# بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گندم اینکورن *T boeoticum* . و *T.urartu* نواحی غرب وشمال غرب ایران با استفاده از نشانگرهای SSR

**مسعود شیری ،[1] علی اشرف مهرابی[2]**
**فرج الله شهریاری،[3] عبدالرضا باقری[4]**

**چکیده**

*یکی از موثرترین اقدامات جهت اصلاح گیاهان زراعی بررسی ساختار ژنتیکی آنهاست. در این تحقیق تنوع ژنتیکی تعداد ۲۵ جمعیت گندم اینکورن از دوگونه تریتیکوم بوئتیکوم و تریتیکوم اورارتو جمع آوری شده از استان‌های غربی و شمال غربی ایران با استفاده از ۱۲ جفت نشانگر ریزماهواره بررسی گردید. ۱۲ جفت آغازگر از ۲ تا ۱۴ آلل و در مجموع ۸۷ آلل در بین ۲۵ ژنوتیپ تکثیر کردند که متوسط تعداد آلل‌ها به ازای هر جفت آغازگر ۷/۲۵ بود و محتوای اطلاعات چند شکلی از ۰/۳۷ تا ۰/۹۲ و میانگین ۰/۷۲ به دست آمد. تجزیه خوشه ای به روش UPGMA و با ضرایب تشابه دایس و جاکارد انجام گردید. بر اساس دندروگرام ترسیم شده ژنوتیپ‌های گونه تریتیکوم بوئتیکوم در استان لرستان و گونه تریتیکوم اورارتو در استان کرمانشاه بیشترین تنوع را داشتند. این مسئله موید این است که به احتمال فراوان استان لرستان خاستگاه اصلی گونه تریتیکوم بوئتیکوم و استان کرمانشاه خاستگاه اولیه گونه تریتیکوم اورارتو می‌باشد. به طور کلی جمعیت‌های مورد بررسی گندم اینکورن در استان‌های غربی تنوع بیشتری در مقایسه با جمعیت‌های مربوط به استان‌های شمال غربی نشان دادند.*

***واژه های کلیدی:*** *تریتیکوم اورارتو، تریتیکوم بوئتیکوم، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ریزماهواره*

**مقدمه**

تنوع ژنتیکی گندم مانند بسیاری ازمحصولات دیگر در طول دهه‌های گذشته روبه کاهش نهاده است. محققین معتقدند که اطلاعات و تنوع ارقام موجود گندم به طور کامل برای اهداف اصلاحی گندم بکار گرفته شده است. پیشرفت در به‌نژادی گندم سه پیش نیاز اساسی دارد: نخست منابع جدید

تنوع ژنتیکی برای فراهم ساختن آلل‌های مطلوب جهت پیشرفت ژنتیکی، دوم فناوری‌هایی برای نوترکیبی این تنوع و تولید ژنوتیپ‌های جدید و سوم فناوری‌هایی برای شناسایی و گزینش فنوتیپ‌های مرتبط با مجموعه‌های ژنی تطابق‌یافته تولیدی، تعیین ژنوتیپ و غربال منابع ژنتیکی برای ژنهای مفید. در این مسیر اولین گام استفاده پایدار از ژرم‌پلاسم گندم کشور است (۱). بنابراین به‌نژادگران به دنبال یافتن منابع ژنی جدید بوده و معتقدند که ارقام بومی و خویشاوندان وحشی گندم که یک منبع بالقوه مفید و با ارزش تنوع ژنتیکی هستند می توانند بطور موفقیت آمیزی در اصلاح گندم به کار گرفته شوند (۷). یکی از نیازهای اولیه اصلاح گندم برآورد تنوع ژنتیکی خویشاوندان گندم برای شناسایی و اهداف اصلاحی می‌باشد. گندم‌های اینکورن اورارتو و بوئتیکوم به عنوان دهنده ژنوم A به گندم‌های زراعی هگزاپلوئید، تتراپلوئید و دیپلوئید (مونوکوکوم) منابع ژنتیکی ارزشمندی برای اصلاح گندم‌های زراعی می‌باشند (۴). نواحی کوهستانی معتدل در دامنه دو رشته کوه زاگرس و البرز در استان‌های شمال غربی و غربی ایران نواحی پیدایش، پراکنش و تنوع گونه‌های گندم‌های دیپلوئید اینکورن محسوب می‌شود. علاقمندان این زمینه همواره مترصد آگاهی از وضعیت دقیق جمعیت‌های خودروی این گیاه در ایران بوده‌اند. در همین راستا مطالعه وضعیت و ساختار تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گندم‌های دیپلوئید اینکورن در دو گونه *Triticum urartu* و *Triticum boeoticum* هدف مهم دیگری است که در این تحقیق دنبال می‌شود.

آناتومی ژنوم گندم اینکورن تریتیکوم اورارتو (AA) به عنوان دهنده این ژنوم به گندم نان و ماکارونی به خوبی در ارقام زراعی آنها حفظ شده است. شناسایی و معرفی نشانگرهای ریزماهواره چند شکل در این گونه دیپلوئید که قابلیت انتقال به جمعیت‌های اصلاحی گندم نان هگزاپلوئید را داشته باشند، از اهداف کاربردی این پژوهش است. یکی از کارآمدترین نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ریزماهواره هستند. توزیع مناسب در ژنوم، سهولت استفاده، طبیعت چندآللی و هم‌بارز بودن از مزایای این نشانگرها می‌باشد(۶). رادر و همکاران در سال ۱۹۹۸، اولین نقشه ژنتیکی ژنوم گندم را بر اساس نشانگرهای ریزماهواره ترسیم کردند. آنان با استفاده از ۲۷۹ مکان ژنی ریزماهواره این نقشه را تهیه نمودند (۹). احمد در سال ۲۰۰۲، از ۴۳ نشانگر ریزماهواره برای برآورد تنوع ژنتیکی در بین ۱۳ ژنوتیپ گندم از منشأهای متفاوت استفاده کرد(۵). تاکنون مطالعات زیادی در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی گندم بااستفاده از نشانگرهای ریزماهواره گزارش شده‌است (۸،۱۱ و۱۲).

## مواد و روش

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق ۲۵ جمعیت از گندم های وحشی اینکورن جمع آوری شده از دامنه های زاگرس بود. جمعیت های مورد بررسی از دو گونه تریتیکوم بوئتیکوم و تریتیکوم اورارتو بودند (جدول ۱).

به منظور تجزیه مولکولی، بذر ۲۵ ژنوتیپ در گلدان و در اتاقک رشد کشت شدند و DNA

ژنومی به روش CTAB از برگ های سالم و جوان تک گیاهچه های دو هفته ای استخراج شد. تکثیر مکان های ریز ماهواره با استفاده از ۱۲ آغازگر انجام گردید. قطعات تکثیر شده با استفاده از ژل پلی اکریل آمید تفکیک و رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام شد. امتیاز دهی باندها به صورت صفر( فقدان باند) و یک (وجود باند) صورت گرفت محتوای اطلاعات چند شکلی بر اساس جایگاه ریز ماهواره محاسبه شد. ماتریس عدم تشابه و تجزیه خوشه ای بر اساس الگوریتم UPGMA و روش های جاکارد و دایس انجام شد. در تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزارهای XLstat, DARwin, Popgene و Excel بهره گرفته شد.

**جدول۱. جمعیت های گندم اینکورن استفاده شده در این تحقیق**

| دیف | جنس | گونه | محل جمع آوری |
|---|---|---|---|
| ۱ | تریتیکوم | اورارتو | جاده نورآباد- خرم آباد - روستای سرناوه |
| ۲ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کرمانشاه- جاده روانسر- پاوه پلیس راه روانسر |
| ۳ | تریتیکوم | بوئتیکوم | آذربایجان شرقی- اوایل راه هوراند- اهر |
| ۴ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کرمانشاه- جاده کرمانشاه – سنقر |
| ۵ | تریتیکوم | بوئتیکوم | لرستان - سفید دشت (گل زرد) |
| ۶ | تریتیکوم | بوئتیکوم | لرستان - جاده درود - خرم آباد- ۳۵ کیلومتر تا خرم آباد |
| ۷ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کرمانشاه - حسین آباد - بیستون |
| ۸ | تریتیکوم | بوئتیکوم | لرستان - نورآباد دلفان |
| ۹ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کرمانشاه - دوراهی جوان رود |
| ۱۰ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کردستان - حومه سقز |
| ۱۱ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کرمانشاه - اویل جاده روانسر به کامیاران |
| ۱۲ | تریتیکوم | اورارتو | کرمانشاه- جاده اسلام آباد- کرند – ۱ کیلومتر بعد از خسروآباد |
| ۱۳ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کرمانشاه- اسلام آباد- ۲ کیلومتر قبل از حسن آباد |
| ۱۴ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کردستان- مسیر قروه- به سنندج- ۱۵ کیلومتر بعد از دهگلان |
| ۱۵ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کردستان- قریه چناره- ۲۰ کیلومتر مانده به مریوان |
| ۱۶ | تریتیکوم | بوئتیکوم | آذربایجان شرقی- ۱۰ کیلومتری جاده اهر- تبریز |
| ۱۷ | تریتیکوم | اورارتو | کرمانشاه- سنقر- اسدآباد- روستای ذوالفاس |
| ۱۸ | تریتیکوم | بوئتیکوم | لرستان- ۳۰ کیلومتری خرمآباد- سپید دشت |
| ۱۹ | تریتیکوم | بوئتیکوم | آذربایجان غربی- سیلوانا- اوشنویه |
| ۲۰ | تریتیکوم | بوئتیکوم | لرستان- ۳۰ کیلومتری جاده خرمآباد- درود |
| ۲۱ | تریتیکوم | بوئتیکوم | آذربایجان شرقی- ۳۰ کیلومتری جاده اهر- کلیبر |
| ۲۲ | تریتیکوم | اورارتو | آذربایجان غربی- حومه نقده |
| ۲۳ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کرمانشاه- جاده سنقر |
| ۲۴ | تریتیکوم | بوئتیکوم | کرمانشاه- سنقر- اسدآباد- روستای قره تپه |
| ۲۵ | تریتیکوم | اورارتو | کرمانشاه- حسین آباد – بیستون |

## نتایج و بحث

بیشتر لوکوس های تکثیر شده چند شکلی مناسب از خود نشان دادند. در نتیجه ی تکثیر ۱۲ مکان ریز ماهواره تعداد ۸۷ آلل شناسایی شد که تعداد آلل ها در هر مکان از ۲ تا ۱۴ آلل متغیر بود. میانگین تعداد آلل در کل لوکوس ها برابر ۷/۲۵ بود(جدول ۲) و با نتایج مطالعات قبلی مکان های ریز ماهواره در گندم مانند استودارت و همکاران(۲۰۰۵) که تعداد آلل را از ۳ تا ۲۹ و به طور متوسط ۱۰ آلل و مک کافری و همکاران (۲۰۰۳) تعداد آلل را از ۲ تا ۱۲ و میانگین ۵/۶ گزارش کرده بودند مطابقت داشت(۱۱و۱۳). محتوای اطلاعات چند شکلی از ۰/۳۷ تا ۰/۹۲ متغیر و میانگین آن ۰/۷۵ بود و با گزارش آگراما و همکاران(۲۰۰۳) از ۰/۲۳ تا ۰/۸۱ و با میانگین ۰/۶۲ و رادر و همکاران(۱۹۹۵) با مقدار ۰/۲۳ تا ۰/۷۹ و میانگین ۰/۷۱ مطابقت می نمود(۳و۹). ضریب عدم تشابه ژنوتیپ‌ها به روش دایس و جاکارد و با استفاده از نرم افزار DARwin محاسبه و تجزیه خوشه ای با الگوریتم UPGMA انجام شد (اشکال ۱و۲).

برای محاسبه قدرت تفکیک(D) نشانگر ریزماهواره از نرم افزارpopgene استفاده گردید. با استفاده از این نرم‌افزار جمعیت‌های گونه اورارتو به عنوان یک گروه و جمعیت‌های گونه بوئتیکوم به عنوان گروه دوم از لحاظ پروفیل ژنومی حاصل از ۸۷ نوار امتیازدهی شده در بین این مواد آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت و قدرت تفکیک نشانگر ریزماهواره ۰/۹۵ و احتمال همسانی (PI) ۰/۰۵۱ تعیین گردید که این موضوع نشاندهنده‌ی کارایی بالای نشانگر ریزماهواره در شناسایی ارقام می‌باشد.

به منظور ارزیابی اطلاعات حاصل از لوکوس‌های ریز ماهواره بررسی شده اطلاعات حاصل از نوارهای نمره‌بندی شده این ۱۲ نشانگر ریزماهواره چند شکل با روش تجزیه به مختصات اصلی مورد بررسی تکمیلی قرار گرفت. نتایج این تجزیه آماری (جدول۳) نشان می‌دهد که محورهای اصلی اول و دوم به ترتیب ۱۸/۲۹ و ۱۶/۷ درصد از اطلاعات را در بر داشتند. در مجموع ۶ محور قادر به تبیین دو سوم از اطلاعات نشانگرها بود. این نتایج بیانگر توزیع مناسب مکان‌های ریز ماهواره انتخاب شده در میان ژنوم افراد بررسی شده است. البته در انتخاب آغازگرها این موضوع از قبل مد نظر بود و تلاش شد آغازگرهای مورد استفاده مربوط به نشانگرهایی از ۷ کرموزوم ژنوم A گندم معمولی باشد. ترسیم بای پلات با دو محور مختصات اصلی اول و دوم که در مجموع ۳۴/۹۹ درصد اطلاعات باندهای نمره دهی شده را دربرداشت نشان داد که ژنوتیپ‌ها به خوبی از هم تمیز داده شده است. دو گونه بوئتیکوم و اورارتو متمایز از هم در صفحه بای پلات قرار گرفتند(شکل۳).

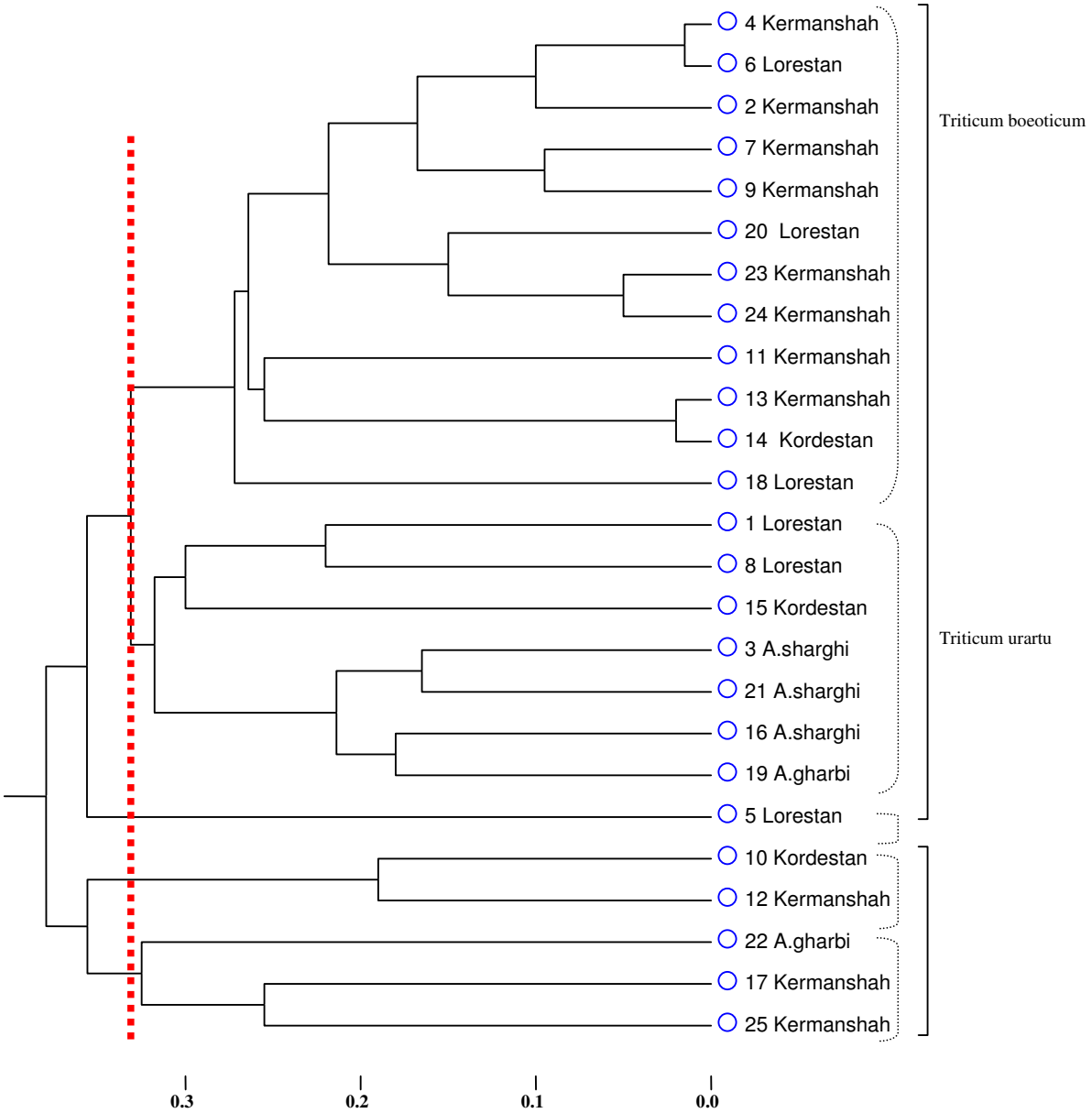
جمعیت‌های مورد بررسی گندم اینکورن در استان‌های غربی(لرستان، کرمانشاه و کردستان) تنوع بیشتری در مقایسه با جمعیت‌های مربوط به استان‌های شمال غربی (آذربایجان شرقی و غربی) نشان دادند.گونه تریتیکوم بوئتیکوم بیشترین تنوع ژنتیکی را در استان لرستان نشان می‌دهد به طوری که در گروه‌بندی ۲۰ ژنوتیپ گونه مذکور که سه گروه را تشکیل می‌دهند در هر سه گروه نمونه‌های این استان

وجـود دارنـد(اشـکال۱ و۲). در خـصوص گونـه تریتیکوم اورارتو نیز استان کرمانشاه بیشترین تنـوع را دارد.

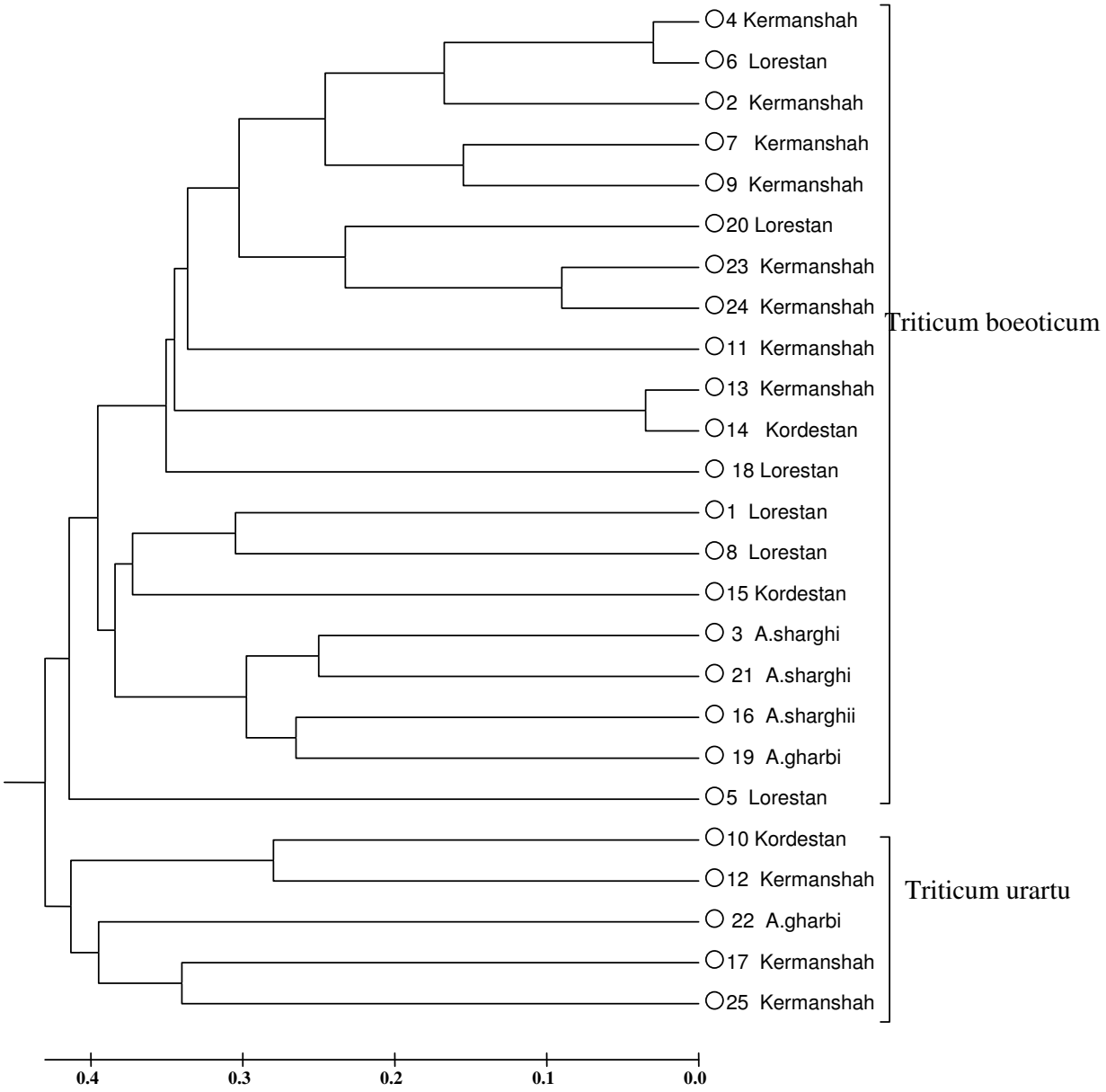
نتـایج ایـن تحقیـق نـشان‌دهنـده‌ی کـارایی بـالای نشانگر ریزماهواره در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های گندم اینکـورن مـی‌باشـد تعـداد انـدک نـشانگر ریـز ماهواره به خـوبی گونـه‌هـای مـذکور را از یکـدیگر تفکیک نموده و اختلافـات درون گونـه‌ای را نمایـان کرده است که یکـی از دلایـل آن پـراکنش مناسـب نشانگر ریز ماهواره در ژنوم A می‌باشـد دلیـل دیگـر شاید مربوط به ماهیت وحشی گونه‌های مورد بررسی و تنوع زیاد بین آنها باشد. به طور کلـی بـا توجـه بـه تنـوع فـوق‌العـاده گونـه‌هـای گنـدم اینکـورن در استان‌های غربی، توجه ویژه به ژرم‌پلاسم آن در ایـن مناطق ضروری به نظر می‌رسـد. طراحـی برنامـه‌هـای اصلاحی جهت بهره‌گیری از این تنوع ژنتیکی لازم و بـا شناسـایی دقیـق ایـن جمعیـت‌هـا بـرای بـسیاری از ژن‌های مطلوب امکان‌پذیر است. از آنجـا کـه گونـه تریتیکوم اورارتو دهنده ژنوم A گنـدم *Triticum aestivvm* و *Triticum durum* محـــسوب می‌شود توجه ویژه بـه ژرم‌پلاسـم ایـن گونـه در ایـن مناطق، مخصوصاً استان کرمانشاه اهمیت دارد (۲).

**جدول۲. خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی و شناسایی مکانهای ژنی و محتوای چند شکلی ۲۵ جمعیت از دو گونه گندم اینکورن**

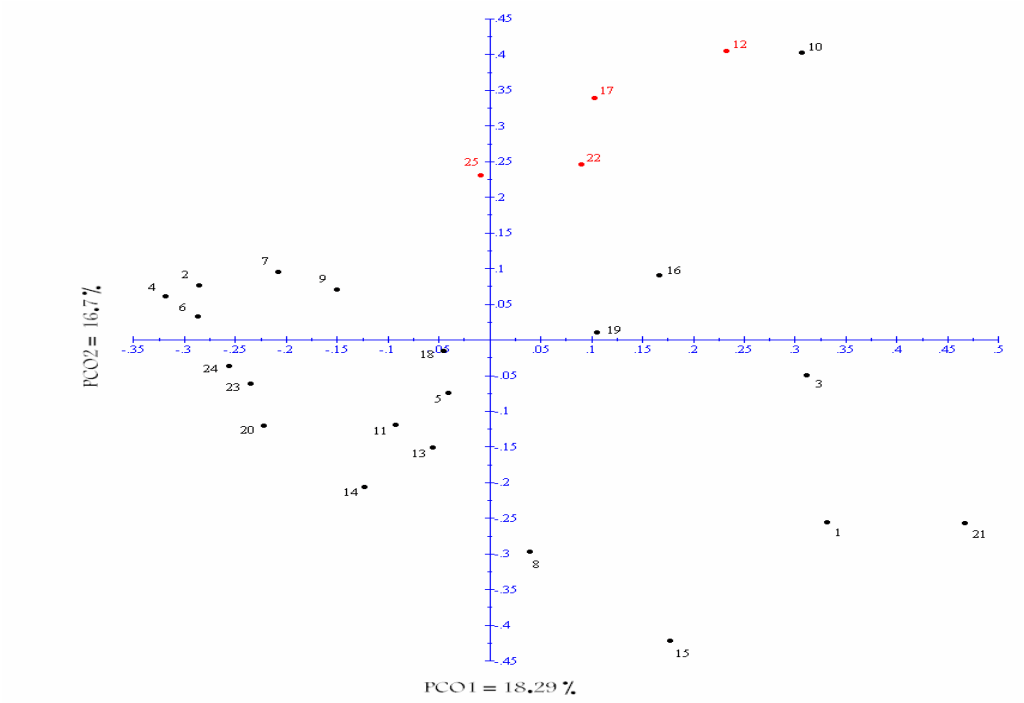
| نام لوکوس | تعداد آلل | دمای اتصال پرایمر | محتوای چند شکلی |
|---|---|---|---|
| Xgwm130-7A | ۷ | ۶۰ | ۰/۸۳ |
| Xgwm156-5A | ۱۱ | ۶۰ | ۰/۹۰ |
| Xgwm160-4A | ۲ | ۶۰ | ۰/۳۷ |
| Xgwm334-6A | ۶ | ۵۰ | ۰/۸۱ |
| Xgwm357-1A | ۳ | ۵۵ | ۰/۵۹ |
| Xgwm369-3A | ۱۴ | ۶۰ | ۰/۹۲ |
| Xgwm372-2A | ۹ | ۶۰ | ۰/۸۷ |
| Xgwm5-3A | ۲ | ۵۰ | ۰/۳۷ |
| Xgwm99-1A | ۷ | ۶۰ | ۰/۸۳ |
| Xgwm164-1A | ۵ | ۵۵ | ۰/۷۶ |
| Xgwm570-6A | ۱۴ | ۶۰ | ۰/۹۲ |
| Xgwm410-5A | ۷ | ۵۵ | ۰/۸۳ |




**شکل ۱. گروه بندی ۲۵ ژنوتیپ گندم اینکورن (دو گونه تریتیکوم بوئتیکوم و تریتیکوم اورارتو) با استفاده از دندروگرام تهیه شده با ۸۷ باند نمره‌دهی شده از ۱۲ مکان نشانگرهای ریز ماهواره (الگوریتم UPGMA روی ماتریس عدم تشابه دایس**




**شکل۲. گرووهبندی ۲۵ ژنوتیپ گندم اینکورن (دو گونه تریتیکوم بوئتیکوم و تریتیکوم اورارتو) با استفاده از دندروگرام تهیه شده با ۸۷ باند نمره‌دهی شده از ۱۲ مکان نشانگرهای ریزماهواره(الگوریتم UPGMA روی ماتریس عدم تشابه جاکارد**




**شکل۳. تجزیه به مختصات اصلی و ترسیم بای پلات ۲۵ ژنوتیپ مورد بررسی با استفاده از اطلاعات دو محور مختصات اصلی اول ودوم.**

**جدول۳. نتایج تجزیه به مختصات اصلی : (توزیع اطلاعات در میان محورها بیانگر توزیع مناسب۱۲ نشانگر بررسی شده در ژنوم افراد مورد بررسی می‌باشد).**

| محور مختصات | مقدار ویژه | سهم واریانس | سهم تجمعی |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۰/۰۴۸ | ۱۸/۲۹ | ۱۸/۲۹ |
| ۲ | ۰/۰۴۴ | ۱۶/۷۰ | ۳۴/۹۹ |
| ۳ | ۰/۰۳۰ | ۱۱/۵۲ | ۴۶/۵۱ |
| ۴ | ۰/۰۲۷ | ۱۰/۱۸ | ۵۶/۶۹ |
| ۵ | ۰/۰۲۰ | ۷/۶۲ | ۶۴/۳۱ |
| ۶ | ۰/۰۱۸ | ۶/۹۶ | ۷۱/۲۷ |
| ۷ | ۰/۰۱۴ | ۵/۴۹ | ۷۶/۷۶ |
| ۸ | ۰/۰۱۴ | ۵/۲۵ | ۸۲/۰۱ |
| ۹ | ۰/۰۰۷ | ۲/۵۹ | ۸۴/۶۰ |
| ۱۰ | ۰/۰۰۵ | ۱/۹۰ | ۸۶/۵۰ |

## منابع


۱. کافی، م.، احمدنژاد، الف. احمدنژاد و جامی الاحمدی، م.، گندم: اکولوژی، فیزیولوژی و برآورد عملکرد. (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد(۱۳۸۴).

۲ــ مهرابی، علی اشرف. بررسی تنوع ژنتیکی گندم‌های وحشی ایران با استفاده از روش آرایه‌های تنوع DNA. پایان نامه دکتری، دانشگاه تهران (۱۳۸۶).

3. Agrama H. and Tuinstra M. R. Phylogenetic diversity and relationship among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. African Journal of Biotechnology. 2(10): 334-340 ( 2003).

4. Ahmad M. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. Theor. Appl. Genet. 101:892-896 (2000).

5. Ahmad M. Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats. Genome. 45: 646-651 (2002).

6. Bryan G. J., Collins A. J., Stephenson P., Orry A. and Smith J. B. Isolation and characterization of microsatellite from hexaploid bread Wheat. Theor. Appl. Genet. 94: 557-563 ( 1997).

7. Chahal G.S. and Gosal S.S. Principles and procedures of plant breeding: Biotechnological and conventional approaches. Alpha Science International Ltd (2002).

8. Christiansen M. J., Andersen S.B. and Ortiz R. Diversity changes in an intensively bread wheat germplasm during the 20th century. Molecular Breeding. 9: 1-11 (2002).

9. Roder M.S., Plaschke J., Konig S. U., Borner A., Sorrells M. E., Tanksley S. D., Ganal M. W. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol. Gen. Genet. 246:327-333 ( 1995).

10. Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P. and Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. Genetics, 149: 2007-2023 ( 1998).

11. Maccaferri M., Sanguineti M.C., Donini P. and Tuberosa R. Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. Theor. Appl. Genet. 107(5): 783-797 ( 2003).

12. Somma S., Cenci M.G. and Blanco A. Detection of QTL for carotenoid pigment content in Durum wheat. Proceedings of the XLVIII Italian Society of Agricultural Genetics Italy. (2004).
13. Stodart B.J., Machay M. and Raman H. AFLP and SSR analysis of genetic diversity among landraces of bread wheat (*Triticum aestivvm* L em. Thell) different geographic regions. Australian Journal of Agricultural Research, 56: 691-697 (2005).