

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران  
جلد ۲۴، شماره ۱، صفحه ۱۲۲-۱۱۴ (۱۳۹۵)

## بررسی تنوع ژنتیکی دم‌گاوی (*Smirnovia iranica* Sabeti) در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD

منصوره قوام<sup>۱\*</sup>، محمدرضا نقوی<sup>۲</sup>، حسین آذرنیوند<sup>۳</sup> و علی طویلی<sup>۴</sup>

\* نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه کاشان.

پست الکترونیکی: [mghavam@kashanu.ac.ir](mailto:mghavam@kashanu.ac.ir)

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۳- استادیار، گروه احیاء مناطق خشک و کوهستانی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۴- دانشیار، گروه احیاء مناطق خشک و کوهستانی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۱

### چکیده

گیاه دم‌گاوی (*Smirnovia iranica*) از خانواده Fabaceae و از گونه‌های درختچه‌ای ارزشمند بومی و سازگار در ماسه‌زارهای مناطق مرکزی ایران است که از نظر تولید علوفه و حفاظت خاک و ایجاد چشم‌انداز زیبا و ارزش دارویی بسیار حایز اهمیت است. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه از رویشگاه آن واقع در ماسه‌زارهای کاشان ۴ سایت مطالعاتی به‌فاصله ۳۰ کیلومتر از هم انتخاب و از هر سایت ۵ نمونه گیاهی جمع‌آوری و با استفاده از ۱۱ آغازگر مورد تجزیه RAPD قرار گرفتند. نتایج حاصل از ماتریس تشابه Dice، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و اطلاعات باندها، نشان داد که از ۷۲ مکان تکثیرشده توسط آغازگرها به‌طور متوسط ۶۱ مکان چندشکل بودند. تجزیه خوشه‌ای، تنوع قابل توجهی را در بین نمونه‌ها نشان داد. میزان تشابه از ۰/۹۷ برای نزدیکترین افراد در سایت ۴ تا ۰/۶۴ بین دورترین نمونه‌ها مربوط به سایت‌های مختلف، مشاهده شد. کل نمونه‌ها به ۵ گروه اصلی تبدیل شدند که دو گروه دارای یک نمونه و به‌ترتیب شامل نمونه‌های ۳ (از سایت اول) و نمونه ۱۲ (از سایت سوم) بودند، دو گروه دیگر مخلوطی از نمونه‌های مختلف بودند که هر کدام به زیرگروه‌هایی تقسیم شدند و یک گروه فقط شامل نمونه‌های متعلق به سایت ۴ بود. گروه‌بندی ژنتیکی به‌دست آمده از RAPD تقریباً با توزیع جغرافیایی مطابقت نشان داد. عدم تطابق در یک سایت ممکن است به‌دلیل مهاجرت بذر این گیاه از منطقه‌ای به منطقه دیگر توسط عوامل مختلف و به‌ویژه بادهای شدید باشد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، دم‌گاوی، RAPD.

### مقدمه

است که گذشته از تولید علوفه و حفاظت از خاک و ایجاد چشم‌انداز زیبا، دارای ارزش دارویی بسیار زیادی است (Sabeti, 1994). این گیاه دارای یک ساقه اصلی با شاخه‌های متعدد، ارتفاع ۱ تا ۱/۵ متر، تاج پوشش ۷۰

گیاه دم‌گاوی (*Smirnovia iranica*) یکی از گونه‌های درختچه‌ای ارزشمند بومی و سازگار در ماسه‌زارهای مناطق مرکزی ایران و از خانواده Fabaceae

بهبود مدیریت ژرم پلاسم و انتخاب به کمک نشانگرها فراهم کرده است (Fernandes *et al.*, 2002).

نشانگرهای RAPD به علت مزایایی چون تولید تعداد زیادی باند، پلی مورفیسم زیاد، عدم استفاده از مواد رادیواکتیو و عدم نیاز به وجود اطلاعاتی در مورد توالی ژنومی گیاه، همواره در بررسی تنوع ژنتیکی مخازن ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Strelchenko *et al.*, 2003). در ضمن RAPD نشانگر ژنتیکی مفیدی در بیان پلی مورفیسم گیاهان خودگشن که تنوع درون گونه‌ای پایینی دارند، می‌باشد (Joshi & Nguyen, 1993).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد این نشانگر می‌تواند در شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی از کارایی لازم برخوردار باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی شبدر ایرانی Samiei و همکاران (۲۰۰۶)، با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD بیست توده بومی از گونه مزبور به اثبات رساندند که در شبدر ایرانی گروه‌بندی حاصل از روش RAPD تا حدودی با گروه‌بندی توده‌های شبدر ایرانی بر اساس مبدا جغرافیایی هماهنگی دارد. تنوع ژنتیکی دو جمعیت از گونه بومی نادر *Oxytropis chankaensis* در سواحل غربی دریاچه خانکا در روسیه توسط Artyukova و همکاران (۲۰۰۴)، با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD بررسی شد و دریافتند که به طور متوسط تفاوت بین جمعیت‌ها حدود ۸ درصد و ناچیز بود. همینطور Dahdeshtian و همکاران (۱۳۹۰)، در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گون سفید (*Astragalus gossypinus* Fisher) در شش مکان در استان اصفهان با توجه به نتایج حاصل از ترادف بین نوکلئوتیدها و باندهای نوکلئوتیدی بر روی الکتروفورز، تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های گون سفید را نشان دادند.

در خصوص تنوع ژنتیکی گیاه دم‌گاوی اطلاعاتی در ایران در دست نیست. به منظور شناسایی تنوع ژنتیکی و دید بهتر از نحوه حفاظت از این گونه در زیستگاههای

سانتی‌متر، برگ‌های گرد یا بیضی شکل پوشیده از کرک‌های انبوه و گل‌آذین خوشه‌ای با گل‌های ارغوانی‌رنگ بسیار معطر و دو نوع سیستم ریشه‌ای عمودی و افقی است که عمدتاً در تپه‌های ماسه‌ای بادی بیابانهای دشت کویر، مسیله، ماسه زارهای کاشان، خراسان گسترش دارد. ریشه‌های عمودی در این گونه بسیار عمیق بوده و ریشه‌های افقی آن به وسعت حدود ۳۰ متر گسترده‌اند. دم‌گاوی از طریق ریشه‌های افقی خود به فواصل یک متر، نهال‌های جوانی تولید می‌کند. سیستم ریشه‌ای این گیاه به گونه‌ای است که هم در جذب مواد غذایی و رطوبت و هم در نگهداشتن گیاه در خاک نقش اساسی داشته و به شکل بسیار جالبی ذرات ماسه را تثبیت می‌کند. این گیاه با داشتن گل‌های معطر و زیبا، طولانی‌بودن دوره فعالیت و کوتاه بودن دوره خواب، یکی از گزینه‌های برتر گیاهی در امر بیابان زدایی و ایجاد فضای سبز در اطراف شهرهای کویری می‌باشد تا به وسیله آن از هجوم ماسه‌ها به نقاط مسکونی و کشاورزی جلوگیری شود (Majid, 1996).

حفاظت و استفاده پایدار از منابع ژنتیکی جهت تامین امنیت غذایی در آینده یک ضرورت است (Runo & Muluvi, 2004). در این بین تکنیک‌های ملکولی توانسته‌اند حفاظت و مدیریت منابع ژنتیکی Plant Genetic Resource (PGR) را خصوصاً در زمینه‌های اطلاعات مربوط به تنوع ژنتیکی در درون و بین گونه‌ها بهبود بخشند (Runo & Muluvi Powell *et al.*, 1996, 2004)، و به طور فزاینده‌ای در شناسایی روابط فیلوژنی مورد استفاده قرار گیرند. اطلاع کافی از همولوژیهای ژنومیک به برنامه‌ریزی و استراتژی‌های اصلاحی در حفاظت از ژرم پلاسم و انتقال ژنها از یک گونه به گونه دیگر کمک می‌کند (Rao & Riley, 1994). پیشرفت‌های اخیر با استفاده از PCR و بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های مختلف یک گونه با بهره‌گیری از نشانگرهای مختلف مولکولی روشهای موثر و سریعی را برای نشاندارکردن و

## مواد و روش‌ها

### ۱- مواد گیاهی و استخراج DNA

رویشگاه گیاه دم‌گاوی ماسه‌زارهای اطراف کاشان است که منطقه مورد مطالعه موسوم به نوار ریگ بلند و تپه‌های ماسه‌ای اطراف آن می‌باشد که به شکل هلالی از جنوب دریاچه نمک واقع در ۷۰ کیلومتری شمال شرق شهر کاشان شروع و تا ۵۵ کیلومتری جنوب شرقی آن ادامه دارد. این ناحیه بین عرض‌های جغرافیایی ۳۸، ۳۴° و ۵۳، ۳۳° شمالی و طول‌های جغرافیایی ۵۱، ۵۱° و ۵۱، ۵۲° شرقی قرار گرفته است. در این منطقه ۴ سایت مطالعاتی به فاصله ۳۰ کیلومتر از هم انتخاب (جدول ۱) و از هر سایت از ۵ پایه گیاه، نمونه برگ جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا زمانی که DNA از آنها استخراج شد.

خشک در این پژوهش تنوع ژنتیکی این گیاه، توسط نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱- شمای کلی از گیاه دم‌گاوی

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی مکان‌های برداشت

شماره سایت	نام مکان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	کمپ ۱	۳۲/۱۹۱'E ۵۱°	۱۰/۵۴۲'N ۳۴°	۲۹۹۲
۲	قندی اباد	۵۰/۶۶۴'E ۵۱°	۵۲/۵۰۵'N ۳۳°	۳۲۶۵
۳	قاسم اباد	۴۹/۵۵۱'E ۵۱°	۰/۵۷۲'N ۳۴°	۳۴۵۱
۴	کمپ ۲	۳۶/۹۱۰'E ۵۱°	۰/۶۸۳'N ۳۴°	۳۱۸۶

استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته انجام شد. بدین شرح که ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه داخل‌هاون چینی ریخته و با استفاده از ازت مایع ساییده شد تا پودر شدند. سپس این پودر را داخل تیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته و ۹۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (حاوی ۲ تا ۳ درصد PVP-40) گرم شده در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد و ۲۰-۳۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول به آن اضافه شد. در این مرحله نمونه‌ها در بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه قرار داده شدند و به آرامی مخلوط شدند. صدو هفتاد میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار و مخلوط نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و پس از آن افزودن ۸۰۰-۷۰۰

میکرولیتر کلروفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت ۱:۲۴ و مخلوط کردن به مدت ۱۵ دقیقه از مراحل بعدی کار بود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۹۵۰۰ دور سانتریفیوژ شده و قسمت بالای نمونه‌های حاصل برداشت شده و به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند. به این نمونه‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محلول CTAB ۵ درصد و ۰/۷ NaCl مولار افزوده شده و به مدت ۵ دقیقه مخلوط شدند. سپس ۷۰۰-۸۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند. مجدداً سانتریفیوژ در ۹۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه و برداشت روی شناور تکرار شد و در صورت تیره بودن این محصول مجدداً مرحله (۲۰۰ میکرولیتر محلول CTAB ۵ درصد و ۰/۷ NaCl

۲/۵ ساعت با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. پس از آن، ژل در محلول اتیدیم بروماید به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی و با استفاده از Gel document عکس برداری شد. تصاویر حاصل از ژلها براساس حضور و عدم حضور، به کد صفر و یک تبدیل و پس از انتقال داده ها به Excel، توسط نرم افزار NTSYS, Ver.2.02e تجزیه و تحلیل شد. ماتریس تشابه براساس ضریب تشابه Dice محاسبه و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام شد.

## نتایج

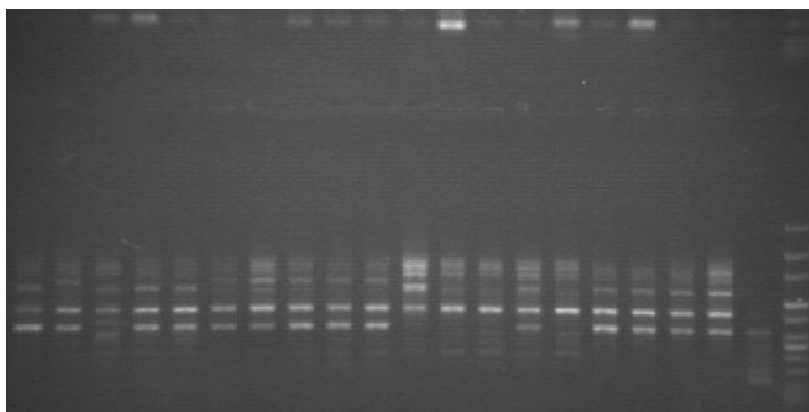
### اطلاعات بانندی

جدول ۲ نشان می‌دهد که آغازگرهای مورد استفاده در ۶۱ مکان از ۷۲ مکان دارای چند شکلی بودند ( 84 درصد از مکانها چند شکلی نشان دادند) و محدوده اندازه باندهای به دست آمده بین ۲۰۰ تا ۹۰۰ جفت باز بود. از این رو این آغازگرها برای مطالعه پلی مورفیسم و تنوع ژنتیکی در جنس *Smirnovia* بسیار مفیدند. آغازگرهای d بیشترین مکان (12 مکان) را تکثیر کردند. به طور متوسط هر آغازگر 4 مکان را شناسایی و تکثیر کرد. آغازگرهای z و g بیشترین نسبت چند شکلی (۱۰۰٪) را نشان دادند. بنابراین این آغازگرها توان بالایی را در تفکیک و گروه بندی و جداسازی بین گونه ها و درون گونه ها دارند، زیرا تعداد لوکوس های شناسایی شده در ژنوم *Smirnovia* در دامنه ۱-۱۲ لوکوس با میانگین ۴ لوکوس و نسبت چندشکلی ۸۴ درصد می باشند.

مولار افزوده شده و به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد. مقدار ۸۰۰-۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند. مجدداً سانتریفیوژ در ۹۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه و برداشت روی شناور ( تکرار شد. پس از آن ۰/۶ تا ۱ برابر ایزوپروپانول سرد و مخلوط کردن به مدت ۲ تا ۳ دقیقه و سانتریفیوژ در ۹۵۰۰ دور در مدت ۱۰ دقیقه انجام شده و روی شناور حذف و پلیت حاصل با اتانول ۷۵ درصد دو مرتبه شستشو شد. در آخر پلیت ها خشک شده و ۱۵ میکرولیتر آب مقطر به آنها اضافه شده و پس از انتقال بر روی ژل در دستگاه Gel document عکس برداری شدند.

### ۲- تجزیه RAPD

در مجموع از ۱۱ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی استفاده شد (جدول ۲). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱/۵ میکرولیتر از (۱- ) 1.MgCl<sub>2</sub> 25mmμl میکرولیتر از ( ۱- ) 2.NTP10mmμl میکرولیتر از ( ۱۰ آغازگر ۲μM) میکرولیتر از بافر ۱۰x، ۲ میکرولیتر DNA الگو (۲۵ ng) 2/0 میکرولیتر از taq پلیمرز ( ۱-۱۵μl) و ۱۶/۳ میکرولیتر آب دوبار تقطیر با اضافه نمودن ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی تهیه شد و با برنامه حرارتی ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد و برای ۴۵ سیکل : ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۳۷/۵ درجه سانتی گراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد، انجام گرفت. واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر انجام شد. محصول واکنش در ژل آگاروز ۱/۵٪ و بافر TAE به مدت



شکل ۲- نمونه ژل مربوط به الگوی بانندی آغازگر z

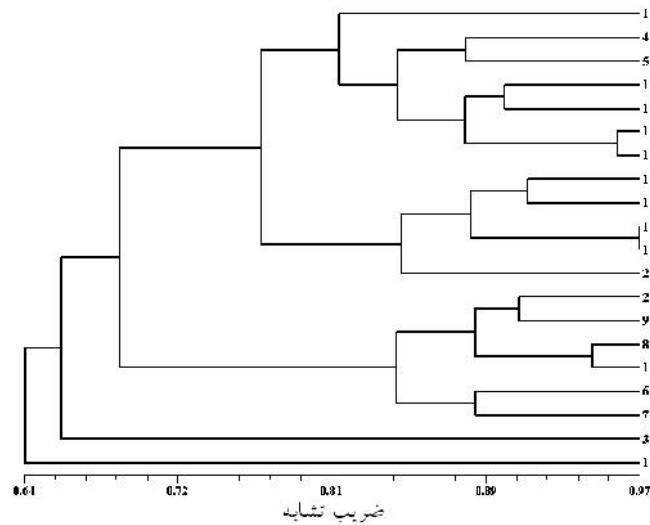
جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده و نتایج تجزیه RAPD

نام	توالی	تعداد مکان تکثیر شده	مکان چند شکلی	نسبت چند شکلی
A	۵- CTT CGG TGT G -۳	۱۰	۹	٪۹۰
B	۵- AGT CGT CCC C -۳	۸	۴	٪۵۰
C	۵- CCA CAG CAG T -۳	۵	۴	٪۸۰
D	۵- GAG CCC TCC A -۳	۱۲	۱۱	٪۹۱/۷
E	۵'- CTC CTG CCA A -۳'	۱	۱	٪۱۰۰
F	۵- CCT GGG CCT A -۳	۲	۱	٪۵۰
G	۵- AAT GCC CCA G -۳	۱۰	۱۰	٪۱۰۰
H	۵- CTG AGA CGG A -۳	۸	۷	٪۸۷/۵
I	۵- AGT CAGCCA C -۳	۵	۴	٪۸۰
J	۵- AGG GAA CGA G -۳	۶	۶	٪۱۰۰
K	۵- GTA GAC CCG T -۳	۵	۴	٪۸۰
کل	-	۷۲	۶۱	٪۸۴
میانگین		۶.۵۴	۵/۵۴	

### تجزیه خوشه‌ای

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۰ نمونه از ۴ سایت مختلف بر اساس ماتریس تشابه (جدول ۳) در ضریب تشابه ۰/۸۱ به ۵ گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۲). گروه A شامل ۷ نمونه که در ضریب تشابه ۰/۸۸ به سه زیرگروه A1 و A2 و A3 تقسیم شدند. زیر گروه A1 شامل نمونه ۱ (از سایت اول)، زیر گروه A2 شامل نمونه‌های ۴ و ۵ (از سایت اول) و زیر گروه A3 شامل نمونه‌های ۱۱، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ (از سایت ۳) بودند. در این زیرگروه گونه‌های نمونه‌های ۱۳ و ۱۵ بیشترین تشابه (۰/۹۶) را داشتند و نمونه‌های ۱۱ و ۱۴ دارای متوسط تشابه ۰/۹۰ بودند. گروه B شامل نمونه‌های ۱۶ و ۱۷ و ۱۸ و ۱۹ و ۲۰ می‌باشد که همگی

متعلق به سایت ۴ بوده و نمونه‌های ۱۶ و ۱۸ دارای تشابه ۰/۹۱ و نمونه‌های ۱۷ و ۱۹ دارای تشابه ۰/۹۷ بودند (جدول ۳). گروه C دارای ۶ نمونه شامل نمونه‌های ۶ و ۷ که در درجه تشابه ۰/۸۷ به دو زیر گروه C1 و C2 تقسیم شدند. زیر گروه C1 شامل چهار نمونه: ۲، ۹، ۸ و ۱۰ که نمونه‌های ۲ و ۹ از دو سایت متفاوت ۱ و ۲ بوده و دارای تشابه ۰/۹۱ و نمونه‌های ۸ و ۱۰ هر دو از سایت بوده و دارای درجه تشابه ۰/۹ بود. زیر گروه C2 متشکل از نمونه‌های ۶ و ۷ با درجه تشابه ۰/۸۸ بود. گروه D و E هر دو دارای یک نمونه و به ترتیب شامل نمونه‌های ۳ (از سایت اول) و نمونه ۱۲ (از سایت سوم) بودند.



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای ۴ سایت و ۲۰ نمونه . روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه Dice

جدول ۳- ماتریس تشابه به روش Dice بین جفت نمونه ها

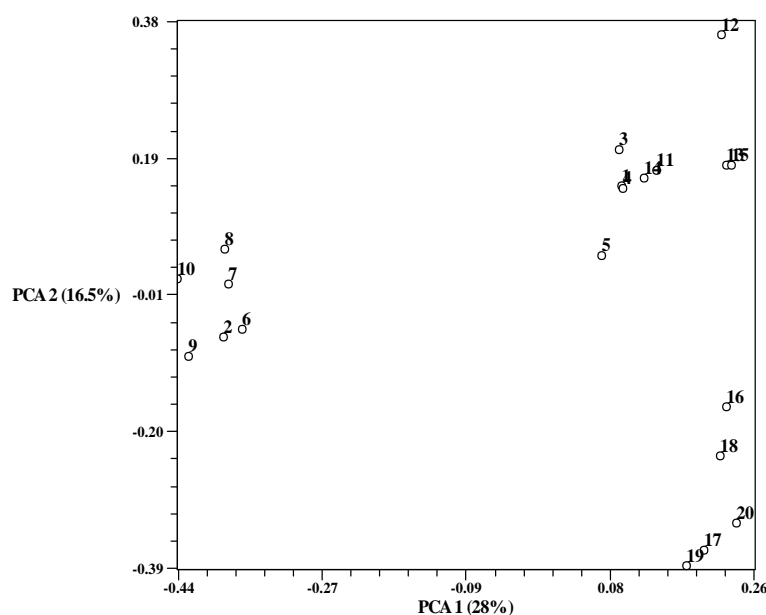
۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	
۱	۱																			
۲	.۷	۱																		
۳	.۶۴	.۶۱	۱																	
۴	.۸۷	.۷	.۷۰	۱																
۵	.۸۰	.۷۱	.۶۵	.۸۸	۱															
۶	.۶۴	.۸۵	.۶۹	.۶۹	.۶۸	۱														
۷	.۶۸	.۸۵	.۶۵	.۷۳	.۶۹	.۸۸	۱													
۸	.۷۱	.۸۴	.۵۸	.۷۸	.۷۴	.۷۸	.۸۵	۱												
۹	.۶۷	.۹۱	.۶۱	.۷۰	.۷۱	.۸۲	.۸۷	.۸۹	۱											
۱۰	.۷۰	.۸۸	.۵۹	.۷۷	.۷۵	.۸۱	.۸۹	.۹۵	.۹۲	۱										
۱۱	.۷۷	.۷۰	.۷۵	.۸۷	.۸۵	.۶۷	.۷۳	.۷۶	.۶۷	.۷۲	۱									
۱۲	.۶۷	.۵۶	.۶۶	.۶۷	.۶۵	.۵۱	.۵۷	.۶۱	.۵۴	.۵۷	.۷۲	۱								
۱۳	.۸۰	.۷۱	.۷۴	.۸۶	.۷۹	.۶۸	.۷۲	.۷۰	.۶۸	.۶۸	.۸۸	.۷۸	۱							
۱۴	.۸۳	.۷۴	.۶۹	.۸۸	.۸۴	.۶۹	.۷۵	.۷۷	.۷۲	.۷۶	.۹۰	.۷۷	.۹۲	۱						
۱۵	.۷۸	.۶۶	.۷۴	.۸۷	.۷۷	.۶۸	.۷۲	.۶۵	.۶۶	.۶۶	.۸۴	.۷۳	.۹۶	.۸۸	۱					
۱۶	.۷۶	.۶۸	.۶۸	.۷۸	.۷۲	.۶۸	.۶۷	.۶۷	.۶۸	.۶۴	.۷۶	.۷۰	.۸۲	.۸۰	.۸۰	۱				
۱۷	.۷۱	.۶۸	.۶۵	.۷۶	.۷۷	.۶۸	.۶۹	.۶۵	.۶۸	.۶۶	.۷۶	.۵۹	.۷۷	.۷۸	.۷۵	.۸۵	۱			
۱۸	.۷۷	.۷۰	.۶۷	.۸۰	.۸۰	.۷۲	.۷۱	.۶۹	.۷۰	.۶۷	.۸۲	.۶۷	.۸۴	.۸۴	.۸۲	.۹۱	.۸۹	۱		
۱۹	.۷۱	.۷۱	.۶۵	.۷۶	.۷۷	.۶۸	.۶۹	.۶۷	.۷۱	.۶۸	.۷۶	.۵۹	.۷۷	.۷۸	.۷۵	.۸۵	.۹۷	.۹۲	۱	
۲۰	.۶۸	.۶۵	.۶۱	.۷۳	.۷۳	.۵۸	.۶۱	.۶۲	.۶۵	.۶۳	.۷۳	.۵۸	.۷۶	.۷۵	.۷۴	.۷۹	.۸۵	.۸۶	.۹	۱

## تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

تجزیه PcoA (Principal Coordinate Analysis)

نشان داد که دو مؤلفه اول بیش از ۴۴٪ از کل واریانس را توجیه می‌کنند. گروه‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه بر اساس دو مؤلفه (شکل ۳) نمونه‌ها را در ۴ گروه قرار داد که با گروه‌بندی افراد بر اساس تجزیه خوشه‌ای در تشابه ۰/۸۱ تقریباً مطابقت دارد. لذا تجزیه به مختصات اصلی وقتی که

مؤلفه اول که ۲۸٪ واریانس موجود در بین افراد جمعیت را توجیه می‌کنند توان تفکیک و گروه‌بندی بالایی را دارد (Mohammadi & Prasanna, 2003). نتایج به دست آمده بر اساس این روش نشان داد که نمونه‌های ۱، ۴، ۳، ۵، ۱۰، ۱۱، ۱۳ و ۱۵ در یک گروه، نمونه‌های ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۲ در یک گروه، نمونه‌های ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰ در یک گروه و نمونه ۱۲ در یک گروه مستقل واقع شده‌اند.



شکل ۴- گروه‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه بر اساس تجزیه به مختصات اصلی

## بحث

تجزیه خوشه‌ای انجام شده بر اساس ماتریس تشابه، در جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد نزدیکترین افراد مربوط به دو نمونه (۱۶ و ۱۷) از سایت ۴ با ضریب تشابه ۰/۹۷ و دورترین آنها با ضریب تشابه ۰/۶۴ مبین تفاوت‌های ژنتیکی بالاست. از بین ۴ سایت تحت مطالعه فقط افراد سایت ۴ (کمپ ۲) با ضریب تشابه ۰/۸۵ در یک گروه مجزای B کنار هم قرار گرفتند که بیانگر این است که این نمونه‌ها تشابه بالایی با هم دارند و به نقاط دیگر پراکنده نشده‌اند. در حالیکه نمونه‌های مناطق دیگر در جاهای مختلف دندروگرام قرار گرفتند که می‌تواند به دلیل جابجایی نمونه‌ها از یک منطقه به منطقه دیگر باشد. حضور نمونه‌های

سایت ۱ در گروه‌های متفاوت (A، C و D) و همراه با نمونه‌های سایت‌های ۲ و ۳ که عدم مطابقت توزیع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد، می‌تواند ناشی از جابجایی بذور به مناطق جغرافیایی از طریق مهاجرت یا بادهای شدید این مناطق بوده و یا اینکه برای حصول نتیجه دقیق پرایمر بیشتری مورد نیاز است در این میان سه نمونه از این سایت ۱ شامل نمونه‌های ۱، ۴ و ۵ با چهار نمونه از سایت ۳ (۱۱، ۱۴، ۱۳ و ۱۵)، که از منطقه جغرافیایی کاملاً مجزایی از هم هستند (جدول ۱)، تشابه زیادی را نشان دادند (۰/۸۱). این تشابه را شاید بتوان مربوط به داشتن جد مشترک نمونه‌های این دو سایت دانست.

### منابع مورد استفاده

- Artyukova, E.V., Kholina, A.B., Kozyrenko, M.M. and Zhuravlev, Yu.N., 2004. Analysis of genetic variation in rare endemic species *Oxytropis chankaensis* (Fabaceae) using RAPD markers. Russian Journal of Genetics. 40: 710-716.
- Fernandes, M.E., Figueiras, A.M. and Beenito, C., 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoretical and Applied Genetics. 104: 845-858.
- Joshi, C.P. and Nguyen, H.T., 1993. RAPD (Random amplified polymorphic DNA) analysis based on intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. Plant Science. 93: 95-103.
- Majid, M., 1996. Some ecological characters study of *Smirnovia turkestanica*. Natural Resources and Animal Husbandry Research Center of Esfahan Province, Isfahan, Iran.
- Mohammadi, S.A., and Prasanna, B. M., 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations Crop Science. 43:1235–1248 (Review & interpretation).
- Powell, W., Morgante, M. and Andre, C., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. Molecular Breeding. 2: 225-238
- Ramantha, R., and Riley, R., 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. Plant Genetic Resource News. 97:3-20
- Runo, M.S. and Muluvi, G.M., 2004. Analysis of genetic structure in *Melia volkensii* (Gurke.) population using random amplified polymorphic DNA. African Journal of Biotechnology. 3: 421-425
- Sabeti, H., 1994. The Iranian's Forests, Trees and Shrubs. The Publications of the University of Yazd, Yazd, Iran.
- Samiei, K., Arzani, A. and Mirmohammad Mibodi, M., 2006. Evaluation of genetic diversity in native accessions of *Trifolium resupinatum* from Iran using RAPD markers. Agricultural Science and technology. 20: 61-69.
- Strelchenko P., Street, K., Mitrofanova, O., Mackay, M., Chabane, K. and Valkoun, J., 2003. The genetic relationships between hexaploid wheat landraces from different geographical origin. In 'Proceedings 10th International Wheat Genetics Symposium.: 2; 637-640

به طور کلی تنوع مشاهده شده بین و درون گونه‌ای جنس *Smirnovia* در این مطالعه شاید به علل زیر باشد:

۱- تشابه ژنتیکی زیاد به دست آمده از RAPD برای افرادی درون یک سایت، شاید بخشی از آن به علت غلبه روش تکثیر غیر جنسی (ریزوم) در این گیاه است. در طبیعت به ندرت از طریق بذر تکثیر می‌شود. زیرا کپسول در اوائل خرداد ماه توسط باد از گیاه جدا شده و تا اسفند ماه که زمان مناسب برای سبز شدن گیاه است، کمتر فرصت می‌یابد که از تلاطم شنزار، در امان مانده و با استفاده از باران سبز شود و اکثراً در دره‌های شنی مدفون می‌شود. ضمناً بذور دم‌گاوی خیلی زود قوه نامیه خود را از دست می‌دهند و آفات شدیداً به آن حمله می‌کنند. این گیاه پس از استقرار در شنزار به صورت خود به خود تکثیر می‌شود. گیاه دارای دو نوع ریشه افقی و عمودی است و از طریق ریشه‌های افقی خود به فواصل یک‌متر نهال جوانی را به بالا می‌فرستد و بدین ترتیب تپه شنی را به نحو بسیار ظریفی اتصال می‌دهد و به صورت مجموعه‌هایی در ماسه‌زار در می‌آید.

۲- اگرچه همبستگی کاملی بین فاصله‌های ژنتیکی و جغرافیایی وجود ندارد اما تنوع جغرافیایی و اکولوژیکی زیستگاه‌های وارینه‌ها و گونه‌های مختلف در ایجاد تنوع موثر است (Dheif *et al.*, ; Sangeeta *et al.*, 2009). جدا افتادن کامل نمونه‌های سه سایت ۲، ۳ و ۴ بر اساس اطلاعات به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه اصلی می‌تواند نشانگر تنوع ژنتیکی بین گونه‌های موجود این گیاه در سه مکان مورد مطالعه باشد. با توجه به یکسان بودن شرایط آب و هوایی و خاک در سایت‌های مورد برداشت به نظر می‌رسد بتوان ادعا کرد اختلاف ژنتیکی بین گونه‌های مورد مطالعه در سایت‌های مختلف یا ناشی از تفاوت میکروکلیمای این سایتهاست و یا نشان‌دهنده زیرگونه‌های مختلف از این گونه است که علی‌رغم شباهت‌های ظاهری بسیار نزدیک به هم، تفاوت ژنتیک آنها منجر به اختلافات ظاهری ناشناخته در آنها شده است که مطالعات سیستماتیک و گیاه‌شناسی بیشتری را می‌طلبد.



## Genetic diversity of *Smirnovia iranica* Sabeti species from Iran using RAPD markers

M. Ghavam <sup>\*1</sup>, M.R. Naghavi <sup>2</sup>, H. Azarnivand <sup>3</sup> and A. Tavili<sup>3</sup>

1\*- Corresponding author, Assist. Prof., Department of Natural Resources and Earth Sciences, University of Kashan, Kashan, I.R.Iran, Email: mghavam@kashanu.ac.ir

2- Prof., Department of Agriculture, University of Tehran, Tehran, I.R.Iran

3- Prof., Department of Natural Resources, University of Tehran, Tehran, I.R.Iran

4- Assoc. Prof., Department of Natural Resources, University of Tehran, Tehran, I.R.Iran

Received: 11.11.2012

Accepted: 11.05.2014

### Abstract

*Smirnovia iranica* Sabeti is an endemic shrub species in Fabaceae family. It is found in sand dunes of central parts of Iran. It is very important for soil conservation, forage, landscape and medicinal values. RAPD is a useful genetic marker to determine polymorphism and relationship among plant species. In order to evaluate genetic diversity within and between *Smirnovia iranica* populations by 11 RAPD primers, 20 samples were collected from 4 sites of sand dune of Kashan. According to diversity indices, Dice similarity, cluster analysis and band information a total of 72 bands were amplified and 61 of the bands were polymorphic. Cluster analysis revealed a high amount of diversity among the studied samples. The most similar samples with 0.97 similarity were found in site 4, while the least similarity (0.65) was obtained for samples from different sites. Cluster analysis classified the samples in five groups. Two groups had only one sample. However, the other samples were distributed in other three groups one of which contained all samples of site 4. There was relatively fair coordination between genetic divergence and geographical origins.

**Keywords:** Cluster analysis, genetic diversity, RAPD, similarity, *Smirnovia iranica*.