تنوع ژنتیکی در توده‌های بومی شبدر ایرانی با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی

کامران سمیعی، احمد ارزانی* و سید علی‌محمد میرمحمدی میبدی[۱]

(تاریخ دریافت: ۸۵/۴/۱۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۲/۲۹)

چکیده

نژادهای بومی یک گیاه زراعی به عنوان منابع با ارزش ژنتیکی محسوب می‌شوند. در این تحقیق ۲۰ توده بومی شبدر ایرانی (*Trifolium resupinatum* L.) که از نقاط مختلف کشور جمع‌آوری شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. نمونه DNA متعلق به ۲۰ ژنوتیپ شبدر با استفاده از نشانگرهای نیمه‌تصادفی که مکان هدف آنها براساس نواحی برش اتصال اینترون- اگزون (ISJ) است، تکثیر شدند. سی آغازگر نیمه‌تصادفی از دو گروه آغازگرهای با هدف اینترون (IT) و هدف اگزون (ET) در این مطالعه به‌کار رفت که ۱۰ آغازگر تکرار پذیر بوده و ایجاد چندشکلی در توده‌های شبدر مورد مطالعه نمودند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم افزار NTSYS و روش UPGMA و تشکیل ماتریس تشابه جاکارد صورت گرفت. آغازگرها مجموعا تولید ۱۱۱ باند نمودند که از این تعداد، ۹۳ باند (۸۴٪) در بین ژنوتیپ‌های شبدر چند شکل بودند. بیشترین و کمترین قطعات تکثیر شده به ترتیب مربوط به آغازگرهای IT_{15-31} و ET_{18-4} بود و متوسط تعداد باند برای هر آغازگر ۱۱/۱ عدد برآورد شد. براساس تجزیه کلاستر توده‌های شبدر به ۵ گروه تقسیم شدند که از آن میان ۲ توده کازرون و کرمانشاهی۱ هر کدام به تنهایی یک گروه را تشکیل دادند. براساس ماتریس تشابه، کمترین شباهت (۰/۴۲) مربوط به توده‌های الویجان و کازرون بود و توده‌های چگنی و هفت‌چین همدانی بیشترین شباهت ژنتیکی را به خود اختصاص دادند. گروه‌بندی حاصله تا حدودی با گروه‌بندی توده‌های شبدر ایرانی براساس مبداء جغرافیایی هم‌آهنگی داشت. با توجه به نتایج به‌دست آمده، می‌توان بیان داشت که استفاده از فن‌آوری PCR با آغازگرهای نیمه‌تصادفی در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های شبدر ایرانی مناسب بوده و آنها را به خوبی از هم متمایز نموده است.

واژه‌های کلیدی: شبدر ایرانی، *Trifolium resupinatum* L.، آغازگر نیمه‌تصادفی، تنوع ژنتیکی

مقدمه

گاهی از میزان تنوع و فاصله ژنتیکی بین افراد، در انتخاب والدین مناسب جهت تولید هیبریدهای برتر از اهمیت فوق‌العادی در اصلاح‌نبات برخوردار است، ضمن این که تنوع ژنتیکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار محسوب می‌گردد(۱، ۱۱ و ۱۸). در این میان توده‌های بومی گیاهان زراعی به دلیل قدمت و سازگاریشان به شرایط محیطی، حاوی مطلوب‌ترین ژن‌ها بوده و تنوع ژنتیکی مورد نیاز اصلاحگران را تأمین می‌نمایند (۶، ۱۰، ۱۲و۱۳). شبدر لگوم، علوفه‌ای با ارزشی بوده که به لحاظ ارزش کمّی و کیفی علوفه و هم‌چنین از نظر حفاظت و حاصل‌خیزی خاک، از اهمیت فراوانی برخوردار است. جنس شبدر *Trifolium* شامل ۳۰۰ گونه مختلف است که

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a_arzani@cc.iut.ac.ir

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.45.14.6]

در این میان شبدر ایرانی *T. resupinatoum* از جمله گونه‌های خودگشن و دیپلوئید (۲n=۲X=۱۴) این جنس بشمار می‌آید که بسیاری از منابع خاستگاه و مرکز تنوع آن را مناطقی از ایران ذکر نموده و به طور گسترده‌ای به‌عنوان گیاه علوفه‌ای پرمحصول مورد کشت و کار قرار می‌گیرد(۲، ۱۳ و۱۹). ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA، در استفاده بهینه از تنوعات ژنتیکی موجود، از دستاوردهای مهم بیوتکنولوژی گیاهی برای اصلاح‌نباتات محسوب می‌گردد (۱، ۱۱و۱۸). نشانگر RAPD در گیاهان زراعی کاربرهای فراوانی دارد، با این وجود بهبود سایر سیستم‌های مبتنی بر PCR با استفاده از تک آغازگرها، قدم بسیار مهمی در جهت جایگزینی این تکنیک می‌باشد(۵). نوعی از این سیستم‌های نشانگری استفاده از آغازگرهایی است که مکان هدف آنها براساس نواحی برش اتصال اینترون- اکسون (Intron-exon splice junction) (ISJ) است. این روش در سال ۱۹۹۱ توسط وینینگ و لانگریج پیشنهاد شد و بعداً توسط رافالسکی و همکاران ارتقا یافت که می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش RAPD و سایر روش‌های هزینه‌بر مانند RFLP و AFLP باشد(۱۶). این دسته از آغازگرها با توالی‌های ۱۰ تا ۱۸ نوکلئوتیدی، به دو دسته آغازگرهای مکان هدف اکسون (Exon targeting) (ET) و اینترون (Intron targeting) (IT) تقسیم‌بندی می‌شوند. آغازگرهای IT نواحی از اینترون و آغازگرهای ET نواحی از اکسون را شناسائی و مورد تکثیر قرار می‌دهند(۹، ۱۴ و ۱۷). نوزیلسکی و همکاران در مطالعه‌ای با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی، تنوع ژنتیکی ارقام تجاری و محلی لوبیای معمولی را مورد بررسی قرار دادند. از بین ۵۰ آغازگر مورد استفاده، ۶ آغازگر براساس تعداد قطعات چندشکل انتخاب شدند. نتایج نشان داد با توجه به تکرارپذیری و دقت بالای این دسته از آغازگرها، می‌توان از فاصله ژنتیکی به‌دست آمده بین ارقام لوبیا، در انتخاب والدین برای تولید بذر هیبرید لوبیا استفاده نمود. وینینگ و هنری در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی ۵۰ ژنوتیپ از گونه جو وحشی (*Hordeum spontaneum*) را که از نقاط مختلف دنیا جمع‌آوری شده بود را با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی مورد بررسی قرار دادند(۲۰). اکثر نمونه‌هایی که از ایران جمع‌آوری شده بود تفاوت معنی‌داری نشان ندادند و گروه مشترکی را تشکیل دادند. رافالسکی و همکاران نیز تنوع ژنتیکی ارقام جو زراعی را که شامل هیبریدهای ساده و والدین برگرداننده باروری بود را با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی مورد بررسی قرار دادند(۱۶). فاصله ژنتیکی اندکی بین ارقام با گرده‌افشانی باز مشاهده شد که ناشی از منبع ژنی مشترک این ژنوتیپ‌ها می‌باشد. گاول و همکاران جهت برآورد فاصله ژنتیکی بین ارقام گندم و تریتیکاله، از آغازگرها تصادفی و نیمه‌تصادفی استفاده نمودند(۵). نتایج بسیار معنی‌داری با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی به‌دست آمد و مشخص گردید که استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی از تکرارپذیری و چندشکلی بسیار برتری نسبت به روش RAPD برخوردار بوده است. رافالسکی و همکاران در مطالعه‌ای دیگر با بررسی تنوع ژنتیکی اینبردلاین‌های ذرت با استفاده از آغازگرهای تصادفی و نیمه‌تصادفی، ضمن برآورد مناسب فاصله ژنتیکی برای تعیین بهترین هیبرید، بر کارائی بالای آغازگرهای نیمه‌تصادفی تاکید نمودند(۱۷). هر آغازگر شامل دو انتهای ′۳ و ′۵ می‌باشد که در هنگام تکثیر DNA قطعات جدید در امتداد ′۵ به ′۳ شروع به رشد می‌کنند. انتهای ′۳ آغازگر مهم‌ترین قسمت جهت اتصال موثرآغازگر در واکنش PCR است (۴). در آغازگرهای گروهIT انتهای ′۳ اختصاصی است و در گروه آغازگرهای ET انتهای ′۵ اختصاصی بوده و با نواحی محافظت شده مکان برش اینترون- اکسون متصل می‌گردد(۵ و ۱۷). بنابراین آغازگرهای گروه IT در تکثیر قطعات از دقت و کارایی بیشتری برخوردار بوده‌اند.

در رابطه با میزان هم‌آهنگی تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی، وینینگ و هنری در ارقام جو را بر اساس آغازگرهای نیمه‌تصادفی به وجود تطابق ارقام با منشاء جغرافیایی در گروه‌بندی پی‌بردند(۲۰). طوری که ارقام جمع‌آوری شده از ایران و فلسطین در گروه‌های مشترک جداگانه‌ای قرار گرفتند. گوستین و همکاران با استفاده از نشانگر RAPD

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.45.14.6]

جدول۱. مشخصات ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی و محل جمع‌آوری آنها

شماره	نام ژنوتیپ	محل جمع‌آوری	شماره	نام ژنوتیپ	محل جمع‌آوری
۱	کرمانشاهی۱	کرمانشاه	۱۱	هراتی	لرستان
۲	کرمانشاهی۲	کرمانشاه	۱۲	ده‌پیر	لرستان
۳	هفتون	اصفهان	۱۳	سیلاخور	لرستان
۴	۵۱۳	اصفهان	۱۴	الشتر	لرستان
۵	نهاوندی	لرستان	۱۵	کازرون	فارس
۶	سه‌چین	اصفهان	۱۶	هفت‌چین بروجرد	لرستان
۷	هفت‌چین	اصفهان	۱۷	الویجان	مرکزی
۸	هفت‌چین همدانی	لرستان	۱۸	بازنه	مرکزی
۹	چگنی	لرستان	۱۹	ریحان	مرکزی
۱۰	دورود	لرستان	۲۰	تجره	مرکزی

توانستند جوامع شبدر سفید را براساس مبدا جغرافیایی گروه‌بندی کنند(۸) در حالی که پراسرت و همکاران گزارش دادند که استفاده از آغازگرهای تصادفی در گروه‌بندی جغرافیایی ارقام شبدر قرمز ناموفق بوده است(۱۵). جونز و همکاران و هم‌چنین گومز و همکاران با بررسی تنوع ژنتیکی ارقام محلی لوبیای معمولی با استفاده از نشانگرهای مولکولی، توانستند ارقام نواحی جغرافیایی مختلف را تفکیک نمایند. با این وجود بعضی از ژنوتیپ‌های مناطق مشترک در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند(۶ و ۱۰).

جزرنکویچ و همکاران برای تائید هیبریدهای سوماتیکی و برآورد فاصله ژنتیکی بین آنها و والدینشان از آغازگرهای نیمه‌تصادفی استفاده نمودند و توانستند با استفاده از قطعات تکثیر شده، افراد هیبرید را شناسایی و بهترین هیبرید را با توجه به حداکثر فاصله ژنتیکی تعیین نمایند(۹). استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی به‌عنوان فن‌آوری جدید در برآورد تنوع ژنتیکی، انتخاب والدین و هیبریدهای مناسب گیاهان زراعی مختلف مطرح می‌باشد(۵، ۹، ۱۴، ۱۶ و ۱۷)، و با توجه به این که اولین قدم در جهت استفاده از ژرم‌پلاسم شبدر ایرانی و اصلاح آن، ارزیابی تنوع ژنتیکی در ذخائر ژرم‌پلاسم موجود از جمله توده‌های بومی آن می‌باشد، مطالعه حاضر تنوع ژنتیکی توده‌های بومی شبدر ایرانی را با استفاده از فن‌آوری PCR و آغازگرهای نیمه‌تصادفی ارزیابی کرده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

در این تحقیق از ۲۰ توده بومی شبدر ایرانی که از نقاط مختلف کشور جمع‌آوری شده بود، استفاده گردید (جدول ۱). استخراج DNA گیاهی به روش ریزنمونه‌ای دلاپورتا و همکاران(۳) با اندکی تغییر به صورت بالک (۸ و ۱۵) با استفاده از مقدار مساوی برگ از ۳۰ بوته از هر توده شبدر انجام گرفت. کمّیت و کیفیت DNA از طریق روش اسپکتروفتومتری با استفاده از اسپکتروفتومتر بک‌من (Beckman DU530 UV-VIS spectrophotometer) مدل DU530 تعیین گردید. ضمن این که کمّیت DNA در مقایسه با غلظت‌های استاندارد DNA لامبدا روی ژل آگارز رنگ شده با اتیدیوم‌بروماید تعیین شد. از کلیه نمونه‌های DNA، محلول پایه ۱۰ نانوگرمی در هر میکرولیتر تهیه و در واکنش PCR استفاده شد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.45.14.6]

آغازگرها، شرایط PCR و الکتروفورز ژل‌آگارز

در بررسی حاضر تعداد ۳۰ آغازگر نیمه‌تصادفی تهیه شده از شرکت پرایم ایتالیا (Primm, Milan- Italy) مورد استفاده قرار گرفت. از این آغازگرها محلول‌هایی با غلظت ۲۰ میکرو مولار تهیه و از این محلول برای اجرای واکنش PCR استفاده گردید. بیست‌وپنج میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی (۲ میکرولیتر از محلول پایه)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، کلریدمنیزیم با غلظت نهایی ۲ میلی‌مولار، dNTPs با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار برای هر کدام، آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی با غلظت ۱ میکرومولار، ۰/۵ واحد آنزیم *Taq* پلی‌مراز و آب دوبار تقطیر بود (۹).

چون آغازگرهای نیمه‌تصادفی استفاده شده دارای توالی‌هایی با تعداد نوکلئوتید متفاوت بودند و هم‌چنین با توجه به اختصاصی بودن قسمتی از آغازگر(۹، ۱۷ و ۲۰)، تکثیر DNA در دو مرحله طبق روش پیشنهادی جزرونکویچ و همکاران با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Techgen اجرا گردید. زمان و دمای مورد نیاز برای مراحل مختلف هر یک از دوره‌های حرارتی در واکنش PCR با آغازگرهای نیمه‌تصادفی بشرح زیر اعمال گردید، که در آن Tm برابر با دمای ذوب آغازگر در نظر گرفته شد (۹):

$[94\ °C\ (40")/Tm + 2\ °\ (60")/72\ °C\ (120")]_7$ /$[94\ °C\ (40")/\ Tm +6\ °C\ (60")/\ 72\ °C(120")]_{33}$ /72 °C (10')

برای انجام الکتروفورز از الکتروفورز افقی ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد استفاده شد. از نشانگر دارای باندهای استاندارد ۱۰۰bp (100bp DNA Ladder, GenCraft, Germany) به‌عنوان نشانگر اندازه استفاده شد و رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵ دقیقه و مشاهده و عکس‌برداری زیر نور UV به کمک دستگاه ژل‌خوان دارای عکس و چاپ ویلبرلورمت (Vilber Lourmat. Model IP-008-SD, France) و نرم‌افزار فتوکپت (Photo-Capt MW, Ver. 99.03) صورت گرفت. قطعات تکثیر شده توسط آغازگرها براساس وجود (۱) و عدم وجود باند (۰) نمره‌گذاری شدند. از نتایج حاصل برای محاسبه ماتریس تشابه جفت توده‌های شبدر براساس ضریب تشابه جاکارد استفاده شد. نهایتاً از این ماتریس تشابه برای تجزیه کلاستر با نرم‌افزار NTSYS.pc براساس روش UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) استفاده شد.

نتایج و بحث

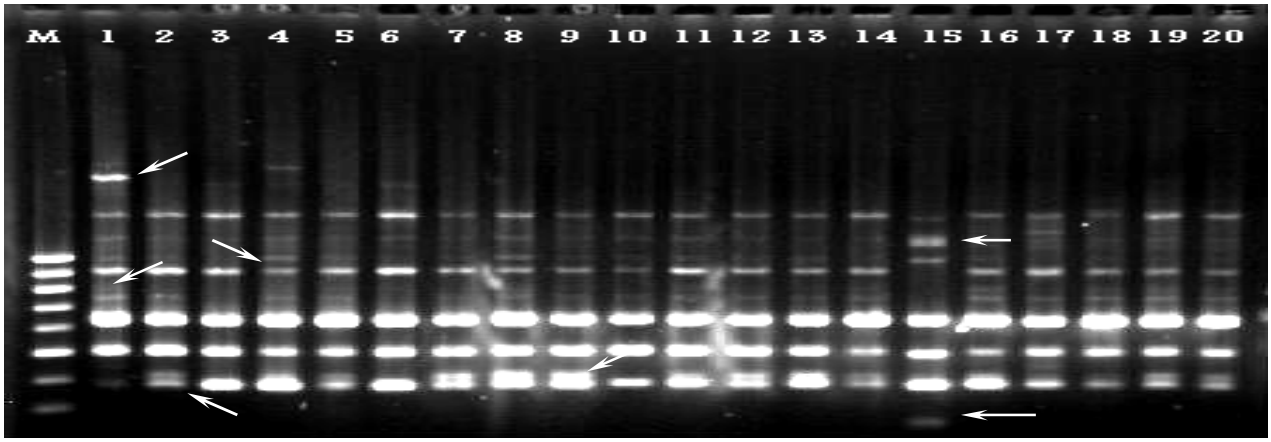
از مجموع ۳۰ آغازگر نیمه‌تصادفی ۱۰ تا ۱۸ نوکلئوتیدی که در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده گردید، ۱۰ آغازگر مجموعاً ۹۳ باند چندشکل تولید نمودند که ۸۴٪ درصد از کل ۱۱۱ عدد باند تولید شده را شامل گردید. بیشترین و کمترین تعداد باند به‌ترتیب متعلق به آغازگرهای(IT_{15-31} وIT_{10-1}) وET_{18-4} با ۱۷ و ۶ باند بود (جدول۲). متوسط تعداد باند به ازای هر آغازگر ۱۱/۱ عدد و برای هر ژنوتیپ ۵/۶ عدد بود. در همین زمینه نوزیلوسکی و همکاران در مطالعه خود روی تنوع ژنتیکی ارقام لوبیا با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی، متوسط تعداد باند به ازای هر ژنوتیپ را ۱۱/۵ باند گزارش نمودند(۱۴). در حالی که رافالسکی و همکاران متوسط تعداد باند تولید شده به ازای هر یک از ژنوتیپ‌های چاودار را ۸/۹ برآورد نمودند(۱۶). در مطالعه‌ای دیگر (۵) میانگین تعداد قطعات تکثیر شده به ازای هر یک از آغازگرهای نیمه‌تصادفی ۱۴ عدد گزارش شده است. در حالی که گوستین و هوف میانگین تعداد باند به ازای هر یک از جوامع شبدر سفید مورد مطالعه را با استفاده از آغازگرهای تصادفی ۳/۵ عدد و پراسرت و همکاران در مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام شبدر قرمز، میانگین تعداد باند به ازای هر آغازگر تصادفی را ۳/۹ باند گزارش نمودند(۷ و ۱۵). نتایج مطالعه حاضر ضمن مشابهت با سایر مطالعات که از آغازگر نیمه تصادفی استفاده کرده بودند (۱۴ و ۱۶)، از میانگین تعداد باند بالاتری نسبت به مطالعات در شبدر مه با استفاده از روش RAPD اجرا شده بود، برخوردار بوده که بیانگر کارایی بالای آغازگرهای نیمه‌تصادفی در ایجاد چندشکلی می‌باشد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.45.14.6]

جدول ۲. مقایسه آغازگرهای نیمه‌تصادفی دارای چندشکلی در توده‌های شبدر ایرانی از لحاظ قطعات تکثیر شده

آغازگر	توالی نوکلئوتیدی (3'–5')	تعداد قطعات تکثیر شده	تعداد قطعات چندشکل	درصد چندشکلی
IT_{10-1}	**ACGTCCA**GAC	۱۷	۱۶	٪۹۴
IT_{10-2}	**ACGTCCA**GGT	۱۱	۱۰	٪۹۱
IT_{10-3}	**ACGTCCA**GCA	۱۰	۷	٪۷۰
IT_{10-4}	**ACGTCCA**CCA	۱۲	۱۰	٪۸۳
IT_{10-6}	**ACGTCCAT**CC	۸	۷	٪۸۸
IT_{15-31}	GAAGCCG**CAGGTAAG**	۱۷	۱۶	٪۹۴
IT_{15-34}	GCGGCAT**CAGGTAAG**	۸	۵	٪۶۳
IT_{15-35}	CGAAGCC**CAGGTAAG**	۱۱	۹	٪۸۲
ET_{15-31}	**ACTTACCTG**GGCCAG	۱۱	۱۰	٪۹۱
ET_{18-4}	**ACTTACCTG**CCTGCCGAG	۶	۳	٪۵۰



شکل ۱. الگوی باندی تولید شده توسط آغازگر IT_{10-3} و نمایش قطعات چندشکل در ۲۰ ژنوتیپ شبدر

آغازگرهای IT نسبت به آغازگرهای ET قطعات تکثیر شده بیشتری با وضوح بهتر تولیدکردند. ضمن این که درصد چندشکلی ناشی از این آغازگرها نیز بیشتر بود. در این میان آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی که همگی از گروه IT بودند، مجموعاً ۵۸ باند تولید نمودند و آغازگرهای IT_{10-1} و IT_{15-31} با ۱۶ عدد باند چندشکل و۹۴٪درصد چندشکلی، بیشترین درصد چندشکلی را در میان آغازگرها به خود اختصاص دادند (شکل۱).

میانگین طول قطعات تولید شده توسط آغازگرهای ET کمتر از ۵۰۰ جفت باز و در آغازگرهای IT بیشتر از ۸۰۰ جفت باز بود. در اکثر موارد به علت طول کم و مشابه بودن حرکت قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهایET بر روی ژل آگارز در طی الکتروفورز، قطعات حاصل از این نوع آغازگرها قابلیت امتیازدهی نداشت و به همین علت در مراحل اولیه بیشتر این آغازگرها از آزمایش حذف شدند. سه دلیل عمده زیر را می‌توان علل احتمالی چندشکلی بیشتر و اندازه بزرگ‌تر قطعات تولید شده در آغازگرهای IT در ژنوتیپ‌های شبدر مورد بررسی دانست:

۱. نواحی از ژنوم که قابلیت کد نمودن ژن‌ها را ندارند (اینترون‌ها) بیش از ۹۵ درصد کل ژنوم یک گیاه را تشکیل می‌دهند (۴، ۱۱، ۱۲ و ۱۸) و با توجه به این که آغازگرهای IT این نوحی را مورد هدف و تکثیر قرار

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.45.14.6]

جدول ۳. ماتریس ضرایب تشابه برای ژنوتیپ‌های شبدر با استفاده ازداده‌های آغازگرهای نیمه‌تصادفی بر اساس روش UPGMA

ژنوتیپ	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
۱	۱/۰۰																			
۲	۰/۷۰	۱/۰۰																		
۳	۰/۶۵	۰/۸۸	۱/۰۰																	
۴	۰/۷۰	۰/۸۲	۰/۸۴	۱/۰۰																
۵	۰/۶۵	۰/۹۱	۰/۸۶	۰/۸۱	۱/۰۰															
۶	۰/۷۰	۰/۸۹	۰/۹۱	۰/۸۹	۰/۹۱	۱/۰۰														
۷	۰/۷۲	۰/۸۴	۰/۷۹	۰/۸۱	۰/۸۲	۰/۸۴	۱/۰۰													
۸	۰/۶۸	۰/۸۴	۰/۷۹	۰/۸۴	۰/۹۰	۰/۸۴	۰/۸۲	۱/۰۰												
۹	۰/۶۵	۰/۸۱	۰/۷۵	۰/۸۱	۰/۸۶	۰/۸۱	۰/۸۲	۰/۹۶	۱/۰۰											
۱۰	۰/۶۵	۰/۷۷	۰/۷۵	۰/۷۷	۰/۷۹	۰/۷۷	۰/۷۹	۰/۸۲	۰/۷۹	۱/۰۰										
۱۱	۰/۵۸	۰/۷۴	۰/۶۸	۰/۷۱	۰/۷۹	۰/۷۰	۰/۷۹	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۲	۱/۰۰									
۱۲	۰/۶۷	۰/۸۲	۰/۸۱	۰/۸۶	۰/۸۸	۰/۸۹	۰/۸۸	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۷۷	۰/۷۷	۱/۰۰								
۱۳	۰/۷۰	۰/۸۶	۰/۸۱	۰/۸۶	۰/۹۱	۰/۸۶	۰/۸۸	۰/۹۵	۰/۹۱	۰/۸۴	۰/۸۱	۰/۹۳	۱/۰۰							
۱۴	۰/۶۵	۰/۸۱	۰/۸۲	۰/۷۰	۰/۸۲	۰/۷۷	۰/۸۲	۰/۷۹	۰/۷۹	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۸۲	۰/۸۴	۱/۰۰						
۱۵	۰/۴۴	۰/۵۶	۰/۵۱	۰/۵۶	۰/۵۸	۰/۵۶	۰/۵۴	۰/۵۸	۰/۵۸	۰/۵۱	۰/۵۸	۰/۶۳	۰/۶۰	۰/۵۱	۱/۰۰					
۱۶	۰/۷۵	۰/۸۱	۰/۷۹	۰/۷۷	۰/۸۲	۰/۸۱	۰/۷۵	۰/۷۹	۰/۷۶	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۷۷	۰/۸۱	۰/۷۵	۰/۵۸	۱/۰۰				
۱۷	۰/۶۷	۰/۷۹	۰/۷۷	۰/۲	۰/۸۱	۰/۷۹	۰/۷۴	۰/۸۱	۰/۷۷	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۷۲	۰/۷۹	۰/۷۰	۰/۴۲	۰/۷۷	۱/۰۰			
۱۸	۰/۶۵	۰/۸۴	۰/۷۹	۰/۷۷	۰/۸۹	۰/۸۴	۰/۷۹	۰/۸۲	۰/۷۹	۰/۷۲	۰/۷۲	۰/۷۷	۰/۸۴	۰/۷۲	۰/۴۷	۰/۸۲	۰/۸۸	۱/۰۰		
۱۹	۰/۶۱	۰/۷۷	۰/۷۵	۰/۶۷	۰/۷۹	۰/۷۴	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۲	۰/۷۲	۰/۷۹	۰/۶۷	۰/۷۴	۰/۷۲	۰/۴۴	۰/۷۵	۰/۸۴	۰/۹۰	۱/۰۰	
۲۰	۰/۶۱	۰/۸۱	۰/۷۵	۰/۷۴	۰/۸۶	۰/۸۱	۰/۷۵	۰/۷۹	۰/۷۵	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۷۴	۰/۸۱	۰/۶۸	۰/۴۷	۰/۷۹	۰/۸۴	۰/۹۶	۰/۸۶	۱/۰۰

می‌دهند (۹، ۱۴ و ۱۷) و یک آغازگر با وجود نقاط اتصال بیشتر روی ژنوم، احتمال بیشتری برای تکثیر قطعات DNA خواهند داشت و هر چه طول قطعه‌ای از ژنوم که آغازگر به عنوان مکان هدف و تکثیر انتخاب می‌کند بزرگ‌تر باشد شانس تکثیر قطعات بیشتر با طول بزرگ‌تر بیشتر خواهد بود (۲۱). این نتایج موید این موضوع است که اندازه وتعداد قطعات بین ژنی (اینترون) در ژنوم شبدر ایرانی زیاد می‌باشد که همین عامل سبب اندازه بزرگ‌تر و قطعات بیشتر تولید شده توسط این دسته از آغازگرها شده است.

۲. جهش‌ها مهم‌ترین عامل ایجاد کننده چندشکلی در مطالعات تنوع ژنتیکی توسط نشانگرهای مولکولی هستند. با توجه به این که نواحی اینترون به بروز جهش‌های مختلف حساسیت بیشتری دارند و از لحاظ تکاملی کمتر حفاظت شده می‌باشند (۴، ۱۱ و ۱۲) به همین لحاظ چندشکلی بیشتر در نواحی اینترون که توسط آغازگرهای IT بروز یافته است، انتظار می‌رود.

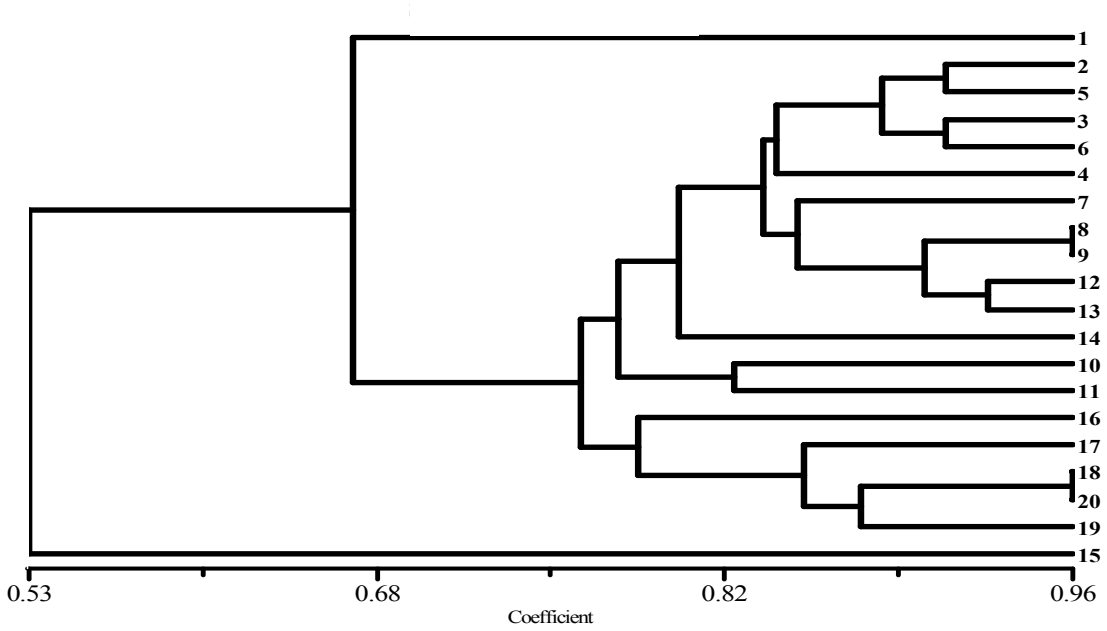
نتایج مشابهی توسط رافالسکی و همکاران روی چاودار مشاهده شد. در مطالعه آنها آغازگرهای ۱۵ نوکلئوتیدی و عمدتاً آغازگرهای IT چندشکلی بیشتری داشتند(۱۶). در مطالعه‌ای دیگر (۹) مشخص شد که آغازگرهای ۱۸ نوکلئوتیدی الگوی باندی پیچیده‌تری تولید می‌کنند ولی تفاوت عمده‌ای بین آغازگرهای ET و IT دیده نشد. نتایج بررسی حاضر با گزارش گاول و همکاران، هم‌آهنگی دارد. آنها ضمن مقایسه آغازگرهای ET و IT، مشاهده نمودند که بیشتر آغازگرهای ET فاقد چندشکلی مناسب بوده و بهترین نتیجه با استفاده از آغازگرهای IT به‌دست آمد(۵).

براساس ضرایب تشابه ارائه شده، بیشترین شباهت بین توده‌های هفت‌چین همدانی و چگنی از لرستان از یک طرف و بازنه و تجره از مرکزی از طرف دیگر با ۹۶ درصد و کمترین شباهت بین دو توده کازرون و الویجان با ۴۲ درصد بود (جدول۳). ضمن این که میانگین ضریب تشابه بین توده‌های مورد بررسی ۰/۷۶ بود.

دندروگرام حاصل نشان داد که توده کازرون کمترین شباهت (۰/۵۳) را با سایر توده‌ها داشت و به تنهایی یک گروه

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.45.14.6]



شکل۲. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۰ ژنوتیپ شبدر با استفاده از داده‌های آغازگرهای نیمه‌تصادفی

جداگانه‌ای را به خود اختصاص داد. پس از آن توده کرمانشاهی ۱ نیز با شباهت متوسط ۰/۶۷ بیشترین فاصله را با ۱۸ توده باقی‌مانده نشان داد و به تنهایی گروه ۲ را تشکیل داد. این دو توده فاصله زیادی از هم داشته (جدول ۳) و در واقع با بیشتر آغازگرها تولید قطعات چند شکل متمایزی نمودند (شکل ۱). در صورتی که دندروگرام حاصل در ضریب تشابه ۰/۷۸ قطع شود (شکل۲)، هیجده توده‌های باقی‌مانده به ۳ گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول شامل توده‌های کرمانشاهی۲، هفتون اصفهان، توده ۵۱۳ اصفهان، نهاوندی، سه‌چین اصفهان، هفت‌چین اصفهان، هفت‌چین همدانی، چگنی، ده‌پیر، سیلاخور و الشتر بود. این گروه بیشترین تعداد توده‌های شبدر مورد بررسی را در خود جای داد. گروه دوم شامل دو توده از استان لرستان با نام‌های دورود و هراتی بروجرد بود و گروه سوم را توده‌های استان مرکزی شامل الویجان، بازنه، ریحان و تجره به همراه توده هفت چین بروجردی تشکیل دادند. در گروه اول توده‌های ده‌پیر و سیلاخور از لرستان و هفتون و سه‌چین از اصفهان در ضریب تشابه ۰/۹۰ به طور جداگانه تشکیل گروه‌های مشابهی دادند که نشان‌دهنده شباهت بالا بین این توده‌ها بود. این گروه‌بندی به جز گروه توده کرمانشاهی ۱ تطابق خوبی با منشا جغرافیایی توده‌های شبدر ایرانی دارد. عدم هم‌آهنگی توده کرمانشاهی ۱ با گروه‌بندی جغرافیایی ممکن است ناشی از ۱) اشتباه در نمونه‌برداری، ۲) اشتباه در نامگذاری، ۳) مهاجرت توده مذکور و یا ۴) ناکافی بودن نتایج حاصل با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده بوده باشد.

توده‌های بومی گیاهان زراعی در طول زمان با جهش‌ها (ژنی و کروموزومی) و نوترکیبی توانسته‌اند که خود را با تغییرات شرایط محیطی تطبیق داده و نسبت به محیط رشد خود سازش پیدا کنند. عموماً هر چه دو محیط از نظر شرایط محیطی اختلافات بیشتری داشته باشند، گیاهان آن دو ناحیه اقلیمی خاص، دارای تفاوت‌های بیشتری از نظر خصوصیات ژنتیکی نسبت به همدیگر می‌باشند(۳، ۶ و۱۰). بنابراین تفاوت‌های دیده شده بین دو ناحیه جغرافیایی ناشی از شرایط خاص اقلیمی بوده که این شرایط موجب تغییرات ژنتیکی بین دو ژنوم سازش یافته در نواحی مختلف می‌شوند. از نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌توان چنین بیان داشت که استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی در مطالعه تنوع ژنتیکی

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.45.14.6]

توده‌های بومی شبدر ایرانی مناسب بوده و می‌توان از نتایج به دست آمده برای سایر مطالعات ژنتیکی و اصلاحی شبدر ایرانی به منظور انتخاب والدین در برنامه‌های دورگ‌گیری با توجه به حداکثر فاصله ژنتیکی برای تولید ارقام برتر، مطالعات صفات مهم و بررسی روابط خویشاوندی در جنس شبدر استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

۱. ارزانی، ا. ۱۳۸۰. *اصلاح گیاهان زراعی (ترجمه)*. مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان.

۲. کریمی، ه. ۱۳۶۷. *زراعت و اصلاح گیاهان علوفه‌ای*. انتشارات دانشگاه تهران.

3. Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Ticks. 1983. A plant molecular DNA minipreparation Version II. Plant. Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.
4. Erlich, H. A. 1989. PCR Technology: Principle and Applications for DNA Amplification. Mostockton Press, USA.
5. Gawel, M., I. Wisnewska and A. Rafalski. 2002. Semi-specific PCR for evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale. Cell. Mol. Biol. Lett. 7: 577-582.
6. Gumez, O. J., M. W. Blair, B. E. Frankow and V. Gullberg. 2004. Molecular and phenotypic diversity of common bean landraces from Nicaragua. Crop Sci. 44: 1412-1418.
7. Gustine, D. L. and D. R. Huff. 1999. Genetic variation within and among white clover populations from managed permanent pastures of the northeastern USA. Crop Sci. 39: 524-530.
8. Gustine, D. L., P. W. Voigt, E. C. Brummer and Y. A. Papadopoulos. 2002. Genetic variation of RAPD markers of North American white clover collections and cultivars. Crop Sci. 42: 343-347.
9. Jrzetakiewicz, J., A. Nadolska-Orczyk and W. Orczyk. 2002. The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. Cell Mol. Biol. Lett. 7:671-676.
10. Johns, M. A., P. W. Skroch, J. Nienhuis, P. Hinrichsen, G. Bascure and C. Munoz-Schick. 1997. Core pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. Crop Sci. 37: 605-613.
11. Kumar, L. S. 1999. DNA marker in plant improvement: An overview. Biotech. Adv. 17: 143-182.
12. Mohan, M., S. Nair, A. Bagwat, T. G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia and T. Sasaki. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Mol. Breed. 3: 87-103.
13. Morris, J.B. and S.L. Greene. 2001. Defining a multiple-use germplasm collection for genus *Trifolium*. Crop Sci. 41: 893-901.
14. Nowoseielski, J., W. Podyma and D. N. W. Sielska. 2002. Molecular research on the genetic diversity of Polish varieties and landraces of *Phaseolus cocclineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. Cell. Mol. Biol. Lett. 7: 753-762.
15. Prasert, K., M. J. Waterway, B. E. Coulman and M. G. Fortin. 1996. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified bulk DNA. Euphytica 89: 355-361.
16. Rafalski, A., L. Madej, I. Wisniewska and M. Gawelo. 2002. The genetic diversity of components of rye hybrids. Cell. Mol. Bio. Lett. 7: 471-475.
17. Rafalski, A., M. Gizinska and I. Wisniewska. 1997. PCR-based system for evolution of relationships among maize inbreds. PP. 106-111. *In*: Tsaftaries, A.S. (Ed.), Genetics and Biotechnology of Maize and Sorghum. Royal Soc. Chem., Cambridge. UK.
18. Sharma, K.K., J.H. Crouch and C.T. Hash. 2002. Applications of biotechnology for crop improvement: Prospects and constraints. Plant. Sci. 163: 381-395.
19. Taylor, N. L. 1987. Clover around the world. *In*: Taylor, N. L. (Ed.), Clover Science and Technology. Amer. Soc. Agron. Madison, WI.
20. Weining, S. and R. J. Henry. 1995. Molecular analysis of DNA polymorphism of barley (*Hordeum spontaneum*) germplasm using the polymerase chain reaction. Genet. Res. Crop. Evol. 42: 273-281.
21. Weining. S. and P. Langridge. 1991. Identification and mapping of polymorphisms in cereals on the polymerase chain reaction. Theor. Appl. Genet. 82: 209-216.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.45.14.6]