مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۰، شماره ۱، سال ۱۳۹۳

ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) بومی ایران با استفاده از نشانگرهای AFLP

Evaluation of Genetic Diversity in Iranian Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Landraces Using AFLP Markers

داود صادق زاده اهری[۱]، محمدرضا حسندخت[۲]، عبدالکریم کاشی[۳] و احمد عمری[۴]

۱- دانشجوی سابق دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم باغبانی، تهران
۲ و ۳- به ترتیب دانشیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج)
۴- محقق ارشد، مرکز بین المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ایکاردا)، حلب، سوریه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۲۸

چکیده

صادق زاده اهری، د.، حسندخت، م. ر.، کاشی، ع. ک. و عمری، ا. ۱۳۹۳. ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) بومی ایران با استفاده از نشانگرهای AFLP . **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰:** ۱۷۱ - ۱۵۵.

این بررسی به منظورارزیابی تنوع ژنتیکی در بین و درون بیست توده شنبلیله بومی ایران و با انتخاب تصادفی هشت تک بوته(لاین) از هر توده با استفاده از نشانگرهای AFLP انجام شد. استفاده از پنج جفت آغازگر انتخابی ۱۴۷ نوار در محدوده ۵۰۰-۵۰ جفت باز تولید کرد که از این تعداد، ۱۲۸ نوار (۸۷٪) چند شکل بود. محتوای اطلاعات چند شکلی برای هر توده بین ۰/۷۹ در توده کاشان(خالص‌ترین توده) تا ۰/۹۳ در توده‌های بروجرد و خراسان(ناخالص‌ترین توده‌ها) متغییر بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) نشان داد که، ۷۵٪ از واریانس کل مربوط به تنوع درون توده‌ای بوده و تنوع ژنتیکی مطلوبی در درون توده‌های مورد مطالعه وجود داشت. دامنه تغییر ضرایب تشابه ژنتیکی بین لاین‌ها از ۴۴٪ تا ۹۴٪ بود. همچنین نتایج حاکی از کارآیی مناسب نشانگرهای AFLP در ارزیابی تنوع ژنتیکی شنبلیله بود.

واژه‌های کلیدی: شنبلیله، توده بومی، AFLP، تنوع ژنتیکی.

نویسنده مسئول: dasadeghzadeh @yahoo.com تلفن: ۰۴۲۱۲۲۲۸۰۷۸

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) از گیاهان یک ساله متعلق به تیره لگومینوزه است. بنا به روایت تاریخ انتشار گیاهان، این گیاه از ایران و غرب آسیا برخاسته و به سایر نقاط دنیا برده شده است. در مقیاس جهانی مناطق عمده کشت شنبلیله کشورهایی نظیر هند، مراکش، مصر، اتیوپی و غیره است و در حال حاضر، در اغلب کشورهای اروپایی، آسیایی و آفریقایی کشت می‌شود (Omidbaighi, 2000؛ Najafpoor Navaei, 1994). در سال‌های اخیر با مشخص شدن ارزش‌های غذایی و دارویی شنبلیله و از سوی دیگر توقعات کم خاکی و سازگاری نسبتاً وسیع آن به کشت در مناطق مختلف، دامنه کشت و زرع آن از آمریکا تا هندوستان گسترش یافته است (Petropoulos, 2002؛ Montgomery *et al*., 2007؛ Acharya *et al*., 2006).

روش تفاوت طول قطعه‌های حاصل از تکثیر (Amplified Fragment Length Polymorphism: AFLP) توسط وس و همکاران (Vos *et al*., 1995) ابداع شد. اساس این روش، تکثیر انتخابی برخی قطعه‌ها از بین تمام قطعه‌های هضم شده DNA است. تکرارپذیری، دقت و حساسیت بالا، توانایی تکثیر اجزای بیشتری از DNA در یک زمان و عدم نیاز به اطلاعات اولیه در خصوص ژنوم موجود زنده، از جمله برتری‌های روش AFLP نسبت به RAPD، RFLP و SSR است (Ganguli,2009؛ Geetha *et al*., 2008؛ Naghavi *et al*., 2002). به دلیل میزان بالای نواردهی و قدرت وضوح این روش، می‌توان به اثر انگشت‌های ژنتیکی کاملاً اختصاصی با اطلاعات زیاد دست یافت و به تمایز گونه‌ها، رقم‌ها، اکوتیپ‌ها و حتی افراد پرداخت (Sarker *et al*., 2005؛ Neumann *et al*., 2001؛ Solimani *et al*., 2002؛ Karakousis *et al*., 2003؛ Botanga *et al*., 2002).

بررسی منابع نشان می‌دهد که استفاده از نشانگرهای DNA در بررسی تنوع ژنتیکی شنبلیله، سابقه زیادی در دنیا و ایران ندارد. دنگی و همکاران (Dangi *et al*., 2004) با بررسی تنوع ژنتیکی ۲۶ ژنوتیپ از دو گونه مختلف شنبلیله (*T. caerulea* و *T. foenum-graecum*) با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR نشان دادند که، میزان تنوع ژنتیکی در گونه *T. caerulea* نسبت به گونه دیگر بیشتر است. همچنین آن ها استفاده از دو روش مذکور برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و تعیین قرابت ژنتیکی بین آن ها را توصیه کردند. مرزوقی و همکاران (Marzougui *et al*., 2007) با ارزیابی صفات مورفولوژیکی و میزان عناصر موجود در برگ (فسفر، پتاس، سدیم، کلسیم، منیزیوم و آهن) ۳۸ رقم شنبلیله خوراکی (*T. foenum-graecum*) در تونس نشان دادند که تنوع مطلوبی از نظر صفات مورفولوژیکی

Archive of SID

www.SID.ir

(غیر از رنگ گل) در بین ارقام موجود است ولی گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر مبنای صفات مورفولوژیک و میزان مواد معدنی برگ‌ها شباهت چندانی با یک دیگر نداشت.آن ها در مطالعات مربوط به بررسی تنوع ژنتیکی در شنبلیله، استفاده از نشانگرهای مولکولی در کنار صفات مورفولوژیکی را توصیه کردند.

مرادی (Moradi, 2008) با بررسی تنوع ژنتیکی در بیست توده شنبلیله بومی مناطق مختلف کشور (توده‌های حاضر در این بررسی) از طریق صفات مورفولوژیکی، سیتوژنتیکی و مولکولی (RAPD) اظهار داشت که تنوع مطلوبی از نظر صفات مورفولوژیکی در بین توده‌ها موجود است و تمامی آن ها دیپلوئید و دارای ۱۶ کروموزوم در سلول‌های سوماتیک خود هستند. ارزیابی مولکولی توده‌ها با استفاده از بیست آغازگر تصادفی، نوارهایی در محدوده ۷۰۰ تا ۲۳۰۰ جفت باز (bp) تولید کرد. بیشترین شباهت بین توده بومی زنجان و خاش و کمترین تشابه بین توده‌های خرم‌آباد و برازجان گزارش شد. در تمام بررسی‌های انجام شده مذکور، توده برازجان در گروهی جداگانه قرار گرفت و با سایر توده‌ها تفاوت معنی‌داری داشت. در نهایت با توجه به کاستی‌های احتمالی نشانگر RAPD، استفاده از نشانگرهای کارآمدتری چون SSR و AFLP را برای شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی شنبلیله توصیه کرد.

وجود تنوع ژنتیکی و تشخیص آن، اساس کار به نژادگران گیاهی را تشکیل می‌دهد و در این میان بررسی تنوع در بین توده‌های بومی از اولویت‌های خاصی برخوردار بوده و مورد تاکید محققان است (Fang *et al*., 2007). با توجه به سابقه کشت و زرع شنبلیله در ایران و توسعه کشت آن در اقصی نقاط کشور و با در نظر گرفتن این که سابقه انجام برنامه‌های به‌نژادی در توده‌های شنبلیله بومی کشور چندان دیرینه نبوده و تاکنون رقم یا لاین خالصی از آن ها معرفی نشده و به نظر می رسد توده‌های بومی شنبلیله کشور از نظر تنوع ژنتیکی غنی باشند، شناسایی این تنوع به عنوان گامی در جهت تهیه و تدوین برنامه‌های به‌نژادی این گیاه ضرورت دارد. هدف از انجام این بررسی ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان خویشاوندی بین توده‌های شنبلیله بومی کشور با استفاده از نشانگرهای AFLP بود که در ضمن آن، میزان تنوع در داخل هر توده بومی نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی بذر بیست توده شنبلیله بومی مناطق مختلف کشور که به طور سنّتی و از دیرباز در آن مناطق کشت می‌شوند، جمع‌آوری و در بهار سال ۱۳۸۷ در مزرعه ایستگاه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه در کرت‌هایی به ابعاد ۳×۱ متر کشت شد. در طول دوران رشد و نمّو گیاهان و ضمن انجام مراقبت‌های لازم زراعی(آبیاری، تغذیه، وجین علف های هرز و غیره)، هشت تک بوته به طور تصادفی در هر کرت(توده بومی) انتخاب شد. بوته‌های منتخب

Archive of SID

www.SID.ir

هر توده بومی از شماره‌های ۱ تا ۸ و با نصب برچسب‌های مخصوص از سایر بوته‌های موجود در کرت تفکیک شدند و پس از رسیدن دانه، بذر هر بوته به صورت مجزا و تحت شماره مخصوص برداشت شد.

بذرهای تک بوته‌های انتخابی از هر توده بومی، به مرکز بین‌المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ICARDA) واقع در شهر حلب سوریه منتقل و در اوایل پاییز سال ۱۳۸۸ در گلخانه واحد تحقیقات منابع ژنتیکی آن مرکز و در گلدان‌های پلاستیکی کاشته شدند. پس از انجام مراقبت‌های لازم از گیاهچه‌های سبز شده هر توده و رسیدن آنها به مرحله ۴ تا ۵ برگی، گلدان‌ها به آزمایشگاه منتقل و مقدار حدود ۲ گرم از بافت گیاهی (ساقه و برگ) هر کدام در هاون چینی استریل و به کمک نیتروژن مایع به حالت پودر درآمد. مواد پودر شده به داخل تیوب‌های استریل با گنجایش ۲ میلی‌لیتر منتقل و عملیات استخراج DNA با استفاده از بافر ستیل تری‌متیل آمونیوم بروماید (CTAB) و به روش مورای و تامسون (Murray and Thompson, 1980) انجام شد. برای ارزیابی کمیّت و کیفیّت DNA استخراج شده از دو روش فلوریمتری (استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Hoefer DyNA Quant 200 ساخت شرکت Amersham آمریکا) و الکتروفورز ژل آگارز (۱٪) استفاده شد.پس از اتمام مراحل فوق‌الذکر، تیوب‌ها بلافاصله به فریزر (۲۵- درجه سانتی‌گراد) منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند.

تجزیه AFLP مطابق روش وس و همکاران (Vos *et al.*, 1995) انجام شد. چرخه‌های حرارتی، شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه برای واسرشت‌سازی DNA)، ۶۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه جهت انجام مرحله اتصال)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه جهت انجام مرحله توسعه) در مرحله اول، در مرحله دوم شامل ۱۲ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۶۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) که در هر چرخه به میزان ۰/۷ درجه سانتی‌گراد از دمای اتصال کاهش می‌یافت (Touch down) و نهایتاً شامل ۲۳ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۵۶ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) بود. در این مرحله و به منظور آزمون کارآیی آغازگرهای مختلف و ارزیابی آن‌ها از نظر توانایی تولید قطعات چند شکلی و در نهایت انتخاب مناسب‌ترین آن‌ها از بیست ترکیب آغازگری استفاده شد. محصولات تکثیری با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۷٪ تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل‌ها به روش نیترات نقره انجام شد.

الگوی نواری نشانگرهای AFLP به صورت حضور و عدم حضور نوارها به ترتیب با اعداد یک و صفر امتیازدهی شدند. از ضریب تطابق ساده (Simple matching coefficient) برای تعیین روابط بین ژنوتیپ‌ها استفاده شد. براساس

Archive of SID

www.SID.ir

این روش، تشابهات ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها بر مبنای هر دو جنبه وجود و یا عدم وجود نوارها قابل ارزیابی و محاسبه است و چون در بررسی نوارهای حاصل ازنشانگرهای AFLP هم وجود و هم عدم وجود نوار می‌تواند مبنایی بر قرابت و یا عدم قرابت باشد، لذا به نظر می‌رسد این روش مطلوبیت بیشتری نسبت به سایر روش‌های محاسبه ضرایب تشابه دارد (Wang *et al*., 1999؛ Jakse *et al*., 2005؛ Sneath and Sokal, 1973). گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای و به روش UPGMA انجام شد. برای تعیین نیکویی برازش گروه‌بندی از ضریب کوفنتیک استفاده شد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین توده‌های مورد مطالعه، اطلاعات چند شکلی (Polymorphic information content : PIC) برای هر ژنوتیپ محاسبه و همچنین با استفاده از تجزیه داده‌های مولکولی (AMOVA) واریانس بین و درون توده‌ها محاسبه شد. نرم‌افزارهای مورد استفاده برای تجزیه داده‌ها NTSYS–PCVer.2.02، POPGENE و GenAlex بود.

نتایج و بحث

مشخصات توده‌های بومی شنبلیله مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است.

انجام آزمون انتخاب آغازگر نشان داد که در بین بیست جفت ترکیب آغازگری (جدول ۲)، آغازگرهای ردیف ۱ الی ۱۶ توانایی نشان دادن چند شکلی در قطعات حاصل از مرحله تکثیر انتخابی DNA را داشتند. در این میان، پنج جفت از ترکیبات مذکور شامل P(AGG) – M(CAT) (ترکیب شماره ۳)، P(AGG) – M(CAG) (ترکیب شماره ۴)، P(ACG) – M(CTC) (ترکیب شماره ۵)، P(GGG) – M(CAG) (ترکیب شماره ۸)، و P(AAG) – M(CTA) (ترکیب شماره ۱۰) از نظر تعداد تولید نوار و وضوح آن‌ها از بقیه ترکیبات برتر بوده و برای ارزیابی و تشخیص تفاوت‌های ژنوتیپی بین توده‌های شنبلیله مناسب‌تر تشخیص داده شدند (جدول۲).

بررسی ژل‌های حاصل از پنج ترکیب مختلف آغازگر (شماره‌های ۳، ۴، ۵، ۸ و ۱۰ در جدول ۲) نشان داد که آغازگرهای مذکور نوارهایی در محدوده ۵۰ تا ۷۰۰ جفت باز (bp) تولید کردند. اغلب نوارهای مورد مطالعه در محدوده ۵۰ تا ۵۰۰ جفت بازی قرار داشتند. در جدول ۳ محدوده نوارهای مورد مطالعه در هر ترکیب آغازگر به همراه تعداد نوارهای مشاهده شده و همچنین درصد نوارهای چند شکل حاصل از ترکیبات مختلف آغازگرها ارائه شده است. از مجموع ۱۴۷ نوار مورد مطالعه، ۱۲۸ نوار چند شکل (۸۷٪ از کل نوارها) و ۱۹ نوار یک شکل وجود داشت. یعنی با بکارگیری پنج ترکیب آغازگر مذکور، میزان چند شکلی بالایی ایجاد و از آن در شناسایی و تفکیک لاین‌های شنبلیله استفاده کرد. میانگین تعداد

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اسامی و مختصات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری بذر توده‌های بومی شنبلیله ایران

Table 1. Names and geographical information of collected locations of Iranian fenugreek landraces

شماره No.	نام توده Landrace name		طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع از سطح دریا Altitude(meter from sea level)
1	Ardestan	اردستان	52°,23′	33°,23′	1250
2	Isfahan	اصفهان	51°,40′	32°,37′	1550
3	Ahvaz	اهواز	48°,40′	31°,20′	20
4	Borazjan	برازجان	51°,34′	29°,35′	630
5	Broojerd	بروجرد	48°,45′	33°,55′	1630
6	Khash	خاش	61°,12′	28°,13′	1390
7	Khorasan	خراسان	57°,43′	36°,12′	980
8	Khoramabad	خرم‌آباد	48°,17′	33°,26′	1150
9	Rey	ری	51°,19′	35°,41′	1190
10	Zanjan	زنجان	48°,29′	36°,41′	1660
11	Semnan	سمنان	53°,32′	35°,35′	1130
12	Shiraz	شیراز	52°,36′	29°,32′	1480
13	Yazd	یزد	54°,17′	31°,55′	1240
14	Ghaenat	قائنات	59°,10′	33°,43′	1430
15	Kashan	کاشان	51°,27′	32°,59′	980
16	Kerman	کرمان	56°,58′	30°,15′	1750
17	Kermanshah	کرمانشاه	47°,90′	34°,31′	1320
18	Neyshaboor	نیشابور	45°,48′	36°,16′	1210
19	Yasooj 1	یاسوج ۱	51°,41′	30°,50′	1830
20	Yasooj 2	یاسوج ۲	51°,58′	30°,25′	1730

نوار به ازای هر ترکیب آغازگر برابر ۲۹/۴ و میانگین نوارهای چند شکل در هر لاین ۲۵/۳ نوار بود (جدول ۳). نتایج مندرج در جدول ۳ نشان می‌دهد که میزان چند شکلی نوارها در بین ترکیبات مختلف آغازگر(درصد نوارهای چند شکل) متفاوت بوده و جفت آغازگر P(GGG) – M(CAG) با ۹۷٪ و جفت آغازگر P(AGG) – M(CAG) با ۷۲٪ به ترتیب بیشترین و کمترین درصد چند شکلی را ایجاد کردند. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که ترکیب آغازگری P(GGG) – M(CAG) برترین ترکیب از نظر نشان دادن اطلاعات مربوط به میزان تنوع در بین لاین‌های شنبلیله بود. در شکل‌های ۱ و ۲ نمونه‌ای از ژل‌های حاصل از کاربرد ترکیبات مختلف آغازگر روی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- توالی و ترکیب آغازگرهای واکنش انتخابی به منظور انجام آزمون انتخاب آغازگرهای مناسب

Table 2. Selective amplification primers sequences and compositions for testing and selection of suitable primers

شماره No.	توالی و ترکیب آغازگر Primers sequences and compositions	شماره No.	توالی و ترکیب آغازگر Primers sequences and compositions
1	P(AGG) - M(GAA)	11	P(ACG) - M(CTC)
2	P(AGG) - M(CTA)	12	P(TGC) - M(AAG)
3	P(AGG) - M(CAT)	13	P(ACT) - M(CTA)
4	P(AGG) - M(CAG)	14	P(ACG) - M(CTG)
5	P(ACG) - M(CTC)	15	P(AAG) - M(ACC)
6	P(AGG) - M(CTT)	16	P(AGG) - M(GAA)
7	P(ACG) - M(CAC)	17	P(AAG) - M(AAG)
8	P(GGG) - M(CAG)	18	P(AGG) - M(CTT)
9	P(ACC) - M(CTT)	19	P(AAG) - M(ACC)
10	P(AAG) - M(CTA)	20	P(AAG) - M(CTA)

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در توده‌های شنبلیله بومی ایران به روش AFLP و نوارهای حاصل از آن ها

Table 3. AFLP primers combinations used to characterize the genetic diversity of Iranian fenugreek landraces and the number of fragments produced

ترکیب آغازگر AFLP primer combination	محدوده وزن مولکولی ارزیابی نوارها Range of scored bands molecular weights	تعداد کل نوارهای بررسی شده Total number of AFLP bands scored	تعداد نوارهای چند شکل number of polymorphic bands	درصد نوارهای چند شکل Percentage of polymorphic bands
P(AGG) – M(CAT)	50-300 bp	25	23	92
P(AGG) – M(CAG)	50-500 bp	25	18	72
P(GGG) – M(CAG)	50-500 bp	29	28	97
P(ACG) – M(CTC)	120-400 bp	37	31	84
P(AAG) – M(CTA)	50-400 bp	31	28	90
Total	–	147	128	–
Mean		29.4	25.3	87

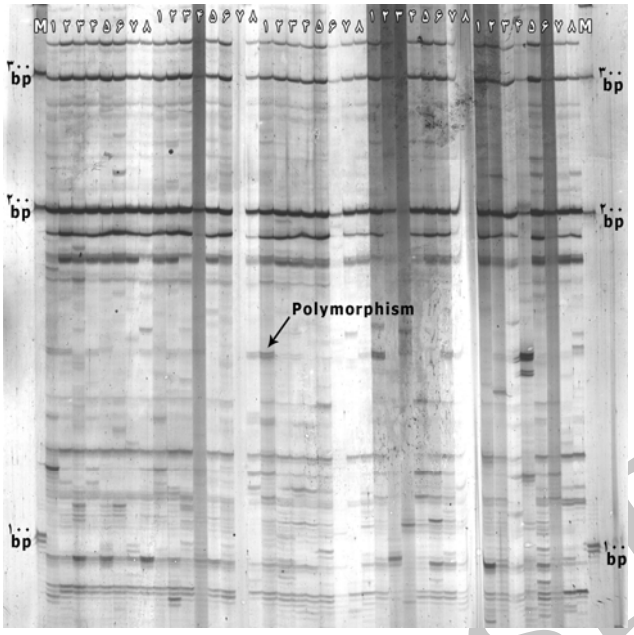
ارائه شده است.

بررسی ضریب تشابه تطابق ساده در بین ۱۶۰ لاین مستخرج از بیست توده شنبلیله بومی کشور (هشت لاین از هر توده) حاکی از وجود دامنه متغییری از حداقل ۴۴٪ تا حداکثر ۹۴٪ بود. کمترین درجه تشابه بین لاین شماره ۷ از توده بروجرد (توده شماره ۵) و لاین شماره ۸ از توده نیشابور (توده شماره ۱۸) مشاهده شد. بین لاین‌های شماره ۷ و شماره ۴ از توده کاشان تشابه بالایی (۹۴٪) وجود داشت. میانگین ضریب تشابهات ژنتیکی در بین کل لاین‌های مورد بررسی (۱۶۰ لاین) برابر ۶۹٪ بود.

نتایج محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیکی که نشان دهنده همبستگی بین ماتریس تشابه لاین‌ها با ماتریس خروجی دندروگرام است، نشان داد که مقدار این ضریب برابر r = ۰/۶۱

Archive of SID

www.SID.ir

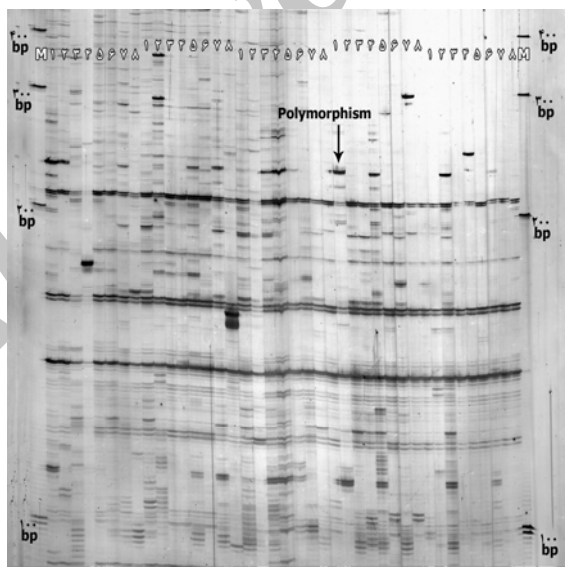


شکل ۱- تصویر یک انگشت نگار AFLP با استفاده از آغازگرهای P(AAG) و M(CTA)

M = نشانگر، هشت ستون اول از سمت چپ متعلق به لاین‌های توده خاش و هر هشت ستون بعدی به ترتیب متعلق به لاین‌های توده‌های بومی خراسان، خرم‌آباد، ری و زنجان است.

Fig. 1. AFLP fingerprint using P(AAG)- M(CTA) primers.

M: Marker, the first 8 columns from left belong to Khash landrace lines and each 8 next columns belong to Khorasan, Khoramabad, Rey and Zanjan landraces lines, respectively.



شکل ۲- تصویر یک انگشت نگار AFLP با استفاده از آغازگرهای P(GGG) و M(CAG)

M = نشانگر، هشت ستون اول از سمت چپ متعلق به لاین‌های توده سمنان و هر هشت ستون بعدی به ترتیب متعلق به لاین‌های توده‌های بومی شیراز، یزد، قائنات و کاشان است.

Fig. 2. AFLP fingerprint using P(GGG)- M(CAG) primers

M: Marker, the first 8 columns from left belong to Semnan landrace lines and each 8 next columns belong to Shiraz, Yazd, Ghaenat and Kashan landraces lines, respectively.

www.SID.ir

است، یعنی نتایج خروجی از دندروگرام ۶۱٪ با ماتریس تشابه اولیه حاصل از ضرایب تطابق ساده همخوانی داشت.

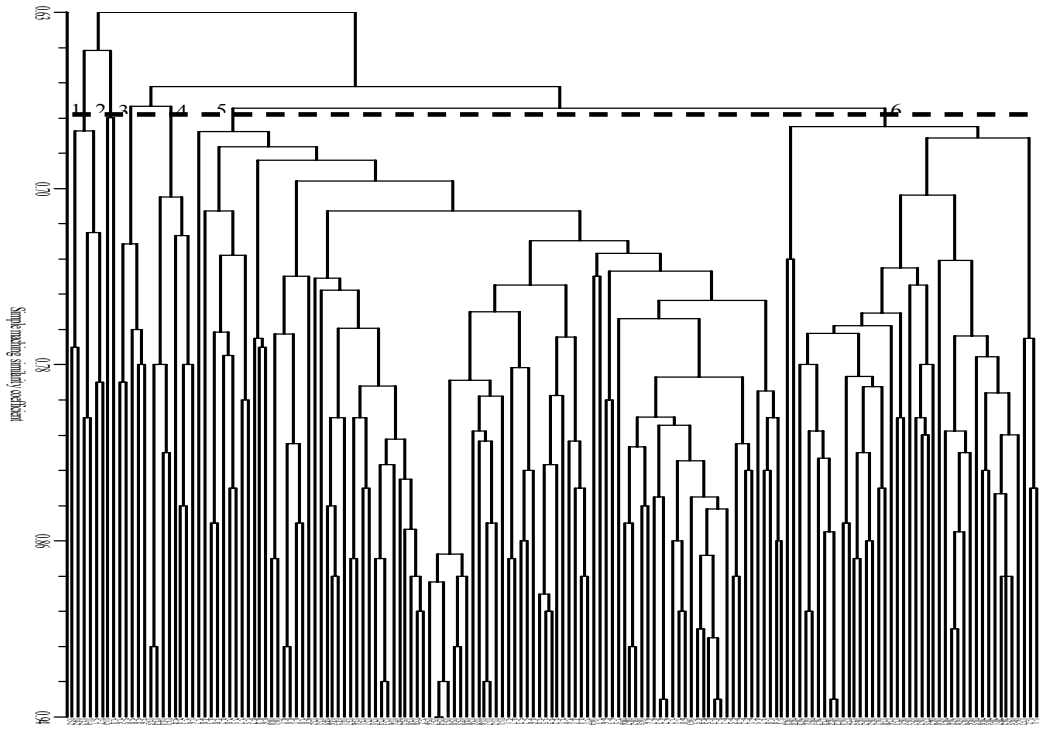
دامنه زیاد ضرایب تشابهات ژنتیکی (از حداقل ۴۴٪ تا حداکثر۹۴٪) در این بررسی، دلیلی بر وجود تنوع بسیار بالا در توده‌های شنبلیله بومی ایران است و نشان می‌دهدکه ایران به عنوان یکی از خاستگاه‌های شنبلیله دارای غنای مطلوبی از نظر تنوع ژنتیکی شنبلیله است. نتایج بررسی‌های انجام شده توسط نشانگرهای مولکولی نظیر AFLP و RAPD در سایر گیاهان زراعی و باغی کشور نیز مؤید غنای ژنتیکی ایران است (Zahedi *et al.*, 2007؛ Rahimi *et al.*, 2004؛ Rahaei *et al.*, 2001) که با نتایج حاصل از این تحقیق همسو بوده و لزوم توجه به منابع با ارزش ژنتیکی را در کشور روشن‌تر می‌سازد.

مرادی (Moradi, 2008) نیز در تحقیقات خود روی همین گروه از توده‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد دامنه ضرایب تشابهات ژنتیکی را از ۴۳٪ تا ۹۴٪ و میانگین آن را ۷۵٪ گزارش کردکه تا حدودی با نتایج این تحقیق مطابقت داشته و آن را تایید می‌کند. دلیل اختلاف در اعداد گزارش شده توسط نامبرده با ضریب تشابهات محاسبه شده در تحقیق حاضر را می‌توان به تفاوت در روش مورد استفاده برای تخمین ضرایب تشابه و نیز تعداد ژنوتیپ‌ها مربوط دانست. چون در این مطالعه از داخل هر توده تعداد هشت تک بوته (لاین) انتخاب شده بود (مجموعاً ۱۶۰ ژئوتیپ) در حالی که در تحقیقات نامبرده، وضعیت کلی توده‌ها (۲۰ توده) ارزیابی شده بود.

نتیجه تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضرایب تشابه ژنتیکی و روش UPGMA در شکل ۳ آمده است و نشان می‌دهد که با برش دندروگرام در فاصله ۰/۶۷ لاین‌های حاصل از ۲۰ توده بومی (۱۶۰ لاین مورد مطالعه) را در شش گروه مجزا قرار داد. در این گروه‌بندی برخی توده‌ها و تک بوته‌های حاصل از آن‌ها بسیار شبیه به هم بوده و برخی تفاوت‌های زیادی با یک‌دیگر داشتند (شکل ۳) .

با توجه به روش به کار رفته در این مطالعه از یک سو می‌توان به تفاوت‌ها و شباهت‌های توده‌های شنبلیله بومی با یک دیگر پی‌برد و از سوی دیگر می‌توان تا حدودی به میزان وجود تنوع در داخل هر توده نیز پی‌برد به عبارتی دیگر تنوع بین توده‌ای و درون توده‌ای (Diversity within and among landraces) را مورد بررسی قرار داد. در گروه اول(شکل ۳) لاین‌هایی از توده‌های بومی کاشان، قائنات، یزد، سمنان، بروجرد و اردستان قرار گرفت.گروه دوم با دو عضو شامل لاین‌هایی از توده بومی سمنان و خراسان بوده و در گروه سوم که شامل پنج عضو بود، لاین‌هایی از توده بومی خراسان، بروجرد و اهوازحضورداشت. گروه چهارم در این دسته‌بندی، حاوی هشت عضو بوده و سه لاین از توده بومی یزد، یک لاین از توده بومی قائنات، یک لاین از توده

www.SID.ir



شکل ۳ - دندروگرام ۱۶۰ لاین مستخرج از بیست تودهٔ شنبلیلهٔ بومی ایران بر اساس اطلاعات حاصل از AFLP

Fig. 3. Dendrogram of 160 lines extracted from 20 Iranian fenugreek landraces based on AFLP markers

بومی بروجرد، دو لاین از توده بومی اصفهان و در نهایت یک لاین از توده بومی اردستان را در خود جای داد. در این گروه‌بندی، گروه پنجم با ۹۷ عضو، بزرگ‌ترین گروه را به خود اختصاص داده و در آن لاین‌هایی از توده‌های مختلف قرار داشتند. در نهایت، گروه ششم حاصل از دسته‌بندی شامل ۴۲ عضو متعلق به توده‌های مختلف بود. در این گروه نیز لاین‌هایی از توده‌های شنبلیله بومی یاسوج۱ (توده شماره ۱۹)، یاسوج ۲ (توده شماره ۲۰)، نیشابور (توده شماره ۱۸)، کرمانشاه (توده شماره ۱۷)، کرمان (توده شماره ۱۶) و اردستان (توده شماره ۱) حضور داشتند و می‌توان دریافت که همانند سایر گروه‌ها، این گروه نیز از نظر منشاء جغرافیایی اعضای آن، گروه همگنی نبوده و لاین‌هایی از مناطق مختلف جغرافیایی کشور در آن حضور داشتند.

یکی از کاربردهای تکنیک AFLP در به‌نژادی گیاهان بررسی میزان خلوص در ژنوتیپ‌های گیاهی است (Ganguli, 2009؛ Geetha *et al*., 2008). چون توده‌های شنبلیله مورد استفاده در این بررسی هیچ گونه سابقه اصلاحی مدونی نداشته و عملیات خالص سازی روی آن‌ها انجام نشده بود بنابرین به نظر می‌رسید، در درون توده‌ها نیز تنوع موجود باشد. با توجه به این نکته و به

www.SID.ir

منظور ارزیابی میزان خلوص در درون توده‌های بومی، بررسی نتایج اطلاعات به دست آمده از کاربرد نشانگرهای AFLP (درصد و محتوای اطلاعات چند شکلی: PIC) نشان داد که در جمعیت مورد مطالعه، میزان PIC بین ۰/۷۹ در توده کاشان (خالص‌ترین توده) تا ۰/۹۳ در توده‌های بروجرد و خراسان (ناخالص‌ترین توده‌ها) متغییر بود (جدول ۴). با توجه به جدول مذکور و شکل ۲ معلوم می‌شود که از نظر میزان خلوص می‌توان توده‌های شنبلیله بومی کشور را در رتبه‌های مختلفی قرار داد.

می‌توان گفت که اساس کار تمامی به نژادگران گیاهان بر تنوع استوار است و بدون تنوع هیچ گونه پیشرفتی در اصلاح محصولات مختلف گیاهی عاید نخواهد شد در این میان، اغلب محققان ضمن تاکید بر اولویت بررسی در توده‌های بومی (Fang *et al*., 2007)، از آن‌ها به عنوان منابع با ارزشی یاد می‌کنند که اغلب دارای ژن‌های مفیدی در زمینه سازگاری و مقابله با تنش‌های زیستی و غیر زیستی محیطی هستند و ماده اولیه پرارزشی در شروع برنامه‌های به‌نژادی محسوب می‌شوند (Brush, 1999). از این دیدگاه معلوم می‌شود که تنوع ژنتیکی مطلوبی در توده‌های شنبلیله بومی کشور موجود است که نیاز به بررسی، کشف و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی دارد.

با توجه به نتایج حاصل از بررسی میزان خلوص و تنوع در درون توده‌های شنبلیله بومی مناطق کشور می‌توان اظهار داشت که، هرگاه هدف از برنامه‌های به‌نژادی گیاه شنبلیله در کشور معرفی لاین یا رقم‌های خالص باشد می‌توان از توده‌های بومی کاشان و یاسوج ۱ بهره‌برداری کرد. از طرف دیگر و به دلیل وجود تنوع درون توده‌ای نسبتاً بیشتر در توده‌های بومی بروجرد، خراسان و کرمان و همچنین تنوع مطلوب در توده‌های بومی اردستان، برازجان و سمنان، می‌توان با انجام برنامه‌های انتخاب تک بوته و روش‌های اصلاحی متداول مربوط به آن (انجام آزمایش‌های مقایسه عملکرد و غیره) از قابلیت‌های نهفته در توده‌های مذکور (تنوع ژنتیکی) بهره‌برداری نموده و رقم‌های مختلفی از نظر زمینه‌های ژنتیکی از درون آن ها شناسایی و معرفی کرد.

در جدول ۵ نتایج حاصل از تجزیه داده‌های مولکولی (AMOVA) آمده است و نشان می‌دهد که تفاوت‌های بین توده‌ها از نظر آماری معنی دار (در سطح احتمال ۱٪) بوده ولی تنوع بیشتری در درون توده‌ها وجود داشت. در این جدول واریانس محاسبه شده درون توده‌ها معادل ۷۵٪ از واریانس کل است در حالی که واریانس بین توده‌ها ۲۵٪ از واریانس کل را شامل می‌شد. این امر نشان از تنوع مطلوب در درون توده‌های مورد بررسی بوده و بر غنای ژرم‌پلاسم توده‌های بومی کشور دلالت دارد.

در شکل ۴ نتایج تجزیه کلاستر داده‌های مولکولی در بیست توده بومی شنبلیله کشور آمده است و نشان می‌دهد که بر اساس این اطلاعات می‌توان توده‌ها را در گروه‌های

www.SID.ir

جدول ۴- تعداد مکان‌های چندشکل، درصد نوارهای چند شکل و محتوای اطلاعاتی چند شکل در ۱۶۰ لاین (۸ تک بوته از ۲۰ توده) شنبلیله بومی ایران بر اساس ۱۴۷ نوار به دست آمده از روش AFLP

Table 4. Number of polymorphic sites, percentage of polymorphic detected markers and polymorphism information content (PIC) for 160 lines (8 individuals from each 20 landrace) of Iranian fenugreek determined by 147 AFLP markers

شماره No.	نام توده Landrace name	تعداد مکان‌های چندشکل Number of polymorphic sites	درصد نوارهای چند شکل Percentage of polymorphic detected markers	محتوای اطلاعات چند شکلی PIC score
1	Ardestan	87	60.84	0.90
2	Isfahan	78	54.55	0.87
3	Ahvaz	76	53.15	0.87
4	Borazjan	87	60.84	0.90
5	Broojerd	99	69.23	0.93
6	Khash	74	51.75	0.86
7	Khorasan	98	68.53	0.93
8	Khoramabad	71	49.65	0.84
9	Rey	80	55.94	0.87
10	Zanjan	73	51.05	0.85
11	Semnan	88	61.54	0.90
12	Shiraz	70	48.95	0.84
13	Yazd	74	51.75	0.84
14	Ghaenat	73	51.05	0.84
15	Kashan	65	45.45	0.79
16	Kerman	93	65.03	0.91
17	Kermanshah	81	56.64	0.88
18	Neyshaboor	74	51.75	0.86
19	Yasooj 1	67	46.85	0.82
20	Yasooj 2	67	46.85	0.84

جدول ۵- نتایج تجزیه داده‌های مولکولی(AFLP) در توده های بومی شنبلیله ایران

Table 5. Analysis of molecular variance in Iranian fenugreek landraces based on AFLP markers.

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات MS	واریانس Variance	درصد تغییرات C. V. (%)
Among landraces	بین توده‌ها	19	57**	5	25
Within landraces	درون توده‌ها	140	15**	15	75
Total	کل	159	-	20	100

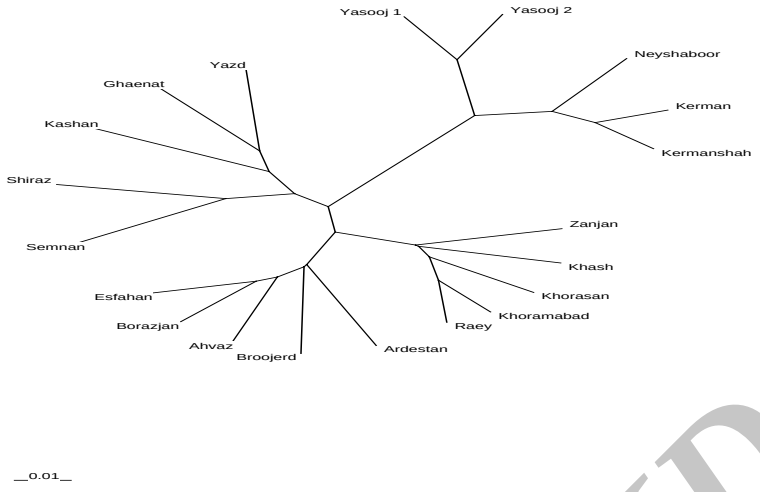
** : Significant at 1% probability level.

** : معنی دار در سطح احتمال ۱٪.

مجزایی قرار داد. با توجه به شکل‌های ۳ و ۴ و نیز جدول ۴ مشاهده می‌شود که توده‌های شنبلیله بومی خاش و زنجان(شماره‌های ۶ و ۱۰) با قرار گرفتن در گروه پنجم شباهت و قرابت نزدیکی، با یک دیگر دارند. مرادی (Moradi, 2008) نیز در مطالعات خود با

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- گروه‌بندی بیست توده بومی شنبلیله بر مبنای اطلاعات حاصل از آنالیز مولکولی (AFLP)
Fig. 4. Grouping of 20 fenugreek landraces according to information of AFLP markers

استفاده از نشانگرهای RAPD میزان قرابت بیشتری بین این دو توده گزارش کرد که با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت داشته و آن را تأیید می‌کند. همچنین نتایج بررسی‌های نامبرده نشان داد که توده‌های شنبلیله بومی کرمان (شماره ۱۶) و قائنات (شماره ۱۴) با قرار گرفتن در یک گروه قرابت نزدیکی با یک دیگر داشتند. ولی نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که، بر اساس اطلاعات حاصل از نشانگرهای AFLP نمی‌توان توده‌های شنبلیله بومی کرمان و قائنات را در یک گروه دسته‌بندی کرد (جدول ۴ و شکل‌های ۳ و۴).

از سوی دیگر مطالعات مرادی (Moradi, 2008) نشان داد که توده شنبلیله بومی برازجان بر اساس اطلاعات حاصل از نشانگر RAPD و همچنین طول کروموزوم‌ها در سلول‌های سوماتیک خود را از سایر توده‌های شنبلیله بومی مناطق مختلف کشور متفاوت بوده و در گروه جداگانه‌ای قرار داشت. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و بر مبنای اطلاعات به دست آمده از نشانگرهای AFLP معلوم می‌شود که توده شنبلیله بومی برازجان در گروهی واقع شده است که سایر اعضای این گروه توده‌های شنبلیله بومی خراسان، اردستان، بروجرد، اهواز و اصفهان هستند و لذا نمی‌توان توده شنبلیله بومی برازجان را در دسته‌ای جداگانه قرار داد (شکل ۴). همچنین شکل ۴ نشان می‌دهد که دو توده بومی انتخابی از یاسوج (۱ و ۲) بر اساس اطلاعات حاصل از نشانگرهای AFLP در یک گروه قرار داشته و از نظر ژنتیکی قرابت بیشتری دارند.

تفاوت‌هایی در نتایج RAPD و AFLP توسط محققان مختلف گزارش شده است (Ferdinandez and Coulman, 2002؛

www.SID.ir

Wachira *et al.*, 2001). این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به مسائل تکنیکی، تعداد زیاد لوکوس در AFLP، پوشش ژنومی نشانگر و اشتباه در امتیازبندی باشد(Rahimi *et al.*, 2004). چون روش مورد استفاده در این بررسی حاصل از نمونه‌برداری تصادفی در داخل هر توده بوده و در آن هشت تک بوته(لاین) از داخل توده مورد مطالعه قرار گرفت لذا به نظر می‌رسد نتایج حاصله قریب به واقعیت بوده و قابل استناد باشد.

مروری بر سابقه معرفی رقم‌های مختلف گیاهی در کشور و جهان نشان می‌دهد که همواره انتخاب از بین توده‌های بومی از روش‌های متداول و مورد استفاده به‌نژادگران گیاهان بوده و از این طریق رقم‌ها و لاین‌های متعددی شناسایی و معرفی شده‌اند. متأسفانه تاکنون برنامه‌های تحقیقاتی جامع و مدون در زمینه به‌نژادی و معرفی رقم‌های خالص و برتر شنبلیله در کشور اجرا نشده و به نظر می‌رسد با توجه به غنای ژرم‌پلاسم شنبلیله بومی کشور از نظر تنوع ژنتیکی، توجه و استفاده از توده‌های بومی آن در برنامه‌های به‌نژادی از اولویت برخوردار باشد.

جمع‌بندی نتایج ضمن اثبات کارآیی نشانگرهای AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه شنبلیله، حاکی از کارآیی مناسب پنج ترکیب آغازگر شامل P(AGG)–M(CAT)، P(ACG)–M(CTC)، P(GGG) – M(CAG)، P(AAG) – M(CTA) و P(AGG) – M(CAG) بود و بنابرین استفاده از آن‌ها در مطالعات مربوط به بررسی تنوع ژنتیکی شنبلیله قابل توصیه است.

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که در بین توده‌های شنبلیله بومی کشور تنوع ژنتیکی مطلوبی موجود بوده و این تنوع در درون هر توده نیز قابل ارزیابی و مشاهده است. شدت و ضعف میزان تنوع در درون توده‌های شنبلیله بومی مورد مطالعه در این بررسی متفاوت بوده و بنابرین در برخی از آن‌ها، مستقیماً و با کمترین کارهای اصلاحی می‌توان به رقم‌های خالص دست یافت و در توده‌هایی با تنوع درون توده‌ای بیشتر، با به کارگیری روش‌هایی از قبیل انتخاب تک بوته و کشت بر روی ردیف‌های جداگانه (Pure line selection) ضمن انتخاب لاین‌های برتر، نسبت به خالص سازی آن‌ها اقدام کرد.

سپاسگزاری

از آقای دکتر عبدالعلی غفاری رئیس موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور به خاطر مساعدت جهت اعزام نگارنده اول و اجرای این پژوهش در سوریه تشکر می‌شود. از آقای دکتر پژمان مرادی به دلیل در اختیار گذاشتن ژرم‌پلاسم و همچنین کلیه افراد شاغل در بخش Genetic Resource Unit مرکز بین‌المللی ICARDA، خصوصاً خانم مهندس فیدا علوء و آقای محمود الشیخ الجنید به خاطر همکاری صمیمانه در اجرای این مطالعه، قدردانی می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

References

Acharya, S. N., Srichamroen, A., Basu, S. K., Ooraikul, B., and Basu, T. 2006. Improvement in the nutraceutical properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). Songkanakarin Journal of Science and Technology 28(1): 1-9.

Acharya, S. N., Thomas, J. E., and Basu, S. K. 2008. Fenugreek, an alternative crop for semiarid regions of North America. Crop Science 48: 841-853.

Botanga, C. J., Kling, J. C., Berner, D., and Timko, M. P. 2002. Genetic variability of Striga *asiatica* based on AFLP analysis and host-parasite interaction. Euphytica 128: 375-388.

Brush, S. B. 1995. *In situ* conservation of landraces in center of crop diversity. Crop Science 35: 346-354.

Dangi, R. S., Lagu, M. D., Choudhary, L. B., Ranjekar, P. K., and Gupta, V. S. 2004. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. BMC Plant Biology 4(13): 1-11.

Fang, J., Chen, J., Henny, R. J., and Chao, C. C. T. 2007. Genetic relatedness of ornamental Ficus species and cultivars analyzed by amplified fragment length polymorphism markers. Journal of the American Society for Hoticultural Science 132(6): 807-815.

Ferdinandez, Y., and Coulman, B. 2002. Evaluating genetic variation and relationships among two bromograss species and their hybrid using RAPD and AFLP markers. Eyphytica 125: 281-291.

Ganguli, A. 2009. Applied Biotechnology and Plant Genetics. Oxford Book Company, India.

Geetha, S., Jebaraj, S., and Pandiyarajan, P. 2008. Agricultural Biotechnology. Agrobios Publications, New Delhi, India.

Jakse, J., Martin, W., Callum, J. Mc., and Havey, M. J. 2005. Single nucleotide polymorphisms, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. Journal of the American Society for Horticultural Science 130(6): 912-917.

Archive of SID

www.SID.ir

Karakousis, A., Gustafson, J. P., Chalmers, K. J., Barr,. A. R., and Langridge, P. 2003. A consensus map of barley integrating SSR,RFLP and AFLP markers. Australian Journal of Agricultural Research 54: 1173-1185.

Marzougui, N., Ferchichi, A., Guasmi, F., and Beji, M. 2007. Morphological and chemical diversity among 38 Tunisian cultivars of *Trigonella foenum-graecum* L. Journal of Food, Agriculture and Environment 5(3&4): 248-253.

Montgomery, J. E., King, J. R., and Doepol, L. 2007. Potential of fenugreek as a forage for dairy cattle. Farm Technology Proceedings 162: 1-15.

Moradi, P. 2008. Study on genetic diversity of Iranian fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) landraces. PhD. Thesis, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (in Persian).

Murray, M. G., and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325

Naghavi, M. R., Gharehyazi, B., and Hoseini Salekdeh, G. 2002. Molecular Markers. Tehran University Publications, Tehran, Iran. 334 pp. (in Persian).

Najafpoor Navaei, M. D. 1994. Some information about fenugreek. Forests and Pangelands Research Institute Publications, No. 127: 18 (in Persian).

Neumann, P., Mouzova, M., and Macas, J. 2001. Molecular and cytogenetic analysis of repetitive DNA in pea (*Pisum sativum*). Genome 44: 716-728.

Omidbaighi, R. 2000. Approaches to Production and Processing of Medicinal Plants. Astan-e- Qods Razavi Publications, Vol. 3, Mashhad, Iran (in Persian).

Petropoulos, G. A. 2002. The Genus Trigonella. pp: 1-17. In: Petropoulos, G. A. (ed.). Fenugreek, (1st ed.). Taylor and Francis, London and New York.

Rahaei, M., Seyed Tabatabaei, B. E., and Shah nejat boushehri, A. A. 2001. Evaluation of different wheat cultivars genetic diversity using AFLP markers. Iranian Journal of Agricultural Science 32(1): 607-614 (in Persian).

Rahimi,T., Seyed Tabatabaei, B. E., Sharif, B., and Ghobadi, S. 2004. Genetic relationships of some Iranian pomegranate (*Punicum granatum*) cultivars using AFLP marker. Iranian Journal of Agricultural Science 26(6): 1373-1379 (in Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

Saker, M. M., Youssef, S. S., Abdallah, N. A., Bashandy, H. S., and El Sharkawy, A. M. 2005. Genetic analysis of some Egyptian rice genotypes using RAPD, SSR and AFLP. African Journal of Biotechnology 4(9): 882-890.

Sneath, P., and Sokal, R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman and Company, San Francisco, USA.

Solimani, V. D., Baum, B. R., and Johanson, D. A. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat (*T. turgidum*). Theoretical and Applied Genetics 104: 350-357.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vander Hornes, M. L. T., Frijers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.

Wachira, F., Tanaka J., and Tanaka, Y. 2001. Genetic variation and differentiation in tea (*Camellia sinensis*) germplasm revealed by RAPD and AFLP variation. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 76: 557-563.

Wang, K., Xu, C., and Liu, B. 1999. Clustering transactions using large items. CIKM. Pp. 483-490.

Zahedi, B., Kashi, A. K., Zamani, Z. A., and Mesbahi, A. 2007. Genetic diversity of some Iranian garlic(*Allium sativum* L.) landraces using RAPD markers. Iranian Journal of Agricultural Sciences 39(2): 245-256 (in Persian).

Archive of SID

www.SID.ir