



بررسی تنوع ژنتیکی حاصل از دو جهش‌زای فیزیکی (پرتو گاما، باریکه‌ی الکترونی) با استفاده از نشان‌گرهای دی‌ان‌ا چندریختی تصادفی تقویت شده در گیاه گندم نان رقم طبسی

فریبا ضرابی اهرابی^{۱*}، احمد مجد^۱، عباس مجدآبادی^۲، طاهر نژاد ستاری^۱

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵، تهران - ایران

۲. پژوهشکده‌ی کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، صندوق پستی: ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران - ایران

چکیده: تنوع ژنتیکی حاصل از دو جهش‌زای فیزیکی متفاوت (پرتو گاما، باریکه‌ی الکترونی) در دزهای مختلف (۵۰ تا ۴۰۰ Gy) و دو رطوبت متفاوت (۶/۵ و ۱۲/۵٪) در دانه‌های گندم نان رقم طبسی با استفاده از نشان‌گرهای دی‌ان‌ا چندریختی تصادفی تقویت شده مورد بررسی قرار گرفت. بیش‌ترین میانگین ناجور تخم‌زایی در جمعیت ۲ (با مقدار ۰/۱۵۵) و کم‌ترین مقدار آن در جمعیت ۵ (با مقدار ۰/۰۴۲) مشاهده شد. براساس نتیجه‌های به دست آمده، بیش‌ترین فاصله‌ی ژنتیکی یا کم‌ترین تشابه ژنتیکی، بین جمعیت M۱TE (ردیف‌های جهش‌یابنده‌ی نسل ۱ رقم طبسی که با الکترون جهش یافته بودند) و جمعیت M۲TE (ردیف‌های جهش‌یابنده‌ی نسل ۲ رقم طبسی که با الکترون جهش یافته بودند) مشاهده شد. کم‌ترین فاصله‌ی ژنتیکی یا بیش‌ترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت M۲TG (جمعیت ردیف‌های جهش‌یابنده‌ی نسل ۲ رقم طبسی که با پرتو گاما جهش یافته بودند) و جمعیت M۲TE (جمعیت ردیف‌های جهش‌یابنده‌ی نسل ۲ رقم طبسی که با الکترون جهش یافته بودند) مشاهده شد. تجزیه‌ی خوشه‌ای پنج جمعیت ردیف‌های جهش یافته و شاهد‌های رقم طبسی براساس مقدار تشابه ژنتیکی و با استفاده از روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی انجام و نمودار درختی با برش نمودار از نقطه تشابه ۰/۸۹ دو گروه حاصل شد. براساس نتایج به دست آمده، تنوع بین جمعیت‌ها معنی‌دار و بیش‌تر از تنوع درون جمعیت‌ها بود.

کلیدواژه‌ها: دی‌ان‌ا چندریختی تصادفی تقویت شده، پرتو گاما، باریکه‌ی الکترونی، گندم نان، رقم طبسی

Investigating the genetic diversity arising from two physical mutagens (gamma ray, electron beam) using random amplified polymorphic DNA markers in the (*Triticum aestivum* L.) plant, Tabasi cultivar

F. Zarrabi Ahrabi^{1*}, A. Majd¹, A. Majdabadi², T. Nejad Sattari¹

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.Box: 14515-775, Tehran - Iran

2. Radiation Applications Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box: 11365-3486, Tehran - Iran

Abstract: This article aims at investigating the genetic diversity arising from two physical mutagens (gamma ray, electron beam) with different doses (50-400 Gy) and two different levels of humidity (6.5% and 12.5%) in the (*Triticum aestivum* L.) plant in Tabasi cultivar, using RAPD markers. The maximum and minimum average rates of heterozygosity were obtained in the second and the fifth populations (0.155 and 0.042), respectively. Based on the obtained results, the highest genetic distance or the lowest genetic similarity was observed between M1TE population (the first generation mutant lines mutated by electron) and M2TE population (the second generation mutant lines mutated by electron). The lowest genetic distance or the highest genetic similarity was found between M2TG (the second generation mutant lines of mutated by gamma ray) and M2TE (the second generation mutant lines mutated by electron) populations. Five mutant lines and Tabasi species witnesses were investigated based on common genetic values using UPGMA cluster analysis. Cutting the obtained dendrogram from the similar point (0.89), two groups were achieved. Based on the obtained results the inter-population diversity was more significant than the intra-population diversity.

Keywords: RAPD, Gamma ray, Electron beam, *Triticum aestivum*, Tabasi cultivar

*email: fa_zarrabiahrahi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۵/۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۲/۶



۱. مقدمه

پروتیین‌ها از طریق تغییر صورت‌بندی، اکسایش اسیدهای آمینه، شکست پیوندهای کووالانسی و تشکیل رادیکال‌های آزاد تأثیر می‌گذارد [۱۲]. زو هونگ و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهشی نشان دادند که باریکه‌ی الکترونی با تپ انرژی بالا نقش بسیار کمی در تخریب مستقیم غشا سلولی دارد، علاوه بر این مشخص شد که دُزهای پایین باریکه‌ی الکترونی سبب بهبود فعالیت آنزیم سلولز به ویژه در محیط آبی می‌شود اگرچه دُزهای بالا به کاهش فعالیت آنزیم می‌انجامد [۱۳]. آلبرتی و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ی کاهش تبلور سلولز در دُزهای بالای ۱۰۰ kGy باریکه الکترونی را گزارش کردند، آن‌ها مشاهده کردند که شاخص تبلور ریزبلورین سلولز در کتان و پنبه در دُز ۲۰۰ kGy باریکه‌ی الکترونی تا ۱۲٪ کاهش می‌یابد [۱۴]. اگر چنان که تنوع ژنتیکی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی تخمین زده شود، اشکال کار این خواهد بود که اولاً چنین ویژگی‌هایی از نظر تعداد محدود بوده و دیگر این که به شدت تحت تأثیر محیط‌اند، در صورتی که نشان‌گرهای مولکولی ابزار بسیار مفیدی برای مشخص کردن تنوع ژنتیکی‌اند چون تحت تأثیر محیط قرار نمی‌گیرند و دیگر این که نیاز به اطلاعات پیشین دودمانه ندارند.

نشان‌گرهای مولکولی به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند:

- نشان‌گرهای پروتیینی: این نوع نشان‌گرها چندریختی^(۱) در سطح پروتیین را نشان می‌دهند ولی به شدت تحت تأثیر عامل‌های محیطی هستند [۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸].
 - نشان‌گرهای دی‌ان‌ا: این نوع نشان‌گرها چندریختی در سطح دی‌ان‌ا را نشان می‌دهند.
- مزیت اصلی نشان‌گرهای مبتنی بر دی‌ان‌ا این است که اطلاعاتی در مورد هر نوع توالی در ژنوم، نه تنها از ایزوآنزیم‌ها یا پروتیین‌های غیر آنزیمی مانند پروتیین ذخیره‌سازی، بلکه هم‌چنین از توالی بیان شده فراهم می‌کند [۴، ۱۵، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲]. توسعه‌ی روش‌های جدید برای انجام تجزیه با استفاده از نشان‌گر مولکولی، هدف بسیاری از مطالعه‌های اخیر بوده است و بسیاری از این‌ها براساس واکنش زنجیری پلیمرز^(۳) و دی‌ان‌ا ژنومی بوده است [۲۳].

گندم نان^(۱) یکی از قدیمی‌ترین و مهم‌ترین غلات جهان است و نقش راهبردی برای اکثریت جمعیت جهان دارد. گندم نان مهم‌ترین غذای اصلی حدود دو میلیارد نفر یعنی، ۳۶٪ جمعیت جهان است [۱]. گندم نان ($2n=6x=42$)، یک گونه‌ی اتوگاموس هگزاپلوئید (AABBDD)، ترکیبی از ژنوم‌های سه گونه‌ی قدیمی دی‌پلوئید است [۲، ۳، ۴]. گندم امروزه در سراسر جهان با نوع‌های مختلف کشت شده و با توجه به شرایط مختلف آب و هوایی و خاکی رشد می‌کند. با توجه به این که ژنوتیپ‌های مختلف گندم در معرض تهدید فشارهای زیستی و غیرزیستی هستند، لذا تولید گندم را می‌توان، از طریق توسعه‌ی کشت بهینه با پایه‌ی ژنتیکی وسیع‌تر، که بتواند تحت شرایط آب و هوایی مختلف محصول بهتری ایجاد نماید، افزایش داد [۵].

استفاده‌ی مستقیم از جهش، به ویژه زمانی که هدف اصلاح یک یا دو صفت قابل شناسایی در گونه‌ی زراعی باشد، مکمل ارزشمندی، در اصلاح گیاهان است. مزیت اصلی این روش آن است که گونه‌ی مادری معمولاً تغییر کمی پیدا می‌کند ضمن آن که صفت یا صفت‌های مطلوب اضافه می‌شود [۶].

عکس‌العمل سلول‌های گیاهان به جهش‌زاهای فیزیکی و شیمیایی به گونه‌ای است که می‌توانند میزان مؤثر بودن جهش (تعداد جهش به ازای هر واحد دُز) و کارآیی جهش (نسبت جهش‌های مؤثر به صدمه‌ها یا ناهنجاری‌ها مانند ناهنجاری کروموزومی) را تغییر دهند [۷، ۸]. جهش‌زاهای فیزیکی شامل پرتوهای یوننده مانند پرتو ایکس، پرتو گاما، ذره‌های بتا و ... هستند [۶]. پرتوهای یوننده با ورود به داخل بافت و سلول با اتم‌ها و مولکول‌های مختلف واکنش داده و رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند. این رادیکال‌ها قادرند به اجزای مهم درون سلول آسیب وارد کرده و یا آن‌ها را تغییر دهند [۹]. ماشیو و همکاران (۱۹۹۵) شاهد کاهش قابل توجهی در عملکرد دانه‌ی گندم در دُزهای بالاتر از ۰/۱۰ kGy پرتو گاما بودند؛ با این حال، دُزهای پایین‌تر از ۰/۲۵ و ۰/۰۱ kGy پرتو گاما در افزایش عملکرد مؤثر بوده است [۱۰]. هو (۱۹۹۴) طی پژوهش‌های گسترده‌ای نشان داد که درشت-مولکول‌های مغذی (کربوهیدرات‌ها، پروتیین‌ها) در برابر دُز ۱۰ kGy پرتو گاما نسبتاً مقاوم‌اند [۱۱]. با این حال لی و همکاران (۲۰۰۵)، گزارش کردند که پرتو گاما بر روی



بین رقم‌های دارای تنوع بیش‌تر، هم به تولید و ایجاد ردیف‌های جدید و هم به جلوگیری از فرسایش ژنتیکی^(۸) کمک نمود [۳۰].

۲. مواد و روش‌ها

بذرهای رقم طبسی گندم نان، از پژوهشکده‌ی کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج تهیه شد. در این پژوهش برای بررسی اثر رطوبت‌های مختلف و دُزهای مختلف دو جهش‌زای فیزیکی (پرتو گاما و باریکه‌ی الکترونی) در ایجاد تغییرهای ژنتیکی، ابتدا مقداری از بذرهای گندم رقم طبسی با مقداری آب مقطر (تقریباً ۱۰٪ وزن دانه‌ها) مخلوط و رطوبت آن‌ها به مقداری بین ۶/۵- و ۷٪- تا ۱۲/۵- تا ۱۴٪ رسانده شد.

بذرهایی که رطوبت‌شان در محدوده‌ی ۳/۵ تا ۴٪ و بدون پرتو دهی بود به عنوان نمونه‌های شاهد در نظر گرفته شد. بخش اول بذرهای گندم نان رقم طبسی بعد از رسیدن به رطوبت مناسب، در آزمایشگاه پرتو دهی گاما پژوهشکده‌ی کشاورزی، پزشکی و صنعتی با پرتو گامای چشمه‌ی ^{60}Co در دُزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری مورد پرتو دهی قرار گرفت. بخش دوم این بذرها در مرکز پرتو فرایند یزد با دُزهای مختلف ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری باریکه‌ی الکترونی پرتو دهی شد. بعد از پرتو دهی، دانه‌ها در بلوک خاکی در شرایط گلخانه‌ای بر روی ردیف‌هایی با فاصله‌ی تقریباً ۲۰ سانتی‌متر کشت شدند. آبیاری گیاهان گلخانه‌ای به صورت هفته‌ای و برحسب نیاز گیاه انجام شد.

۱.۲ استخراج دی ان ا

استخراج دی ان ا از برگ‌های تازه‌ی گیاهک‌های ۱۵ روزه که پس از برداشت به فریزر ۷۰- منتقل شده بودند، با استفاده از پروتکل استخراج دی ان ا (که در روش DArT به کار می‌رود) انجام شد [۳۹]. برای بررسی کیفی و کمی دی ان ا استخراج شده، به ترتیب، از الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸٪ دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۳۰ و ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد.

اولین و شاید بتوان گفت مهم‌ترین و بهترین سیستمی که در آن مولکول هدف افزایش می‌یابد، روش واکنش زنجیری پلیمرز است [۲۴، ۲۵، ۲۶].

روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیری پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختیاری، شامل سه راهکار دی ان ا چندریختی تصادفی تقویت شده^(۴)، واکنش زنجیری پلی‌مرز با آغازگر اختیاری^(۵)، انگشت‌نگاری دی ان ا^(۶) است [۱۵]. راهکار دی ان ا چندریختی تصادفی تقویت شده برای اولین بار توسط ویلیام [۲۷] و سپس توسط ولش و مک‌لند [۲۸، ۲۹] در سال ۱۹۹۰ برای انگشت‌نگاری دی ان ا معرفی شد. نشان‌گرهای مولکولی دی ان ا چندریختی تصادفی تقویت شده کاربرد فراوانی، از جمله برای توصیف ژرم پلاسما، بررسی سازمان ژنوم، بررسی تنوع ژنتیکی، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، تهیه‌ی نقشه‌های ژنتیکی، بررسی جای گاه‌های ژنی کنترل‌کننده‌ی صفت‌های کمی^(۷)، دارند [۳۰]. بوزاری (۲۰۱۲) برای تشخیص اثر ژنوتوکسیک یک نوع علف‌کش تری‌فلدرالین روی گیاه ذرت [۳۱]، پال‌پیو (۲۰۰۶) برای بررسی تنوع ژنتیکی در تعدادی از ردیف‌ها و هیبریدهای ذرت [۳۲]، فردریک نگزاهو (۲۰۰۷) برای بررسی تنوع سوماکلونال در توالی نوکلئوتیدی گیاه برنج (*Oryza sativa*) [۳۳]، محمد آصیف (۲۰۰۶) برای تجزیه‌ی ژنتیکی شش دورگه‌ی گیاه ذرت (*Zea mays*) و ۹ ژنوتیپ مختلف گندم نان [۳۴، ۵]، فرناندا برِد (۲۰۰۲) برای بررسی تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما گندم نان [۳۵]، پاک‌نیت (۲۰۰۷) برای جستجوی تنوع ژنتیکی و نشان‌گرهای مرتبط با تحمل خشکی در ۲۰ گونه‌ی گندم نان (*Triticum aestivum* L.) [۳۶]، نعمت‌زاده (۲۰۰۴) برای تعیین ژن‌های کنترل‌کننده‌ی عطر و طعم در برنج نسل دوم و سوم [۳۷] و نقوی (۲۰۰۹) برای تعیین ارتباط ژنتیکی بین ۳۶ جمعیت گندم دیپلوئید وحشی (*Triticum boeoticum*) [۳۸]، از نشان‌گرهای دی ان ا چندریختی تصادفی تقویت شده استفاده نمودند.

بنابراین با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جمعیت، حدود انتخاب چه طبیعی و چه مصنوعی وسیع‌تر می‌شود. لذا شناخت تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های اصلاح‌شده‌ی فعلی گیاهان زراعی بسیار ضروری است تا بتوان از طریق هدایت دورگه‌گیری



جدول ۱. نام و توالی آغازگرها

ردیف	آغازگرها	توالی (۵'→۳')
۱	OPA-۹	GGGTAACGCC
۲	OPA-۱۰	GTGATCGCAG
۳	OPA-۱۲	TCGGCGATAG
۴	OPA-۱۳	CAGCACCCAC
۵	OPA-۱۴	TCTGTGCTGG
۶	OPA-۱۸	AGGTGACCGT
۷	OPA-۱۹	CAAACGTCGG
۸	OPA-۲۰	GTTGCGATCC
۹	OPB-۰۵	TGCGCCCTTC
۱۰	OPB-۰۶	TGCTCTGCC
۱۱	OPB-۰۸	GTCCACACGG
۱۲	OPB-۱۱	GTAGACCCGT
۱۳	OPC-۰۲	GTGAGGCGTC
۱۴	OPC-۱۵	GACGGATCAG
۱۵	OPC-۱۶	CACACTCCAG
۱۶	OPC-۱۹	GTTGCCAGCC
۱۷	OPD-۴	TCTGGTGAGG
۱۸	OPD-۱۱	AGCGCCATTG
۱۹	OPF-۱	ACGGATCCTG
۲۰	OPF-۱۴	TGCTGCAGGT
۲۱	OPG-۴	AGCGTGTCTG
۲۲	OPG-۶	GTGCCTAACC
۲۳	OPR-۲	CACAGCTGCC
۲۴	OPR-۳	ACACAGAGGG
۲۵	OPUBC۳۰	CCGGCCTTAG
۲۶	OPUBC۷۵	GAGGTCCCAA
۲۷	OPUBC۷۸	GAGCACTAGC
۲۸	۷۱AB۱۰G۱۱	AGCGCCATTG
۲۹	۷۲AB۱۰G۱۲	AGGGCGTAAG
۳۰	۷۳AB۱۰T۱۳	CTGGGGACTT

جدول ۲. مرحله‌های واکنش زنجیری پلیمرز و آزمایش دی ان ا چندریختی

تصادفی تقویت شده		زمان	دما (°C)	مرحله
تعداد دور	تعداد دور			
۱	۳ دقیقه	۹۴	واسرشت‌سازی ^(۱۲) اولیه	
۳۵	۳۰ ثانیه	۹۴	واسرشت‌سازی ^(۱۳) اتصال	
۱	۳۰ ثانیه	۷۲	بسط	
۱	۷ ثانیه	۷۲	بسط نهایی	

۲.۲. آزمایش دی ان ا چندریختی تصادفی تقویت شده و واکنش

زنجیری پلیمرز

۱.۲.۲ اجزای مورد نیاز

آغازگرها

در این پژوهش از ۳۰ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی مخصوص واکنش دی ان ا چندریختی تصادفی تقویت شده استفاده شد. کلیه‌ی آغازگرهای مورد استفاده از شرکت اپرون تکنولوژی^(۹) تهیه شدند. محلول‌های آغازگرها با رقت ۱۰ μM تهیه و برای انجام واکنش زنجیری پلیمرز استفاده شدند. نام و توالی این آغازگرها در جدول ۱ ذکر شده است.

تهیه‌ی مخلوط اصلی و تنظیم مرحله‌های واکنش زنجیری پلیمرز

از ۱۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش زنجیری پلیمرز (۱۰x)، ۲ میکرولیتر (۱۰mM) MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰mM) dNTP، ۱ میکرولیتر آغازگر (۱۰mM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم و ۱ میکرولیتر دی ان ا به عنوان اجزای واکنش زنجیری پلیمرز استفاده شد.

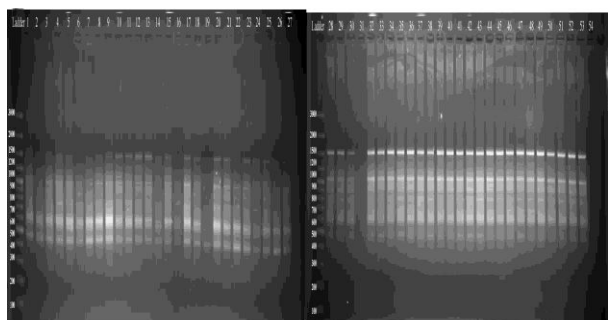
مرحله‌های مختلف واکنش زنجیری پلیمرز (جدول ۲)، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Mastercycler gradient (Corbet) به انجام رسید.

۲.۲.۲ الکتروفورز محصول‌های واکنش زنجیری پلیمرز

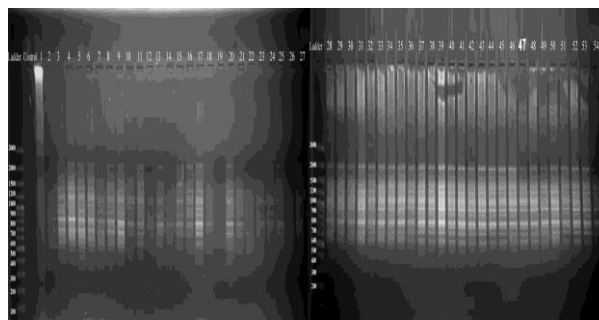
محصول‌های واکنش زنجیری پلیمرز به طور جداگانه روی ژل آگارز ۱٪ تهیه شده با بافر (1X) TBE و ولتاژ ۱۰۰ ولت مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در این پژوهش از دستگاه نشان‌گذار وزن مولکولی (مدل DNA ladder Plus ۱۰۰ bp) ساخت شرکت فرمانتاس^(۱۰) استفاده شد (شکل ۱).

۳.۲ تحلیل آماری

داده‌های دی ان ا چندریختی تصادفی تقویت شده به دو صورت - حضور نوارها با کد یک و عدم حضور نوارها با کد صفر - مشخص شده‌اند. به منظور مطالعه و بررسی تنوع مولکولی و تعیین گروه‌های ناهنجار آرا^(۱۱) در رقم طبسی گندم نان، تعداد ۲۸ نمونه، شامل نمونه‌های شاهد و ردیف‌های جهش‌یابنده‌ی نسل‌های M۱ و M۲ (جدول ۳) به کمک ۳۰ آغازگر دی ان ا چندریختی تصادفی تقویت شده (جدول ۱) که صرفاً ۲۲ آغازگر حالت چندریختی را ارایه دادند، مورد ارزیابی قرار گرفتند.



(ب)



(الف)

شکل ۱. نوارهای تکثیر شده توسط آغازگر؛ (الف) OPA-۲۰ و (ب) OPA-۱۳.

جدول ۳. مشخصه‌های ژنوتیپ‌های جهش یافته به همراه کد اختصاری و شماره‌ی آن‌ها، بر روی ژل الکتروفورز

شماره‌ی ژنوتیپ	علامت اختصاری	مشخصه‌های ژنوتیپ
۱	TC۱	رقم شاهد طبیعی شماره‌ی ۱
۲	M۱TH۶G۵۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۵۰ گری پرتو گاما
۳	M۱TH۶G۱۰۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۱۰۰ گری پرتو گاما
۴	M۱TH۶G۲۰۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۲۰۰ گری پرتو گاما
۵	M۱TH۶G۳۰۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۳۰۰ گری پرتو گاما
۶	M۱TH۶G۴۰۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۴۰۰ گری پرتو گاما
۷	M۱TH۱۲G۵۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۱۲/۵٪- جهش با دُز ۵۰ گری پرتو گاما
۸	M۱TH۱۲G۱۰۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۱۲/۵٪- جهش با دُز ۱۰۰ گری پرتو گاما
۹	M۱TH۱۲G۲۰۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۱۲/۵٪- جهش با دُز ۲۰۰ گری پرتو گاما
۱۹	TC۲	رقم شاهد طبیعی شماره‌ی ۲
۲۰	M۱TH۶E۱۰۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۱۰۰ گری باریکه‌ی الکترونی
۲۱	M۱TH۶E۲۰۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۲۰۰ گری باریکه‌ی الکترونی
۲۲	M۱TH۱۲E۱۰۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۱۲/۵٪- جهش با دُز ۱۰۰ گری باریکه‌ی الکترونی
۲۳	M۱TH۱۲E۲۰۰	نسل ۱- رقم طبیعی- رطوبت ۱۲/۵٪- جهش با دُز ۲۰۰ گری باریکه‌ی الکترونی
۲۸	TC۳	رقم شاهد طبیعی شماره‌ی ۳
۲۹	M۲TH۶G۵۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۵۰ گری پرتو گاما
۳۰	M۲TH۶G۱۰۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۱۰۰ گری پرتو گاما
۳۱	M۲TH۶G۲۰۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۲۰۰ گری پرتو گاما
۳۲	M۲TH۶G۳۰۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۳۰۰ گری پرتو گاما
۳۳	M۲TH۶G۴۰۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۴۰۰ گری پرتو گاما
۳۴	M۲TH۱۲G۵۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۱۲/۵٪- جهش با دُز ۵۰ گری پرتو گاما
۳۵	M۲TH۱۲G۱۰۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۱۲/۵٪- جهش با دُز ۱۰۰ گری پرتو گاما
۳۶	M۲TH۱۲G۲۰۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۱۲/۵٪- جهش با دُز ۲۰۰ گری پرتو گاما
۴۶	TC۴	رقم شاهد طبیعی شماره‌ی ۴
۴۷	M۲TH۶E۱۰۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۱۰۰ گری باریکه‌ی الکترون
۴۸	M۲TH۶E۲۰۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۶/۵٪- جهش با دُز ۲۰۰ گری باریکه‌ی الکترون
۴۹	M۲TH۱۲E۱۰۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۱۲/۵٪- جهش با دُز ۱۰۰ گری باریکه‌ی الکترون
۵۰	M۲TH۶E۲۰۰	نسل ۲- رقم طبیعی- رطوبت ۱۲/۵٪- جهش با دُز ۲۰۰ گری باریکه‌ی الکترون



بنابراین برای تأیید روش به کار رفته در تجزیه‌ی خوشه‌ای و نیز مطلوبیت معیار فاصله یا تشابه چندین روش وجود دارد که یکی از آن‌ها محاسبه‌ی ضریب همبستگی کوفتیک است. این ضریب نشان می‌دهد که چه قدر از اطلاعات اولیه یا ماتریس ورودی (ماتریس فاصله یا تشابه اولیه) توانسته است به نمودار درختی منتقل شود. اگر مقدار این ضریب بالای ۰/۸ باشد، نشان‌دهنده این است که روش تجزیه‌ی خوشه‌ای مورد استفاده به خوبی توانسته است از اطلاعات ماتریس فاصله یا تشابه اولیه برای گروه‌بندی افراد و جمعیت‌ها استفاده کند. برای محاسبه‌ی ضریب کوفتیک از نرم‌افزار NTSYS-pc استفاده شد.

۳.۳.۲ تجزیه به مختصه‌های اصلی^(۱۷)

بالا بودن تعداد متغیرهایی که باید محاسبه شود، همواره به عنوان یکی از مشکلات اساسی پژوهش‌گران در مبحث‌های تحلیل آماری داده‌ها بوده است. افزایش تعداد متغیرها که در مورد داده‌های مولکولی، برابر تعداد نوارهای حاصل از الکتروفورز است، منجر به افزایش تعداد ضریب همبستگی می‌شود. اگر تعداد این متغیرها خیلی زیاد باشد، تعداد معادله‌ها بیش از حد تصور خواهد بود. بنابراین به روش‌هایی نیاز داریم که داده‌ها را کاهش دهد و ماتریس همبستگی بزرگ را خلاصه کند.

تجزیه به مختصه‌های اصلی یکی از مبحث‌های ارزشمند جبر خطی است. این روش ساده بوده و می‌تواند اطلاعات اساسی مورد نیاز را از حجم گسترده‌ی داده‌های مرکب و پیچیده استخراج کند. در این روش گروه‌های داده‌های مرکب به ابعاد محدودتری کاهش می‌یابند و ساختارهایی که اغلب علت اصلی تغییرهای داده‌ها هستند، نشان داده می‌شوند [۵۲].

۳. بحث و نتیجه‌ها

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها (رقم طبسی به همراه ردیف‌های جهش یافته‌ی آن‌ها) به وسیله‌ی (نسخه‌ی ۲/۱) نرم‌افزار NTSYS و با استفاده از ضریب‌های تشابه دایس^(۱۸)، جاکارد^(۱۹)، تطابق ساده^(۲۰)، به روش‌های UPGMA و دورترین همسایه‌ها^(۲۱) انجام شد.

به منظور ارزیابی عملکرد هر روش، ضریب کوفتیک برای هر کدام از نمودارهای درختی رسم شده، محاسبه شد. در نهایت تجزیه‌ی خوشه‌ای، که با استفاده از ضریب تشابه تطابق ساده و به روش دورترین همسایه دارای بیش‌ترین ضریب کوفتیک بود ($r=0/921$)، انتخاب شد.

از سه نرم‌افزار POPGENE، NTYSYS-pc [۴۰] و Genealex برای تحلیل آماری داده‌های به دست آمده برای امتیازدهی نوارها استفاده شد. شاخص‌های مختلفی برای بررسی سودمندی و کارایی نشان‌گر دی ان ا چندریختی تقویت شده و ارزیابی تنوع [۴۱، ۴۲]، فاصله و تشابه ژنتیکی جمعیت‌ها [۴۳]، به کار گرفته شد.

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از اطلاعات حاصل از نشان‌گرهای مولکولی، می‌توان چندین مؤلفه را مورد ارزیابی قرار داد که مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از: مقدار اطلاعات چندریختی (PIC) و میزان ناجورتخمی^(۱۴) (H) [۴۴، ۴۵]. مقدار اطلاعات چندریختی [۴۶، ۴۷] تخمینی از قدرت تمایز هر آغازگر با در نظر گرفتن تعداد و فراوانی نسبی دگرها (آلل‌ها) است [۴۸، ۴۹].

۱.۳.۲ تحلیل واریانس مولکولی

تحلیل واریانس مولکولی روشی برای مطالعه‌ی تنوع مولکولی درون یک گونه است و براساس یک مدل سلسله‌مراتبی یا آشیانه‌ای است [۵۰، ۵۱]. تحلیل واریانس مولکولی داده‌ها و محاسبه‌ی درصد واریانس مولکولی بین و درون جمعیت با استفاده از نسخه‌ی ۶/۴۱ نرم‌افزار Genealex انجام شد [۵۰، ۵۱].

۲.۳.۲ تجزیه‌ی خوشه‌ای

تجزیه‌ی خوشه‌ای^(۱۵) یک عنوان کلی برای مجموعه‌ای از روش‌های ریاضی برای یافتن شباهت بین افراد یک مجموعه است. افرادی که در یک خوشه قرار می‌گیرند شباهت زیادتری نسبت به افرادی که در خوشه‌های دیگر قرار می‌گیرند، دارند. با استفاده از یکی از روش‌های دسته‌بندی، افراد براساس شباهت بینشان گروه‌بندی می‌شوند و گروه‌بندی افراد به صورت نمودار درختی ارائه می‌شود. از بین روش‌های دسته‌بندی، UPGMA متداول‌ترین روش مورد استفاده است و بیش‌ترین کاربرد را در تجزیه‌ی تنوع ژنتیکی دارد.

کلیدی مرحله‌های مربوط به تجزیه‌ی خوشه‌ای و رسم نمودار درختی به وسیله‌ی نرم‌افزار NTSYS-pc ۲/۰۲e انجام شد.

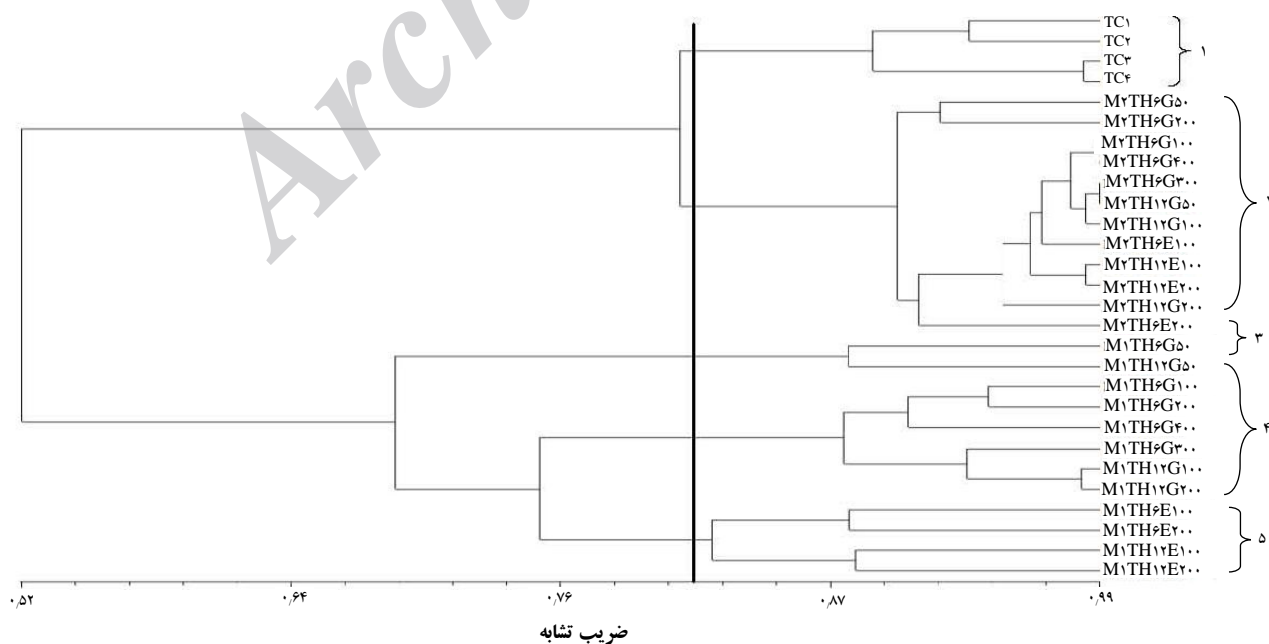
تأیید تجزیه‌ی خوشه (محاسبه‌ی ضریب همبستگی کوفتیک^(۱۶))

نمودار درختی حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای نشان‌دهنده‌ی ماتریس داده‌ها است، اما ممکن است به طور دقیق آن را بیان نکند.

با برش نمودار تجزیه‌ی خوشه از نقطه‌ی تشابه ۰/۸۱، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در ۵ گروه قرار گرفتند (شکل ۲). با توجه به گروه‌بندی ردیف‌های جهش یافته و رقم‌های شاهد طبعی ذکر شده، با استفاده از داده‌های مولکولی حاصل از نشان‌گرهای دی ان ا چندریختی تصادفی تقویت شده مورد استفاده می‌توان نتیجه گرفت که نشان‌گرهای دی ان ا چندریختی تصادفی تقویت شده‌ی مورد استفاده در این پژوهش رقم‌های شاهد را به خوبی از ردیف‌های جهش یافته جدا کرده و هم‌چنین ردیف‌های جهش یافته‌ی نسل اول و دوم را نیز در گروه‌های مجزایی قرار داده‌اند.

ردیف‌های جهش یافته‌ی حاصل از جهش‌زاهای مختلف (پرتو گاما و باریکه‌ی الکترونی) نیز در داخل زیرگروه‌ها از یک‌دیگر تفکیک شده‌اند. جدا شدن رقم‌های شاهد از ردیف جهش یافته به دلیل متفاوت بودن این رقم‌ها از ردیف‌های جهش یافته بوده یا به عبارت دیگر جهش با پرتو گاما و الکترون باعث ایجاد تغییرهای ژنتیکی در سطح دی ان ا در این رقم شده است. ردیف‌های جهش یافته‌ی نسل اول به دلیل تنوع زیادتر در چند گروه قرار گرفته‌اند (گروه‌های سوم، چهارم و پنجم). البته این گروه‌ها در نقطه‌ی تشابه کم‌تر (نقطه‌ی تشابه ۰/۶۹) با یک‌دیگر در یک گروه جای می‌گیرند (شکل ۲). اقبال (۲۰۰۷) برای تعیین درجه‌ی واگرایی ژنتیکی در بین ۷ رقم گندم نان، ماتریس تشابه ژنتیکی Li و Nei را در محدوده‌ی

۱.۳ گروه‌بندی شاهد‌های طبعی به همراه ردیف‌های جهش یافته‌ی آن‌ها با استفاده از شیوه‌ی تجزیه به مختصه‌های اصلی
تجزیه به مختصه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام شد. در تجزیه به مختصه‌های اصلی، مؤلفه‌های تعیین شده (معمولاً دو تا سه مؤلفه‌ی اول) درصد بالایی از تغییرهای بین داده‌های مولکولی را توجیه می‌کنند. مقدارهای مربوط به تجزیه به مختصه‌های اصلی شامل ویژه مقدارها، درصد واریانس و واریانس جمعی برای ۱۵ مؤلفه‌ی اول، که بیش از ۹۹٪ تغییرها را توجیه می‌کند، هستند (جدول ۴).



شکل ۲. نمودار درختی به دست آمده برای ۲۴ ردیف جهش یافته و ۴ شاهد رقم طبعی با استفاده از ضریب تشابه تطابق ساده و روش دورترین همسایه.



جدول ۵. نام شماره‌ی ردیف‌ها برای شناسایی بهتر آن‌ها در نمودار تجزیه به مختصه‌های اصلی

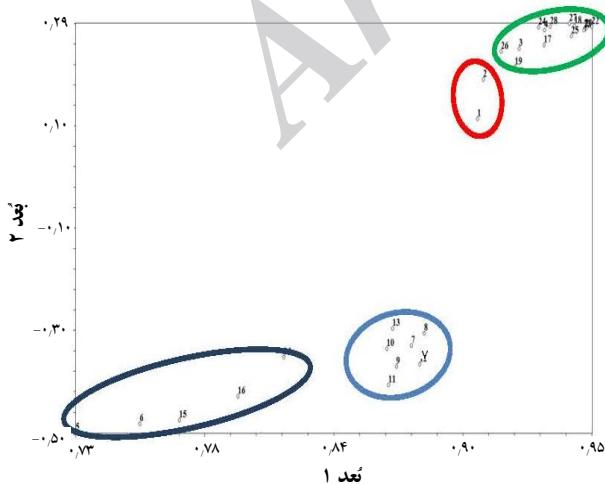
شماره	نام ردیف
۱	شاهد طبعی ۱
۲	شاهد طبعی ۲
۳	شاهد طبعی ۳
۴	شاهد طبعی ۴
۵	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، پرتو گاما دُز ۵۰ گری
۶	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، پرتو گاما دُز ۱۰۰ گری
۷	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، پرتو گاما دُز ۲۰۰ گری
۸	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، پرتو گاما دُز ۳۰۰ گری
۹	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، پرتو گاما دُز ۴۰۰ گری
۱۰	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۱۲ درصد، پرتو گاما دُز ۵۰ گری
۱۱	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۱۲ درصد، پرتو گاما دُز ۱۰۰ گری
۱۲	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۱۲ درصد، پرتو گاما دُز ۲۰۰ گری
۱۳	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، الکترون دُز ۱۰۰ گری
۱۴	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، الکترون دُز ۲۰۰ گری
۱۵	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۱۲ درصد، الکترون دُز ۱۰۰ گری
۱۶	جهش یافته‌ی نسل اول رقم طبعی، رطوبت ۱۲ درصد، الکترون دُز ۲۰۰ گری
۱۷	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، پرتو گاما دُز ۵۰ گری
۱۸	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، پرتو گاما دُز ۱۰۰ گری
۱۹	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، پرتو گاما دُز ۲۰۰ گری
۲۰	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، پرتو گاما دُز ۳۰۰ گری
۲۱	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، پرتو گاما دُز ۴۰۰ گری
۲۲	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۱۲ درصد، پرتو گاما دُز ۵۰ گری
۲۳	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۱۲ درصد، پرتو گاما دُز ۱۰۰ گری
۲۴	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۱۲ درصد، پرتو گاما دُز ۲۰۰ گری
۲۵	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، الکترون با دُز ۱۰۰ گری
۲۶	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۶ درصد، الکترون دُز ۲۰۰ گری
۲۷	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۱۲ درصد، الکترون دُز ۱۰۰ گری
۲۸	جهش یافته‌ی نسل دوم رقم طبعی، رطوبت ۱۲ درصد، الکترون دُز ۲۰۰ گری

جدول ۴. ویژه-مقدارها، درصد واریانس و واریانس جمع‌ی مؤلفه‌های حاصل از تجزیه به مختصه‌های اصلی در جمعیت جهش یافته‌ی طبعی به همراه شاهدهای طبعی

مؤلفه	ویژه-مقدار	درصد واریانس	واریانس جمع‌ی
۱	۲۲٫۱۸	۷۹٫۲۱	۷۹٫۲۱
۲	۲٫۹۵	۱۰٫۵۵	۸۹٫۷۶
۳	۰٫۵۹	۲٫۱۰	۹۱٫۸۶
۴	۰٫۵۲	۱٫۸۶	۹۳٫۷۲
۵	۰٫۳۲	۱٫۱۳	۹۴٫۸۶
۶	۰٫۲۰	۰٫۷۰	۹۵٫۵۶
۷	۰٫۱۷	۰٫۶۰	۹۶٫۱۶
۸	۰٫۱۴	۰٫۵۱	۹۶٫۶۸
۹	۰٫۱۳	۰٫۴۷	۹۷٫۱۴
۱۰	۰٫۱۳	۰٫۴۵	۹۷٫۶۰
۱۱	۰٫۱۱	۰٫۳۹	۹۷٫۹۹
۱۲	۰٫۰۹	۰٫۳۲	۹۸٫۳۱
۱۳	۰٫۰۹	۰٫۳۱	۹۸٫۶۲
۱۴	۰٫۰۷	۰٫۲۴	۹۸٫۸۶
۱۵	۰٫۰۶	۰٫۲۲	۹۹٫۰۹

مستقل از یک‌دیگر بودن مؤلفه‌های تعیین شده، نشان‌دهنده‌ی این موضوع است که نشان‌گرهای مورد استفاده در این پژوهش، ارتباطی با یک‌دیگر نداشته و توزیع یکنواختی روی ژنوم ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه داشته‌اند (جدول ۵). براساس پراکنش دوبعدی حاصل از دو مؤلفه‌ی اصلی اول تجزیه به مختصه‌های اصلی، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را می‌توان در گروه‌های جداگانه قرار داد (شکل ۳). این گروه‌ها با تغییرهای بسیار اندکی مشابه با گروه‌بندی حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای است.

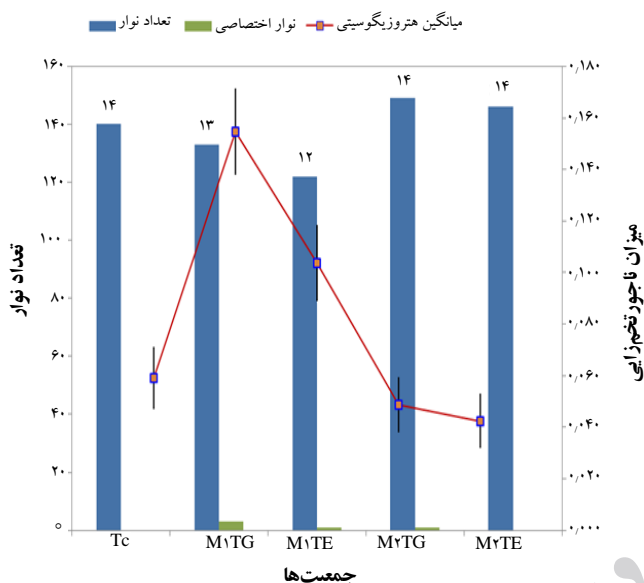
۲.۳ نتایج حاصل از قطعه‌های تکثیر شده در پنج جمعیت ردیف‌های جهش یافته‌ی رقم طبعی به همراه شاهد‌های این رقم ژنوتیپ‌های مورد بررسی به ۵ جمعیت تفکیک و تجزیه‌های مربوط به جمعیت‌ها توسط نرم‌افزارهای مولکولی POPGENE ۳۲ و Genealex ۶٫۴۱ بر روی آن‌ها انجام شد. در جدول ۶ اطلاعات مربوط به جای‌گاه‌های تکثیر شده در پنج جمعیت ردیف‌های جهش یافته‌ی رقم طبعی به همراه شاهد‌های آن نشان داده شده است.



شکل ۳. نمودار دوبعدی حاصل از تجزیه به مختصه‌های اصلی ردیف‌های جهش یافته به همراه شاهد‌های رقم طبعی.

جدول ۶. اطلاعات مربوط به جای‌گاه‌های تکثیر شده در ۵ جمعیت جهش یافته و شاهد‌های رقم طوسی

جمعیت‌ها	تعداد ردیف	میانگین تعداد دگره‌ی مشاهده شده در هر آغازگر (Na)	میانگین تعداد دگره‌ی مؤثر در هر آغازگر (Ne)	میانگین شاخص شانون در هر آغازگر (I)	میانگین میزان ناجورتخمی برآورد شده در هر آغازگر (He)	درصد جای‌گاه‌های چندریختی
جمعیت ۱ (TC)	۴	۱/۰۰۰	۱/۱۱۱	۰/۰۸۴	۰/۰۵۹	۱۳/۵۸٪
جمعیت ۲ (M۱TG)	۸	۱/۱۸۵	۱/۲۸۲	۰/۲۲۳	۰/۱۵۵	۳۶/۴۲٪
جمعیت ۳ (M۱TE)	۴	۱/۰۰۶	۱/۱۸۸	۰/۱۵۰	۰/۱۰۴	۲۵/۳۱٪
جمعیت ۴ (M۲TG)	۸	۱/۰۴۹	۱/۰۸۸	۰/۰۷۱	۰/۰۴۹	۱۲/۹۶٪
جمعیت ۵ (M۲TE)	۴	۰/۹۹۴	۱/۰۸۲	۰/۰۶۰	۰/۰۴۲	۹/۲۶٪
میانگین	۵/۶	۱/۰۴۷	۱/۵۰	۰/۱۱۸	۰/۰۸۲	۱۹/۵۱٪


شکل ۴. الگوی نواری ۵ جمعیت جهش یافته و شاهد‌های رقم طوسی.
جدول ۷. فاصله و تشابه ژنتیکی ۵ جمعیت ردیف‌های جهش یافته و شاهد

جمعیت‌ها	جمعیت ۱ (TC)		جمعیت ۲ (M۱TG)		جمعیت ۳ (M۱TE)		جمعیت ۴ (M۲TG)		جمعیت ۵ (M۲TE)	
	فاصله	تشابه	فاصله	تشابه	فاصله	تشابه	فاصله	تشابه	فاصله	تشابه
جمعیت ۱ (TC)	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰								
جمعیت ۲ (M۱TG)	۰/۳۲۱	۰/۷۲۵	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰						
جمعیت ۳ (M۱TE)	۰/۳۵۳	۰/۷۰۳	۰/۱۱۷	۰/۸۹۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰				
جمعیت ۴ (M۲TG)	۰/۰۸۳	۰/۹۲۰	۰/۳۵۶	۰/۷۰۱	۰/۶۹۵	۰/۳۶۳	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰		
جمعیت ۵ (M۲TE)	۰/۱۰۹	۰/۸۹۷	۰/۳۷۲	۰/۶۸۹	۰/۶۷۹	۰/۳۸۶	۰/۹۶۸	۰/۰۳۲	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰

الگوی نواری ۵ جمعیت مربوط به ردیف‌های جهش یافته‌ی

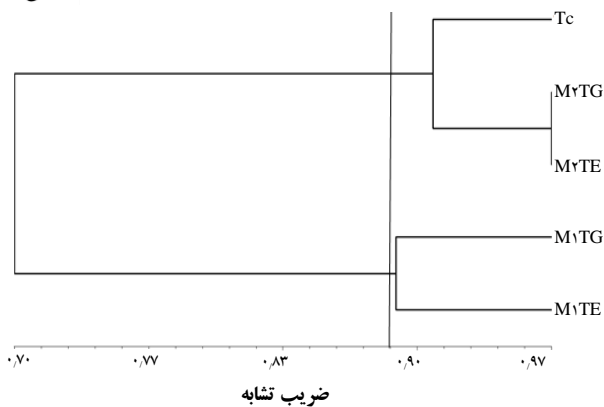
رقم طوسی به همراه شاهد‌های این رقم در شکل ۴ نمایش داده شده است.

موریتا و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی تجزیه و تحلیل ژنتیکی در جهش یافته‌های حاصل از پرتو گاما در گیاه برنج نشان دادند که بیش‌ترین فراوانی جهش القاء شده به وسیله پرتو گاما در گیاه برنج که منجر به تنوع ژنتیکی می‌شود، جهش‌های حذف، به ویژه جهش‌های حذف کوچک در حد ۱ تا چند ده جفت باز و یا ۱۰ کیلو جفت باز است [۵۷].

۳.۳ تشابه و فاصله‌ی ژنتیکی بین جمعیت‌های مربوط به ردیف‌های جهش یافته و شاهد‌های رقم طوسی

فاصله‌ی ژنتیکی بین دو موجود به منزله‌ی تفاوت قابل توجه بین آن دو موجود با استفاده از تنوع دگره‌ای است. به عبارت دیگر این شاخص بیان‌گر میزان تفاوت‌های ژنی بین جمعیت‌ها یا گونه‌ها است که با استفاده از برخی کمیت‌های عددی قابل اندازه‌گیری است. تشابه و فاصله‌ی ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس روش نی [۴۵، ۴۲] محاسبه و نتیجه‌های آن در جدول ۷ ارائه شده است.

بهوتا و همکاران (۲۰۰۵) در تعیین درجه‌ی واگرایی در بین رقم گندم نان، که مربوط به مکان‌های مختلف پاکستان بود، یک ماتریس تشابه ژنتیکی در محدوده‌ی ۸۴٪ تا ۹۳٪ در میان ژنوتیپ‌ها مشاهده نمودند [۵۸]. احمد (۲۰۱۰) در بررسی تنوع ژنتیکی میان ۳۲ ردیف اصلاح شده‌ی گندم نان هگزابلوید که به صورت دیم نیز کشت می‌شود، ضریب‌های تشابه ژنتیکی از ۰/۸۱ تا ۰/۹۴ مشاهده نمود [۵۹].



شکل ۵. نمودار درختی به دست آمده با استفاده از روش UPGMA براساس فاصله‌ی ژنتیکی نی بین جمعیت‌های جهش یافته و شاهد‌های رقم طوسی.

جدول ۸. تحلیل واریانس مولکولی جمعیت ردیف‌های جهش یافته و شاهد‌های رقم طوسی

منبع‌های تغییرها	درجه‌ی آزادی	مجموع مربع‌ها	میانگین مربع‌ها	درصد واریانس
بین جمعیت	۴	۳۱۷٫۴۸	۷۹٫۳۷ ^{۵۵}	۸۷٫۹۰٪
درون جمعیت	۲۳	۲۵۱٫۳۸	۱۰٫۹۳	۱۲٫۱۰٪
کل	۲۷	۵۶۸٫۸۶		

پی‌نوشت‌ها

1. *Triticum aestivum* L. em. thell
2. Polymorphic information content (PIC)
3. Polymerase chain reaction (PCR)
4. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)
5. Arbitrary primed polymerase chain reaction (AP-PCR)
6. DNA amplification fingerprinting (DAF)
7. Quantitative trait loci
8. Gene erosion
9. Operon technology (Alameda, CA)
10. Fermentas
11. Heterotic
12. Denaturation
13. Annealing
14. Heterozygosity
15. Cluster analysis
16. Cophenetic correlation coefficient
17. Principle coordinate analysis
18. Dice
19. Jacard
20. Simple matching
21. Complete linkage
22. Durum wheat

۴.۳ تجزیه‌ی خوشه‌ای پنج جمعیت ردیف‌های جهش یافته و شاهد‌های رقم طوسی

تجزیه‌ی خوشه‌ای پنج جمعیت ردیف‌های جهش یافته و شاهد‌های رقم طوسی براساس مقدارهای تشابه ژنتیکی نی و با استفاده از روش UPGMA انجام و با برش نمودار درختی از نقطه‌ی تشابه ۰/۸۹، دو گروه حاصل شد، که در شکل ۵ ارایه شده است.

میترا و همکاران (۲۰۰۹) در تجزیه و تحلیل مولکولی بر روی شش رقم گیاه هگزاپلوئید گندم نان، این شش رقم گندم را در نمودار درختی UPGMA و براساس شاخص نی به دو خوشه‌ی اصلی گروه‌بندی نمودند [۶۰]. آیدل هالم (۲۰۰۹) در تجزیه‌ی ژنتیکی و بررسی چندریختی دی ان اچ چندریختی تصادفی تقویت شده، با استفاده از تحلیل نمودار درختی، ۱۱ ژنوتیپ مختلف گندم دورم^(۲۲)، را در دو خوشه قرار داد [۶۱]. راشد (۲۰۰۸) نیز از آغازگرهای دی ان اچ چندریختی تصادفی تقویت شده برای تخمین گوناگونی ژنتیکی در میان ۳۰ گونه‌ی گندم نان هگزاپلوئید استفاده و نمودار درختی ناشی از تحلیل خوشه‌ای UPGMA گونه‌ی مورد بررسی را در دو خوشه‌ی اصلی قرار داد [۶۲].

۵.۳ تحلیل واریانس مولکولی جمعیت ردیف جهش یافته و شاهد‌های رقم طوسی

تحلیل واریانس مولکولی، تنوع درون و بین جمعیت‌ها را مورد ارزیابی قرار می‌دهد. براساس نتیجه‌های به دست آمده در پژوهش حاضر، تنوع بین جمعیت‌ها معنی‌دار و بیش‌تر از تنوع درون جمعیت‌ها بود. واریانس بین افراد درون جمعیت ۱۲٪ کل تنوع را توجیه می‌کند، در حالی که واریانس بین جمعیت‌ها حدود ۸۸٪ کل تنوع را شامل می‌شود. تحلیل واریانس مولکولی جمعیت‌ها در جدول ۸ ارایه شده است. چاکرابارتی و همکاران (۲۰۱۰) عنوان نمودند که در حال حاضر تجزیه و تحلیل دی ان اچ چندریختی تصادفی تقویت شده نه تنها برای برآورد تنوع ژنتیکی در جهش یافته‌های القا شده با پرتو گاما استفاده می‌شود، بلکه برای شناسایی صحیح جهش یافته/رقم‌های جدید برای حمایت قانونی آن‌ها، تحت عنوان اصلاح تنوع گیاهی نیز می‌تواند استفاده شود [۶۳].



- [1] M.A. Malik, F. Zahoor, Weed biomass and economic yield of wheat (*Triticum aestivum*) as influenced by chemical weed control under rainfed conditions, *African Journal of Biotechnology*, 11 (7) (2012) 1567-1573.
- [2] A. Khan, M. Khaliq, Cytogenetics and evolution of *Triticum aestivum* L. em Thell, *International J. of agriculture and biology*, 7 (3) (2005) 527-534.
- [3] J. Salse, V. Chagué, New insights into the origin of the B genome of hexaploid wheat: Evolutionary relationships at the SPA genomic region with the S genome of the diploid relative *Aegilops speltoides*, *BMC Genomics*, 9 (555) (2008) 1-12.
- [4] P.K. Gupta, R.K. Varshney, The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113 (2000) 163-185.
- [5] M. Asif, DNA fingerprinting studies of some wheat (*Triticum aestivum*) genotypes using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, *Pak. J. Bot*, 37 (2) (2005) 271-277.
- [6] I. Piri, M. Babayan, The use of gamma irradiation in agriculture, *African Journal of Microbiology Research*, 5 (32) (2011) 5806-5811.
- [7] C. Tenley French, Comparison of the mutagenic potential of 17 physical and chemical agents analyzed by the flow cytometry mutation assay, *Mutation Research*, 602 (2006) 14-25.
- [8] IAEA, *Developments in Mutation Assisted Plant Breeding*, (2010).
- [9] S.G. Wi, B.Y. Chung, Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants, *J. Micron*, 38 (2007) 553-564.
- [10] N. Mashev, G. Vassilev, K. Ivanov, A study of N-allyl N-2 pyridyl thiourea and gamma radiation treatment on growth and quality of peas and wheat, *Bulgerian J. Plant Physiol*, 21 (4) (1995) 56-63.
- [11] WHO, High-dose Irradiation: Wholesomeness of Food Irradiated with Doses above 10kGy, Safety and Nutritional Adequacy of Irradiated Food, WHO, Geneva (WHO Technical Report Series no: 890), (1994) 120-124.
- [12] S. Lee, M. Lee, K. Song, Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of gluten films. *Food Chem*, 92 (2005) 621-925.
- [13] Z. Hong, X. Jing Zao, Effects of high-energy-pulse-electron beam radiation on biomacromolecules, Springer, *Sci China Ser B-Chem*, 51 (1) (2008) 86-91.
- [14] A. Alberti, S. Bertini, G. Gastaldi, Electron beam irradiated textile cellulose fibres: ESR studies and derivatisation with glycidyl methacrylate (GMA). *Eur. Polym. J.*, 41 (2005) 1787-1797.
- [15] D. Patnaik, Wheat biotechnology, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 4 (2) (2001).
- [16] M.D. Edwards, C.W. Stuber, Molecular-Marker-Facilitated Investigations of Quantitative-Trait Loci in Maize, I. Numbers, Genomic Distribution and Types of Gene Action, *Genetics Society of America*, 116 (1987) 113-125.
- [17] S.D. Tanksley, C.M. Rick, Isozymic gene linkage map of the tomato: applications in genetics and breeding. *Theor. & Appl. Genet*, 57 (1980) 161-170.
- [18] S.D. Tanksley, N.D. Young, A.H. Paterson, M.W. Bonierbale, RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technology*, 7 (1989) 257-264.
- [19] B. Burr, F.A. Burr, Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations, *Trends Genet*, 7 (2) (1991) 55-60.
- [20] Y.G. Liu, K. Tsunewaki, Restriction fragment length polymorphism analysis of wheat. II. Linkage maps of the RFLP sites in common wheat. *Jpn. J. Genet*, 66 (1991) 617-633.



- [21] M. Mohan, S. Nair, Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants, *Molec breed*, 3 (1997) 87-103.
- [22] R. Bernatzky, S.D. Tanksley, Genetics of actin-related sequences in tomato, *Theoretical and Applied Genetics*, 72 (3) (1986) 314-321.
- [23] G. Kochert, RFLP technology. DNA-based markers in plants, (1994) 8-38. In: Phillips, R.L. and Vasil, I.K. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [24] K. Kleppe, H.G. Khorana, Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol*, 56 (1971) 341-361.
- [25] K.B. Mullis, F.A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155 (1987) 335-350.
- [26] R.K. Saiki, S. Sharf, Faloona, 'Enzymic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia', *Science*, 230 (1985) 1350-1354.
- [27] J. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acid Res*, 18 (1990) 6531-6535.
- [28] J. Welsh, M. McClelland, Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers, *Nucleic Acid Res*, 18 (1990) 7213-7218.
- [29] M. McClelland, J. Welsh, RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR, *Trends in genetics*, 11 (1995) 242-246.
- [30] C.J. Jones, Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories, *Mol. Breed*, 3 (1997) 381-390.
- [31] S. Bozari, O. Aksakal, Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect genotoxic effect of trifluralin on maize (*Zea mays*), *Departemant of biology Turkey*, 46 (22) (2012) 12527-12533.
- [32] P. Pepo, Comparison of RAPD and AFLP analysis in some Maize (*Zea mays* L.) lines and hybrids, *J. of agricultural sciences, Debrecen*, 24 (2006) 3-7.
- [33] F. Ngezahayo, Somaclonal Variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis, *J. appl. gene*, 48 (4) (2007) 329-336.
- [34] M. Asif, M. Rahman, Genotyping analysis of six maize (*Zea mays* L.) hybrids and fingerprinting technology, *Pak. J. Bot*, 38 (5) (2006) 1425-1430.
- [35] F. Bered, Genetic variability in wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm revealed by RAPD markers, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2 (4) (2002) 499-506.
- [36] H. pakniyat, Tavakol, RAPD markers associated with drought tolerance in bread Wheat (*Triticum aestivum* L.), *Pakistan. J. of Biological sciences*, 10 (18) (2007) 3237-3239.
- [37] Gh.A. Nematzadeh, Mapping the Gene for Aroma in Rice (*Oryza sativa* L.) by Bulk Segregant Analysis via RAPD Markers, *J. Agric. Sci. Technol*, 6 (2004) 129-137.
- [38] M.R. Naghavi, M. Malaki, H. Alizadeh, An Assessment of Genetic Diversity in Wild Diploid Wheat *Triticum boeoticum* from West of Iran Using RAPD, AFLP and SSR Markers, *Agr. Sci. Tech*, 11 (2009) 585-598.
- [39] Plant DNA Extraction Protocol for DarT.
- [40] F.C. Yeh, Y. Rong-Cai, T. Boyle, POPGENE VERSION 1.32, University of Alberta, Center for International Forestry Research: Edmonton, Alberta, Canada (1998).
- [41] N. Takahata, M. Nei, FST and GST statistics in the finite island model, *Genet*, 107 (1984) 501-504.
- [42] M. Nei, Genetic distance between populations, *Am. Nat*, 106 (1972) 283-292.
- [43] M. Nei, Statistics an DNA analysis of gene diversity in subdivided populations, *Ann. Hum. Genet*, 41 (1977) 225-233.
- [44] M. Nei, Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 70 (1973) 3321-3323.



- [45] M. Nei, Molecular phylogeny and genetic diversity analysis. Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA, (1978).
- [46] M. Nei, N. Takezaki, T. Sitnikova, Assessing molecular phylogenies, *Sci*, 267 (1995) 253-254.
- [47] M. Nei, W.H. Li, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (1979) 5269-5273.
- [48] H. Agrama, M.R. Tuinstra, Phylogenetic diversity and relationship among sorghum accessions using SSRs and RAPDs, *Afr. J. Biotechnol*, 10 (2003) 334-340.
- [49] M. Kimura, J.F. Crow, The number of alleles that can be maintained in a finite population, *Genet*, 49 (1964) 725-738.
- [50] P.E. Smouse, R. Peakall, E. Gonzales, A heterogeneity test for fine-scale genetic structure, *Mol. Eco*, 17 (2008) 3389-3400.
- [51] N. Beck, R. Peakall, R. Heinsohn, Social constraint and an absence of sex-biased dispersal drive fine-scale genetic structure in white-winged choughs, *Mol. Eco*, 17 (2008) 4346-4358.
- [52] J. Shlens, A tutorial on principal component analysis, (2005) 1-13, <http://www.sn/salk.edu/shlens/>.
- [53] A. Iqbal, Study of genetic divergence among wheat genotypes through random amplified polymorphic DNA, *Genet. Mol. Res*, 6 (3) (2007) 476-481.
- [54] P. Raghunathachari, V.K. Khanna, RAPD analysis of genetic variability in Indian scented rice germplasm (*Oryza sativa* L.), *Current science*, 79 (7) (2000) 994-998.
- [55] N. Kanawapee, Genetic diversity analysis of rice cultivars (*Oryza sativa*) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers, *Electronic. J. of biotechnology*, (2011) 1-10.
- [56] R. El-Bakatoushi, Genetic diversity of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) growing near a high voltage transmission line, *ROM. J. BIOL. PLANT BIOL*, 55 (2) (2010) 71-87.
- [57] R. Morita, M. Kusaba, Molecular characterization of mutations induced by gamma irradiation in rice, *Genes Genet Syst*, 84 (5) (2009) 361-370.
- [58] W.M. Bhutta, A. Shahzad, J. Akhtar, Assessment of genetic divergence among wheat (*Triticum aestivum*) genotypes using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, *Biologia, Bratislava*, 60 (6) (2005) 671-674.
- [59] M.F. Ahmed, Assessment of genetic diversity among Pakistani wheat (*Triticum aestivum* L.) advanced breeding lines using RAPD and SDS-PAGE, *Institute of Agricultural Biotechnology & Genetic Resources*, 13 (3) (2010) 1-10.
- [60] S. Mitra, K.M. Nasiruddin, E.H. Chowdhury, Molecular analysis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars by RAPD markers, *Plant Tissue Cult. & Biotech*, 19 (1) (2009) 35-44.
- [61] S.H.M. Abd-El-Haleem, Genetic analysis and RAPD polymorphism in some Durum wheat genotypes, *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4 (1) (2009) 01-09.
- [62] M.A. Rashed, Estimation of genetic diversity among thirty bread wheat varieties by RAPD analysis, *Journal of Applied Sciences Research*, 4 (12) (2008) 1898-1905.
- [63] D. Chakrabarty, S.K. Datta, Application of RAPD markers for characterization of γ -ray-induced rose mutants and assessment of genetic diversity, *Plant Biotechnology Reports*, 4 (3) (2010) 237-242.