

بررسی تنوع آللی لوکوس‌های ریزماهوارة ژنومی گندم نان در جمعیت‌های گندم نیای وحشی *Aegilops triuncialis*

علی اشرف مهرابی^{۱*}، سمیرا محمدی^۲، صغری ولیان^۳ و محمود خسروشاهلی^۴

۱ و ۲. دانشیار و کارشناس ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

۳ و ۴. کارشناس ارشد و استاد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی،

دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (تهران)

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۲۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱/۱۸)

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۳۵ جمعیت *Aegilops triuncialis* L. از ۱۷ مکان ریزماهوارة ژنومی انتخاب شده از میان ۵۶ جفت آغازگر ریزماهوارة برگرفته از ژنوم‌های A و D گندم نان استفاده شد. در مجموع ۷۱ آلل برای تمامی مکان‌های SSR مشاهده شد که ۶۸ آلل دارای چندشکلی بودند. آلل‌ها در دامنه ۱ تا ۸ آلل و با میانگین ۴/۱۸ آلل برای هر مکان ژنی قرار داشتند. محتوای اطلاعات چندشکلی از ۰/۵۹۳ در نشانگرهای Xgwm30-2D، Xgwm383-3D و Xgwm654-5D تا ۰/۸۶۱ در نشانگر Xgwm156-5A متغیر بود. همچنین شاخص نشانگر از ۱/۷۷۹ تا ۶/۸۸۸ متفاوت بود. میانگین فاصله ژنتیکی محاسبه شده برابر ۰/۸۵۹ بود و کمترین فاصله ژنتیکی ۰/۲۳۱ (بین دو جمعیت از لرستان و خوزستان) و بیشترین فاصله ژنتیکی نیز با میزان یک برای تعدادی از جمعیت‌ها به دست آمد. روش‌های گروه‌بندی خوشه‌ای نتوانست جمعیت‌ها را به طور کامل از هم تفکیک کند و عدم ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان داد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی زیاد این جمعیت‌هاست. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۱۰۰ درصد تنوع کل مربوط به تنوع درون‌گروهی است و هیچ آلل اختصاصی برای جمعیت‌های ارزیابی شده مشاهده نشد. این تنوع و انتقال‌پذیری نشانگرهای SSR شناخته شده در گندم‌های زراعی به سایر گونه‌های گندم نشان می‌دهد که نشانگرهای SSR ابزار کارآمدی برای مدیریت منابع ژنتیکی خویشاوندان وحشی گندم‌اند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، نشانگر SSR، *Aegilops triuncialis* L.

مقدمه

گونه *Aegilops triuncialis* L. گیاهی یکساله، خودگشن و متعلق به خانواده Poaceae و طایفه Triticeae است. این گونه آلوپلوئید (2n=4x=28) با ژنوم UUCC است که از تلاقی گونه‌های دیپلوئید *Ae. umbellulata* (2n=2x=14) با ژنوم UU و *Ae. caudata* (2n=2x=14) با ژنوم CC به وجود آمده است. گونه *Ae. triuncialis* گسترده‌ترین گونه *Aegilops* در جهان است

(Vanichanon et al., 2003). این گونه منبع بسیار خوبی از مقاومت در برابر بیماری‌های مختلف گندم، از جمله زنگ برگ است (Aghaee-Sarbarzeh et al., 2001). همچنین دارای ژن‌های مقاومت به نماتد Cyst غلات است (Romero et al., 1998). سازگاری زیاد این گونه، ممکن است از ویژگی‌های ژنتیکی پلی‌پلوئیدی مانند تنوع ژنتیکی زیاد و تکامل عملکردهای ژن جدید منتج شود (Soltis & Soltis, 2000).

دندروگرام‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای، گونه‌های *Aegilops* مورد مطالعه در سه گروه اصلی جای گرفتند و گونه‌های با ژنوم مشترک در یک گروه قرار داده شدند. Fathi et al. (2014) تنوع ژنتیکی ۴۰ توده از گونه *Ae. triuncialis* مع‌آوری شده از ۱۳ استان در مناطق غربی ایران را با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR بررسی کردند. تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های بررسی شده را در سه گروه اصلی گروه‌بندی کرد.

هدف این تحقیق مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Ae. triuncialis* جمع‌آوری شده از چند منطقه ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهوره و استفاده از اطلاعات به‌دست‌آمده در مدیریت بهتر ژرم‌پلاسما موجود و استفاده بهینه از آن در برنامه‌های به‌زادی است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از بذور ۳۵ جمعیت *Ae. triuncialis* که از ۱۲ استان شامل اردبیل، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، همدان، کردستان، کرمانشاه، لرستان، ایلام، چهارمحال و بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد، خوزستان و فارس جمع‌آوری شده بود، استفاده شد (جدول ۱).

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی به‌صورت بالک از بافت برگ گیاهچه‌های دو تا سه‌برگی رشدیافته در گلدان (پنج گیاهچه از هر جمعیت)، به‌روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) براساس دستورالعمل Doyle & Doyle (1987) با اندکی تغییر استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA نمونه‌ها با استفاده از روش الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و نیز روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی شد و غلظت DNA نمونه‌ها تا حد ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد.

مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

۳۵ جفت نشانگر ریزماهوره روی ژنوم A و ۲۱ جفت نشانگر از ژنوم D گندم نان در این بررسی استفاده شد که جداسازی این نشانگرهای ریزماهوره از ژنوم گندم

اولین گام در مدیریت مؤثر منابع ژنتیکی و ذخایر توارثی گیاهی، داشتن اطلاعات کامل از میزان تنوع ژنتیکی است و با دانستن ساختار ژنتیکی گونه‌های وحشی، اصلاحگران قادر به شناسایی و بهره‌برداری بهتر از تنوع در برنامه‌های اصلاحی و همچنین قادر به مدیریت مؤثر منابع ژنتیکی از طریق تعیین حجم نمونه‌های ذخایر توارثی برای نگهداری در بانک ژن یا بذر و شناسایی همنامی و ترادف‌ها خواهند بود (Falahati-Anbaran et al., 2006). از جمله نشانگرهای مبتنی بر DNA، نشانگرهای ریزماهوره‌اند که به‌علت سطوح زیاد چندشکلی، چندآلی بودن، وراثت هم‌بارز، پوشش وسیع ژنومی و همچنین سهولت آشکارسازی و تشخیص کاربرد فراوانی دارند (Plaschke et al., 1995).

مطالعات مختلفی درباره بررسی تنوع ژنتیکی بعضی از گونه‌های *Aegilops* انجام گرفته است. در مطالعه Okuno et al. (1998)، در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی بین ۱۱۲ توده از *Ae. tauschii* (ژنوم DD)، *Ae. cylindrica* (ژنوم CCDD)، *Ae. crassa* (ژنوم DDMM)، *Ae. biuncialis* (ژنوم UUMM) و *Ae. triuncialis* (ژنوم UUCC) جمع‌آوری شده از آسیای مرکزی و شمال منطقه قفقاز به‌وسیله نشانگر RAPD، گونه‌های *Aegilops* به‌طور کلی به دو گروه اصلی، یکی شامل گونه‌های با ژنوم D و دیگری شامل گونه‌های با ژنوم U تقسیم شدند. Ranjbar et al. (2008) تنوع ژنتیکی ۷۰ نمونه *Ae. crassa* جمع‌آوری شده از ۱۵ استان در ایران را با استفاده از ۲۱ جفت آغازگر SSR بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که هیچ‌گونه ارتباط جغرافیایی و مولکولی بین نمونه‌های مورد بررسی وجود ندارد که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی این نمونه‌هاست. پژوهش Ghavibazoo et al. (2011) نشان داد که جمعیت‌های *Ae. triuncialis* دارای تنوع زیادی از نظر زیرواحدهای گلوئین با وزن مولکولی کم هستند و تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها نشان داد که رابطه قابل قبولی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی وجود ندارد. Jam Baranduzi et al. (2013) برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۶ توده از ۶ گونه *Aegilops* شامل *Ae. tauschii*، *Ae. cylindrica*، *Ae. crassa*، *Ae. triuncialis*، *Ae. biuncialis* و *Ae. umbellulata* از ۱۷ آغازگر ISSR استفاده کردند. در

شده بود، به این صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و به‌ازای هر چرخه، ۰/۵ درجه از دمای اتصال کاهش یافت تا به دمای اتصال واقعی رسید. در ۲۵ چرخه بعد دمای اتصال ثابت بود (بسته به دمای اتصال آغازگر متفاوت بود) و با زمان ۳۰ ثانیه انجام گرفت. در هر چرخه نیز زمان و دمای واسرشته‌سازی به‌ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۴ درجه سانتی‌گراد بود. زمان و دمای بسط رشته نیز به‌ترتیب ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه بود. قطعات DNA تکثیرشده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE، 1X (Tris Borate EDTA) تفکیک شد و جهت رنگ‌آمیزی ژل از محلول اتیدیوم برمایید استفاده شد.

نان قبلاً توسط Roder *et al.* (1998) شرح داده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (غلظت ۱۰۰ نانوگرم)، ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs ۱ میلی‌مولار، ۰/۱۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رو به جلو (Forward) و رو به عقب (Reverse) (غلظت ۱۰۰ پیکومول)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۵ واحد) که در نهایت با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۵ میکرولیتر رسید، انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر BioRad با برنامه زمانی ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، و ۳۵ چرخه حرارتی انجام گرفت که ۱۰ چرخه اول به‌صورت تاچ‌داون (Touchdown) برنامه‌ریزی

جدول ۱. جمعیت‌های *Aegilops triuncialis* استفاده‌شده در این تحقیق

کد	محل جمع‌آوری	کد	محل جمع‌آوری
A1	جاده اردبیل - مشکین‌شهر	A19	ناغان - ایذه
A2	لرستان - منطقه چغلووندی	A20	جاده یاسوج - بروجن - ۶۰ کیلومتر تا بروجن
A3	سرابله - دامنه مانشت کوه	A21	جاده شیراز - مهارلو
A4	جاده اسدآباد - همدان	A22	۳۰ کیلومتری خرم‌آباد - سپیددشت
A5	ارتفاعات مشرف به شهر سرابله	A23	جاده دهدز - اردل
A6	۱۰ کیلومتری اهر - کلیبر	A24	جاده بوکان - مهاباد
A7	جاده خرم‌آباد - اندیمشک - منطقه شوراب	A25	کاکارضا - دیواندره
A8	ابتدای جاده الیگودرز - دورود	A26	جاده سی‌سخت - بروجن - ۱۱۵ کیلومتر تا بروجن
A9	جاده هرسین - نورآباد - نزدیک روستای چغاسعید	A27	جاده اردبیل - سرعین - ۱۵ کیلومتری سرعین
A10	چهارمحال و بختیاری - شلمزار	A28	جاده فیروزآباد - خرم‌آباد
A11	جاده کامفیروز - سپیدان	A29	یاسوج - محله زیرتل
A12	بعد از گردنه شلمزار	A30	کیلومتر ۱۰ جاده شیراز - سپیدان - روستای کلتان
A13	ابتدای جاده خرم‌آباد - سپیددشت	A31	جاده کرمانشاه - کامیاران - ۵ کیلومتری کامیاران
A14	خوزستان - جاده دهدز	A32	جاده هرسین - تمرگ
A15	سرابله - دامنه مانشت کوه	A33	خوزستان - ناغان
A16	جاده ایذه	A34	چهارمحال و بختیاری - شهرکرد
A17	جاده آذر شهر - بناب - ۳۰ کیلومتری بناب	A35	جاده سپیدان - یاسوج
A18	لرستان - دلفان		

در این فرمول P_i بیانگر فراوانی آلل i ام؛ P_j بیانگر فراوانی آلل j ام؛ و k بیانگر تعداد آلل است. همچنین میزان شاخص نشانگر یا (Marker Index) MI با استفاده از فرمول $MI = PIC \times N \times \beta$ (Powell *et al.*, 1996) محاسبه شد، به‌طوری که PIC میانگین میزان اطلاعات چندشکلی برای هر جفت آغازگر، N تعداد کل

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی براساس وجود باند (۱) و نبود باند (۰) انجام گرفت. میزان اطلاعات چندشکلی یا PIC (Polymorphic Information Content) با استفاده از رابطه ۱ (Naghavi *et al.*, 2007) محاسبه شد:

$$PIC = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k p_i p_j (1 - p_i p_j) \quad (1)$$

آغازگر، به طور جداگانه محاسبه شد که نتایج در جدول ۲ آمده است. بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی در بین نشانگرهای دارای چندشکلی با مقدار ۰/۸۶۱ مربوط به نشانگر Xgwm156-5A و کمترین آن با ۰/۵۹۳ مربوط به نشانگرهای Xgwm30-2D، Xgwm383-3D و Xgwm654-5D است. میانگین محتوای چندشکلی ۰/۷۳۳ بود که با نتایج گزارش شده در مطالعات قبلی مکان‌های ریزماهوره در گندم، توسط Prasad *et al.* (1995) Röder *et al.* (2000) با میانگین ۰/۷۱ و Prasada *et al.* (2000) با میانگین ۰/۷۱ مطابقت داشت. در بررسی Shiri *et al.* (2009) محتوای اطلاعات چندشکلی از ۰/۳۷ تا ۰/۹۲ متغیر و میانگین آن ۰/۷۵ بود. نتایج مطالعات انجام گرفته با آغازگرهای ریزماهوره و همچنین این بررسی بیانگر این است که محتوای چندشکلی، همبستگی مثبتی با تعداد آلل تولیدی توسط هر نشانگر دارد. بیشترین شاخص نشانگر با مقدار ۶/۸۸۸ مربوط به نشانگر Xgwm156-5A و کمترین میزان با مقدار ۱/۷۷۹ مربوط به نشانگرهای Xgwm30-2D، Xgwm383-3D و Xgwm654-5D بود. میانگین شاخص نشانگر ۳/۶۹ بود.

در این تحقیق برای مشخص کردن بهترین شاخص فاصله و مناسب‌ترین الگوریتم برای ترسیم دندروگرام، شاخص‌های فاصله دایس و جاکارد با روش‌های اتصال میانگین (UPGMA) و اتصال مجاور (NJ) با استفاده از نرم‌افزار DARwin 5.0 محاسبه و براساس ضرایب کوفنتیک حاصل از آزمون مانتل (Montel test) با استفاده از نرم‌افزار XLSTAT 2013 مقایسه شدند. نتایج نشان داد که شاخص دایس و الگوریتم UPGMA در آزمون مانتل ضریب کوفنتیک بالاتری (۰/۹۶۹) نشان دادند؛ در نتیجه در گزارش نتایج از آنها استفاده شد. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها با استفاده از ماتریس فاصله دایس محاسبه شد که بر این اساس میانگین فاصله ژنتیکی محاسبه شده ۰/۸۵۹ بود و کمترین فاصله ژنتیکی ۰/۲۳۱ (بین دو جمعیت از لرستان و خوزستان) و بیشترین فاصله ژنتیکی نیز با میزان یک برای تعدادی از جمعیت‌ها به دست آمد.

با استفاده از داده‌های حاصل از ماتریس فاصله دایس و الگوریتم UPGMA، گروه‌بندی جمعیت‌ها با

باند‌ها برای هر جفت آغازگر و β نسبت چندشکلی برای هر جفت آغازگر است. شاخص‌های فاصله دایس (Dice) و جاکارد (Jaccard) همراه با روش‌های اتصال میانگین یا UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic average) و اتصال مجاور یا NJ (Neighbor Joining) با استفاده از نرم‌افزار DARwin 5.0 (Perrier *et al.*, 2003) محاسبه و با استفاده از نرم‌افزار XLSTAT (Addinsoft, New York, USA) 2013 مقایسه شدند. از نسخه ۳/۱ نرم‌افزار MEGA (Kumar *et al.*, 2004) برای تجزیه خوشه‌ای و محاسبه فاصله ژنتیکی درون گروه‌ها استفاده شد و سپس با استفاده از نسخه ۶/۴۱ نرم‌افزار GenAlEx (Peakall & Smouse, 2006) فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، میزان مکان‌های چندشکل، شاخص تصحیح شده هتروژنی و شاخص اطلاعات شانون محاسبه شد و تجزیه واریانس مولکولی یا AMOVA (Analysis of Molecular Variance) نیز انجام گرفت.

نتایج و بحث

از ۳۵ جفت نشانگر مربوط به ژنوم A و ۲۱ جفت نشانگر مربوط به ژنوم D، به ترتیب ۱۰ (۲۸/۶ درصد) و ۷ (۳۳/۳ درصد) جفت نشانگر انتخاب و امتیازدهی شدند. از این ۱۷ جفت نشانگر، ۱۴ جفت پلی‌مورف بودند و ارزیابی‌ها براساس آنها صورت گرفت. در مجموع ۷۱ آلل مشاهده شد که ۶۸ آلل دارای چندشکلی بودند، به طوری که تعداد آلل برای هر آغازگر از ۱ تا ۸ متغیر بود (جدول ۲). نشانگر Xgwm156-5A با ۸ آلل بیشترین و نشانگرهای Xgwm126-5A، Xgwm372-2A و Xgwm111-7D با یک آلل کمترین تعداد آلل را در میان آلل‌های تولیدی توسط هر آغازگر داشتند. میانگین تعداد آلل نیز ۴/۱۸ برای هر جفت نشانگر بود که با نتایج Kharestani *et al.* (2013) با ۲ تا ۹ آلل در هر لوکوس ریزماهوره و میانگین ۴/۱۰ مطابقت داشت. در مشاهدات Esmaili *et al.* (2012) نیز تعداد آلل‌ها بین ۲ تا ۷ متغیر بود و میانگین تعداد آلل‌ها برای هر لوکوس ۴/۶ محاسبه شد.

با استفاده از فراوانی آللی، میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) برای هر

نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی زیاد آنهاست. از طرف دیگر بسیاری از جمعیت‌هایی که در یک گروه قرار گرفته‌اند از مناطق جغرافیایی متفاوت‌اند که این مورد دلیل تشابه ژنتیکی گسترده این جمعیت‌ها در مناطق مختلف کشور است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به‌نظر می‌رسد که این گونه با تنوع زیاد و تقریباً یکنواخت در شمال غرب، غرب و جنوب غرب ایران وجود دارد. نتایج این پژوهش با یافته‌های پژوهش‌های *Ghavibazoo et al.* (2011) و *Fathi et al.* (2014) در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Ae. triuncialis* مطابقت دارد. *Fathi et al.* (2014) یکی از دلایل تطابق کم بین تنوع ژنتیکی و منشأ جغرافیایی را قابلیت جابه‌جایی توسط چهارپایان بیان کردند؛ زیرا این گیاه به‌دلیل وجود در مراتع و داشتن ریشک ممکن است توسط چهارپایان جابه‌جا شوند.

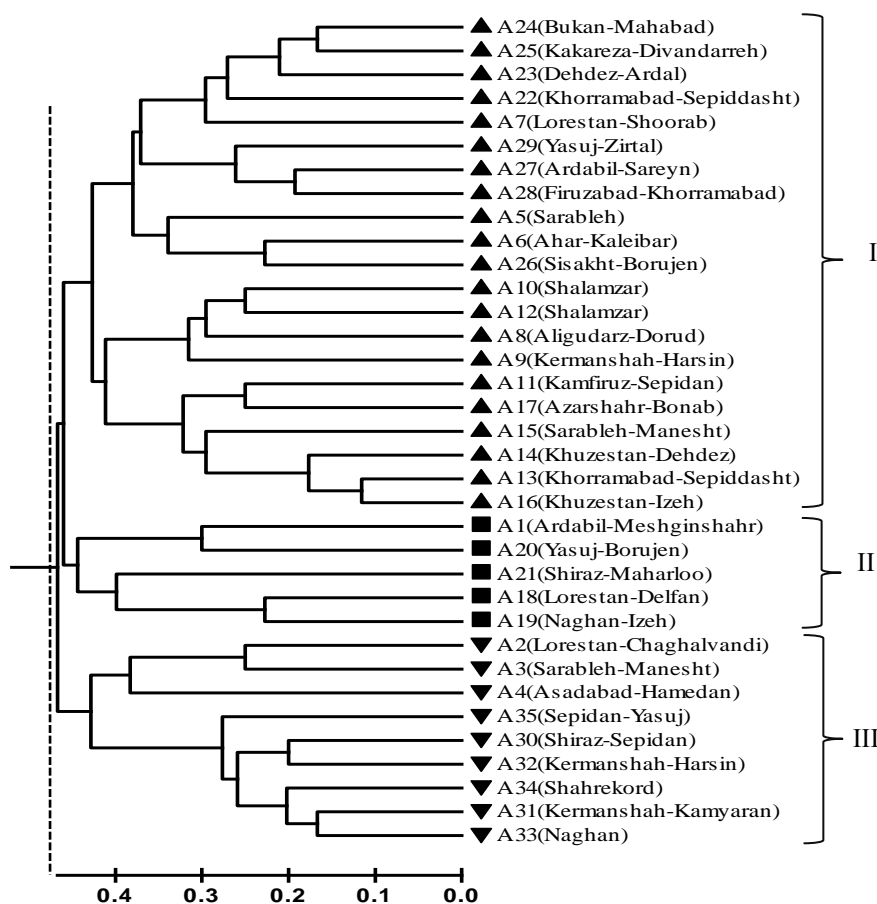
نسخه ۳/۱ نرم‌افزار MEGA انجام گرفت. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای (شکل ۱)، قادر به گروه‌بندی براساس مناطق جغرافیایی نبوده و جمعیت‌ها را در سه گروه عمده قرار داد. در گروه اول، ۲۱ جمعیت از استان‌های لرستان، چهارمحال و بختیاری، آذربایجان غربی، کردستان، ایلام، آذربایجان شرقی، اردبیل، کهگیلویه و بویراحمد، کرمانشاه، فارس و خوزستان؛ در گروه دوم ۵ جمعیت از استان‌های اردبیل، کهگیلویه و بویراحمد، فارس، لرستان و خوزستان؛ و در گروه سوم ۹ جمعیت از استان‌های لرستان، ایلام، همدان، فارس، کرمانشاه، چهارمحال و بختیاری و خوزستان قرار گرفت. نتایج این دندروگرام، ارتباط نداشتن تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان می‌دهد، به‌طوری که جمعیت‌های جمع‌آوری شده در یک استان یا شهر در گروه‌ها یا زیرگروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفته‌اند که

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده به‌همراه تعداد آلل‌های تکثیری، محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر آنها

ردیف	لوکوس	توالی آغازگر (5' → 3')	موتیف	دمای اتصال (°C)	تعداد آلل‌ها	PIC	MI
۱	Xgwm2-3A	R: CAT TCT CAA ATG ATC GAA CA L: CTG CAA GCC TGT GAT CAA CT	(CA)18	۵۰	۶	۰/۸۱	۴/۸۶
۲	Xgwm10-2A	R: TGG TCG TAC CAA AGT ATA CGG L: CGC ACC ATC TGT ATC ATT CTG	(AT)5(GT)15	۵۰	۴	۰/۷۰۳	۲/۸۱۲
۳	Xgwm95-2A	R: AAT GCA AAG TGA AAA ACC CG L: GAT CAA ACA CAC ACC CCT CC	(AC)16	۶۰	۴	۰/۷۰۳	۲/۸۱۲
۴	Xgwm126-5A	R: GTT GAG TTG ATG CGG GAG G L: CAC ACG CTC CAC CAT GAC	(CA)15	۶۰	۱	--	--
۵	Xgwm156-5A	R: CAA TGC AGG CCC TCC TAA C L: CCA ACC GTG CTA TTA GTC ATT C	(GT)14	۶۰	۸	۰/۸۶۱	۶/۸۸۸
۶	Xgwm165-4A	R: CTT TTC TTT CAG ATT GCG CC L: TGC AGT GGT CAG ATG TTT CC	(GA)8YC	۶۰	۶	۰/۸۱	۴/۸۶
۷	Xgwm312-2A	R: ACA TGC ATG CCT ACC TAA TGG L: ATC GCA TGA TGC ACG TAG AG	(GA)37	۶۰	۵	۰/۷۶۸	۳/۸۴
۸	Xgwm332-7A	R: AGT GCT GGA AAG AGT AGT GAA GC L: AGC CAG CAA GTC ACC AAA AC	(GA)36	۶۰	۴	۰/۷۰۳	۲/۸۱۲
۹	Xgwm369-3A	R: ACC GTG GGT GTT GTG AGC L: CTG CAG GCC ATG ATG ATG	(CT)11(T)2(CT)21	۶۰	۵	۰/۷۶۸	۳/۸۴
۱۰	Xgwm372-2A	R: GAA GGA CGA CAT TCC ACC TG L: AAT AGA GCC CTG GGA CTG GG	(GA)51	۶۰	۱	--	--
۱۱	Xgwm30-2D	R: TTC TGC ACC CTG GGT GAT L: ATC TTA GCA TAG AAG GGA GTG GG	(AT)19(GT)15	۶۰	۳	۰/۵۹۳	۱/۷۷۹
۱۲	Xgwm44-7D	R: ACT GGC ATC CAC TGA GCT G L: GTT GAG CTT TTC AGT TCG GC	(GA)28	۶۰	۶	۰/۸۱	۴/۸۶
۱۳	Xgwm111-7D	R: ACC TGA TCA GAT CCC ACT CG L: TCT GTA GGC TCT CTC CGA CTG	(CT)32(GT)17	۵۵	۱	--	--
۱۴	Xgwm271-5D	R: AGC TGC TAG CTT TTG GGA CA L: CAA GAT CGT GGA GCC AGC	(CT)4imp(GA)10	۶۰	۷	۰/۸۴	۵/۸۸
۱۵	Xgwm383-3D	R: GAC ATC AAT AAC CGT GGA TGG L: ACG CCA GTT GAT CCG TAA AC	(GT)27	۶۰	۳	۰/۵۹۳	۱/۷۷۹
۱۶	Xgwm608-4D	R: GAT CCC TCT CCG CTA GAA GC L: ACA TTG TGT GTG CGG CC	(GA)16	۶۰	۴	۰/۷۰۳	۲/۸۱۲
۱۷	Xgwm654-5D	R: TGC GTC AGA TAT GCC TAC CT L: TGC TGA TGT TGT AAG AAG GC	(GT)28	۵۵	۳	۰/۵۹۳	۱/۷۷۹

نداشتن ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان داد. در پژوهش Farkhari *et al.* (2007) ارتباط نداشتن تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی جمعیت‌های *Ae. cylindrica* را در وجود این گونه به عنوان علف هرز در مزارع گندم و جابه‌جایی دانه‌های این گیاه همراه با برداشت محصول بیان کردند.

Mohammadi *et al.* (2014) تنوع ژنتیکی ۳۵ جمعیت *Aegilops cylindrica* جمع‌آوری شده از ۱۱ استان ایران را با استفاده از ۱۷ آغازگر ISSR بررسی کردند. دندروگرام حاصل از ماتریس فاصله دایس و الگوریتم NJ جمعیت‌ها را در دو گروه عمده و زیرگروه‌های متعددی قرار داد. نتایج این تحقیق نیز



شکل ۱. گروه‌بندی جمعیت‌های *Ae. triuncialis* با استفاده از شاخص دایس و الگوریتم UPGMA

ژنتیکی درون گروه‌ها براساس ماتریس فاصله دایس با استفاده از نسخه ۳/۱ نرم‌افزار MEGA و نیز ماتریس فاصله و تشابه بین گروه‌ها با استفاده از نسخه ۶/۴۱ نرم‌افزار GenAlEx از طریق شاخص تصحیح شده Nei، محاسبه شد. براساس اطلاعات به دست آمده (جدول ۳)، فاصله ژنتیکی درون گروه‌ها دامنه‌ای از ۰/۱۸۹۶ تا ۰/۹۲۴ داشت که کمترین فاصله ژنتیکی درون گروه‌ها (۰/۱۸۹۶) مربوط به گروه شمال غرب کشور و بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۹۲۴) مربوط به گروه غرب کشور بود. بیشترین

به منظور بررسی بهتر و دقیق‌تر اطلاعات مولکولی، ۳۵ جمعیت مورد بررسی براساس محل جمع‌آوری آنها به سه گروه کلی شمال غرب با ۵ جمعیت (A1، A6، A17، A24، A27)؛ غرب با ۱۵ جمعیت (A2، A3، A4، A5، A7، A8، A9، A13، A15، A18، A22، A25، A28، A31، A32)؛ و جنوب غرب با ۱۵ جمعیت (A10، A11، A12، A14، A16، A19، A20، A21، A23، A26، A29، A30، A33، A34، A35) تقسیم شدند. برای آگاهی از تنوع ژنتیکی درون و بین گروه‌های مورد بررسی، فواصل

(۲۹/۵۸)، تعداد آلی مشاهده شده (۰/۵۹۲)، تعداد آلی مؤثر (۱/۱۰۴)، شاخص تصحیح شده هتروژنی (۰/۰۸۰) و شاخص شانون (۰/۱۱۹) نیز مربوط به گروه جمعیت‌های شمال غرب کشور بود.

از آنجا که یکی از مهم‌ترین جنبه‌های تجزیه خوشه‌ای، تعیین تعداد مطلوب خوشه است، به منظور تعیین تعداد مطلوب خوشه و تعیین بهترین نقطه برش دندروگرام، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) درون و بین گروه‌ها با استفاده از نسخه ۶/۴۱ نرم‌افزار GenAIEx صورت گرفت. در تجزیه واریانس مولکولی این امکان نیز وجود دارد که اجزای واریانس محاسبه و سهم هر یک از آنها در تنوع کل تعیین شود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۵) نشان می‌دهد که تمایز ژنتیکی معنی‌داری بین سه گروه وجود دارد که طبق این اطلاعات ۱۰۰ درصد تنوع کل مربوط به تنوع درون گروهی است. نتیجه اینکه کلیه قطعات تکثیر شده در هر سه گروه موجود و هیچ آلی ریزوماهواره ژنومی از میان جایگاه‌های مورد مطالعه در این تحقیق مختص به گروه خاصی از جمعیت‌های مورد مطالعه نبوده است. Fathi et al. (2014) در بررسی خود عنوان کردند که درصد زیاد واریانس درون گروه‌ها (۹۱ درصد) ممکن است به دلیل وجود جمعیت‌هایی با فاصله ژنتیکی زیاد در گروه‌های بررسی شده باشد.

فاصله ژنتیکی شاخص Nei میان دو گروه شمال غرب و جنوب غرب کشور (۰/۰۰۳) و کمترین فاصله نیز میان دو گروه غرب و جنوب غرب کشور (۰/۰۰۰) وجود داشت، به عبارت دیگر این دو گروه، بیشترین شباهت ژنتیکی را دارند.

جدول ۳. فاصله ژنتیکی درون گروه‌ها، فاصله ژنتیکی (پایین قطر) و همسانی ژنتیکی (بالای قطر) بین گروه‌های *Ae. Triuncialis*

گروه	بین گروه‌ها		
	جنوب غرب	شمال غرب	درون گروه‌ها
شمال غرب	۰/۹۹۷	***	۰/۸۹۶
غرب	۱/۰۰۰	***	۰/۹۲۴
جنوب غرب	***	۰/۰۰۰	۰/۹۰۷

با استفاده از آنالیز داده‌ها در نسخه ۶/۴۱ نرم‌افزار GenAIEx میزان آلی‌های چندشکل، تعداد آلی مشاهده شده، تعداد آلی مؤثر، شاخص‌های تصحیح شده هتروژنی و شانون، برای هر گروه و میانگین کل آنها به دست آمد (جدول ۴). گروه جمعیت‌های جنوب غرب کشور با بیشترین درصد مکان‌های چندشکل (۷۳/۲۴)، تعداد آلی مشاهده شده (۱/۴۵۶)، تعداد آلی مؤثر (۱/۱۳۷)، شاخص تصحیح شده هتروژنی (۰/۱۱۲) و شاخص شانون (۰/۱۹۷)، تنوع آلی و هتروژنی بیشتری نشان داد. کمترین میزان مکان‌های چندشکل

جدول ۴. محاسبه شاخص‌های ژنتیکی در گروه‌های *Ae. triuncialis*

گروه	تعداد نمونه	درصد مکان‌های چندشکل	تعداد آلی مشاهده شده	تعداد آلی مؤثر	شاخص تصحیح شده هتروژنی	شاخص اطلاعات شانون
شمال غرب	۵	۲۹/۵۸	۰/۵۹۲±۰/۱۰۹	۱/۱۰۴±۰/۰۲۴	۰/۰۸۰±۰/۰۱۶	۰/۱۱۹±۰/۰۲۳
غرب	۱۵	۶۶/۲۰	۱/۳۲۴±۰/۱۱۳	۱/۱۰۷±۰/۰۱۵	۰/۰۹۰±۰/۰۱۱	۰/۱۶۳±۰/۰۱۸
جنوب غرب	۱۵	۷۳/۲۴	۱/۴۵۶±۰/۱۰۶	۱/۱۳۷±۰/۰۱۷	۰/۱۱۲±۰/۰۱۲	۰/۱۹۷±۰/۰۱۹
میانگین کل	۳۵	۵۶/۳۴	۱/۱۲۷±۰/۰۶۸	۱/۱۱۶±۰/۰۱۱	۰/۰۹۴±۰/۰۰۸	۰/۱۶۰±۰/۰۱۲

جدول ۵. تجزیه واریانس مولکولی گروه‌های *Ae. triuncialis*

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس	آماره PhiPT	درصد احتمال معنی‌داری
بین گروه‌ها	۲	۱۲/۵۹۰	۶/۲۹۵	%۰	۰/۰۰۴	۰/۳۸۰
درون گروه‌ها	۳۲	۱۹۳/۸۶۷	۶/۰۵۸	%۱۰۰		
جمع کل	۳۴	۲۰۶/۴۵۷		%۱۰۰		

نتیجه‌گیری کلی

باتوجه به گسترش این گونه در جغرافیای وسیعی از کشور با شرایط اقلیمی بسیار متفاوت، می‌توان از نشانگرهای مولکولی برای مدیریت منابع ژنتیکی جمعیت‌های *Ae. triuncialis* ایران در راستای شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش در مورد ژن‌های مهم در کنترل تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی بهره گرفت. همچنین نتایج این تحقیق می‌تواند اطلاعات باارزشی را برای استفاده از این منابع ژنتیکی به‌منظور انتقال‌پذیری نشانگرهای معرفی‌شده در گندم‌های زراعی برای ارزیابی خویشاوندان وحشی آنها در اختیار اصلاح‌کنندگان قرار دهد.

با توجه به اینکه آگاهی از الگوی پراکنش تنوع ژنتیکی، یکی از مراحل اساسی پایه‌ریزی اقدامات حفاظتی مؤثر ذخایر ژنتیکی گونه‌های گیاهی است و نظر به اینکه درک ساختار ژنتیکی گونه‌های گیاهی برای استفاده کامل از ژرمپلاسما آنها برای اجرای برنامه‌های اصلاحی امری ضروری است، تنوع ژنتیکی ۳۵ جمعیت *Ae. triuncialis* با استفاده از ۱۷ جفت نشانگر ریزماهوره بررسی شد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که جمعیت‌های بررسی‌شده در سراسر کشور از تنوع زیادی برخوردارند و

REFERENCES

1. Aghaee-Sarbarzeh, M., Singh, H. & Dhaliwal, H. S. (2001). A microsatellite marker linked to leaf rust resistance transferred from *Aegilops triuncialis* into hexaploid wheat. *Plant Breeding*, 120(3), 259-261.
2. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
3. Esmaili, K., Mehrabi, A. A., Etminan, A. R., Azizian, E., Mansoury, S., Hossein Abadi, M. & Haidarnejadian, M. (2012). Study of genetic diversity in *Aegilops tauschii* accessions using SSR marker. *Journal of Genetic Novin*, 7(4), 333-342. (in Farsi)
4. Falahati-Anbaran, M., Habashi, A. A., Esfahany, M., Mohammadi, S. A. & Ghareyazie, B. (2006). Study of genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid annual medics using Microsatellite markers. *Journal of Science and Technology of Agricultural and Natural Resources*, 10(3), 349-358. (in Farsi)
5. Farkhari, M., Naghavi, M. R., Pyghambari, S. A. & Sabokdast, M. (2007). Genetic variation of Jointed Goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host.) from Iran, using RAPD-PCR and SDS-PAGE of Seed Proteins. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(17), 2868-2873.
6. Fathi, T., Souhani, M. M., Samizadeh Lahiji, H. & Mehrabi, A. A. (2014). Genetic diversity among accessions of *Aegilops triuncialis* L. from west of Iran using ISSR molecular markers. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 45(2), 85-93. (in Farsi)
7. Ghavibazoo, F., Asghari Zakaria, R. & Jahanbakhsh-Godehkahriz, S. (2011). Studying of Low Molecular Weight Glutenin Subunits diversity in wild wheat *Aegilops triuncialis* by SDS-PAGE method. In: *Proceeding of the first national conference on economic resolutions in the field of Agriculture and Natural Resources*, Qom, Iran. (in Farsi)
8. Jam Baranduzi, A., Sofalian, O., Asghari Zakaria, R., Asghari, A. & Shokrpour, M. (2013). Assessment of genetic diversity in *Aegilops* species in North-West of Iran using ISSR marker. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, 23(2), 66-75.
9. Kharestani, H., Nasrolah Nejad Qomi, A. A. & Mehrabi, A. A. (2013). Genetic diversity assessment of Einkorn wheat by using microsatellite markers. *Electronic Journal of Crop Production*, 6(2), 1-16. (in Farsi)
10. Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2), 150-163.
11. Mohammadi, S., Mehrabi, A. A., Arminian, A. & Fazeli, A. (2014). Genetic Diversity Structure of *Aegilops cylindrica* Accessions Revealed by Genomic ISSR Markers. *Journal of Plant Genetic Research*, 1(1), 13-26. (in Farsi)
12. Naghavi, M. R., Ghareyazie, B. & Hosseini Salekdeh, Gh. (2007) *Molecular Markers* (2nd ed.). Tehran: University of Tehran Press. (in Farsi)
13. Okuno, K., Ebana, K., Noov, B. & Yoshida, H. (1998). Genetic diversity of Central Asian and north Caucasian *Aegilops* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 45(4), 389-394.
14. Peakall, R. & Smouse, P.E. (2006). GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288-295.

15. Perrier, X., Flori, A. & Bonnot, F. (2003) Data Analysis Methods. 43-76. In: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X. & Glaszmann, J.C. (Ed.), *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*. Enfield, Science Publishers, Montpellier, 359p.
16. Plaschke, J., Ganal, M. W. & Röder, M. S. (1995). Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 91(7), 1001-1007.
17. Powell, W., Morgante, M., Ander, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingy, S. & Rafalaski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2(3), 225-238.
18. Prasad, M., Varshney, R. K., Roy, J. K., Balyan, H. S. & Gupta, P. K. (2000). The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 584-592.
19. Ranjbar, M., Naghavi, M. R., Zali, A.A., Aghaii, M. J., Pirseiedi, M. & Mardi, M. (2008). Evaluation of Genetic Diversity of *Aegilops crassa* of Iran Using SSR Markers. *Journal of Genetic Novin*, 3(1), 29-38. (in Farsi)
20. Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P. & Ganal, M. W. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149(4), 2007-2023.
21. Romero, M.D., Montes, M.J., Sin, E., Lopez-Braña, I., Duce, A., Martin-Sanchez, J.A., Andrés, M.F. & Delibes, A. (1998). A cereal cyst nematode (*Heterodera avenae* Woll.) resistance gene transferred from *Aegilops triuncialis* to hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(8), 1135-1140.
22. Shiri, M., Mehrabi, A. A., Shahriari, F. & Bagheri, A. R. (2009). Genetic diversity assessment of Einkorn wheat populations of *T.boeoticum* and *Turartu* from West and North-West areas of Iran using SSR markers. *Journal of Applied Biology*, 22, 44-54. (in Farsi)
23. Soltis, D. E. & Soltis, P. S. (2000). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7051-7057.
24. Vanichanon, A., Blake, N.K., Sherman, J.D. & Talbert, L.E. (2003). Multiple origins of allopolyploid *Aegilops triuncialis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(4), 804-810.