و ژنگان‌های همسان در گروه‌های یکسان و ژنگان‌های غیرهمسان بودند، که امکان استفاده از آن‌ها برای تعیین خویشاوندی و جداسازی گونه‌ها به‌ویژه جایی که شباهت‌های ریخت‌شناسی آن‌قدر زیاد است که رده‌بندی درست بر پایه صفات ریخت‌شناسی دشوار است را فراهم می‌کنند.

بر پایه نتایج به‌دست‌آمده، نمودار دووجهی به‌دست‌آمده جمعیت‌ها را به سه گروه مختلف تقسیم کرد. بنابراین، گونه‌های وحشی *T. urartu* و *T. boeoticum* که هر دو به‌صورت دیپلوئید و ژنگان A دارند، در یک سمت محور مختصات و نزدیک به همدیگر قرار گرفته‌اند. گونه‌های زراعی و پلی‌پلوئید *T. aestivum* و *T. turgidum* که ژنگان‌های A و B دارند، بسیار نزدیک به هم و در یک گروه جای گرفتند. از سوی دیگر، گونه *H. spontaneum* نیز که به‌عنوان بیرون از گروه استفاده شد، با فاصله زیادی از گونه‌های وحشی و زراعی گندم، در سمت دیگری از محور مختصات و در یک گروه جداگانه قرار گرفت (شکل ۴).

نتیجه‌گیری کلی

توالی‌های تکثیرشده توسط آغازگرهای ITS مورد

REFERENCES

1. Baghaee-Ravari, S., Falahati-Rastegar, M., Jafarpour, B. & Shokoohifar, F. (2007). The study of probable variation in ITS- rDNA region of *Fusarium solani* in potato and its correlation with pathogenicity and geographical origin in Razavi and Northern Khorasan Provinces. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 14, 1-9. (in Farsi)
2. Bandopadhyay, R., Sharma, Sh., Rustgi, S., Singh, R., Kumar, A., Singh-Balyan, H. & Kumar-Gupta, P. (2004). DNA polymorphism among 18 species of *Triticum-Aegilops* complex using wheat EST-SSRs. *Plant Science*, 166, 349-356
3. Belgerami, S. (2009). *The effects of ploidy and planting season on the phytic acid and some morphological characteristics of some species of grasses family*. M.Sc. thesis. Faculty of Agriculture, University Shahrekord. (in Farsi)
4. Calonje, M., Martin-Bravo, S., Dobes, C., Gong, W., Jordon-Thaden, I., Kiefer, C., Kiefer, M., Paule, J., Schmickl, R. & Koch, M. A. (2009). Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. *Plant Systematics and Evolution*, 282, 257-280.
5. Carvalho, A., Guedes-Pinto, H. & Lima-Brito, J. (2009). Genetic variability assessed by ITS PCR-RFLP markers in old Portuguese bread wheat. *Journal of Genetics*, 88, 363-367.
6. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry*, 19, 11-15.
7. Dvorák, J. & Appels, R. (1982). Chromosomal and nucleotide sequence differentiation in genomes of polyploid *Triticum* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 63, 349-360.
8. Ehtemam, M H., Rahiminejad, M. R., Saeidi, H. & Ebrahim, F. (2014). Phylogenetic comparison of the A genome using karyotype analysis in some *Triticum* species. *Taxonomy and Biosystematics*, 21, 11-20.
9. Golovnina, K. A., Glushkov, S. A., Blinov, A. G., Mayorov, V. I., Adkison, L. R. & Goncharov, N. P. (2007). Molecular phylogeny of the genus *Triticum* L. *Plant Systematics and Evolution*, 264, 195-216.
10. Goryunova, S. V., Chikida, N. N., Gori, M. & Kochieva, E. Z. (2005). Analysis of Nucleotide Sequence Polymorphism of Internal Transcribed Spacers of Ribosomal Genes in Diploid *Aegilops* (L.) Species. *Journal of Molecular Biology*, 39, 173-176.
11. Hammer, K., Filatenko, A.A. & Korzun, V. (2000). Microsatellite markers-a new tool for distinguishing diploid wheat species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47, 497-505.
12. Hsiao, C., Chatterton, N. J., Asay, K. H. & Jensen, K. B. (1995). Phylogenetic relationship of the monogenomic species of the wheat tribe, Triticeae (Poaceae), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences. *Genome*, 38, 211-223.

13. Kharestani, H., A.A. Nasrolah-Nejad-Qomi. A. A. & Mehrabi, A. A. (2013). Genetic diversity assessment of Einkorn wheat by using microsatellite markers. *Electronic Journal of Crop Production*, 6, 1-16. (in Farsi)
14. Mammdouh-Alnaddaf, L., Moualla, M. Y. & Haider, N. (2013). Genetic Relationships among *Aegilops* L. and *Triticum* L. Species based on the Internal Transcribed Spacer Sequences of nrDNA (ITS). *Asian Journal of Agricultural Sciences*, 5, 108-117.
15. Mostafavi, G. (2013). *Taxonomy and molecular phylogeny of land plants*. Islamic Azad University, shahre rey. First Edition, 355 pp. (in Earsi)
16. Nalini, E., Bhagwat, S. G. & Jawali, N. (2007). Identification and characterization of some ITS variants from hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 173, 262-268.
17. Peacock, W. J., Gerlach, W. L. & Dennis, E. S. (1981) *Molecular aspects of wheat evolution: repeated DNA sequences*. In: Evans LT, Peacock WJ (eds) *Wheat science today and tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 41-60.
18. Wang, G. Z., Matsuoka, Y. & Tsunewaki, K. (2000). Evolutionary features of chondriome divergence in *Triticum* (wheat) and *Aegilops* shown by RLFP analysis of mitochondrial DNAs. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 221-231.
19. Zhang, W., Qu, L. J., Gu, H., Gao, W., Liu, M., Chen, J. & Chen, Z. (2002). Studies on the origin and evolution of tetraploid wheats based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 1099-1106.

Archive of SID