دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی توده‌های بومی گاودانه ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

سیدرسول صحافی[۱]، بهرام ملکی زنجانی[۲]، مجید طالبی[۳] و رضا فتوت[۴]

۱- استادیار، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان (نویسنده مسوول: s.r.sahhafi@vru.ac.ir)
۲ و ۴- دانشیار و استادیار، دانشگاه زنجان
۳- دانشیار، دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۴

چکیده

در این پژوهش تنوع ژنتیکی بین ۱۹ توده‌ی بومی گاودانه (*Vicia ervilia* L.) از استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل و زنجان از طریق تنوع در توالی‌های تکراری کوتاه با استفاده از ۱۸ جفت آغازگر ریزماهواره (SSR) مورد ارزیابی قرار گرفت. هشت جفت آغازگر SSR الگوی مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند. تعداد ۲۷ آلل در مجموع هشت جایگاه ریزماهواره در توده‌های مورد بررسی ردیابی شد به‌طوری‌که مکان‌های ژنی VE02، VE05، VE07، VE09 و VE19 با چهار آلل بیشترین و مکان های ژنی VE14 و VE27 با دو آلل کمترین تعداد آلل را در بین نشانگرها نشان دادند. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۰۴۳۵ برآورد گردید. با توجه به آزمون کای‌اسکور در هر مکان ژنی نتیجه‌گیری شد که توده‌های مورد مطالعه از تعادل هاردی –واینبرگ تبعیت نمی‌کنند. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی آغازگرها (PIC) ۰/۵۳۶۳ برآورد گردید و آغازگر VE02 بیشترین مقدار PIC (۰/۶۹۳۴) و آغازگر VE27 کمترین مقدار PIC (۰/۱۰۹۳) را نشان دادند. بیشترین فاصله ژنتیکی بین توده اردبیل (از استان اردبیل) با توده چومالو (از استان زنجان) و کمترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های برازین (از استان آذربایجان شرقی) و خیارک (از استان اردبیل) مشاهده شد. روابط ژنتیکی بین توده‌های مورد ارزیابی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی نی مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز خوشه‌ای، توده‌های بومی را به پنج گروه تقسیم کرد. نتایج این پژوهش نشان دادند که نشانگر مولکولی SSR در تشخیص چندشکلی و فاصله ژنتیکی میان توده‌های بومی گاودانه مؤثر و کارآمد بوده و می‌تواند به عنوان ابزار مناسبی در تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی میان توده‌های گاودانه، مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: گاودانه، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، SSR

مقدمه

منابع تأمین‌کننده انرژی و پروتئین حجیم‌ترین و پر هزینه‌ترین بخش خوراک دام را تشکیل می‌دهد و سالانه مقدار زیادی از این منابع جهت استفاده در صنعت دامپروری از خارج وارد کشور می‌شود (۳). یکی از اقدامات مهم در کاهش هزینه خوراک که سهم عمده‌ای در تولید دام دارد، استفاده از منابع موجود و شناخت مواد غذایی جدید و بکارگیری آن در جیره دام است (۲۰). در سال‌های اخیر توجه به گیاهان تیره بقولات به دلیل ارزش غذایی بالا و دوره رشد کوتاه و نیاز به رسیدگی کم، از طرف کشاورزان، دامپروران و کارخانه‌های تولید خوراک دام و حتی اصلاحگران نباتات در اکثر کشورهای جهان افزایش یافته است (۲۲). یکی از محصولات دانه‌ای از خانواده بقولات، گاودانه با نام علمی *Vicia ervilia* L. می‌باشد. این گیاه جزو ماشک‌ها بوده و در زبان انگلیسی bitter vetch نامیده می‌شود (۱۱). گاودانه از گذشته‌های دور بویژه در کشورهای مهم از نظر تاریخ کشاورزی، برای تغذیه دام مورد استفاده قرار می‌گرفت. این گیاه بومی مناطق غرب آسیا و جنوب اروپاست (۵) و به دلیل ارزش غذایی بالا، توانایی تثبیت ازت خاک و توان رشد در خاک‌های کم عمق و قلیایی همواره مورد توجه بوده است (۱۵). دانه گاودانه ماده خوراکی غنی از انرژی، پروتئین و منبع مناسبی از مواد معدنی و اسید آمینه‌های ضروری می‌باشد. اما از نظر اسیدهای آمین گوگرددار کمبود دارد. این دانه حاوی ۲۶/۶۵٪ پروتئین و ۱۸/۱۰ مگاژول بر کیلوگرم انرژی خام است (۲۳) و از آن می‌توان به‌عنوان یک ماده خوراکی مناسب با قابلیت هضم و تجزیه‌پذیری بالا در جیره نشخوارکنندگان مورد استفاده قرار داد (۲۰). دانه گاودانه نسبتاً ارزان است و به قیمتی حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد سویا قابل خریداری است و می‌تواند جایگزین سویا در جیره غذایی دام و طیور شود (۲). کشت این گیاه از سال‌های قبل در غرب و شمال غرب ایران مرسوم بوده و از لحاظ اکولوژیکی سازگار با خشکسالی و پراکنش نامطلوب باران بوده و در تناوب با گندم توصیه می‌شود (۱۳). در سال‌های اخیر کاشت توده‌های نامرغوب، سنتی بودن ساختار تولید، برداشت غیرمکانیزه، عملکرد پایین دانه و هزینه بالای تولید، متأسفانه به کاهش شدید سطح زیر کشت این گیاه منجر شده است. به نظر می‌رسد توجه توأم به مسائل به‌نژادی و به‌زراعی می‌تواند تا حد زیادی این مشکلات را بر طرف کرده و سطح زیر کشت این محصول را بهبود بخشد. آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد میزان آن در ژرم‌پلاسم گیاهان و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات به شمار می‌رود (۱۲). به منظور تخمین تنوع ژنتیکی، انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری توسط اصلاحگران گیاهی استفاده می‌شوند که از جمله آن‌ها می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی اشاره کرد (۹). استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از روش‌های بسیار ارزشمند در این زمینه می‌باشد که در بررسی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف کاربرد دارند (۴). نشانگرهای ریز ماهواره (SSR) نوعی از نشانگرهای مولکولی هستند که به دلیل ماهیت هم‌بارزی، محتوای اطلاعات چند

شکلی بالا و توزیع تصادفی در ژنوم، ابزارهای مناسبی برای مطالعات تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های پیوستگی و نیز مکان‌یابی ژن‌ها محسوب می‌شوند (۲۵،۱۴،۷). در تنها تحقیق صورت گرفته در ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های گاودانه با نشانگر SSR، ال‌فتحی و همکاران (۸) نوزده جمعیت گاودانه در مراکش را مورد ارزیابی قرار دادند. با استفاده از نه نشانگر SSR در مجموع ۶۸ آلل شناسایی شد. تعداد آلل‌ها در هر جایگاه ژنی بین ۳ تا ۱۶ متغیر بود و متوسط آن برای هر نشانگر ۷/۶ بدست آمد. محتوای اطلاعات چند شکلی برای نشانگر SSR حدود ۰/۶۵ به دست آمد. در تحقیقات انجام شده در ایران، ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های گاودانه تنها بر اساس خصوصیات زراعی- مورفولوژیک صورت گرفته است. عباسی و همکاران (۱) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در کلکسیون گاودانه بانک ژن گیاهی ملی ایران، تعداد ۱۲۶ توده را از لحاظ صفات زراعی- مورفولوژیک مورد بررسی قرار دادند و توده‌های مورد مطالعه در سه گروه دسته‌بندی شدند. در تحقیق انجام شده توسط صحافی و ملکی زنجانی (۲۴)، تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط بین عملکرد و اجزای عملکرد ۴۸ توده بومی گاودانه جمع‌آوری شده از استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل و زنجان بر اساس صفات زراعی-مورفولوژیک بررسی شد و تجزیه خوشه‌ای توده‌ها را در سه گروه با پتانسیل عملکرد بالا، متوسط و پایین قرار داد. با وجود غنی بودن ذخایر ژنتیکی گاودانه در ایران، مطالعات چندانی برروی آن‌ها انجام نشده و تاکنون هیچ تحقیقی مبنی بر بررسی تنوع ژنتیکی گاودانه با استفاده از نشانگرهای مولکولی در ایران گزارش نشده است. شناسایی و معرفی این توده‌ها و هم‌چنین بررسی میزان قرابت آن‌ها اساسی‌ترین بخش در برنامه‌ریزی‌های بعدی جهت اصلاح عملکرد و کیفیت محصول به حساب می‌آید. با توجه به سابقه کشت و کار طولانی گاودانه در مناطق شمال غرب کشور، این پژوهش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی میان و درون ۱۹ توده بومی گاودانه متعلق به استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل و زنجان با استفاده از نشانگر مولکولی SSR انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

تعداد ۱۹ توده بومی از بذور گاودانه‌های استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل و زنجان موجود در کلکسیون گاودانه‌ی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان تهیه شد (جدول ۱). این توده‌ها بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای و الگوی خویشاوندی ژنتیکی به دست آمده توسط صحافی و ملکی زنجانی (۲۴) انتخاب شدند به‌طوری که این توده‌ها حداکثر فاصله ژنتیکی را از لحاظ صفات زراعی- مورفولوژیک نشان داده‌اند. بذور مربوط به هر توده در گلدان‌های جداگانه کاشته شد و گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند. برای هر توده‌ی بومی ۱۰ نمونه برگی از ۱۰ گیاه تهیه شد و هر نمونه چهار تا پنج برگ سالم جوان از هر گیاه بودند و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت استخراج DNA ژنومی، سه گرم از بافت برگی جمع‌آوری شده در هاون چینی در حضور ازت مایع پودر شده و استخراج DNA بر اساس روش CTAB انجام گرفت (۶).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز

در این پژوهش نه جفت آغازگر SSR که در مطالعه ال فتحی و همکاران (۸) کیفیت آللی مناسب و میزان پلی‌مورفیسم بالایی را بین توده‌های گاودانه در مراکش نشان داده بودند مورد استفاده قرار گرفت. همچنین نه جفت آغازگر بر اساس کتابخانه ژنومی *Vicia sativa* طراحی و به کار برده شد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است. کارهای آزمایشگاهی طی سال‌های ۹۴-۹۳ در آزمایشگاه ژنتیک دپارتمان زراعت دانشکده کشاورزی و علوم زیستی دانشگاه ایالتی آیوا، امریکا صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر 10x PCR، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۲ میلی‌مولار)، ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۰/۳ میکرولیتر از هر آغازگر (۰/۴ میلی‌مولار)، ۰/۳ میکرولیتر dNTP (۰/۱ میلی‌مولار) و ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی انجام شد. تکثیر در یک دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت اپندورف با چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۸ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای مناسب هر آغازگر به مدت ۱ دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. به فرآورده‌های PCR، ۲ میکرولیتر رنگ GelRed Nucleic Acid Stains اضافه شد و جداسازی بر روی ژل آگارز دو درصد در دستگاه الکتروفورز ساخت شرکت Bio Rad انجام شد.

جدول ۱- توده‌های بومی گاودانه مورد استفاده در آزمایش

Table 1. The list of studied bitter vetch landraces

شماره	محل جمع‌آوری (استان-شهرستان- روستا)	شماره	محل جمع‌آوری (استان-شهرستان-روستا)
۱	آذربایجان شرقی- اهر- بهل	۱۱	اردبیل- اردبیل-خیارک
۲	آذربایجان شرقی- ملکان-بایقوت	۱۲	اردبیل- خلخال- آل‌هاشم سفلی
۳	آذربایجان شرقی- ملکان-یولقنلوی جدید	۱۳	اردبیل- سرعین-آلوارس
۴	آذربایجان شرقی- میانه-کاغذکنان	۱۴	اردبیل- نمین- سقزچی
۵	آذربایجان شرقی- هریس- برازین	۱۵	زنجان- ابهر- داش‌بلاغ
۶	آذربایجان غربی- چالدران-قوروق علیا	۱۶	زنجان- زنجان- چلگان
۷	آذربایجان غربی- خوی-الند	۱۷	زنجان- زنجان- چومالو
۸	آذربایجان غربی- خوی-سگتلو	۱۸	زنجان- زنجان- قلعه
۹	آذربایجان غربی- خوی-میدان سفلی	۱۹	زنجان- زنجان- گلوجه
۱۰	اردبیل- اردبیل- اردبیل		

جدول ۲- توالی‌های رفت و برگشت ۱۸ جفت آغازگر ریزماهواره مورد استفاده

Table 2. Backward and forward sequences of the 18 studied SSR markers

نام آغازگر	توالی آغازگرها	نام آغازگر	توالی آغازگرها
VE02	F: CAAGCTGGCCACCTAATGC	VSS256	F: GCCTCGTAGATTTGGTTTGATG
	R: ATATTAAGGGTTTCGAGTTGGG		R: TGATAATTTGCGGCTTATAGGG
VE03	F: TAGCAAGCCTTTGAACCTTTT	VSS270	F: GGTTAAAGGGCGTGATAAGGAT
	R: CCTGAAACAGCAAACCAACA		R: TATTAGCCAACCCAGAAAGAGG
VE05	F: TTTAATTTTGCTCCTTGCGG	VSS279	F: GCTTTGTTCATCTGTTGCTTTG
	R: CCTTACCATAACCTAAACCTAACCC		R: AGTTCACCTTCCCACATCCTC
VE07	F: TTCGGATATGGGAACCTTTATG	VSS282	F: GAAAATCGTAGCTGGGAACG
	R: GGTTCTAGAAAACAGCTCCCAA		R: TCACGGATCTAACACCAACG
VE09	F: CTGCTGATGATGTTGTGGATG	VSS288	F: CGAAATCTATTGCCACGGTT
	R: GAACACGTGTACGGAGACCA		R: ACGTTGTTGTCGGTGTCTTG
VE14	F: TTTGGAGGCTTTGAGCCTTA	VSS292	F: TTTGATTTGTTGGGTGACGA
	R: CCCAACAGGGATACCACTTC		R: GGAGGAAGAGGTTTGGAAGG
VE19	F: GTCAGAATCCCCATGTACACAA	VSS298	F: CAGTTTCCATTGTCAGAAGCAC
	R: CCCTCTCAAAACACCTTCCA		R: ACGGTTAGGTGGTTAGGTCGT
VE27	F: GTGTCTTAGATTTCATCAATGCG	VSS300	F: GTCATCTTCATCGGCTCCAC
	R: TCATTCATCACAAAGTTACTGCAA		R: GGTAGCGAGTTCAGGTTTGC
VE28	F: GACGAGTTACATCTTCGGCG	VSS312	F: ACCACTAAGAGCTGCCCGA
	R: TGAGTTTTGAGATTTAGCCCTTG		R: TTTCTGTTGTTCATTCGCCA

آغازگرهای سمت راست جدول استفاده شده از مطالعه ال‌فتحی و همکاران (۷) و آغازگرهای سمت چپ جدول طراحی شده بر اساس کتابخانه ژنومی *Vicia sativa*

تجزیه و تحلیل داده‌ها

قطعات تکثیر شده توسط جفت آغازگرها امتیازبندی شدند. الگوهای نواری حاصل به صورت وجود و یا عدم وجود باندها در محصول PCR با اعداد یک و صفر امتیازدهی شدند. برای هر نشانگر تعداد آلل‌ها در توده‌های مورد مطالعه به صورت a، b، c نامگذاری شدند. فراوانی‌های آللی و پارامترهای ژنتیکی هر جایگاه ریز ماهواره و نیز فاصله ژنتیکی توده‌ها برآورد شد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده و میزان اطلاعات چندشکلی محاسبه شدند. جهت محاسبه فاصله ژنتیکی توده‌ها از ضریب تشابه نی (۱۹) استفاده گردید. گروه‌بندی لاین‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه نی انجام شد. مناسب‌ترین روش تجزیه خوشه‌ای با محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک تعیین شد و مقدار قابل ملاحظه و معنی‌دار این همبستگی برای انتخاب روش مناسب مورد توجه قرار گرفت. تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (Principle Coordinate Analysis) به منظور تشخیص دقیق‌تر روابط ژنتیکی بین توده‌ها و تأیید گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای صورت گرفت. تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای PowerMarker V. 3.25، PopGen V. 1.31 و GeneALex V. 6.5 صورت گرفت.

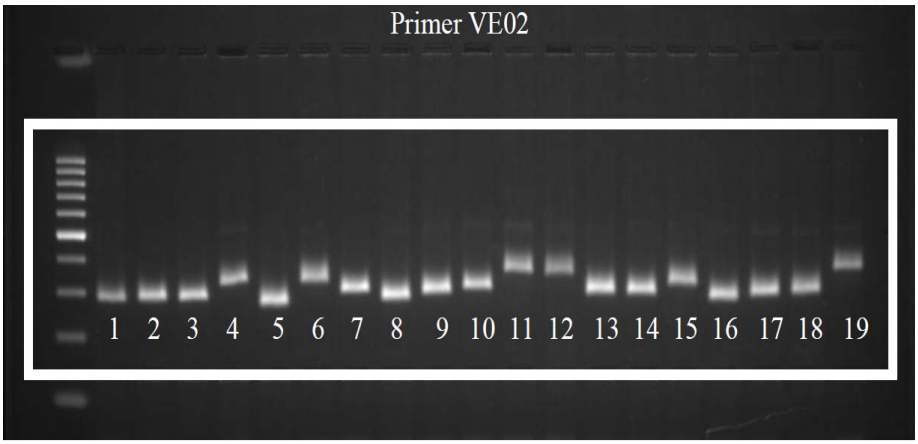
نتایج و بحث

از ۱۸ جفت آغازگر مورد استفاده ۱۴ جفت آغازگر قادر به تکثیر مکان‌های ژنی ریز ماهواره شدند و از این تعداد، هشت جفت آغازگر الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی برای ۱۹ توده مورد مطالعه تولید نمودند (جدول ۳). در شکل ۱ الگوی باندی DNAهای تکثیر شده از ۱۹ توده‌ی بومی گاودانه مربوط به آغازگر VE02 نشان داده شده است. در مجموع هشت جایگاه ریزماهواره‌ای با الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی، تعداد ۲۷ آلل چند شکل در توده‌های تحت بررسی مشاهده شد و تعداد آلل چند شکل در هر جایگاه ژنی از دو تا چهار آلل با میانگین آلل ۳/۳۷۵ متغیر بود. حداقل تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان‌های ژنی VE14 و VE27 (دو آلل) و حداکثر تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان‌های ژنی VE02، VE05، VE07، VE09 و VE19 (چهار آلل) بود (جدول ۳). تعداد آلل مؤثر از ۳/۸۶ در مکان‌های ژنی VE02 و VE05 تا ۱/۱۳ در مکان ژنی VE27 متغیر و با میانگین ۲/۸۹ بود (جدول ۳). در مطالعه حاضر تعداد آلل‌های چند شکل مشاهده شده برای مکان‌های ژنی و میانگین آللی مشاهده شده کم‌تر از مطالعه ال‌فتحی و همکاران (۸) که بر

روی توده‌های بومی گاودانه در مراکش انجام گرفته بود می‌باشد به طوری که آن‌ها اظهار داشتند بیشترین تعداد آلل مربوط به جایگاهVE07 با ۱۶ آلل و کمترین آن مربوط به جایگاه VE27 با سه آلل و میانگین آللی مشاهده شده ۷/۶ بود. این مساله می‌تواند بخاطر تنوع بیشتر توده‌های بومی مراکشی نسبت به توده‌های بومی ایرانی بدلیل تفاوت در محیط اکو جغرافیایی باشد. با بررسی محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) هشت جایگاه ریزماهواره، بیشترین مقادیر PIC مربوط به نشانگرهای VE02، VE05، VE19 و VE09 و نشانگر VE27 دارای کمترین مقدار PIC بود. معیار PIC توان تمایز هر آغازگر را از طریق تعداد آلل‌ها در یک مکان ژنی و فراوانی نسبی آلل‌ها تعیین می‌کند (۱۸). متوسط PIC در این بررسی ۰/۵۳۶۳ برآورد شده است که دلالت بر ظرفیت نسبتاً بالای نشانگرها در تفکیک و تمایز افراد دارد که می‌توان به خوبی برای آنالیز مجموعه ژرم‌پلاسم‌های دیگر گاودانه بکار برد. بنابراین چهار نشانگر VE02، VE05، VE09 و VE19 با توجه به بیشترین محتوای اطلاعات چند شکلی به عنوان نشانگرهای مفید و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی گاودانه ایرانی معرفی می‌شوند. در مطالعه صورت گرفته توسط الفتحی و همکاران (۸)، PIC در محدوده ۰/۲۴ تا ۰/۸۷ با میانگین ۰/۶۵ گزارش گردید که بسیار نزدیک به اعداد به دست آمده در مطالعه حاضر می‌باشد.

جدول ۳- دمای اتصال و شاخص‌های تنوع ژنتیکی در ۱۹ توده بومی گاودانه برای هشت نشانگر SSR با الگوی مناسب و قابل امتیازدهی
Table 3. The annealing temperature and genetic diversity indices of 8 SSR markers in 19 bitter vetch landraces

نام آغازگر	دمای اتصال	دامنه اندازه آللی	تعداد آلل مشاهده شده	تعداد آلل مؤثر	محتوای اطلاعات چند شکلی	هتروزیگوسیتی مشاهده شده
VE02	۵۶/۵ ^{o}C	۳۴۰-۲۷۹	۴	۳/۸۶	۰/۶۹۳۴	۰/۰۲۶۹
VE03	۵۱/۵ ^{o}C	۲۱۳-۱۸۶	۳	۲/۶۰	۰/۵۳۹۱	۰/۰۱۶۲
VE05	۵۵/۳ ^{o}C	۴۰۳-۳۲۵	۴	۳/۸۶	۰/۶۹۳۳	۰/۰۰۰
VE07	۵۰/۷ ^{o}C	۳۱۵-۲۷۷	۴	۳/۲۷	۰/۶۳۷۵	۰/۰۰۰
VE09	۵۴ ^{o}C	۱۱۹-۵۲	۴	۳/۵۸	۰/۶۶۹۵	۰/۰۲۷۸
VE14	۵۵/۷ ^{o}C	۶۹-۵۷	۲	۱/۲۶	۰/۲۷۴۹	۰/۲۳۹۸
VE19	۵۳ ^{o}C	۲۴۷-۲۰۷	۴	۳/۶۱	۰/۶۷۳۷	۰/۰۰۰
VE27	۵۳ ^{o}C	۲۲۷-۱۸۳	۲	۱/۱۳	۰/۱۰۹۳	۰/۰۳۷۶
میانگین	-	-	۳/۳۷۵	۲/۸۹	۰/۵۳۶۳	۰/۰۴۳۵



شکل ۱- الگوی باند DNAهای تکثیر شده از ۱۹ توده‌ی بومی گاودانه مورد بررسی توسط آغازگر VE02
Figure 1. The banding pattern of primer VE02 in 19 bitter vetch landraces

هتروزیگوتی مشاهده شده در توده‌های مورد مطالعه بین ۰/۰۰۷۹ تا ۰/۰۴۶۸ و با میانگین ۰/۰۲۴۸ برآورد گردید. جریان ژنی (Nm) در ژرم‌پلاسم برابر ۰/۸۵۹۱ محاسبه گردید. وجود جریان ژنی در جمعیت‌ها به سه دسته تقسیم شده است: مقادیر جریان ژنی کمتر از یک نشان‌دهنده هموزیگوسیتی در جمعیت است، مقادیر بالاتر از یک، نشان‌دهنده تمایز و تفکیک شدید (هتروزیگوسیتی) میان جمعیت‌های مورد مطالعه است و مقادیر بالاتر از چهار منجر به ایجاد واحد تصادفی در جمعیت می‌گردد (۱۰). بر این اساس، جریان ژنی پایینی در میان توده‌ها در این مطالعه وجود دارد. پایین بودن جریان ژنی و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در توده‌های بومی گاودانه مورد بررسی می‌تواند نشان‌دهنده خود گرده‌افشانی و به تبع آن کاهش هتروزیگوسیتی آن‌ها باشد. در مطالعه فتوت (۱۱) که برای تعیین درصد دگرگرده‌افشانی گاودانه از طریق ایزوزایم CPT صورت گرفت درصد دگرباروری صفر گزارش گردید و اصلی‌ترین دلیل مشاهده کم دگرباروری، به ساختمان گل و کلستوگام بودن آن نسبت داده شد. از شاخص شنون به عنوان معیاری برای تخمین تنوع درون جمعیتی استفاده شد که بین ۰/۲۰۵۱ تا ۰/۵۲۵۸ متغیر بود. بالاترین مقدار شاخص شنون مربوط به توده کاغذکنان و کمترین مقدار آن به توده اردبیل تعلق داشت. میانگین شاخص شنون ۰/۴۲۶۹ محاسبه شد. بررسی تعادل هاردی- وینبرگ بر اساس آزمون کای

اسکور و با توجه به سطح احتمال کمتر از ۰/۰۵ نشان داد ژنوتیپ‌های درون همه توده‌ها برای همه نشانگرها از تعادل مزبور تبعیت نمی‌کنند. خودگشن بودن گاودانه از عوامل بر هم زننده تعادل هاردی- وینبرگ و کاهش سطح هتروزیگوسیتی می‌باشد. اطلاع از فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها برای محافظت و استفاده از منابع ژرم‌پلاسم دارای اهمیت زیادی است (۱۶). این اطلاعات می‌تواند محققان را در انتخاب ترکیبات والدینی مناسب برای بهره‌برداری حداکثر از مواد ژنتیکی موجود برای تولید هیبریدهای پر محصول و جمعیت‌های در حال تفکیک یاری دهد (۲۱). فاصله ژنتیکی بین توده‌های گاودانه بر اساس ضریب تشابه نی محاسبه شد. بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۲۶۴۹) بین توده‌های بومی اردبیل و چومالو و کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۲۱۹) بین توده‌های بومی برازین و خیارک بود. بالا بودن فاصله ژنتیکی میان برخی توده‌های مورد مطالعه بیانگر تنوع توده‌های بومی گاودانه مورد بررسی می‌باشد. بنابراین می‌توان این توده‌ها را در صورت داشتن صفات مطلوب (عملکرد، مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی) به عنوان والد در برنامه‌های دورگ‌گیری برای اصلاح گاودانه و به دست آوردن حداکثر هتروزیس استفاده کرد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه نی انجام گردید (شکل ۲). بر اساس دندروگرام، ارقام مورد مطالعه به پنج گروه تقسیم شدند. توده بومی بهل از استان آذربایجان شرقی در گروه اول قرار گرفت. حدود ۷۳/۶۸ درصد از توده‌ها (۱۴ توده) در گروه دوم جای گرفتند و این گروه به هشت زیرگروه تقسیم شد. در اولین زیر گروه، توده‌های بومی کاغذکنان و سگتلو به ترتیب از استان‌های آذربایجان شرقی و غربی قرار گرفتند. در زیرگروه دوم، توده‌های برازین و خیارک به ترتیب از استان‌های آذربایجان شرقی و اردبیل قرار گرفتند. در زیر گروه سوم، توده‌های چلگان و قلعه که هر دو متعلق به استان زنجان بودند قرار گرفتند. در زیرگروه چهارم، توده‌های قوروال‌علیا و میدان سفلی هر دو از استان آذربایجان غربی قرار گرفتند. در زیرگروه پنجم، توده‌های آلوارس و سقزچی که هر دو متعلق به استان اردبیل بودند قرار گرفتند. توده آل‌هاشم سفلی از استان اردبیل در زیرگروه ششم و در زیرگروه هفتم، توده‌های چومالو و داش‌بلاغ هر دو از استان زنجان قرار گرفتند. در زیرگروه هشتم، فقط توده گلوجه که متعلق به استان زنجان بود قرار گرفت. در گروه سوم، توده‌های بایقوت و الند به ترتیب از استان‌های آذربایجان شرقی و غربی و در گروه چهارم، فقط توده یولقنلوی جدید از استان آذربایجان شرقی قرار گرفت. در گروه پنجم، تنها توده بومی اردبیل که متعلق به استان اردبیل بود قرار گرفت. قرارگیری توده‌های بومی بهل، یولقنلوی جدید و اردبیل به صورت منفرد و در گروه‌های جداگانه (به ترتیب گروه‌های یک، چهار و پنج) بر فاصله بیشتر این توده‌ها با دیگر توده‌های بومی مورد بررسی تاکید می‌کند و شاید حاکی از این باشد که بر خلاف سایر توده‌ها، آن‌ها از سایر توده‌های بومی متمایز بوده و سال‌ها در این مناطق به طور جداگانه کشت و محافظت شده‌اند. بنابراین می‌توان از توده‌های بومی قرار گرفته در گروه‌های دور از هم مانند گروه‌های یک، چهار و پنج، با توجه به خصوصیات مورفولوژیک و زراعی مورد نظر در ایجاد جمعیت‌های دارای تنوع ژنتیکی به منظور استفاده در برنامه‌های اصلاح گاودانه بهره برد. با توجه به منطقه جغرافیایی توده‌ها و مقایسه آن با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای تطابق مطلوبی بین فاصله ژنتیکی اکثر توده‌ها و پراکنش جغرافیای آن‌ها مشاهده گردید. به عنوان مثال حدود ۷۳/۶۸ درصد از توده‌ها (۱۴ توده) در گروه دوم جای گرفتند. صد درصد از توده‌های بومی استان زنجان، ۸۰ درصد از توده‌های بومی استان اردبیل و ۷۵ درصد از توده‌های بومی استان آذربایجان غربی در گروه ۲ قرار گفتند که حاکی از قرابت زیاد این توده‌ها می‌باشد. به نظر می‌رسد با توجه به قرارگیری این استان‌ها در شمال غرب کشور و نزدیکی جغرافیایی و اقلیمی این مناطق، قرار گرفتن اکثر توده‌ها در یک گروه قابل انتظار باشد. در این گروه، در تمام زیرگروه‌ها، توده‌های بومی دارای فاصله ژنتیکی اندکی بودند، به طوری که در زیرگروه‌های سوم (چلگان و قلعه هر دو از زنجان)، چهارم (قوروال‌علیا و میدان هر دو متعلق به آذربایجان غربی)، پنجم (آلوارس و سقزچی هر دو متعلق به اردبیل) و هفتم (چومالو و داش‌بلاغ هر دو متعلق به زنجان) توده‌های بومی متعلق به یک استان قرار گرفتند. لذا احتمال دارد که این‌ها، توده‌هایی یکسان هستند که بین مناطق مختلف جابه‌جا شده‌اند و یا اینکه مکان‌های ژنی مورد استفاده در این بررسی قادر به تشخیص تفاوت‌های اندک موجود بین آن‌ها نبوده‌اند. با توجه به شواهد به نظر می‌رسد که دندروگرام در اکثر موارد با پراکنش جغرافیایی و اقلیمی تطابق دارد. این نتایج کارایی نشانگرهای ریزماهواره را در تشخیص تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی بیان می‌دارد. تاکنون کار ژنتیکی مبتنی بر نشانگرهای مولکولی روی توده‌های بومی گاودانه ایرانی گزارش نشده است. عباسی و همکاران (۱) تنوع ژنتیکی توده‌های گاودانه موجود در کلکسیون گاودانه بانک ژن گیاهی ملی ایران را با استفاده از صفات زراعی- مورفولوژیک مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش دادند که توده‌های مورد بررسی از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند. همچنین در مطالعات صحافی و ملکی زنجانی (۲۴)، برای شناسایی تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط بین عملکرد و اجزای عملکرد ۴۸ توده بومی گاودانه جمع‌آوری شده از استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل و زنجان از صفات زراعی- مورفولوژیک استفاده کردند و با مشاهده تنوع ژنتیکی، توده‌های مورد بررسی را طبقه‌بندی کردند.

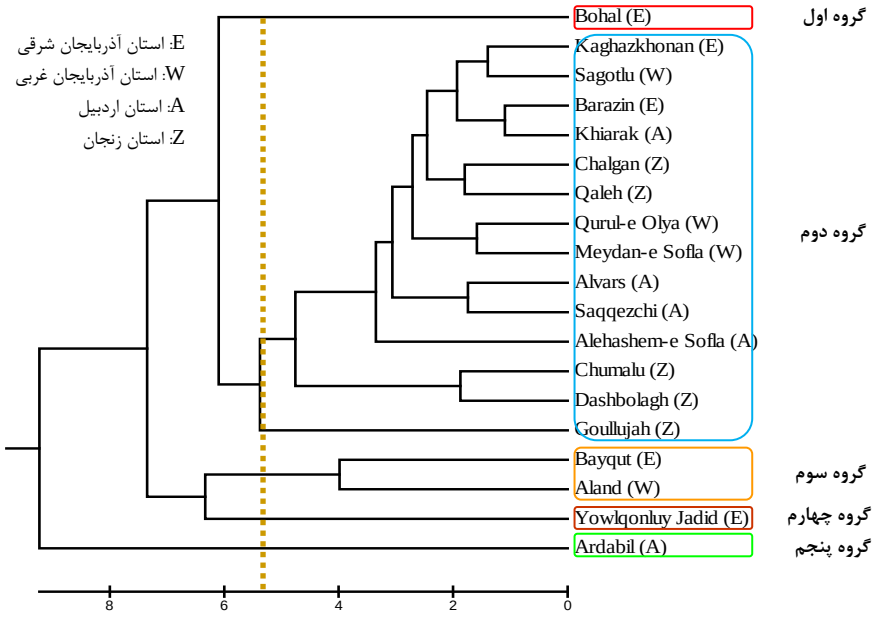
نتایج تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی نشان داد که دو مؤلفه اول حدود ۵۳/۴۵ درصد تغییرات مولکولی بین توده‌ها را تبیین کردند. مؤلفه اول ۳۲/۴۳ درصد و مؤلفه دوم ۲۱/۰۱ درصد از تغییرات کل را تبیین کردند. نمودار دوبعدی بر اساس دو مؤلفه اصلی اول در شکل ۳ نشان داده شده است و با تفکیک توده‌ها، تا حدی توانست گروه‌بندی بدست آمده از تجزیه خوشه‌ای را تأیید کند. با توجه به این که حدود ۴۶ درصد از تغییرات توسط دو مؤلفه اول تبیین نمی‌شود این امر باعث عدم تطابق کامل نتایج گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی می‌شود. کم بودن درصد

تبیین تغییرات مولکولی در تجزیه‌های چند متغیره مانند تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی می‌تواند ناشی از توزیع مناسب نشانگرهای مولکولی در سراسر ژنوم و درنتیجه عدم کفایت دو مؤلفه اول برای توجیه حداکثر تغییرات مولکولی باشد (۱۷).

این پژوهش به عنوان گام اولیه و اساسی در شناسایی و ارزیابی توده‌های بومی گاودانه ایرانی نشان داد که تنوع ژنتیکی نسبتاً خوبی در توده‌های بومی گاودانه استان‌های غرب کشور با وجود فاصله جغرافیایی نسبتاً کم بین توده‌ها وجود دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که نشانگرهای مولکولی SSR دارای توانایی در شناسایی و متمایز نمودن توده‌های بومی گاودانه می‌باشند و از این رو ابزارهای موثر و کارایی برای انگشت‌نگاری توده‌های بومی گاودانه، بررسی روابط بین توده‌ها و دسته‌بندی آن‌ها درگروه‌های مختلف بر اساس فاصله ژنتیکی بشمار می‌روند. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های SSR، از میان نشانگرهای ریزماهواره‌ای مورد استفاده در این تحقیق، نشانگرهای VE02، VE05، VE09 و VE19 با توجه به تعداد آلل‌های مشاهده شده و محتوای اطلاعات چند شکلی جهت مطالعات آینده روی کلکسیون گاودانه کشور پیشنهاد می‌شوند. همچنین با توجه به تنوع بدست آمده در بین توده‌های مورد بررسی می‌توان با مطالعات تکمیلی و شناسایی بیشتر از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی آتی استفاده کرد.

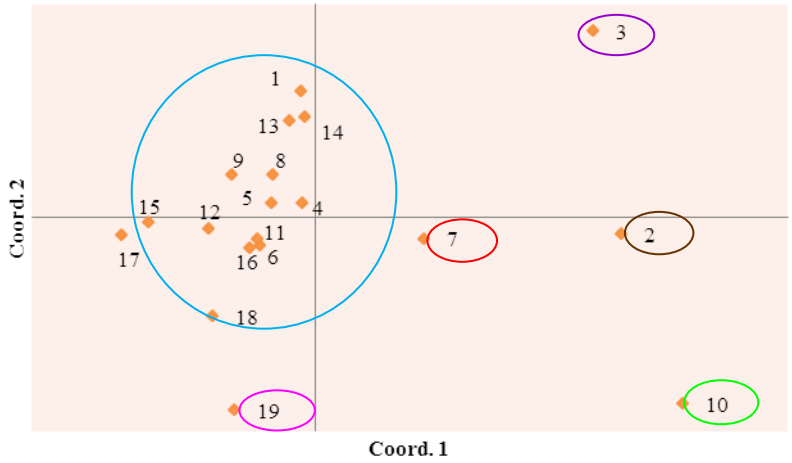
تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود را از جناب آقای پروفسور توماس لوبرستد به دلیل همکاری و مساعدت در انجام آزمایش و فراهم آوردن امکانات اجرایی تحقیق در آزمایشگاه ژنتیک دپارتمان زراعت دانشکده کشاورزی و علوم زیستی دانشگاه ایالتی آیوا، ایالات متحده امریکا ابراز می‌دارند.



شکل ۲- گروه‌بندی توده‌های گاودانه مورد مطالعه بر اساس داده‌های مولکولی نشانگر SSR به روش UPGMA

Figure 2. Classification of bitter vetch landraces based on SSR markers using UPGMA method



شکل ۳- پراکنش ۱۹ توده بومی گاودانه بر اساس دو مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی هماهنگ حاصل از داده‌های ریزماهواره
Figure 3. Transmittance of 19 bitter vetch landraces on the first two axes derived from principle coordinate analysis using microsatellite data

منابع

1. Abbasi, M.R., S. Vaezi and N. Baghaie. 2007. Genetic diversity of bitter vetch (*Vicia ervilia*) collection of the National Plant Gene Bank of Iran based on agro-morphological traits. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15: 113-128 (In Persian).
2. Abdullah, A.Y., M.M. Muwalla, R.I. Qudsieh and H.H. Titi. 2010 .Effect of bitter vetch (*Vicia ervilia*) seeds as a replacement protein source of soybean meal on performance and carcass characteristics of finishing Awassi lambs. Tropical Animal Health and Production, 42: 293-300.
3. Amini, J., S. Razaghzadeh and A. Mohsenpour Azari. 2001. The effects of use of *Lathyrus sativus* instead of soybean meal in broiler chicken nutrition. The 3rd Research Seminar of Poultry and Livestock Nutrition, 239-247 (In Persian).
4. Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J. Brouwer and E.C.K. Bandpang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concept. Euphytica, 142: 169-196.
5. Davis, P.H. and U. Plitwan. 1990. Vicia. In: Davis, P.H. (eds.) Flora of Turkey. Edinburgh University Press, Edinburgh Scotland, 3: 274-325.
6. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
7. Ebrahimi, T., G.A. Ranjbar, G. Nematzadeh and G. Kiani. 2013. Molecular tagging of stem anthocyanin gene in rice using SSR markers. Journal of Crop Breeding, 5: 60-68 (In Persian).
8. ElFatehi, S., G. Béna, L. Sbabou, A. Filali-Maltouf and M. Ater. 2013. Preliminary results for use SSR markers in bitter vetch "*Vicia ervilia* (L.) willd. International Journal of Research in Agriculture and Food Science, 1: 40-46.
9. Farrokhi, J. and L. Naseri. 2012. Genetic diversity survey of Iranian native apples (*Malus*× *domestica*) genotypes using SSR markers. Agricultural Biotechnology, 10: 27-34 (In Persian).
10. Feg, F., M. Chen, D. Zhang, X. Sui and S. Ha. 2009. Application of SRAP in the genetic diversity of *Pinus koraiensis* of different provenances. African Journal of Biotechnology, 8: 1000-1008.
11. Fotovat, R. 1996. Estimation of the mating system of bitter vetch using Isozyme CPT and study of genetic diversity. M.Sc. Thesis, Tabriz University, 99 pp (In Persian).
12. Ganjkhanlo, A., S.A. Mohammadi, M. Moghadam, K. Ghasemi Golazani, M.R. Shakiba and A. Yosefi. 2012. Genetic diversity in barley as revealed by microsatellite markers and association analysis of these markers by traits related to freezing tolerance. Seed and Plant improvement Journal, 28: 101-114 (In Persian).
13. Haddad, S.G. 2006. Bitter vetch grains as a substitute for soybean meal for growing lambs-livestock. Science, 99: 221-225.
14. Hoshyardel, F., R. Darvishzadeh, A. Basirnia and H. Hatami Maleki. 2016. Association mapping of agronomic traits in oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genotypes. Journal of Crop Breeding, 8: 134-143 (In Persian).

15. Lopez Belido, L. 1994. Legumes for animal feed. http://www.hortprudue.edu./new crop/1492/legume-animal.html.
16. Matus, I.A. and P.M. Hayes. 2002. Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. Genome, 45: 1095-1106.
17. Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and consideration. Crop Science, 43: 1235-1248.
18. Muminovic, J., A.E. Melchinger and T. Lubberstedt. 2004. Genetic diversity in cornsalad (*Valerianella locusta*) and related species as determined by AFLP markers. Plant Breeding, 123: 460-466.
19. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist, 106: 283-292.
20. Razmazar, V., N.M. Torbatinejad, J. Seifdavati and S. Hassani. 2012. Evaluation of chemical characteristics, rumen fermentation and digestibility of *Vicia sativa*, *Lathyrus sativus* and *Vicia ervilia* grain by *in vitro* methods. Journal of Animal Science Researches, 22: 107-119 (In Persian).
21. Reif, J.C., X.C. Xia, A.E. Melchinger, M.L. Warburton, D.A. Hoisington, D. Beck, M. Bohn and M. Frisch. 2004. Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize population of tropical, subtropical and temperate germplasm by SSR markers. Crop Science, 44: 326-334.
22. Rotger, A., A. Ferret, S. Calsamiglia and X. Manteca. 2006. In situ degradability if seven plant protein supplements in hifers fed high concentration diet with different forage to concentrate ratio. Animal Feed Science and Technology, 125: 73-87.
23. Sadeghi, G.H., J. Pourreza, A. Samei and H. Rahmani. 2009. Chemical composition and some anti-nutrient content of raw and processed bitter vetch (*Vicia ervilia*) seed for use as feeding stuff in poultry diet. Tropical Animal Health and Production, 41: 85-93.
24. Sahhafi, S.R. and B. Maleki Zanjani. 2016. Analysis of genetic variation for morphological and agronomic traits in bitter vetch landraces. The 2nd international and 14th National Iranian Crop Science Congress, 1-5 (In Persian).
25. Snowdon, R.J. and W. Fried. 2004. Molecular markers in Brassica oilseed breeding, current status and future possibilities. Plant Breeding, 123: 1-8.

Evaluation of Genetic Diversity in Some Iranian Bitter Vetch Landraces using Microsatellite Markers

Seyed Rasoul Sahhafi[1], Bahram Maleki Zanjani[2], Majid Talebi[3] and Reza Fotovat[4]

1- Assistant Professor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan (Corresponding author: s.r.sahhafi@vru.ac.ir)
2 and 4- Associate Professor and Assistant Professor, University of Zanjan
3- Associate Professor, Isfahan University of Technology
Received: October 18, 2015 Accepted: January 24, 2016

Abstract

The genetic diversity of 19 bitter vetch landraces (*Vicia ervilia* L.) from four provinces (East Azerbaijan, West Azerbaijan, Ardabil and Zanjan) of Iran was evaluated using 18 pairs of SSR primers. The extracted genomic DNA was amplified with eight pair primers and PCR products were separated on DNA sequencing gels. In this research, eight pair of SSR primers detected a total of 27 alleles. Primers VE02, VE05, VE07, VE09 and VE19 with four alleles had the highest and VE14 and VE27 with two alleles had the lowest number of alleles among the SSR markers employed. The average of observed heterozygosity was 0.0435. According to Chi-square test, populations were out of Hardy–Weinberg equilibrium. The results showed that the average of polymorphism information content (PIC) of primers was 0.5363. Primer VE02 had the highest PIC (0.6934) and primer VE27 had the lowest PIC (0.1093). The highest genetic distance was observed between Ardabil (from Ardabil province) with Chumalu (from Zanjan province) landraces. The least genetic distance was observed between Barazin (from East Azerbaijan province) and Khiarak (from Ardabil province) landraces. Cluster analysis based on Nei similarity coefficient matrix using UPGMA method classified the landraces into five main groups. The results indicated that SSR markers are efficient in case of polymorphism detection and genetic distance evaluation between Iranian bitter vetch landraces, and can be used as valuable tools in analysis of genetic relationships between bitter vetch landraces.

Keywords: Bitter vetch, Genetic diversity, Molecular markers, SSR