بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دیم با استفاده از نشانگرهای RAPD و صفات مورفولوژیکی

رضا دریکوند[1*]، الهام سلاحورزی[1]، طهماسب حسین‌پور[2] و احمد اسماعیلی[3]

چکیده

تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های گندم دیم برای اهداف بهنژادی بسیار مهم است، زیرا ژرم پلاسم یکنواخت ممکن است در معرض تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار گیرد. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ گندم دیم با استفاده از صفات مورفولوژیکی و ۲۰ آغازگر RAPD بررسی شدند. ژنوتیپ‌ها از نظر اغلب صفات مورفولوژیکی اختلاف معنی‌دار داشتندکه بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بین آن‌ها است. بر اساس داده‌های مولکولی، در مجموع ۱۹۷ نوار متمایز در ۲۵ ژنوتیپ بدست آمد. میانگین تعداد نشانگر به‌ازای هر آغازگر ۹/۸ بود. از تعداد کل نوارها، ۱۶۰ نوار چند شکل بودند. با توجه به ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها و داده‌های مولکولی و مورفولوژیکی بر اساس فاصله اقلیدسی آن‌ها، دامنه تشابه ژنوتیپ‌ها به ترتیب بین ۰/۵۶ تا ۰/۸۳ و ۱/۹۲ تا ۱۰۸/۶۹ متغیر بود. بیشترین میزان شباهت بر اساس نشانگر RAPD و صفات مورفولوژیکی به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های مارون با گهر(۸۳٪) و کوهدشت با Pigo (۱/۹۲) بود. نشانگر RAPD و صفات مورفولوژیکی توانستند ژنوتیپ‌های تیپ بهاره، زمستانه و هم‌چنین ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا (Nestor, TV2, Katila-11 و GHK) را به‌خوبی از هم تفکیک نمایند، ولی در تفکیک ژنوتیپ‌های گندم نان و دوروم نشانگرها متفاوت بودند. بین ماتریس تشابه داده‌های مولکولی و صفات موفورلوژیک همبستگی منفی ولی غیرمعنی‌دار وجود داشت.

واژه‌های کلیدی: گندم دیم، صفات مورفولوژیک، تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای، RAPD.

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۰

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد، * مسئول مکاتبات: drikvand_f@yahoo.com

۲- عضو هیأت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان

۳- عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان.

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum*) در بین تمام گیاهان زراعی بیشترین سطح زیر کشت را در جهان به خود اختصاص داده است. این گیاه دارای ارقام مختلف است که در اختیار کشاورزان قرار دارند و یا ارقام تحت معرفی که توسط موسسات بهنژادی در حال معرفی می‌باشند. با اطلاع از میزان تنوع منابع ژنتیکی و بهره برداری از آن می‌توان واریته‌های جدید و مطلوب‌تر به‌خصوص برای مناطق دیم توصیه نمود. بنابراین آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان اجزای مهم طرح‌های بهنژادی تلقی می‌شود. در واقع تنوع مبنای همه گزینش‌ها است و دسترسی به تنوع ژنتیکی، اساس کارهای اصلاحی و انتخاب ژنوتیپ‌ها و نمونه‌های گیاهی مورد نظر می‌باشد (Ghareyazie, 1995). ساده‌ترین راهی که پیش روی بهنژادگران جهت افزایش عملکرد در واحد سطح وجود دارد، گزینش رگه‌های پر محصول است (Joshig and Nguyen, 1993). اما لازمه گزینش تنوع است و بایستی از میزان تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آن‌ها و فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت‌ها اطلاع کافی داشت تا بتوان در برنامه‌های بهنژادی، امکان سازماندهی ژرم پلاسم و نمونه‌گیری موثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم آورد (Samiey, 2003).

فراهانی (Farahani, 2003) با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی و صفات مورفولوژیک توانست ۲۰ لاین پیشرفته گندم دوروم را به خوبی گروه‌بندی نماید و با توجه به اطلاعات به دست آمده و دورترین گروه‌ها از نظر فاصله ژنتیکی، لاین‌های برتر را معرفی کرد. علی‌اف و همکاران (Aliyev *et al*., 2007) با استفاده از نشانگرRAPD توانستند ۱۰ گونه دیپلوئید و تتراپلوئید گندم را گروه‌بندی نمایند. گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید به‌طور مجزا گروه‌هایی را تشکیل دادند، با این وجود در بعضی گروه‌ها هر دو گونه وجود داشتند. نتایج به طور کلی نشان داد که شباهت ژنتیکی به دست آمده در این روش با شباهت‌های فنوتیپی موجود متفاوت است. ماریک و همکاران (Maric *et al*., 2004) تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم نان را با استفاده از نشانگر مولکولیRAPD و صفات مورفولوژیک مورد مقایسه قرار دادند و نتیجه گرفتند که گروه‌بندی بر اساس نشانگر و صفات مورفولوژیک با هم متفاوت است و هیچ‌گونه همبستگی بین این دو گروه نشانگر مشاهده نشد. تشال و همکاران (Teshal *et al*., 2008)، ۲۷ ژنوتیپ گندم شامل گونه‌های تتراپلوئید و هگزاپلوییید را با استفاده از نشانگر تصادفی RAPD مورد مقایسه قرار دادند. با توجه به فاصله ژنتیکی به دست آمده، تنوع بین ژنوتیپ‌های گونه تتراپلوئید بیشتر از گونه هگزاپلوئید بود. مندولکانی و همکاران (Mandolkany *et al*., 2002) در مطالعه خود تنوع ژنتیکی ۲۸ رقم گندم نان را با استفاده از آغازگرهای تصادفی RAPD مورد بررسی قرار دادند. گروه‌بندی حاصل این ارقام را به دو گروه مساوی تقسیم نمود. آن‌ها نتیجه گرفتند که نشانگر RAPD جهت ارزیابی‌های تنوع ژنتیکی در گندم مناسب است. پوجار و همکاران (Pujar *et al*., 1999) با استفاده از ۸۱ آغازگر تصادفی تنوع ٦٤ ژنوتیپ گندم تتراپلوئید را بررسی نمودند، این نشانگر ژنوتیپ‌ها را به درستی گروه‌بندی نمود. بوتا و همکاران (Bhutta *et al*., 2005) هفت ژنوتیپ گندم معمولی را از نواحی مختلف پاکستان با استفاده از ۲۰۰ آغازگر تصادفی RAPD مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که شباهت ژنتیکی بالایی بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد و آن‌ها مطالعات بیشتر با استفاده از سایر نشانگرها را در این زمینه مورد تاکید قرار دادند. مرادی و چغامیرزا (Moradi and Cheghamirza, 2006) از نشانگرهای RAPD و ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی نمونه‌های مختلف گندم دوروم استفاده نمودند. نتایج نشان داد که نشانگرهای تصادفی روش مناسبی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در گندم است. تاران و همکاران (Taran *et al*., 2005) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD، ریز ماهواره و صفات مورفو- فیزیولوژیکی به ارزیابی روابط ژنتیکی و تشابه ژنتیکی ٦٥ واریته نخود فرنگی پرداختند. با استفاده از داده‌های مولکولی و محاسبه ضریب تشابه نی و لی و مقایسه داده‌های مولکولی دو نشانگر مشخص شد که تشابه ژنتیکی واریته‌ها از۳٤٪ تا ۱ متغیر است. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش گروه‌های جفتی بر اساس میانگین حسابی و تجزیه هماهنگ اصلی بر اساس تشابه ژنتیکی داده‌های مولکولی، واریته های زراعی را بطور جداگانه از اجداد وحشی آن‌ها تفکیک نمود. دالبرگ و همکاران (Dahlberg *et al*., 2002) تنوع ژنتیکی۹٤ ژنوتیپ سورگوم را با استفاده از نشانگر RAPD و صفت مورفولوژی رنگ بذر مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق بین این صفت و تنوع حاصل از نشانگر RAPD همبستگی مشاهده نگردید.

هدف از انجام این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دیم با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و صفات موفولوژیک و مقایسه دو روش در تفکیک و تمایز ژنوتیپ‌ها بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای انجام این تحقیق ۲۵ ژنوتیپ گندم دیم از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان تهیه شدند. لازم به ذکر است که ژنوتیپ‌های آذر۲ و سرداری، تیپ رشد زمستانه و سایر ژنوتیپ‌ها تیپ رشد بهاره دارند (جدول ۱).

آزمایش مزرعه‌ای

پس از آماده‌سازی زمین، ژنوتیپ‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی کشت شدند. در طی فصل رشد و پس از برداشت صفات: ارتفاع بوته، تعداد دانه در سنبله، روز تا رسیدگی، طول ریشک، طول سنبله، طول برگ پرچم، طول پدانکل، وزن دانه‌های ده سنبله، وزن هزار دانه، عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک و شاخص برداشت اندازه گیری شدند.

آزمایش مولکولی

از هر ژنوتیپ تعداد ۲۰ بذر در گلخانه کشت گردید. بعد از گذشت ۱٤ روز از هر نمونه تعدادی برگ جمع آوری شد و پس از قرار دادن در داخل فویل آلومینیومی روی یخ گذاشته شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در فریزر $-20^{o}C$ نگهداری شدند. استخراج DNA به روش ریز نمونه‌ای با روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1983)، صورت گرفت. به منظور حذف RNA از نمونه‌ها با توجه به مشاهدات اولیه بر اساس ژل الکتروفورز، ۱-۲ میکرولیتر از آنزیم RNase (۱۰ *mg/ml*) برای هر نمونه استفاده شد. پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA، از محلول پایه نمونه‌هایی با غلظت ۱۰ نانوگرم در هر میکرولیتر تهیه و برای استفاده در واکنش‌های PCR در فریزر $-20^{o}C$ نگهداری شدند. ۲۰ آغازگر تصادفی ده نوکلئوتیدی با توجه به مطالعات قبلی انجام شده در گندم، تهیه شدند (جدول ۲).

محلول واکنش در حجم ۲۵ میکرو لیتر (جدول ۳) تهیه گردید. ابتدا گرادیانت دمایی هر آغازگر تعیین شد، محلول واکنش به‌منظور واسرشته سازی DNA و تک رشته‌ای شدن به ترتیب به مدت چهار و یک دقیقه در دمای ^{oC} ۹٤ قرار گرفت. چسبیدن آغازگر به مدت یک دقیقه در دمای ^{oC} ۳٦ و تکثیر نهایی به مدت شش دقیقه در دمای ^{oC} ۷۲ انجام شد. فرآورده‌های حاصل از تکثیر جهت تفکیک به ژل آگارز ۱/۵٪ منتقل شدند و رنگ‌آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) انجام شد. الگوهای نواری بر اساس حضور (۱) و عدم حضور (۰) امتیازدهی شدند و ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد تشکیل شد.

تجزیه آماری داده‌ها

داده‌های مورفولوژیک پس از اندازه‌گیری بر اساس طرح آماری و با استفاده از نرم افزارSAS تجزیه واریانس شدند. دندروگرام در داده‌های مولکولی بر اساس الگوریتم UPGMA و در داده‌های مورفولوژیک بر اساس روش Ward به ترتیب با استفاده از نرم افزارهای NTSYS و SPSS تهیه شدند.

نتایج و بحث

داده‌های مورفولوژیک

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه‌ی آماری، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر اغلب صفات مورد بررسی اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ٤). این موضوع بیانگر این است که بین ژنوتیپ‌ها از نظر صفات مورفولوژیک تنوع وجود دارد. فاصله اقلیدسی بین ژنوتیپ‌ها دامنه‌ای از۱/۹۲ تا ۱۰۸/٦۹را داشت. کمترین فاصله مربوط به دو ژنوتیپ کوهدشت و Pigo و بیشترین فاصله مربوط به ژنوتیپ‌های شاهیوندی و GHK بود. فاصله ژنوتیپ‌های با تیپ رشد زمستانه (سرداری و آذر۲) ٦/٦۷ و فاصله ژنوتیپ‌های دوروم (شاهیوندی و سیمره) ۲۲/۳۲ بود. میانگین فاصله‌ی اقلیدسی برابر۲٤ بود. بر اساس کلیه صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده، با استفاده از روش Ward و فاصله‌ی استاندار شده اقلیدسی، ژنوتیپ‌ها گروه‌بندی شدند (شکل۱). روش‌های مختلفی جهت پیش‌بینی محل برش دندروگرام وجود دارد، که مهم‌ترین آن‌ها برش دندروگرام با توجه به هدف تحقیق بوده است (Samiey, 2003). بر این اساس ژنوتیپ‌ها در شش گروه به شرح زیر قرار گرفتند. گروه اول شامل: ژنوتیپ‌های کوهدشت، Berkut, Florkawa-2, Sitha/Chil, TV2, Seri, Nestor, Pigo و زاگرس بود. این ژنوتیپ‌ها دارای تیپ رشد بهاره هستند و در شرایط دیم محل اجرای آزمایش نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها از عملکرد دانه بیشتری برخوردار بودند (مانند Nestor و TV2). گروه دوم:

ژنوتیپ‌های مارون، Hamam-4, Seri-82, Zemamra-8, Seri/Rayon و Bavicora بودند. گروه سوم: سه ژنوتیپ Croc, Chen/Agilops و گهر بودند. این ژنوتیپ‌ها همگی تیپ رشد بهاره دارند. گروه چهارم: ژنوتیپ‌های سرداری و آذر۲ بودند. که این ژنوتیپ‌ها تیپ رشد زمستانه دارند و در مناطق سردسیر دیم کشت می‌شوند. گروه پنجم: ژنوتیپ‌های سیمره و شاهیوندی بودند که جزء گندم‌های دوروم هستند (تتراپلوئید). گروه ششم: در این گروه ژنوتیپ‌های TJN, GHK و Katila-11 (بعد از گروه اول، بالاترین عملکرد دانه را تولید کردند) قرار گرفتند. با توجه به گروه بندی‌های فوق ملاحظه می گردد که تجزیه‌ی خوشه‌ای بر اساس صفات مورفولوژیک، ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی از هم تفکیک نمود، به‌طوری‌که گندم های نان، دوروم و گندم‌های با تیپ رشد بهاره و پاییزه و هم‌چنین ژنوتیپ‌های با تیپ رشد بهاره که در محل اجرای آزمایش عملکرد دانه بالایی داشتند، در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. هرچند صفات مورفولوژیک تحت تاثیر محیط قرار می‌گیرند و ممکن است در محیط‌های مختلف بروز متفاوتی داشته باشند، ولی در مطالعه حاضر گروه‌بندی بر اساس این صفات توانسته ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی تفکیک کند. بنابراین با توجه به سادگی اندازه‌گیری و هزینه‌ی پایین، در برخی موارد می‌توان از این صفات جهت بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده نمود.

داده‌های مولکولی

از ۲۰ آغازگر مورد استفاده، ۱۸ آغازگر در مکان‌های تکثیر شده چند شکلی نشان دادند، آغازگرهایی که چند شکلی نشان دادند در کل ۱۹۷ نوار قابل امتیازدهی در ۲۵ ژنوتیپ مورد بررسی را تکثیر کردند که اندازه آن‌ها بین ۲۵۰۰bp-۱۰۰ بود. از این نوارها، تعداد ۱۶۰ نوار چند شکلی نشان دادند. میانگین نوار تکثیر شده به‌ازای هر آغازگر ۹/۸ بود. بسته به نوع آغازگر تعداد نوار چند شکل از چهارده نوار (آغازگر OPE-02) تا هفت نوار (در آغازگر A1) متغیر بود. در این میان آغازگر OPE-02 و OPB-10 تنوع بیشتری را شناسایی کردند. بیشترین درصد چندشکلی در آغازگرهای OPB-11، OPF-4، F12، OPL-08، OPG-13 و OPA-19 مشاهده شد. آغازگرهای OPO-01 و OPO-02 نیز نوار مناسبی جهت امتیازدهی نشان ندادند.

ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA تشکیل گردید. ارزش‌های تشابه بین جفت ژنوتیپ‌ها دامنه‌ای از ۵۰ تا ۸۳ درصد داشتند. کمترین تشابه ژنتیکی (۵۰٪) بین ژنوتیپ‌های Nestor و Seri-82 و بیشترین شباهت (۸۳٪) بین ژنوتیپ‌های گهر و مارون مشاهده شد. ضریب تشابه بین دو ژنوتیپ آذر۲ و سرداری که تیپ رشد زمستانه دارند، ٦٧٪ و بین ژنوتیپ‌های سیمره و شاهیوندی ٦٢٪ بود. کمترین تشابه ژنتیکی (۵۰٪) بین ژنوتیپ‌های Nestor و Seri-82 و بیشترین شباهت (۸۳٪) بین ژنوتیپ‌های گهر و مارون وجود داشت. میانگین ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌های گندم دیم ٦٣٪ درصد بود. ژنوتیپ شاهیوندی که جز ارقام محلی استان لرستان است، ضریب تشابه کمتری با سایر ژنوتیپ‌ها داشت.

بوتا و همکاران (Bhutta *et al*., 2006) با استفاده از نشانگر RAPD ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌های گندم را بین ۸۳ تا ۹۳٪ گزارش نمودند. در مطالعه‌ی دیگری شارما و هش (Sharma and Hash, 2002) با استفاده از نشانگر RAPD، مشخص نمودند بالاترین درصد تشابه بین ژنوتیپ‌های گندم متحمل به شوری ۹۷٪ است. در بررسی شاه نجات بوشهری و همکاران (Shah nejat-Bushehri *et al*., 2002) دامنه ضریب تشابه بین ارقام گندم نان با استفاده از نشانگر RAPD بین ٦٥ تا ۹۱٪ برآورد شد. تشال و همکاران (Teshal *et al*., 2008) نیز با استفاده از نشانگر RAPD دامنه ضریب تشابه ژنوتیپ‌های گندم را بین ٦٣ تا ۹۵٪ برآورد نمودند. تاران و همکاران (Taran *et al*., 2005) در مطالعه خود با استفاده از نشانگر RAPD و SSR نشان دادند که تشابه ژنتیکی ٦٥ واریته نخود فرنگی از ٣٤٪ تا ۱ متغیر بوده است.

در این مطالعه بر اساس ماتریس تشابه حاصل از ضریب جاکارد و دندروگرام به روش UPGMA با ضریب ۹۱٪، گروه‌بندی ۲۵ ژنوتیپ گندم انجام گرفت. بر اساس ضرایب تشابه به دست آمده، با قطع دندروگرام در نقطه ٦٠ درصد، ٤ گروه اصلی به دست آمد.

گروه اول: شامل ژنوتیپ‌های آذر۲، سرداری، زاگرس، گهر، مارون، Katila-11، سیمره، GHK، کوهدشت، Florkawa-2، Pigo، Berkut، Seri، Croc، Bavicora، TJN، Hamam-4، Chen/agilops، Seri/rayon و Sith/Chil بودند. گروه دوم:

شامل ژنوتیپ‌های Zemamra-8 و Seri-82 بودند که با ٦٢ درصد تشابه ژنتیکی طبق جدول ماتریس تشابه و دندروگرام حاصل در یک گروه قرارگرفته‌اند که هر دو جزء ژنوتیپ‌های بهاره می‌باشند.

گروه سوم: شامل ژنوتیپ‌های TV2 و Nestor بودند که ۷۱ درصد تشابه ژنتیکی را با یکدیگر نشان داده و در یک گروه قرار گرفتند. این ژنوتیپ‌ها که از ژنوتیپ‌های امید بخش می‌باشند، دارای عملکرد نسبتا بالایی در شرایط محل اجرای آزمایش بودند. گروه چهارم: به تنهایی شامل رقم شاهیوندی بود که تتراپلوئید بوده و جزء ارقام بومی استان لرستان می‌باشد. بیشترین میزان تشابه ژنتیکی را طبق جدول ماتریس تشابه با رقم سیمره (تتراپلوئید) با ٦٢ درصد تشابه و کمترین میزان شباهت را Zemamra-8 با ۵۰ درصد تشابه نشان داده است. علی اف و همکاران (Aliyev *et al*., 2007) با استفاده از نشانگر RAPD توانستند ۱۰ گونه دیپلوئید و تتراپلوئید گندم را گروه‌بندی نمایند. گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید به طور مجزا گروه‌هایی را تشکیل داده با این وجود در بعضی گروه‌ها هر دو گونه وجود داشتند. عباس و همکاران (Abbas *et al*., 2008) نیز با استفاده از نشانگر RAPD توانستند گونه‌های تتراپلوئید و دیپلوئید گندم را به‌خوبی از هم تفکیک نمایند، هر چند که در مطالعه‌ی آنها شباهت‌های ژنتیکی به‌دست آمده با شباهت‌های فنوتیپی متفاوت بودند. در بررسی حاضر نیز نشانگر مولکـولی RAPD به درستی ارقـام بهاره و زمستانه را در گروه‌هـای مجزایی قرار داد. رقم تتراپلوئید شاهیوندی نیز در گروه مجزایی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها قرار گرفت. با وجود این که رقم سیمره نیز تتراپلوئید است، در گروه هگزاپلوئید دسته بندی شد ولی بیشترین شباهت را با رقم شاهیوندی نشان داد.

مقایسه بین دو روش گروه‌بندی

با توجه به دندروگرام‌ها (اشکال ۱و۳) ملاحظه می‌شود که دو دندروگرام در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از جنبه‌هایی مشابه و از جهات دیگر متفاوت هستند. از تشابهات دو نوع گروه‌بندی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ژنوتیپ‌های سرداری و آذر۲ (تیپ رشد زمستانه دارند) در هر دو دندروگرام در یک گروه قرار گرفته‌اند، دو دندروگرام به‌خوبی توانستند ژنوتیپ‌های با تیپ رشد زمستانه و پاییزه را از هم تفکیک نمایند. علاوه بر این ژنوتیپ‌های TV2, Nestor, Katila-11 و GHK که در شرایط محل اجرای آزمایش دارای عملکرد دانه بالایی بودند در دو حالت، در یک گروه قرار گرفتند. بنابراین در این موارد می‌توان اظهار داشت که داده‌های نشانگر و داده‌های فنوتیپی با هم تطابق دارند و در حقیقت فنوتیپ گیاه تا حدودی بیانگر ژنوتیپ آن می‌باشد. از تفاوت‌های دو دندروگرام یکی این است که ژنوتیپ‌های سیمره و شاهیوندی که گندم دوروم هستند براساس داده‌های مورفولوژیک در یک خوشه و بر اساس داده‌های مولکولی در دو گروه جداگانه قرار گرفته‌اند. برای مقایسه بهتر دو دندروگرام و هم‌چنین ماتریس‌های دو سری داده، همبستگی بین آن‌ها محاسبه شد، دو سری داده همبستگی منفی ضعیف و غیر معنی‌دار با هم داشتند (r= -۰/۲۳). این نتیجه با نتایج تحقیق ماریک و همکاران (Maric *et al*., 2004) که تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم نان را با استفاده از نشانگر مولکولیRAPD و صفات مورفولوژیک مورد مقایسه قرار دادند، مطابقت می نماید. هم‌چنین با نتایج تحقیق دالبرگ و همکاران (Dahlberg *et al*., 2002) در مورد ژنوتیپ‌های سورگوم مطابقت دارد. عباس و همکاران (Abbas *et al*., 2008) دریافتند که شباهت ژنتیکی بین گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید گندم بر اساس نشانگر RAPD و داده‌های فنوتیپی با هم تفاوت دارند. یو و همکارن (Hu *et al*., 2005) در گروه‌بندی ژنوتیپ‌های کلزا، دریافتند که بین گروه‌بندی توسط نشانگر RAPD و نشانگرهای مورفولوژیک تشابه وجود دارد. تاران و همکاران (Taran *et al*., 2005) در نخود فرنگی بر اساس داده‌های حاصل از نشانگر RAPD و صفات مورفولوژیک، خوشه‌بندی یکسانی را بدست آوردند. به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر گروه‌بندی بر اساس دو سری داده با هم کاملا تطبیق ندارد، لازم به ذکر است که برخی از ژنوتیپ‌ها که از نظر صفات مورفولوژیک تنوع دارند ممکن است در سطح مولکولی تفاوت چندانی نداشته باشند. بر اساس دو روش مطالعه تنوع ژنتیکی، بین ژنوتیپ‌ها فاصله ژنتیکی مشاهده شد، که می‌توان از این تنوع و فواصل ژنتیکی در اصلاح گندم استفاده نمود. بنابراین با توجه به اهداف بهنژادی می‌توان تلاقی‌های مناسب بین ژنوتیپ‌هایی که در فواصل دورتری از هم قرار دارند جهت تولید لاین‌های نوترکیب استفاده کرد.

این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر صفات مورفولوژیک و نشانگرهای RAPD دارای تنوع کافی

هستند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات مورفولوژیک و نشانگر توانست ژنوتیپ‌های با تیپ رشد بهاره، زمستانه و با عملکرد دانه بالا در محل اجرای آزمایش را به‌خوبی تفکیک نماید، ولی نتایج دو روش گروه‌بندی، در تفکیک ارقام گندم دوروم متفاوت بود.

Table 1. Names and pedigree of rainfed wheat genotypes. **جدول۱- اسامی و شجره ژنوتیپ‌های گندم دیم مورد استفاده**

Genotype	Pedigree	Genotype	Pedigree
1. Azar2	Crosses of internal genotypes	14. TJN	TJN//JHK{S}/BOW{S}/3/SHIR
2. Sardari	Local variety, Kordestan Province	15. Hamam-4	HAMAM-4 -1CA92
3. Symareh	ICARDA	16. Chen/Agilops	CHEN/AGILOPS.SQUAROSA(TAUS)BCN3/ NEE
4. Shahivandi	Local variety, Lorestan Province	17. Seri/Rayon	SERI/RAYON CRG 2753
5. Zagros	ICARDA	18. Sitta/Chil	SITTA/CHIL/IRENA/CM
6. Kuhdasht	ICARDA	19. Zemamra-8	ZEMAMRA-8-ICW91
7. Ghahar	ICARDA	20. Berkut	BERKUT CM96
8. Maron	Avd*Pchu((28mt54A*N10-Brv21-1c/Kt54B) Nar59> 1093))7	21. Pigo	PASTOR CM95
9. Katila-11	KATILA-11	22. Seri	SERI/3//RL6010/4* YR CM96
10. GHK	GHK{S}BOW{S}//90-ZHONG87	23. Croc	CROC_1/AE.SGUAROSA.
11. TV2	TEV2/3/URES/FUN/KAUZ-CM	24. Bavicora	BAVIACORA M92 CM 92...
12. Nestor	NESTOR/3/HE1/3*CNO72//2* SERI/CMS92	25. Seri-82	SERI82/SHUA"S"ISW89….
13. Florkawa-2	FLORKWA-2/KAUZ1CA94		

Table 2. List of arbitrary primers and their sequences. **جدول۲- نام و توالی آغازگرهای استفاده شده.**

No	Primers	Sequences 5´-3´	No	Primers	Sequences 5´-3´
1	OPE-02	ACGGGTCCTG	11	OPL-08	AGCAGGTGGA
2	OPB-10	CTGCTGGGAC	12	F12	ACGGTACCAG
3	OPB-07	GGTGACGCAG	13	OPB-08	GTCCACACGG
4	OPB-01	CCGTCGGTAG	14	OPF-14	TGCTGCAGGT
5	OPA20	GTTGCGATCC	15	OPF-1	ACGGATCCTG
6	OPG13	CTCTCCGCCA	16	OPB-11	GTAGACCCGT
7	OPF-4	GGTGATCAGG	17	OPA-17	GACCGCTTGT
8	UBC77	GAGCACCAGG	18	A1	ACCGTTCCAG
9	OPA-10	GTGATCGCAG	19	OPO-01	GTGCTCTCGG
10	OPA19	CAAACGTCGG	20	OPO-02	AGGAGCACGT

جدول۳- غلظت نهایی مواد شیمیایی برای انجام PCR

Table 3. Final concentrations of chemicals for PCR.

Component of reaction	Basic solution	Final concentration	Value for each reaction (25 µlit)
ddH_2O	–	–	17
Buffer	10x	1 X	2.5
Primer	10 µl	0.5mM	1.25
dNTPs	10mM	0.2mM	0.5
Taq Polymerase	5U/µl	1.25U/µl	0.25
DNA	10 ng	35 ng	3.5

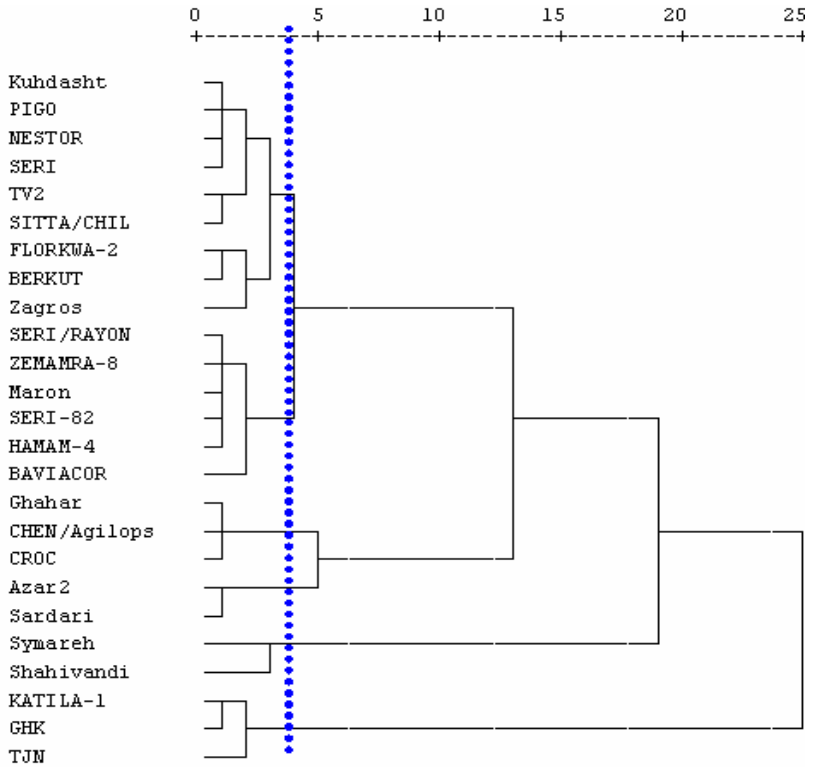
جدول ٤- تجزیه واریانس صفات مختلف در ژنوتیپ‌های گندم دیم

Table 4. Analysis of variance for different traits in rainfed wheat genotypes.

		Mean squares											
S.O.V	D.F.	Plant height	Grain/spike	Days to ripening	Awn length	Spike length	Flag leaf length	Peduncle length	10 Grain spike weight	1000 Kernel weight	Grain yield	Biological yield	Harvest index
Replication	2	11.41	709.49	109.21	1.05	3.77	2.70	42.96	13.33	30.77	404987.11	385685.33	53.21
Genotype	24	340.46**	288.57**	86.61**	6.44**	2.92**	21.92**	178.41**	14.28**	55.55**	324553.33^{ns}	2084625.75**	26.60^{ns}
Error	48	24.23	52.73	9.24	0.24	0.58	4.15	20.04	5.15	16.60	256213.50	602654.91	21.86

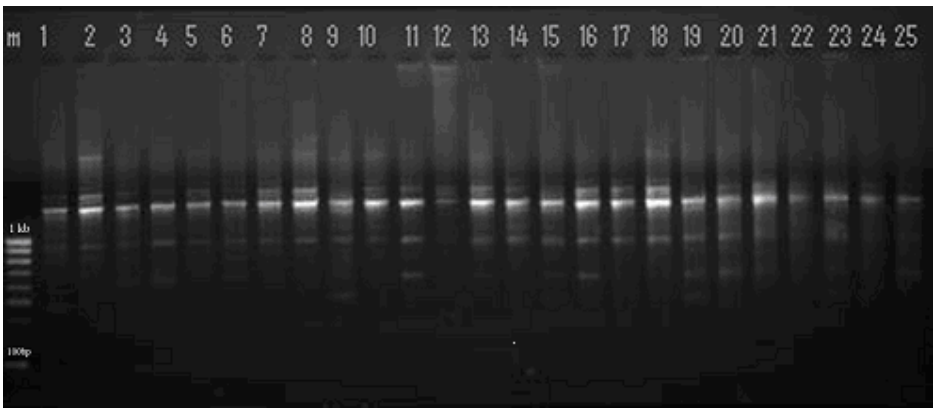
ns ، * و ** : به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns , * and ** : Non significant and significant at 5% and 1% of probability levels , respectively.



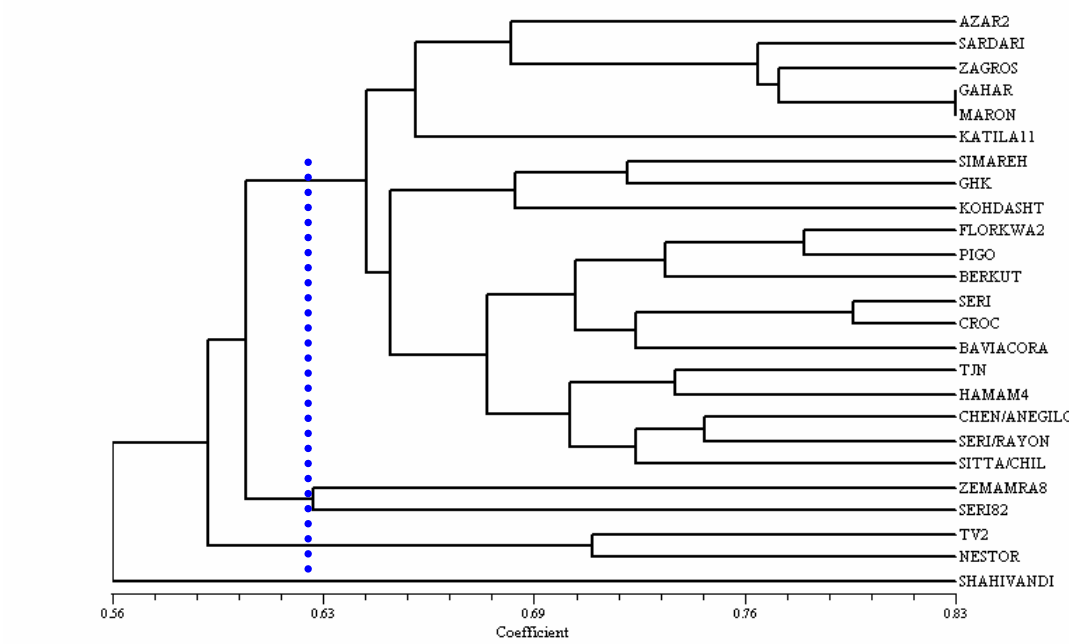
شکل ۱- دندروگرام ژنوتیپ‌های گندم دیم با استفاده از روش Ward بر اساس ضریب فاصله اقلیدسی برای داده‌های مورفولوژیک.

Figure 1. Dendrogram of rainfed wheat genotypes using Ward method based on Euclidian distance for morphological traits.



شکل۲- الگوی نواری ژنوتیپ‌های گندم دیم با استفاده از آغازگر**OPB-07** در ژل آگارز.

Figure 2. Banding pattern of rainfed wheat genotypes using OPB-07 primer in agaros gel.



شکل ۳- دندروگرام ژنوتیپ‌های گندم دیم به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای داده‌های RAPD.

Figure 3. Dendrogram of rainfed wheat genotypes using UPGMA method based on Jaccard's coefficient for RAPD data.

References

Abbas SA, Shah SRU, Rasool G, Ighbal A (2008) Analysis of genetic diversity in Pakistan wheat varieties by using RAPD primers. American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture 2: 29-33.

Aliyev RT, Abbasov MA, Mammadov AG (2007) Genetic identification of diploid and tetraploid wheat species with RAPD markers. Turkish Journal of Biology 31: 173-180.

Bhutta WM, Akhtar J, Ibrahim M, Shabazad A (2006) Genetic variation between Pakistani wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. South African Journal of Botany 72: 280-283.

Bhutta WM, Shahzad A, Akhtar J, Ibrahim M (2005) Assessment of genetic diversity among wheat genotypes using RAPD analysis. Biologia Bratislava 60: 671-674.

Dahlberg JA, Zhang X, Hart GE, Mullet JE (2002) Comparative assessment of variation among sorghum germplasm accessions using seed morphological and RAPD measurements. Crop science 42: 291-296.

Dellaporta SL, Wood J, Ticks JB (1983) A plant molecular DNA minipreparation version II. Plant Molecular Biology Reporter 14: 19-21.

Farahani A (2003) Evaluation of genetic variation in durum wheat varieties using morphological and molecular markers. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. [In Persian with English Abstract].

Ghareyazie B (1995) Application of DNA markers in plant breeding. Proceeding of 7th Iranian Crop Science Congress. pp. 328-382. Isfahan University of Technology, Isfahan. Iran.

Hu CY, Yu SW, Zhao HX, Guoa AG (2005) Genetic distance revealed by morphological characters, Isozymes, Proteins and RAPD markers and relationships with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.) Theoretical and Applied Genetics 110: 511-518.

Joshig CP, Nguyen HT (1993) RAPD analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. Plant Science 93: 95-103.

Mandolkany B, Seyedtabatabaei BA, Shahnejat-Bushehri AA, Omidi M (2002) Study the relationships and genetic diversity in wheat varieties and lines using RAPD marker. Journal of Iranian Agricultural Sciences. 2: 447-454. [In Persian with English Abstract].

Maric S, Bolaric S, Martinic J, Kozumplik V (2004) Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers. Plant Breeding 123: 366-369.

Moradi A, Cheghamirza K (2006) Evaluation of genetic diversity in durum wheat genotypes using RAPD and ISSR markers. 5th Iranian Biotechnology Congress. Tehran, Iran.

Pujar S, Tamkanker SA, Rao VS (1999) Arbitrary primed PCR based diversity assessment reflect hierarchical grouping of Indian tetraploid wheat genotypes. Theoretical and Applied Genetics 99: 868-876.

Samiey K (2003) Evaluation of genetic variation in clover (*Trifolium resupinatum* L.) using molecular and morphological markers. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. [In Persian with English Abstract].

Shahnejat-Bushehri AA, Syedtabatabaei BA, Abdollahi B (2002) Evaluation of bread wheat cultivars relation using RAPD and AFLP markers. Proceeding of 7th Iranian Crop Science Congress. Karaj, Iran. [In Persian with English Abstract].

Sharma KK, Crouch JH, Hash CT (2002) Application of biotechnology for crop improvement, prospects and constrains. Plant Science 163: 381-395.

Taran B, Zhang C, Warkentin T, Tullu A, Vandenberg A (2005) Genetic diversity among varieties and wild species accession of pea (*Pisum Sativum* L.) based on molecular markers and morphological and physiological characters. Genome 48: 257-272.

Teshal ET, Bansal S, Mishra A, Khanna VK (2008) DNA fingerprinting of wheat genotypes by RAPD markers. Wheat Information Service 96: 23-27.