Archive of SID

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۱، صفحه ۱۲۲-۱۱۴ (۱۳۹۵)

بررسی تنوع ژنتیکی دم‌گاوی (*Smirnovia iranica* Sabeti) در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD

منصوره قوام[۱*]، محمدرضا نقوی [۲]، حسین آذرنیوند[۳] و علی طویلی[۴]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه کاشان،
پست الکترونیک: mghavam@kashanu.ac.ir

۲- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۳- استاد، گروه احیاء مناطق خشک و کوهستانی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۴- دانشیار، گروه احیاء مناطق خشک و کوهستانی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۱

چکیده

گیاه دم‌گاوی (*Smirnovia iranica*) از خانواده Fabaceae و از گونه‌های درختچه‌ای ارزشمند بومی و سازگار در ماسه‌زارهای مناطق مرکزی ایران است که از نظر تولید علوفه و حفاظت خاک و ایجاد چشم‌انداز زیبا و ارزش دارویی بسیار حایز اهمیت است. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه از رویشگاه آن واقع در ماسه‌زارهای کاشان ۴ سایت مطالعاتی به‌فاصله ۳۰ کیلومتر از هم انتخاب و از هر سایت ۵ نمونه گیاهی جمع‌آوری و با استفاده از ۱۱ آغازگر مورد تجزیه RAPD قرارگرفتند. نتایج حاصل از ماتریس تشابه Dice، تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA و اطلاعات باندها، نشان داد که از ۷۲ مکان تکثیرشده توسط آغازگرها به‌طور متوسط ۶۱ مکان چندشکل بودند. تجزیه خوشه‌ای، تنوع قابل توجهی را در بین نمونه‌ها نشان داد. میزان تشابه از ۰/۹۷ برای نزدیکترین افراد در سایت ۴ تا ۰/۶۴ بین دورترین نمونه‌ها مربوط به سایت‌های مختلف، مشاهده شد. کل نمونه‌ها به ۵ گروه اصلی تبدیل شدند که دو گروه دارای یک نمونه و به‌ترتیب شامل نمونه‌های ۳ (از سایت اول) و نمونه ۱۲ (از سایت سوم) بودند، دو گروه دیگر مخلوطی از نمونه‌های مختلف بودند که هر کدام به زیرگروه‌هایی تقسیم شدند و یک گروه فقط شامل نمونه‌های متعلق به سایت ۴ بود. گروه‌بندی ژنتیکی به‌دست آمده از RAPD تقریبا با توزیع جغرافیایی مطابقت نشان داد. عدم تطابق در یک سایت ممکن است به‌دلیل مهاجرت بذر این گیاه از منطقه‌ای به‌منطقه دیگر توسط عوامل مختلف و به‌ویژه بادهای شدید باشد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، دم‌گاوی، RAPD.

مقدمه

گیاه دم‌گاوی (*Smirnovia iranica*) یکی از گونه‌های درختچه‌ای ارزشمند بومی و سازگار در ماسه‌زارهای مناطق مرکزی ایران و از خانواده Fabaceae است که گذشته از تولید علوفه و حفاظت از خاک و ایجاد چشم‌انداز زیبا، دارای ارزش دارویی بسیار زیادی است (Sabeti, 1994). این گیاه دارای یک ساقه اصلی با شاخه‌های متعدد، ارتفاع ا تا ۱/۵متر، تاج پوشش ۷۰

www.SID.ir

Archive of SID

سانتی‌متر، برگ‌های گرد یا بیضی شکل پوشیده از کرک‌های انبوه و گل‌آذین خوشه‌ای با گل‌های ارغوانی‌رنگ بسیار معطر و دو نوع سیستم ریشه‌ای عمودی و افقی است که عمدتا در تپه‌های ماسه‌ای بادی بیابانهای دشت کویر، مسیله، ماسه زارهای کاشان، خراسان گسترش دارد. ریشه‌های عمودی در این گونه بسیار عمیق بوده و ریشه‌های افقی آن به‌وسعت حدود ۳۰ متر گسترده‌اند. دم‌گاوی از طریق ریشه‌های افقی خود به‌فواصل یک متر، نهال‌های جوانی تولید می‌کند. سیستم ریشه‌ای این گیاه به گونه‌ای است که هم در جذب مواد غذایی و رطوبت و هم در نگهداشتن گیاه در خاک نقش اساسی داشته و به‌شکل بسیار جالبی ذرات ماسه را تثبیت می‌کند. این گیاه با داشتن گل‌های معطر و زیبا، طولانی‌بودن دوره فعالیت و کوتاه بودن دوره خواب، یکی از گزینه‌های برتر گیاهی در امر بیابان زدایی و ایجاد فضای سبز در اطراف شهرهای کویری می‌باشد تا به‌وسیله آن از هجوم ماسه‌ها به نقاط مسکونی و کشاورزی جلوگیری شود (Majid, 1996).

حفاظت و استفاده پایدار از منابع ژنتیکی جهت تامین امنیت غذایی در آینده یک ضرورت است (Runo & Muluvi, 2004). در این بین تکنیک‌های ملکولی توانسته‌اند حفاظت و مدیریت منابع ژنتیکی Plant Genetic Resource (PGR) را خصوصاً در زمینه‌های اطلاعات مربوط به‌تنوع ژنتیکی در درون و بین گونه‌ها بهبود بخشند (Runo & Muluvi Powell *et al*., 1996; 2004,) و به‌طور فزاینده‌ای در شناسائی روابط فیلوژنی مورد استفاده قرار گیرند. اطلاع کافی از همولوژیهای ژنومیکی به برنامه‌ریزی و استراتژی‌های اصلاحی در حفاظت از ژرم‌پلاسم و انتقال ژنها از یک گونه به گونه دیگر کمک می‌کند (Rao & Riley ,1994). پیشرفت‌های اخیر با استفاده از PCR و بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های مختلف یک گونه با بهره‌گیری از نشانگرهای مختلف مولکولی روشهای موثر و سریعی را برای نشاندارکردن و بهبود مدیریت ژرم‌پلاسم و انتخاب به‌کمک نشانگرها فراهم کرده است (Fernandes *et al*., 2002).

نشانگرهای RAPD به‌علت مزایائی چون تولید تعداد زیادی باند، پلی‌مورفیسم زیاد، عدم استفاده از مواد رادیواکتیو و عدم نیاز به‌وجود اطلاعاتی در مورد توالی ژنومی گیاه، همواره در بررسی تنوع ژنتیکی مخازن ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Strelchenko *et al*., 2003). در ضمن RAPD نشانگر ژنتیکی مفیدی در بیان پلی‌مورفیسم گیاهان خودگشن که تنوع درون گونه‌ای پایینی دارند، می‌باشد (Joshi & Nguyen, 1993).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد این نشانگر می‌تواند در شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی از کارایی لازم برخوردار باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی شبدر ایرانی Samiei و همکاران (۲۰۰۶)، با استفاده از نشانگر مولکولیRAPD بیست توده بومی از گونه مزبور به اثبات رساندند که در شبدر ایرانی گروه‌بندی حاصل از روش RAPD تا حدودی با گروه‌بندی توده‌های شبدر ایرانی بر اساس مبدا جغرافیایی هماهنگی دارد. تنوع ژنتیکی دو جمعیت از گونه بومی نادر *Oxytropis chankaensis* در سواحل غربی دریاچه خانکا در روسیه توسط Artyukova و همکاران (۲۰۰۴)، با استفاده از نشانگر مولکولیRAPD بررسی شد و دریافتند که به‌طور متوسط تفاوت بین جمعیت‌ها حدود ۸ درصد و ناچیز بود. همینطور Dahdeshtian و همکاران (۱۳۹۰)، در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گون سفید (*Astragalus gossypinus* Fisher) در شش مکان در استان اصفهان با توجه به نتایج حاصل از ترادف بین نوکلئوتیدها و باندهای نوکلئوتیدی بر روی الکتروفورز، تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های گون سفید را نشان دادند.

در خصوص تنوع ژنتیکی گیاه دم‌گاوی اطلاعاتی در ایران در دست نیست. به‌منظور شناسایی تنوع ژنتیکی و دید بهتر از نحوه حفاظت از این گونه در زیستگاههای

www.SID.ir

Archive of SID

خشک در این پژوهش تنوع ژنتیکی این گیاه، توسط نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت.

شکل۱- شمای کلی از گیاه دم‌گاوی

مواد و روش‌ها

۱- مواد گیاهی و استخراج DNA

رویشگاه گیاه دم‌گاوی ماسه‌زارهای اطراف کاشان است که منطقه مورد مطالعه موسوم به نوار ریگ بلند و تپه‌های ماسه‌ای اطراف آن می‌باشد که به‌شکل هلالی از جنوب دریاچه نمک واقع در ۷۰ کلیوتری شمال شرق شهر کاشان شروع و تا ۵۵ کیلومتری جنوب شرقی آن ادامه دارد. این ناحیه بین عرض‌های جغرافیایی ′۳۸، °۳۴ و ′۵۳، °۳۳ شمالی و طول‌های جغرافیایی ′۵۳، ° ۵۱ و ´۵۱، °۵۲ شرقی قرار گرفته است. دراین منطقه ۴ سایت مطالعاتی به‌فاصله ۳۰ کیلومتر از هم انتخاب (جدول ۱) و از هر سایت از ۵ پایه گیاه، نمونه برگ جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند تا زمانی که DNA از آنها استخراج شد.

جدول۱- مشخصات جغرافیایی مکان‌های برداشت

شماره سایت	نام مکان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	کمپ ۱	۵۱° ۳۲/۱۹۱´E	۳۴° ۱۰/۵۴۲´N	۲۹۹۲
۲	قندی اباد	۵۱° ۵۰/۶۶۴´E	۳۳° ۵۲/۵۰۵´N	۳۲۶۵
۳	قاسم اباد	۵۱° ۴۹/۵۵۱´E	۳۴° ۰/۵۷۲´N	۳۴۵۱
۴	کمپ ۲	۵۱° ۳۶/۹۱۰´ E	۳۴° ۰/۶۸۳´N	۳۱۸۶

استخراج DNA به‌روش CTAB تغییر یافته انجام شد. بدین شرح که ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه داخل‌هاون چینی ریخته و با استفاده از ازت مایع ساییده شد تا پودر شدند. سپس این پودر را داخل تیوپ ۲ میلی‌لیتری ریخته و ۹۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (حاوی ۲ تا ۳ درصد PVP-40) گرم شده در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد و ۳۰-۲۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول به آن اضافه شد. در این مرحله نمونه‌ها در بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه قرار داده شدند و به آرامی مخلوط شدند. صدو هفتاد میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار و مخلوط نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه و پس از آن افزودن ۸۰۰-۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم: ایزوآمیل الکل به‌نسبت ۱:۲۴ و مخلوط کردن به‌مدت ۱۵ دقیقه از مراحل بعدی کار بود. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۹۵۰۰ دور سانتریفیوژ شده و قسمت بالای نمونه‌های حاصل برداشت شده و به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند. به این نمونه‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محلول CTAB ۵ درصد و NaCl ۰/۷ مولار افزوده شده و به‌مدت ۵ دقیقه مخلوط شدند. سپس ۸۰۰-۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند. مجددا سانتریفیوژ در ۹۵۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه و برداشت روی شناور تکرار شد و در صورت تیره بودن این محصول مجددا مرحله (۲۰۰ میکرولیتر محلول CTAB ۵ درصد و NaCl ۰/۷

www.SID.ir

Archive of SID

مولار افزوده شده و به‌مدت ۵ دقیقه مخلوط شد. مقدار ۸۰۰-۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند. مجددا سانتریفیوژ در ۹۵۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه و برداشت روی شناور) تکرار شد. پس از آن ۰/۶ تا ۱ برابر ایزوپروپانول سرد و مخلوط کردن به‌مدت ۲ تا ۳ دقیقه و سانتریفیوژ در ۹۵۰۰ دور در مدت ۱۰ دقیقه انجام شده و روی شناور حذف و پلیت حاصل با اتانول ۷۵ درصد دو مرتبه شستشو شد. در اخر پلیت‌ها خشک شده و ۱۵ میکرولیتر آب مقطر به آنها اضافه شده و پس از انتقال بر روی ژل در دستگاه Gel document عکس برداری شدند.

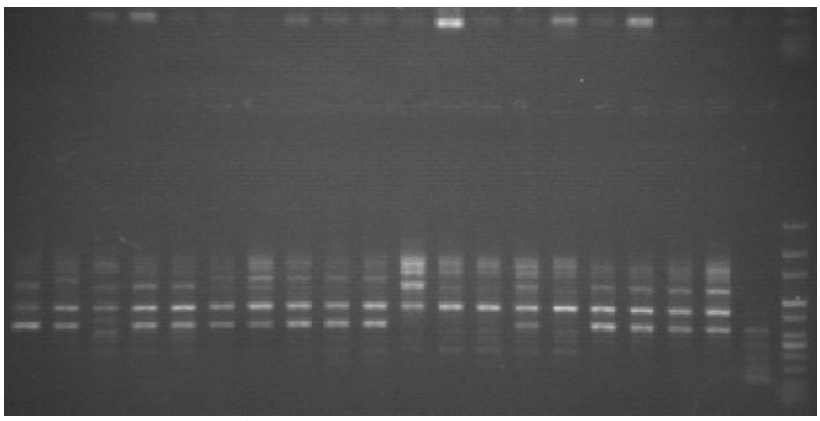
۲- تجزیه RAPD

در مجموع از ۱۱ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی استفاده شد (جدول ۲). واکنش PCR درحجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱/۵ میکرولیتراز (۱-۱۰ 1،MgCl2 25mmµl) میکرولیتر از (۱-۲،NTP10mmµl) میکرولیتر از(آغازگر۱۰ (2،µM میکرولیتر از بافر۱۰ 2،x میکرولیتر DNA الگو (۲۵ (ng، 2/0 میکرولیتراز taq پلیمراز (۱-۱۵µl) و ۱۶/۳ میکرولیتر آب دوبار تقطیر با اضافه نمودن ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی تهیه شد و با برنامه حرارتی ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و برای ۴۵ سیکل : ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد و۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، انجام گرفت. واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلرانجام شد. محصول واکنش در ژل آگاروز ۱/۵٪ و بافر TAE به‌مدت ۲/۵ ساعت با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. پس از آن، ژل در محلول اتیدیم بروماید به‌مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و با استفاده از Gel document عکس‌برداری شد. تصاویر حاصل از ژلها براساس حضور و عدم حضور، به کد صفر و یک تبدیل و پس از انتقال داده‌ها به Excel، توسط نرم‌افزار NTSYS,Ver.2.02e تجزیه و تحلیل شد. ماتریس تشابه براساس ضریب تشابه Dice محاسبه و تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA انجام شد.

نتایج

اطلاعات باندی

جدول ۲ نشان می‌دهد که آغازگرهای مورد استفاده در ۶۱ مکان از ۷۲ مکان دارای چند شکلی بودند (84 درصد از مکانها چند شکلی نشان دادند) و محدوده اندازه باندهای به‌دست آمده بین ۲۰۰ تا ۹۰۰ جفت باز بود. از این رو این آغازگرها برای مطالعه پلی‌مورفیسم و تنوع ژنتیکی در جنس *Smirnovia* بسیار مفیدند. آغازگرهای d بیشترین مکان (12 مکان) را تکثیر کردند. به‌طور متوسط هرآغازگر 4 مکان را شناسایی و تکثیر کرد. آغازگرهای j و g بیشترین نسبت چند شکلی (۱۰۰٪) را نشان دادند. بنابراین این آغازگرها توان بالایی را در تفکیک و گروه‌بندی و جداسازی بین گونه‌ها و درون گونه‌ها دارند، زیرا تعداد لوکوس‌های شناسایی شده در ژنوم *Smirnovia* در دامنه ۱-۱۲ لوکوس با میانگین ۴ لوکوس و نسبت چندشکلی ۸۴ درصد می‌باشند.



شکل ۲- نمونه ژل مربوط به الگوی باندی آغازگر j

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده ونتایج تجزیه **RAPD**

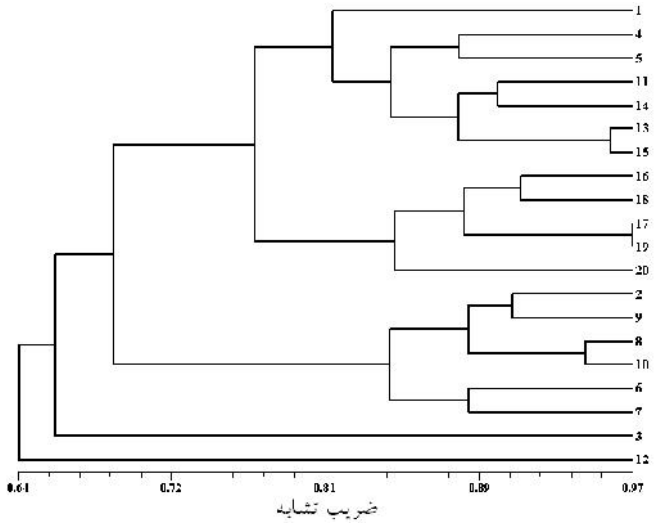
نام	توالی	تعداد مکان تکثیر شده	مکان چند شکلی	نسبت چندشکلی
A	۵′- CTT CGG TGT G -۳′	۱۰	۹	٪۹۰
B	۵′- AGT CGT CCC C -۳′	۸	۴	٪۵۰
C	۵′- CCA CAG CAG T -۳′	۵	۴	٪۸۰
D	۵′- GAG CCC TCC A -۳′	۱۲	۱۱	٪۹۱/۷
E	۵'- CTC CTG CCA A -۳'	۱	۱	٪۱۰۰
F	۵′- CCT GGG CCT A -۳′	۲	۱	٪۵۰
G	۵′- AAT GCC CCA G-۳′	۱۰	۱۰	٪۱۰۰
H	۵′- CTG AGA CGG A -۳′	۸	۷	٪۸۷/۵
I	۵′- AGT CAGCCA C -۳′	۵	۴	٪۸۰
J	۵′- AGG GAA CGA G -۳′	۶	۶	٪۱۰۰
K	۵′- GTA GAC CCG T -۳′	۵	۴	٪۸۰
کل	-	۷۲	۶۱	٪۸۴
میانگین		۶.۵۴	۵/۵۴	

تجزیه خوشه‌ای

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۰ نمونه از ۴ سایت مختلف بر اساس ماتریس تشابه (جدول ۳) در ضریب تشابه ۰/۸۱ به ۵ گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۲). گروه A شامل ۷ نمونه که در ضریب تشابه ۰/۸۸ به سه زیرگروه A1 وA2 و A3 تقسیم شدند. زیر گروه A1 شامل نمونه ۱ (از سایت اول)، زیر گروه A2 شامل نمونه‌های ۴ و ۵ (از سایت اول) و زیر گروه A3 شامل نمونه‌های ۱۱، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ (از سایت ۳) بودند. در این زیرگروه گونه‌های نمونه‌های ۱۳ و ۱۵ بیشترین تشابه (۰/۹۶) را داشتند و نمونه‌های ۱۱ و ۱۴ دارای متوسط تشابه ۰/۹۰ بودند. گروه B شامل نمونه‌های ۱۶و ۱۷ و ۱۸ و ۱۹ و ۲۰ می‌باشد که همگی متعلق به سایت ۴ بوده و نمونه‌های ۱۶ و۱۸ دارای تشابه ۰/۹۱ و نمونه‌های ۱۷ و ۱۹ دارای تشابه ۰/۹۷ بودند (جدول ۳). گروه C دارای ۶ نمونه شامل نمونه‌های ۶ و ۷ که در درجه تشابه ۰/۸۷ به‌دو زیر گروه C1 وC2 تقسیم شدند. زیر گروه C1 شامل چهار نمونه : ۲، ۹، ۸ و۱۰ که نمونه‌های ۲ و ۹ از دو سایت متفاوت ۱ و ۲ بوده و دارای تشابه ۰/۹۱ و نمونه‌های ۸ و ۱۰ هر دو از سایت بوده و دارای درجه تشابه ۰/۹ بود. زیر گروه C2 متشکل از نمونه‌های ۶ و ۷ با درجه تشابه ۰/۸۸ بود . گروه D و E هر دو دارای یک نمونه و به‌ترتیب شامل نمونه‌های ۳ (از سایت اول) و نمونه ۱۲ (از سایت سوم) بودند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای ۴ سایت و ۲۰ نمونه . روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه Dice

جدول ۳- ماتریس تشابه به روش Dice بین جفت نمونه ها

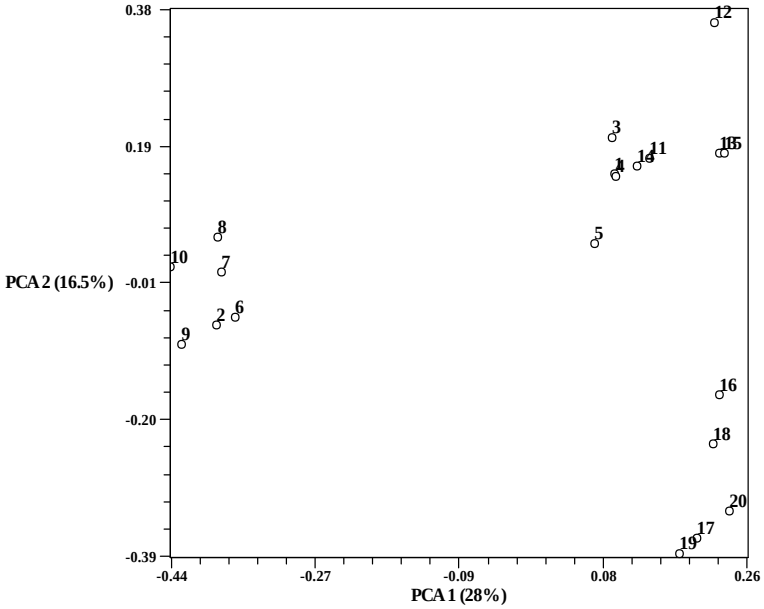
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
۱	۱																			
۲	/۷	۱																		
۳	/۶۴	/۶۱	۱																	
۴	/۸۷	/۷	/۷۰	۱																
۵	/۸۰	/۷۱	/۶۵	/۸۸	۱															
۶	/۶۴	/۸۵	/۶۹	/۶۹	/۶۸	۱														
۷	/۶۸	/۸۵	/۶۵	/۷۳	/۶۹	/۸۸	۱													
۸	/۷۱	/۸۴	/۵۸	/۷۸	/۷۴	/۷۸	/۸۵	۱												
۹	/۶۷	/۹۱	/۶۱	/۷۰	/۷۱	/۸۲	/۸۷	/۸۹	۱											
۱۰	/۷۰	/۸۸	/۵۹	/۷۷	/۷۵	/۸۱	/۸۹	/۹۵	/۹۲	۱										
۱۱	/۷۷	/۷۰	/۷۵	/۸۷	/۸۵	/۶۷	/۷۳	/۷۶	/۶۷	/۷۲	۱									
۱۲	/۶۷	/۵۶	/۶۶	/۶۷	/۶۵	/۵۱	/۵۷	/۶۱	/۵۴	/۵۷	/۷۲	۱								
۱۳	/۸۰	/۷۱	/۷۴	/۸۶	/۷۹	/۶۸	/۷۲	/۷۰	/۶۸	/۶۸	/۸۸	/۷۸	۱							
۱۴	/۸۳	/۷۴	/۶۹	/۸۸	/۸۴	/۶۹	/۷۵	/۷۷	/۷۲	/۷۶	/۹۰	/۷۷	/۹۲	۱						
۱۵	/۷۸	/۶۶	/۷۴	/۸۷	/۷۷	/۶۸	/۷۲	/۶۵	/۶۶	/۶۶	/۸۴	/۷۳	/۹۶	/۸۸	۱					
۱۶	/۷۶	/۶۸	/۶۸	/۷۸	/۷۲	/۶۸	/۶۷	/۶۷	/۶۸	/۶۴	/۷۶	/۷۰	/۸۲	/۸۰	/۸۰	۱				
۱۷	/۷۱	/۶۸	/۶۵	/۷۶	/۷۷	/۶۸	/۶۹	/۶۵	/۶۸	/۶۶	/۷۶	/۵۹	/۷۷	/۷۸	/۷۵	/۸۵	۱			
۱۸	/۷۷	/۷۰	/۶۷	/۸۰	/۸۰	/۷۲	/۷۱	/۶۹	/۷۰	/۶۷	/۸۲	/۶۷	/۸۴	/۸۴	/۸۲	/۹۱	/۸۹	۱		
۱۹	/۷۱	/۷۱	/۶۵	/۷۶	/۷۷	/۶۸	/۶۹	/۶۷	/۷۱	/۶۸	/۷۶	/۵۹	/۷۷	/۷۸	/۷۵	/۸۵	/۹۷	/۹۲	۱	
۲۰	/۶۸	/۶۵	/۶۱	/۷۳	/۷۳	/۵۸	/۶۱	/۶۲	/۶۵	/۶۳	/۷۳	/۵۸	/۷۶	/۷۵	/۷۴	/۷۹	/۸۵	/۸۶	/۹	1

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

تجزیه PcoA (Principal Coordinate Analysis) نشان داد که دو مؤلفه اول بیش از ۴۴٪ از کل واریانس را توجیه می‌کنند. گروه‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه بر اساس دو مؤلفه (شکل ۳) نمونه‌ها را در ۴ گروه قرار داد که با گروهبندی افراد براساس تجزیه خوشه‌ای در تشابه ۰/۸۱ تقریبا مطابقت دارد. لذا تجزیه به مختصات اصلی وقتی که مؤلفه اول که ۲۸٪واریانس موجود در بین افراد جمعیت را توجیه می‌کنند توان تفکیک و گروه‌بندی بالایی را دارد (Mohammadi & Prasanna ,2003). نتایج به‌دست آمده بر اساس این روش نشان داد که نمونه‌های ۱، ۴، ۳، ۵، ۱۰، ۱۱، ۱۳ و ۱۵ در یک گروه، نمونه‌های ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰و۲ در یک گروه، نمونه‌های ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹و۲۰ در یک گروه و نمونه ۱۲ در یک گروه مستقل واقع شده‌اند.



شکل۴- گروهبندی نمونه‌های مورد مطالعه براساس تجزیه به مختصات اصلی

بحث

تجزیه خوشه‌ای انجام شده براساس ماتریس تشابه، در جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد نزدیکترین افراد مربوط به دو نمونه (۱۶و ۱۷) از سایت ۴ با ضریب تشابه ۰/۹۷ و دورترین آنها با ضریب تشابه ۰/۶۴ مبین تفاوت‌های ژنتیکی بالاست. از بین ۴ سایت تحت مطالعه فقط افراد سایت ۴ (کمپ۲) با ضریب تشابه ۰/۸۵ در یک گروه مجزای B کنار هم قرارگرفتند که بیانگر این است که این نمونه‌ها تشابه بالایی با هم دارند و به نقاط دیگر پراکنده نشده‌اند. در حالیکه نمونه‌های مناطق دیگر در جاهای مختلف دندروگرام قرار گرفتند که می‌تواند به‌دلیل جابجایی نمونه‌ها از یک منطقه به‌منطقه دیگر باشد. حضور نمونه‌های سایت ۱ در گروه‌های متفاوت (A، C و D) و همراه با نمونه‌های سایت‌های ۲و ۳ که عدم مطابقت توزیع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد، می‌تواند ناشی از جابجایی بذور به‌مناطق جغرافیایی از طریق مهاجرت یا بادهای شدید این مناطق بوده و یا اینکه برای حصول نتیجه دقیق پرایمر بیشتری مورد نیاز است در این میان سه نمونه از این سایت۱ شامل نمونه‌های ۱، ۴ و ۵ با چهار نمونه از سایت ۳ (۱۱، ۱۴، ۱۳ و ۱۵)، که از منطقه جغرافیایی کاملا مجزایی از هم هستند (جدول ۱)، تشابه زیادی را نشان دادند (۰/۸۱). این تشابه را شاید بتوان مربوط به داشتن جد مشترک نمونه‌های این دو سایت دانست.

www.SID.ir

Archive of SID

به طورکلی تنوع مشاهده شده بین و درون گونه‌ای جنس *Smirnovia* در این مطالعه شاید به‌علل زیر باشد:

۱-تشابه ژنتیکی زیاد به‌دست آمده از RAPD برای افرادی درون یک سایت، شاید بخشی از آن به‌علت غلبه روش تکثیر غیر جنسی (ریزوم) در این گیاه است. در طبیعت به‌ندرت از طریق بذر تکثیر می‌شود. زیرا کپسول در اوائل خرداد ماه توسط باد از گیاه جدا شده و تا اسفند ماه که زمان مناسب برای سبز شدن گیاه است، کمتر فرصت می‌یابد که از تلاطم شنزار، در امان مانده و با استفاده از باران سبز شود و اکثرا در دره‌های شنی مدفون می‌شود. ضمنا بذور دم‌گاوی خیلی زود قوه نامیه خود را از دست می‌دهند و آفات شدیدا به آن حمله می‌کنند. این گیاه پس از استقرار در شنزار به‌صورت خود به‌خود تکثیر می‌شود. گیاه دارای دو نوع ریشه افقی و عمودی است و از طریق ریشه‌های افقی خود به‌فواصل یک‌متر نهال جوانی را به بالا می‌فرستد و بدین ترتیب تپه شنی را به‌نحو بسیار ظریفی اتصال می‌دهد و به‌صورت مجموعه‌هایی در ماسه‌زار در می‌آید.

۲- اگرچه همبستگی کاملی بین فاصله‌های ژنتیکی و جغرافیایی وجود ندارد اما تنوع جغرافیایی و اکولوژیکی زیستگاه‌های واریته‌ها و گونه‌های مختلف در ایجاد تنوع موثر است (Dheif *et al.*, 2011 ; Sangeeta *et al.*, 2009). جدا افتادن کامل نمونه‌های سه سایت ۲، ۳ و ۴ براساس اطلاعات به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه اصلی می‌تواند نشانگر تنوع ژنتیکی بین گونه‌های موجود این گیاه در سه مکان مورد مطالعه باشد. با توجه به‌یکسان بودن شرایط آب و هوایی و خاک در سایت‌های مورد برداشت به‌نظر می‌رسد بتوان ادعا کرد اختلاف ژنتیکی بین گونه‌های مورد مطالعه در سایت‌های مختلف یا ناشی از تفاوت میکروکلیمای این سایتهاست و یا نشان‌دهنده زیرگونه‌های مختلف از این گونه است که علی‌رغم شباهت‌های ظاهری بسیار نزدیک به‌هم، تفاوت ژنتیک آنها منجر به اختلافات ظاهری ناشناخته در آنها شده است که مطالعات سیستماتیک و گیاه‌شناسی بیشتری را می‌طلبد.

منابع مورد استفاده

- Artyukova, E.V., Kholina, A.B., Kozyrenko, M.M. and. Zhuravlev, Yu.N., 2004. Analysis of genetic variation in rare endemic species *Oxytropis chankaensis* (Fabaceae) using RAPD markers. Russian Journal of Genetics. 40: 710-716.
- Fernandes, M.E., Figueiras, A.M. and Beenito, C., 2002.The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoretical and Applied Genetics. 104: 845-858.
- Joshi, C.P. and Nguyen, H.T., 1993. RAPD (Random amplified polymorphic DNA) analysis based on intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. Plant Science. 93: 95-103.
- Majid, M., 1996. Some ecological characters study of *Smirnovia turkestana*. Natural Resources and Animal Huasbandary Research Center of Esfahan Provience, Isfahan, Iran.
- Mohammadi, S.A., and Prasanna, B. M., 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations Crop Science. 43:1235–1248 (Review& interpretation).
- Powell, W., Morgante, M. and Andre, C., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. Molecular Breeding. 2: 225-238
- Ramantha, R., and Riley, R., 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. Plant Genetic Resource News. 97:3-20
- Runo, M.S. and Muluvi, G.M., 2004. Analysis of genetic structure in Melia volkensii (Gurke.) population using random amplified polymorphic DNA. African Journal of Biotechnology. 3: 421-425
- Sabeti, H., 1994. The Iranian's Forests, Trees and Shrubs. The Publications of the University of Yazd, Yazd, Iran.
- Samiei, K., Arzani, A. and Mirmohammad Mibodi, M., 2006. Evaluation of genetic diversity in native accessions of Trifolium resupinatum from Iran using RAPD markers. Agricultural Science and technology. 20: 61-69.
- Strelchenko P., Street, K., Mitrofanova, O., Mackay, M., Chabane, K. and Valkoun, J., 2003. The genetic relationships between hexaploid wheat landraces from different geographical origin. In 'Proceedings 10th International Wheat Genetics Symposium.: 2; 637-640

www.SID.ir

Archive of SID

Genetic diversity of *Smirnovia iranica* Sabeti species from Iran using RAPD markers

M. Ghavam [*1], M.R. Naghavi [2], H. Azarnivand [3] and A. Tavili[3]

1*- Corresponding author, Assist. Prof., Department of Natural Resources and Earth Sciences, University of Kashan, Kashan, I.R.Iran, Email: mghavam@kashanu.ac.ir
2- Prof., Department of Agriculture, University of Tehran,Tehran, I.R.Iran
3- Prof., Department of Natural Resources, University of Tehran,Tehran, I.R.Iran
4- Assoc. Prof., Department of Natural Resources, University of Tehran,Tehran, I.R.Iran

Received: 11.11.2012 Accepted: 11.05.2014

Abstract

Smirnovia iranica Sabeti is an endemic shrub species in Fabaceae family. It is found in sand dunes of central parts of Iran. It is very important for soil conservation, forage, landscape and medicinal values. RAPD is a useful genetic marker to determine polymorphism and relationship among plant species. In order to evaluate genetic diversity within and between *Smirnovia iranica* populations by 11 RAPD primers, 20 samples were collected from 4 sites of sand dune of Kashan. According to diversity indices, Dice similarity, cluster analysis and band information a total of 72 bands were amplified and 61 of the bands were polymorphic. Cluster analysis revealed a high amount of diversity among the studied samples. The most similar samples with 0.97 similarity were found in site 4, while the least similarity (0.65) was obtained for samples from different sites. Cluster analysis classified the samples in five groups. Two groups had only one sample. However, the other samples were distributed in other three groups one of which contained all samples of site 4. There was relatively fair coordination between genetic divergence and geographical origins.

Keywords: Cluster analysis, genetic diversity, RAPD, similarity, *Smirnovia iranica*.

www.SID.ir