

## بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری با استفاده از نشانگر AFLP و صفات زراعی

ژایلا عثمانی<sup>۱\*</sup> و عادل سی و سه مرده<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۷/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱/۱۱)

### چکیده

کاهش تنوع ژنتیکی موجب آسیب‌پذیری شدید محصولات زراعی در برابر تنش‌های محیطی، آفات و بیماری‌ها و در نتیجه کاهش عملکرد می‌شود. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۷۲ اکوتیپ گندم سرداری (جمع‌آوری شده از مناطق مختلف غرب ایران) با استفاده از نشانگر AFLP و ۱۷ صفت زراعی مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA طبق روش تغییر یافته Dellaporta و همکاران انجام گرفت. سه جفت پرایمر *EcoRI:MseI*، ۱۵۸۲ بانده پلی‌مورف ایجاد کرد (با میانگین درصد پلی‌مورفیسم ۷۳/۹۲٪). تجزیه خوشه‌ای صفات مولکولی بر اساس ضریب تشابه جاکارد اکوتیپ‌های مورد مطالعه را در سطح تشابه ۰/۶۲ به هشت گروه تقسیم کرد. میانگین، ضریب تغییرات، واریانس ژنوتیپی، فنوتیپی و محیطی در هر کدام از صفات زراعی محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای صفات کمی بر اساس فاصله اقلیدوسی اکوتیپ‌ها را در فاصله ۴۶ به ۶ گروه مجزا تقسیم کرد. هم‌بستگی کمی بین صفات کمی با نشانگر AFLP بر اساس آزمون مانتل دیده شد (۰/۰۲). نتایج، تنوع ژنتیکی بالایی میان اکوتیپ‌ها نشان داد، در نتیجه سرداری احتمالاً یک رقم نبوده بلکه توده‌ایی از اکوتیپ‌هاست و در پژوهش‌های آینده می‌توان اکوتیپ‌های برتر را شناسایی کرده و جایگزین این توده از اکوتیپ‌ها نمود هم‌چنین می‌توان از آنها جهت معرفی ژن‌های جدید در داخل خزانه ژنی گندم نان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، گندم سرداری، صفات زراعی، AFLP و PCR

### مقدمه

ریشک‌دار و بیضی شکل، رنگ دانه زرد، مقاوم به سرما، حساس به سیاهک‌ها، متحمل به زنگ و کیفیت نانوائی خوبی داشته‌اند و در سال‌های مرطوب حساس به ورس می‌باشند. این رقم هم‌چنین به ریزش دانه مقاوم بوده و میزان عملکرد آن در شرایط مطلوب ۱/۵ تا ۲ تن بوده و قابل کشت در مناطق دیم و سرد کوهستانی کشور است (۲ و ۳). یکی از پی‌آمدهای اجتناب‌ناپذیر کشاورزی مدرن که مبتنی

گندم اولین غله و مهم‌ترین گیاه زراعی دنیاست (۶). طبق آمارهای مختلف بیش از ۷۰ درصد سطح زیر کشت محصولات زراعی در جهان به کشت غلات اختصاص دارد که از این مقدار ۲۲ درصد آن را گندم در برمی‌گیرد (۶). گندم سرداری که از بین توده‌های بومی ایران انتخاب و اصلاح شده است، دارای میانگین ارتفاع بوته ۱۰۵ سانتی‌متر، نیمه زمستانه، سنبله

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲. استادیار زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

\*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zhila\_osmany@yahoo.com

بر استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت قابل قبول است، کاهش تنوع ذخائر ژنتیکی بوده است. اگر چه تخمین این کاهش تنوع ژنتیکی مشکل و یا غیرممکن می‌نماید اما در این که تعداد بسیاری از ژن‌های مفید از دست رفته‌اند و ذخائر ژنتیکی با سرعت فزاینده‌ای کاهش یافته‌اند و محصولات زراعی عمده در معرض تهدید روزافزون شرایط محیطی نامناسب و تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار گرفته‌اند، تردیدی وجود ندارد. بنابراین امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به‌عنوان اجزای مهم پروژه‌های اصلاح نباتات تلقی می‌گردند (۱). پیشرفت‌های اخیر در ژنتیک سلولی و مولکولی، امیدهای تازه‌ای در به‌نژادگران به‌وجود آورده است که از جمله این پیشرفت‌ها می‌توان به ابداع انواع نشانگرهای مولکولی اشاره کرد. یکی از مهم‌ترین موارد کاربرد این نشانگرها در اصلاح نباتات، ارزیابی پتانسیل ذخائر توارثی است (۵). تکنیک AFLP مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز است که توسط ووس و همکاران، ارائه گردید (۴۱). این تکنیک براساس تکثیر دستجات خاصی از قطعات برش‌یافته ژنومی با استفاده از PCR می‌باشد. تکرارپذیری بالا، امکان بررسی هم‌زمان چندین مکان ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر، غیرحساس بودن به غلظت DNA الگو، ظرفیت بررسی کل ژنوم برای نمایان کردن چندشکلی و تولید تعداد زیاد نوار تکرارپذیر در مدت زمان کوتاه از مزایای این روش می‌باشد (۲۸، ۳۵ و ۴۱). پیرسیدی و همکاران به بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مؤثر مرتبط با ۶ صفت زراعی ۳۵ لاین گندم سرداری با استفاده از نشانگر مولکولی SSR پرداختند (۲۹). نتایج این تحقیق تنوع بالایی را میان این لاین‌ها نشان داده است، هم‌چنین نشانگرهای مربوط به صفات تعداد سنبلچه در هر سنبله، تعداد دانه در هر سنبله، وزن هزار دانه، ارتفاع ساقه، طول ریشه، عملکرد و درصد پروتئین دانه شناسایی شدند. و هم‌چنین آنها به این نتیجه رسیدند که استفاده هم‌زمان از نتایج تجزیه‌های مولکولی و مورفولوژیکی لاین‌های مشتق شده گندم

سرداری می‌تواند در انتخاب والدین مناسب جهت برنامه‌های تحقیقاتی با اهداف مختلف مورد استفاده قرار گیرد. هم‌چنین صادق‌زاده و همکاران با ارزیابی صفات زراعی و مورفولوژیکی ۱۰۶ لاین مشتق شده از گندم سرداری در دو سال گزارش کردند که تنوع بسیار زیادی در بین لاین‌های مشتق شده از نظر عملکرد، مقاومت به زنگ زرد، زودرسی نسبی، حساسیت به ورس، درصد پروتئین دانه، وزن هزار دانه، تعداد دانه در سنبله، تعداد سنبلچه در سنبله و ارتفاع وجود دارد. آنها وجود تنوع ژنتیکی بین لاین‌های گندم سرداری را مهم‌ترین عامل سازگاری و پایداری آن در مناطق سردسیر دیم کشور بیان کرده و استفاده از روش‌های مولکولی را به‌منظور بررسی‌های تکمیلی پیشنهاد کردند (۴). ارزیابی ارتباط بین فواصل ژنتیکی در گندم با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و AFLP (۴۰)، تعیین تنوع ژنتیکی بین نژادهای پرتغالی گندم (۲۷)، بررسی تنوع ژنتیکی گندم نان توسط نشانگر AFLP و مقایسه با تنوع حاصل از نشانگرهای SSR، SAMPL و صفات فنوتیپی آنها (۳۲)، تشخیص تنوع ژنتیکی و تعیین صفات زراعی گندم‌های هگزاپلوئید مصنوعی و والدین آنها (۲۰)، از گزارش‌های موجود در ارتباط با بررسی تنوع ژنتیکی گندم توسط نشانگر AFLP و صفات فیزیولوژیکی آنها و مقایسه این دو روش اندازه‌گیری تنوع است.

جهت بهره‌وری جامع‌تر و مؤثرتر از خزانه ژنی، لازم است که قادر به پیش‌بینی، غربال‌گری و ارزیابی تنوع ژنتیکی احتمالی در جمعیت‌های طبیعی و ژنوتیپ‌های خویشاوندان گندم باشیم. در این رابطه برای به‌دست آوردن اطلاعات موجود در گندم سرداری، بررسی‌های مورفولوژیکی که متأثر از محیط بوده و نمی‌تواند نماینده کامل ژنوم باشد کافی به‌نظر نمی‌رسد. بنابراین استفاده از نشانگرهای DNA که چندشکلی را در سطح DNA آشکار نمایند می‌تواند به‌عنوان روش‌های مکمل داده‌های مورفولوژیکی، روابط ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری را به‌طور کارا تر تعیین کند. بنابراین موضوع این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم

وزن خشک نیز با برداشت یک خط نیم متری از هر واحد آزمایشی و خشک کردن نمونه‌ها در آون به مدت ۴۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید.

هم‌چنین درصد خسارت غشا پس از تنش خشکی و تنش گرمایی نیز به صورت زیر برآورد شد:

ابتدا بذرها در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان کشت شدند و در گیاهچه‌های ۲۵ روزه که در شرایط آبیاری رشد یافته بودند، در هر واحد آزمایشی ۲۰ دیسک برگی (هر یک با ۲۰ میلی‌متر قطر) از برگ‌های کاملاً توسعه یافته در فاصله ساعات ۱۴-۱۲ تهیه و در یک لوله آزمایش با یک میلی‌لیتر آب مقطر، مرطوب شده و لوله‌ها به صورت در بسته به آزمایشگاه منتقل شدند. برای حذف الکترولیت‌های چسبیده به سطح برگ، این نمونه‌ها با آب مقطر شسته شدند. ۵ نمونه از دیسک‌ها (شاهد) در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک لوله آزمایش قرار گرفته و ۵ نمونه دیگر از دیسک‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محلول (۴۰٪) PEG 6000 در یک لوله آزمایش قرار داده شدند. سپس تمامی نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و پس از این مدت مواد محلول هر دو لوله آزمایش را دور ریخته و نمونه‌ها با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. به هر دو دسته نمونه‌ها ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس لوله‌های آزمایش حاوی دیسک‌های برگی و آب مقطر در یک حمام آب گرم قرار گرفتند تا دمای آنها در حد ۲۵ درجه سانتی‌گراد متعادل شود و پس از تکان دادن لوله‌ها هدایت الکتریکی آب محتوی نمونه‌ها با استفاده از EC متر بر حسب  $\mu\text{s}/\text{cm}$  تعیین شد. پس از آن جهت مرگ بافت‌های برگی، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در 15PSI اتوکلاو شدند و هدایت الکتریکی نمونه‌ها مجدداً قرائت شد. درصد خسارت غشاء ناشی از پسابیدگی با توجه به رابطه زیر تعیین شد:

$$100 \times [1 - \frac{1 - (T_1/T_2)}{1 - (C_1/C_2)}] = \text{درصد خسارت غشاء به پایداری غشای سلولی}$$

سرداری با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP و صفات زراعی است.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و ارزیابی کمی اکوتیپ‌ها

جمعیت مورد استفاده شامل ۷۲ اکوتیپ گندم سرداری بود که بذر آنها از مرکز تحقیقات کشاورزی سنندج تهیه شد. بذرها در شرایط مزرعه‌ای به صورت دیم و در سه تکرار، در قالب طرح لاتیس مستطیل سه‌گانه در ایستگاه تحقیقات دیم قاملو قروه در سال زراعی ۱۳۸۴ کشت شدند. در تجزیه واریانس اکوتیپ‌ها به دلیل تعداد بالای اکوتیپ‌ها، بلوک‌ها بزرگ‌تر شده و در نتیجه غیر یک‌نواختی ایجاد می‌شود به همین دلیل از طرح‌های بلوک ناقص استفاده گردید که بدین منظور از یک طرح لاتیس مستطیل سه‌گانه استفاده شد. هر اکوتیپ در چهار خط ۵ متری با استفاده از بذرکار آزمایشی کشت گردید. نمونه‌های برگ پرچم در بهار ۱۳۸۵ در مرحله گل‌دهی برداشت شدند و در داخل نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل شد. پارامترهای مورد بررسی در طی ماه‌های بهار، تابستان و پاییز ۱۳۸۵ در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان مورد ارزیابی قرار گرفت، که شامل صفات زیر است:

میزان کلروفیل با استفاده از دستگاه کلروفیل متر مدل SPAD، که در مزرعه و روی برگ‌های متصل به ساقه ارزیابی شد، جهت ارزیابی طول خوشه (سانتی‌متر)، ارتفاع ساقه (سانتی‌متر) و اجزای عملکرد که شامل: تعداد خوشه در متر مربع، تعداد سنبلچه در هر سنبله، تعداد سنبلچه عقیم در هر سنبله، وزن هزار دانه (گرم)، وزن دانه در هر سنبله (گرم)، تعداد دانه در هر سنبله و تعداد دانه در سنبلچه می‌باشد ۱۰۰ بوته به صورت تصادفی از هر واحد آزمایشی برداشت شد، هم‌چنین پارامتر عملکرد با توزین عملکرد دو خط طولی (هر خط ۴ متر) ارزیابی شد، سایر پارامترهای مورد بررسی شامل تعداد روز تا خوشه‌دهی (با محاسبه دوره خواب زمستان)، تعداد روز تا رسیدگی (با محاسبه دوره خواب زمستان) و وزن خشک اندام هوایی در پایان فروردین ماه می‌باشد که محاسبه

استخراج DNA طبق روش تغییر یافته Dellaporta و همکاران (۱۹۸۳)، انجام شد (۱۱). جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA، الکتروفورز ژل آگارز با ولتاژ ۷۰ ولت، به مدت ۴۰ دقیقه انجام شد سپس رنگ آمیزی آن با اتیدیوم بروماید انجام شد و ژل در زیر نور ماورای بنفش در دستگاه ترانس ایلومیناتور (Transluminator) مشاهده گردید و غلظت DNA از طریق مقایسه با مارکر MIII تعیین شد. تکنیک AFLP طبق روش ووس و همکاران انجام شد (۴۱). در ابتدا DNA ژنوم (۳۰۰ نانوگرم) توسط آنزیم‌های محدودکننده *MseI* و *EcoRI* برش داده شد. سپس قطعات DNA دورشته‌ای برش یافته به آداپتورها (۵ پیکومول از *EcoRI* و ۵۰ پیکومول از *MseI*) متصل شدند. مرحله تکثیر مقدماتی توسط پرایمرهای *EcoRI* و *MseI* بدون نوکلئوتید اضافی و تکثیر انتخابی توسط پرایمرها با سه نوکلئوتید انتخابی انجام شد. محصولات تکثیر انتخابی بر روی ژل اکریل آمید واسرشته‌ساز بارگذاری و برای رنگ آمیزی ژل حاصل از روش نیترا نقره استفاده شد (۳۳). تشخیص باندها با استفاده از نرم افزار Croos Cheker (۱۶) و ویرایش دستی انجام شد. پس از تشکیل ماتریس تشابه، تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc ver 2/02 (۳۱) و به روش تجزیه خوشه‌ای (Cluster analysis) انجام گرفت، سپس تجزیه تشخیص و تشخیص مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم افزار SAS Ver 8.2 (۳۴)، مکمل با روش تجزیه خوشه‌ای و هم‌چنین جهت تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای انجام شد. هم‌چنین جهت تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای از نرم افزار (Population genetic analysis(1.31)) Popgene Ver-1.31 (۴۴) استفاده شد.

### نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس اکوتیپ‌ها (جدول ۱) نشان داد که به جز صفات وزن هزار دانه و وزن دانه در هر خوشه در بقیه صفات مورد بررسی بین اکوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. و این نمایانگر وجود تنوع بالا در میان اکوتیپ‌های مورد بررسی

در این رابطه  $C_1$  و  $C_2$  به ترتیب هدایت الکتریکی نمونه‌های شاهد در قرائت‌های اول و دوم و  $T_1$  و  $T_2$  هدایت الکتریکی نمونه‌های تیمار شده با PEG در قرائت‌های اول و دوم بر حسب  $\mu\text{s/cm}$  هستند (۹ و ۳۷).

مراحل ارزیابی پایداری غشا در مقابل تنش گرمایی همانند تنش خشکی است فقط به جای قرار دادن ۵ دیسک برگی در محلول PEG، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای  $44^\circ\text{C}$  در یک لوله که با پارافیلیم بسته شده بود در حمام آب گرم قرار داده شدند (۸ و ۹).

پس از انجام آزمایش‌های فوق، میانگین، حداقل و حداکثر مقادیر، انحراف معیار و ضریب تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی و واریانس ژنوتیپی، فنوتیپی و محیطی در هر کدام از صفات محاسبه شد. برای به دست آوردن ضریب تغییرات ژنوتیپی و محیطی ابتدا داده‌ها را تصحیح کرده و سپس با استفاده از تجزیه بلوک‌های کامل تصادفی، اجزای واریانس یعنی واریانس ژنوتیپی، محیطی و فنوتیپی محاسبه شد، ضریب تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی نیز با استفاده از اجزای واریانس به دست آمد. بعد از تشکیل ماتریس فاصله، تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc ver 2/02 (۳۱) و به روش تجزیه خوشه‌ای (Cluster analysis) انجام گرفت، سپس تجزیه مؤلفه‌های اصلی (principle component analysis) (PCA) و تجزیه تابع تشخیص (Discrimination factor analysis) با استفاده از نرم افزار SAS Ver 8.2 (۳۴)، مکمل با روش تجزیه خوشه‌ای و هم‌چنین جهت تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای انجام شد.

### مواد گیاهی و ارزیابی کیفی اکوتیپ‌ها

بذرها در بهمن ماه ابتدا در گلدان کشت شده و در اوائل اردیبهشت برگ‌های جوان هر اکوتیپ جداگانه جهت استخراج DNA برداشت شدند سپس نمونه‌ها پس از قرار دادن در کیسه‌های جداگانه و برچسب‌گذاری تا زمان استخراج، در فریزر  $-80^\circ$  درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در این تحقیق

جدول ۱. تجزیه واریانس ۱۷ صفات زراعی بررسی شده در اکوتیپ‌های گندم سرداری

منابع تنوع	درجه آزادی	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q
تکرار	۲	۳۰۴۳۰۲	۱۲/۰۰۹	۲۳/۳۰۰	۱۲/۶۵۹	۱۹۹۵/۰۲۵	۲۴۱/۴۰۸	۲/۱۳۵	۰/۸۶۳	۱۶۲۳/۷۱۴	۳۸۱۳/۵۶۱	۱۸۲۵/۲۸۲	۳۱/۲۹۲	۲/۹۲۱	۲۰۳۲/۵۵	۰/۰۴۰	۰/۰۰۱	۳۵۰۳/۶
تیمار																		
تصحیح شده	۷۱	۱۵۰/۸۶۷**	۲/۸۹۳**	۶/۶۸۵**	۱/۰۸۱**	۵۱/۹۸۴	۵۶/۶۱۹**	۰/۱۱۲**	۰/۰۲۶	۳۲۰۲/۲۴۷**	۴۲۸۳/۹۲۷**	۱۰۷/۹۸۰**	۱۰/۴۲۹**	۹/۰۴۴**	۴۲۰۹/۶۳**	۰/۰۱۸**	۰/۰۰۵**	۳۴۷/۱**
پلوی																		
داخل تکرار	۲۴	۵/۹۰۹	۰/۴۲۱	۰/۳۷۱	۰/۸۵۹	۵۶/۶۵۸	۶/۵۴۶	۰/۰۶۳	۰/۰۲۱	۶۲/۱۱۸	۱۱۱/۴۴۵	۵۶/۳۴۶	۶/۴۹۸	۲/۵۱۲	۶۱/۸۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۴۰/۲۴۹
خطای داخل	۱۱۸	۷/۷۹۳	۰/۳۲۸	۰/۴۹۴	۰/۲۰۲	۴۲/۳۰۸	۵/۹۸۱	۰/۰۵۷	۰/۰۳۹	۵۸/۰۶۹	۱۰۱/۳۵۰	۴۱/۵۵۸	۳/۰۱۲	۳/۰۸۹	۷۷/۷۹۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۳۲/۵۲۹

صفات بررسی شده در جدول شامل: ۸- میزان کلروفیل (SPAD)، ۹- طول خوشه (سانتی‌متر)، ۱۰- تعداد سنبلیچه عقیم در هر سنبله، ۱۱- تعداد سنبلیچه در هر سنبله، ۱۲- وزن هزار دانه (گرم)، ۱۳- تعداد دانه در هر خوشه، ۱۴- تعداد دانه در هر خوشه، ۱۵- درصد خسارت غشاه پس از تنش خشکی، ۱۶- وزن خشک اندام هوایی (گرم در مترمربع)، ۱۷- وزن خشک اندام هوایی (گرم در مترمربع) می‌باشند.

\*\* معنی‌داری در سطح یک درصد.

است.

وقتی تنوع مشاهده شده بین افراد را با توجه به صفات کمی اندازه‌گیری می‌کنیم، این تنوع ممکن است به علت اختلافات ژنوتیپی افراد یا به علت اختلافات شرایط محیطی و یا گاهی توسط اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط به وجود آمده باشد. نتایج به دست آمده از ضریب تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی (جدول ۲) نشان داد که صفاتی چون تعداد خوشه در متر مربع، وزن دانه در مترمربع، تعداد سنبلچه در هر سنبله، وزن خشک اندام هوایی و میزان کلروفیل دارای بیشترین ضرایب تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی بودند بنابراین این صفات دارای تنوع بیشتری نسبت به سایر صفات هستند. هم‌چنین بین ضرایب ژنتیکی و فنوتیپی صفات تعداد خوشه در مترمربع، وزن دانه، عملکرد، تعداد روز تا رسیدگی تعداد روز تا خوشه‌دهی اختلاف چندانی دیده نمی‌شود پس در تنوع به وجود آمده در این صفات هم ژنتیک و هم محیط مؤثر بوده است. ولی در صفاتی مانند تعداد سنبلچه در هر سنبله، وزن هزار دانه، وزن خشک اندام هوایی و وزن دانه در هر خوشه چون بین ضرایب تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی اختلاف زیادی وجود دارد و ضریب تغییرات محیطی در آنها بالاتر است پس این صفات بیشتر تحت تأثیر محیط بوده و از نظر ژنتیکی اختلاف چندانی ندارند. به طور کلی همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود در همه صفات تنوع محیطی سهم بیشتری از تنوع کل را به خود اختصاص داده است. پس تغییرات محیطی در ایجاد تنوع بین اکوتیپ‌ها بسیار مؤثر بوده است.

همان‌طور که می‌دانیم هر چه فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها و والدین بیشتر باشد هتروزیس بیشتر می‌توان مشاهده کرد هم‌چنین برای کاهش تعداد داده‌ها افراد مشابه در گروه‌های مختلف دسته‌بندی می‌شوند و این مسأله از ضروریات مطالعات در کشاورزی است. در این پژوهش برای دسته‌بندی داده‌های مربوط به صفات کمی روش تجزیه خوشه‌ای به کار برده شد و برای این کار از نرم‌افزار NTSYS-pc ver 2/02 استفاده شد. تشکیل ماتریس فاصله با استفاده از ضرایب فاصله

اقلیدوسی (Euclidean distance)، مربع فاصله اقلیدوسی (Euclidean squared distance) و ضریب هم‌بستگی (Coefficient of correlation) انجام شد و از روش‌های دسته‌بندی هم‌بستگی کامل (Complete linkage)، هم‌بستگی متوسط (Average Linkage (UPGMA)) و وارد (Ward's method) استفاده شد و در نهایت برای دستیابی به بهترین نتیجه، دندروگرام‌های مربوط به آنها ترسیم شده و مورد مقایسه قرار گرفت. برای تعیین هم‌بستگی بین ماتریس‌های تشابه و کوفتیک از آزمون مانتل (Mantel test) استفاده گردید. ضریب فاصله اقلیدوسی و روش دسته‌بندی هم‌بستگی متوسط نسبت به روش‌های دیگر ضریب کوفتیک بالاتری به خود اختصاص داد (۰/۹۵)، به بیان دیگر دندروگرام مربوط به آن شباهت افراد را بهتر از سایر روش‌ها نشان می‌دهد، لذا برای ادامه کار جهت گروه‌بندی اکوتیپ‌ها از ضریب فاصله اقلیدوسی و روش دسته‌بندی هم‌بستگی متوسط استفاده شد.

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای صفات زراعی در شکل ۱ آورده شده است. جهت اطمینان از صحیح بودن مکان خط برش (Cut of line) و یا صحیح قرار گرفتن هر اکوتیپ در دسته مربوط به خود از تجزیه تابع تشخیص استفاده شد، برای انجام این تجزیه نرم‌افزار SAS Ver 8.2 به کار برده شد. بر اساس نتایج تجزیه تابع تشخیص میزان خطای گروه‌بندی برای تمام کلاسترها مشخص شده است. از آنجائیکه در فاصله ۶۳ خطای گروه‌بندی تمام کلاسترها بالا بود در نتیجه مکان خط برش تغییر داده شده و در نهایت بهترین مکان خط برش که خطای گروه‌بندی در آن حداقل بود در فاصله ۴۶ تعیین شد، در این فاصله اکوتیپ‌ها به ۶ گروه تقسیم شدند. درصد اشتباه گروه‌بندی برای کلاسترهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۷/۱۴، ۴/۵۵، ۰، ۹/۰۹، ۹/۰۹ و صفر درصد بود در نتیجه کلاسترهای سوم و ششم ۱۰۰ درصد درست گروه‌بندی شده و خطای دسته‌بندی سایر کلاسترها به این صورت تصحیح شد: اکوتیپ ۷ از کلاستر ۴ به ۵، اکوتیپ ۱۶ از کلاستر ۵ به ۴، اکوتیپ ۶۵ از کلاستر ۱ به ۵ و اکوتیپ ۶۹ از کلاستر ۲ به ۵ انتقال داده شد. هم‌چنین

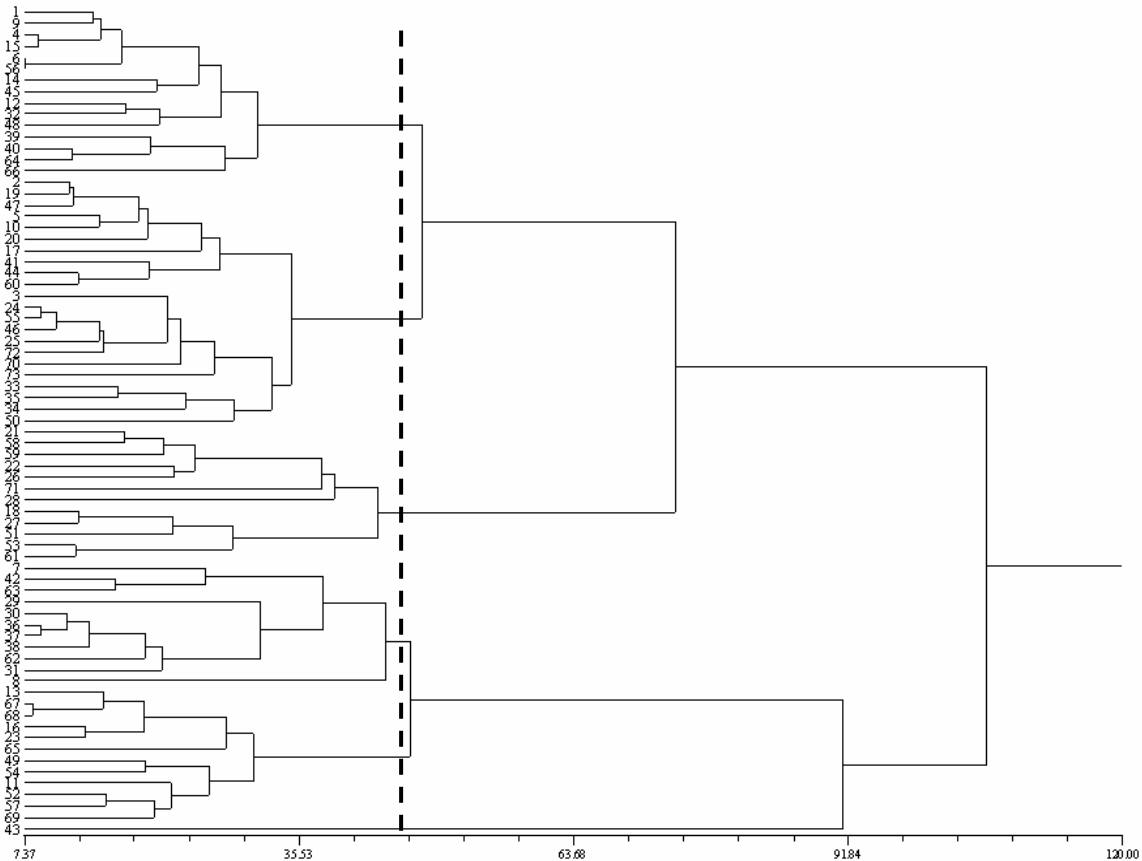
جدول ۲. شاخص‌های اندازه‌گیری شده جهت بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری بر اساس ۱۷ صفت زراعی

صفات	میانگین	حداکثر	حداقل	انحراف معیار		واریانس			ضریب تغییرات	
				P	G	P	E	G	P	G
a	۳۲/۰۳	۵۰	۱۲/۶	۶/۹۲	۷/۴۴	۴۷/۹۱	۷/۵۲	۵۵/۴۳	۲۱/۶	۲۳/۲۴
b	۸/۶۸	۱۱/۶۷	۷/۱	۰/۸۳	۰/۹۹	۰/۶۹	۰/۳	۰/۹۸	۹/۵۵	۱۱/۴
c	۱۴/۴۴	۱۹/۵	۱۱/۸	۱/۴۴	۱/۵۸	۲/۰۹	۰/۴۳	۲/۵۱	۹/۹۹	۱۰/۹۷
d	۱/۵۳	۳	۰/۳	۰/۵۵	۰/۷۱	۰/۳۲	۰/۲۱	۰/۵	۳۵/۵۴	۴۶/۴۲
e	۳۸/۹۷	۷۴	۲۷/۷	۱/۵۴	۶/۸۶	۲/۳۹	۴۴/۶۸	۴۷/۰۷	۳/۹۶	۱۷/۶
f	۲۲/۹۳	۴۰/۹	۱۸/۴	۴/۱۱	۴/۷۹	۱۶/۹۳	۶/۰۲	۲۲/۹۵	۱۷/۹۵	۲۰/۹
g	۱/۷۶	۲/۴۱	۱/۵۱	۰/۱۳	۰/۲۷	۰/۰۲	۰/۰۶	۰/۰۸	۷/۵۶	۱۵/۵۷
h	۰/۸۸	۱/۲۶	۰/۷	۰/۰۲	۰/۱۹	۰/۰۰۰۷	۰/۰۴	۰/۰۴	۲/۹۳	۲۱/۶
i	۱۱۹	۱۹۸/۳	۴۷/۸	۳۲/۴۲	۳۳/۲۹	۱۰۵۱/۶	۵۶/۴۳	۱۱۰۸	۲۷/۲۴	۲۷/۹۶
j	۱۳۶/۲	۲۳۹	۵۳	۳۷/۳۶	۳۸/۷۱	۱۳۹۵/۶	۱۰۳/۱۴	۱۴۹۸	۲۷/۴۲	۲۸/۴۲
k	۷۴/۵۳	۸۸	۶۲	۴/۵۸	۸/۰۸	۲۰/۹۵	۴۴/۳۲	۶۶/۲۶	۶/۱۴	۱۰/۸۴
l	۲۱۷/۲	۲۲۳	۲۱۶	۱/۵۳	۲/۴۵	۲/۳۴	۳/۶۷	۶/۰۱	۰/۷	۱/۱۲۸
m	۲۵۱/۶۳	۲۵۸	۲۴۷	۱/۴۶	۲/۲۹	۲/۱۳	۳/۱	۵/۲۳	۰/۵۸	۰/۹
n	۲۰۶/۹۸	۲۰۷	۶۹/۲	۳۷/۱۶	۳۸/۱۲	۱۳۸۱/۱	۷۲/۳۹	۱۴۵۳/۴	۱۷/۹۵	۱۸/۴۲
o	۰/۸۴	۱/۰۳	۰/۶۹	۰/۰۷	۰/۰۹	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۱	۸/۴۶	۱۰/۶۶
p	۰/۸	۰/۸۹	۰/۶۷	۰/۰۳	۰/۰۵	۰/۰۰۱	۸/۰۰۱	۰/۰۰۲	۴/۶	۶/۰۴
q	۳۵/۵۲	۱۸/۱	۶۷/۸	۱۰/۱۴۶	۱۱/۶۹	۱۰۲/۹۵	۳۳/۷۳	۱۳۶/۶۸	۲۸/۵۷	۳۲/۹۱

G, E و P به ترتیب مقادیر مربوط به اختلافات ژنوتیپی، محیطی و فنوتیپی را نشان می‌دهد.

بر اساس تجزیه تابع تشخیص فاصله بین کلاسترها مشخص گردید. کلاستر سوم از ششم بیشترین فاصله را داشت

کلاستر ۱ (۲۰ درصد) واقع شد و کمترین درصد آنها در کلاستر ۶ (۱ درصد) قرار گرفت. اصولاً اگر تعداد متغیرهای مورد اندازه‌گیری زیاد باشد تفسیر آن مشکل و سخت خواهد بود در نتیجه محققین به دنبال روش‌هایی هستند که کاهش داده‌ها را انجام دهد به طوری که این مجموعه کاهش یافته بیشترین واریانس داده‌ها را توجیه کند برای رسیدن به این هدف از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. بردارهای مشخصه مربوط به ۵ ریشه مشخصه بزرگ‌تر از یک ( $\lambda_1=4/7801$ ,  $\lambda_2=3/5975$ ,  $\lambda_3=1/7443$ ,  $\lambda_4=1/2056$  و  $\lambda_5=1/1554$ ) مهم‌ترین بردارهای متعامد بودند. مؤلفه اول ۲۸/۱۲ درصد از واریانس کل بین اکوتیپ‌ها را توجیه نمود و این مقدار برای مؤلفه‌های بعدی به ترتیب ۲۱/۱۶، ۱۰/۲۶،



شکل ۱. دندروگرام داده‌های حاصل از صفات زراعی با استفاده از نرم‌افزار NTSYS Ver. 2.02. اعداد دندروگرام بیانگر شماره اکوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشد.

سنبله  $0.3303$ ، تعداد سنبلچه عقیم در هر سنبله  $0.5540$ ، وزن هزار دانه  $0.3104$ ، تعداد دانه در هر سنبله  $0.3855$  و ارتفاع ساقه  $0.3310$  سهم عمده‌ای را در تنوع بین اکوتیپ‌ها ایفا نمودند. این صفات هم‌بستگی معنی‌داری (به ترتیب  $0.43^{**}$ ،  $0.73^{**}$ ،  $0.41^{**}$ ،  $0.44^{**}$  و  $0.50^{**}$ ) با این مؤلفه نشان دادند. در مؤلفه چهارم صفات تعداد روز تا رسیدگی ( $0.5772$ )، درصد خسارت غشا پس از تنش گرمایی ( $0.4016$ ) و درصد خسارت غشا پس از تنش خشکی ( $0.4524$ ) بیشترین نقش را در توجیه تنوع بین اکوتیپ‌ها داشتند. این صفات هم‌بستگی بسیار معنی‌داری (به ترتیب  $0.63^{**}$ ،  $0.44^{**}$  و  $0.49^{**}$ ) با این مؤلفه نشان دادند. در مؤلفه پنجم سهم صفات، در توجیه تغییرات تنوع بین اکوتیپ‌ها برای ارتفاع ساقه  $0.4030$ ، درصد خسارت غشا پس از تنش گرمایی  $0.5701$  و وزن خشک

$0.07$  و  $0.06$  درصد بود. پنج مؤلفه اول جمعاً  $73/43$  درصد از کل تنوع را توجیه نمود. در مؤلفه اول سهم صفات، در توجیه تغییرات تنوع بین اکوتیپ‌ها برای تعداد خوشه در مترمربع  $0.3859$ ، وزن دانه  $0.3387$ ، عملکرد  $0.3387$ ، تعداد دانه در هر خوشه  $0.3502$ ، تعداد دانه در سنبلچه  $0.3099$  و برای وزن هزار دانه  $0.3088$  بود. این صفات هم‌بستگی بسیار معنی‌داری (به ترتیب  $0.84^{**}$ ،  $0.74^{**}$ ،  $0.74^{**}$ ،  $0.74^{**}$ ،  $0.39^{**}$ ،  $0.67^{**}$  و  $0.67^{**}$ ) با این مؤلفه نشان داده‌اند. صفات میزان کلروفیل، طول خوشه، تعداد سنبلچه در هر سنبله و وزن دانه در هر خوشه (بترتیب  $0.3171$ ،  $0.3913$ ،  $0.3315$  و  $0.3992$ ) سهم مهمی را در مؤلفه دوم داشتند. این صفات هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری (به ترتیب  $0.60^{**}$ ،  $0.74^{**}$ ،  $0.61^{**}$  و  $0.75^{**}$ ) با این مؤلفه نشان دادند. در مؤلفه سوم صفات تعداد سنبلچه در هر



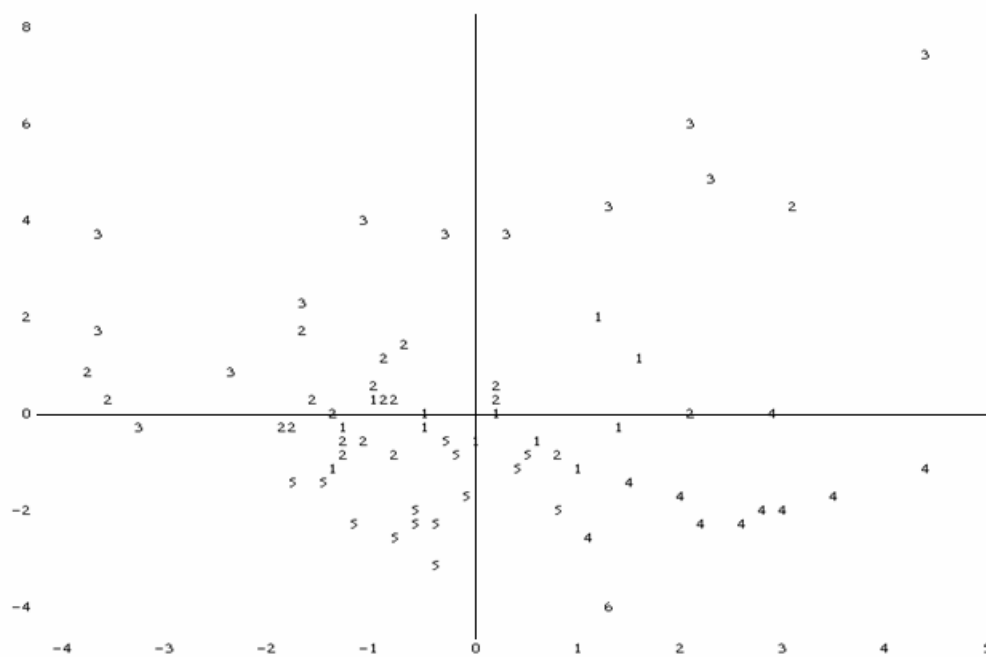
می‌شود بین کلاسترهای ۱، ۲ و ۳ با کلاسترهای ۴، ۵ و ۶ بیشترین فاصله وجود داشته است در نتیجه اکوتیپ‌های این کلاسترها بیشترین اختلاف را با هم دارند، و نتایج داده‌های زراعی نیز این مسأله را تأیید می‌کند. بر اساس داده‌های به‌دست آمده از صفات زراعی، اکوتیپ‌های کلاسترهای ۲ و ۳ در صفات تعداد دانه در خوشه، تعداد دانه در سنبلچه، وزن دانه در هر خوشه و تعداد سنبلچه در هر سنبله برترین اکوتیپ‌ها را تشکیل داده‌اند به‌عنوان مثال اکوتیپ‌های ۲۸، ۵۱، ۵۳ و ۶۱ مربوط به این کلاسترها، در هر کدام از صفات ذکر شده بیشترین مقادیر را به خود اختصاص داده‌اند. اما اکوتیپ‌های این کلاسترها (کلاستر ۲ و ۳)، چون تعداد خوشه در مترمربع، وزن هزار دانه و وزن دانه در مترمربع کمتری داشته‌اند و در کل تراکم پایین‌تری داشته‌اند، در نتیجه عملکرد آنها پایین آمده است. هم‌چنین تعداد روزهای لازم تا خوشه‌دهی و رسیدگی در آنها بیشتر بوده و درصد خسارت غشا پس از تنش گرمایی و خشکی نیز در آنها بالاتر است. اما اکوتیپ‌های کلاسترهای ۴، ۵ و ۶ بیشترین مقادیر وزن دانه در مترمربع، خوشه در مترمربع و وزن خشک اندام هوایی را داشته‌اند و به‌طور متوسط عملکردهای بالاتر از میانگین داشته‌اند. بیشترین انحراف معیار مربوط به عملکرد دانه است، یعنی این اکوتیپ‌ها از لحاظ عملکرد پراکندگی زیادی را در اطراف میانگین نشان داده‌اند، به‌عنوان مثال دو اکوتیپ ۲۹ (کلاستر ۴)، با عملکرد ۲۷۵/۳ گرم در مترمربع و اکوتیپ ۴۳ (کلاستر ۶)، با عملکرد ۲۷۱/۱ گرم در مترمربع بالاترین عملکرد را داشته‌اند در حالی که اکوتیپ ۲ (کلاستر ۲)، با عملکرد ۶۹/۲ گرم در مترمربع کمترین عملکرد را داشته است. در نتیجه عملکرد، پراکندگی بالایی در اطراف میانگین (۲۰۷ گرم در مترمربع) داشته است.

برای بررسی چندشکلی‌های DNA بین اکوتیپ‌های گندم سرداری، از ۱۱ جفت آغازگر *EcoRI* به همراه آنزیم *MseI* با سه نوکلئوتید انتخابی استفاده شد. از بین این آغازگرها سه جفت آغازگر *E+GCC/M+GCG*، *E+CAC/M+CAT* و *E+CGG/M+GGA* تولید باندهای تکثیری چندشکل در بین

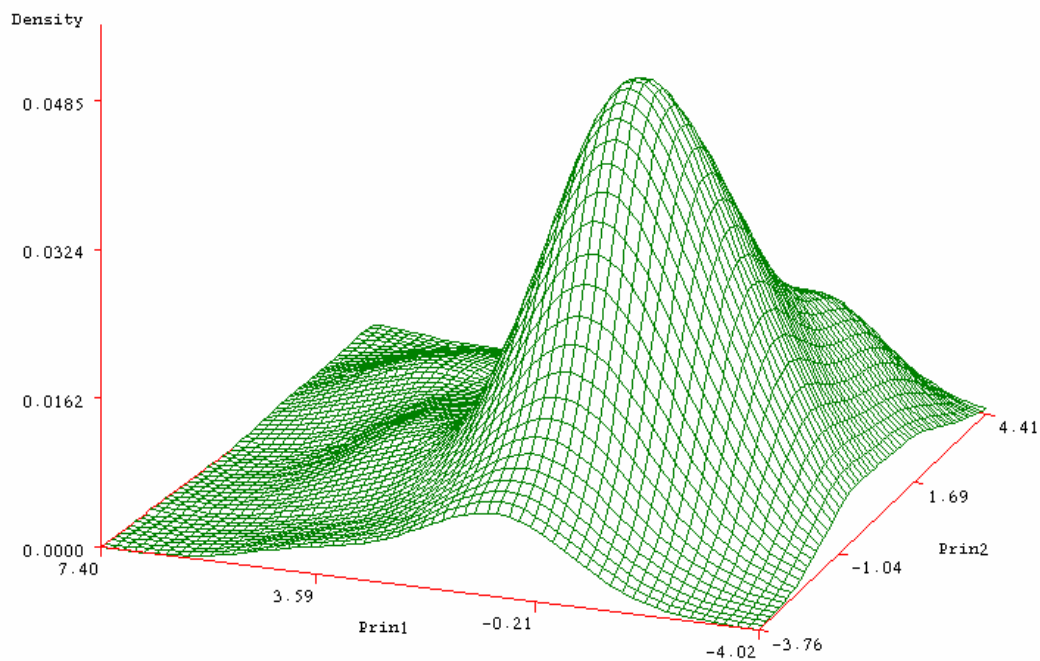
بود. این صفات هم‌بستگی معنی‌داری (به‌ترتیب  $0/3748$ ،  $0/433^{**}$  و  $0/61-$  و  $0/40^{**}$ ) با این مؤلفه نشان دادند.

با توجه به این‌که دو مؤلفه اول و دوم حدود ۵۰ درصد از تغییرات بین گروه‌ها را توجیه نموده‌اند، رسم نمودار پراکنش و چگالی بر مبنای این دو مؤلفه می‌تواند تقسیم‌بندی قابل توجیه‌تری از توزیع واقعی داده‌ها ارائه نماید. نمودار پراکنش گروه‌ها بر مبنای مؤلفه اول و دوم در شکل ۲ نشان داده شده است. ۶ گروه حاصل از دسته‌بندی اکوتیپ‌ها بر اساس تجزیه خوشه‌ای، در شکل ۲ کاملاً قابل تشخیص می‌باشد که این مسأله مؤید قطع نمودار تجزیه خوشه‌ای از محل مناسب و دسته‌بندی صحیح اکوتیپ‌ها می‌باشد. هم‌چنین قرار گرفتن اکوتیپ‌های هر کلاستر، در کنار هم، نتایج تجزیه کلاستر را تأیید می‌کند. هم‌چنین نمودار چگالی بر مبنای دو مؤلفه اول و دوم در شکل ۳ نشان داده شده است. دیده شد که در این نمودار اکوتیپ‌ها از دو دسته اصلی (سمت راست نمودار) تشکیل شده است که به ترتیب مؤید کلاستر دوم و اول حاصل از تجزیه خوشه‌ای می‌باشد که بیشترین اکوتیپ‌ها را در خود جای داده‌اند. هم‌چنین سایر کلاسترها که درصد کمتری از اکوتیپ‌ها را تشکیل داده بودند در نمودار قابل تفکیک هستند (سمت چپ نمودار) لذا نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای توجیه شد.

در دندروگرام مربوط به صفات زراعی (شکل ۱) مشاهده می‌شود که دو اکوتیپ ۶ و ۵۶ بیشترین شباهت را داشته‌اند داده‌های خام به‌دست آمده از صفات زراعی نیز این مسأله را تأیید کرده و نشان می‌دهد که این دو اکوتیپ در بیشتر صفات مورد بررسی، مقادیر مشابه و البته پایین‌تر از میانگینی داشته‌اند. اکوتیپ ۴۳ بیشترین اختلاف را با سایر اکوتیپ‌ها نشان داده است و این نشان‌دهنده خصوصیات منحصر به فرد این اکوتیپ در میان سایر اکوتیپ‌هاست. به‌عنوان مثال این اکوتیپ بیشترین مقادیر وزن دانه در مترمربع و خوشه در مترمربع را در میان سایر اکوتیپ‌ها داشته است و در نتیجه عملکرد بالایی را نشان داده است. همان‌طور که در این دندروگرام (شکل ۱) دیده



شکل ۲. نمودار پراکنش گروه‌ها بر مبنای دو مؤلفه اول و دوم حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر اساس ۱۷ صفت زراعی در اکوتیپ‌های گندم سرداری



شکل ۳. نمودار چگالی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای ۱۷ صفت زراعی در اکوتیپ‌های گندم سرداری

ژنوتیپ لوبیا با استفاده از دو پرایمر تصادفی از همدیگر گزارش گردیده است (۲۲) که دلیل اصلی آن تنوع زیاد در بین نمونه‌های مورد آزمایش بود که در این تحقیق نیز تنوع بالایی میان اکوتیپ‌ها به دست آمد. ساسانوما و همکاران، تنوع ژنتیکی ارقام وحشی گندم را با استفاده از ۴ ترکیب پرایمری به دست آوردند (۳۵)، الیس و همکاران، نیز ثابت کردند که با به کارگیری شش ترکیب آغازگری امکان توجیه ۸۰ درصد از روابط مورد انتظار در گیاه جو وجود دارد (۱۳). در صورتی که نشانگرهای مولولی از کروموزوم‌های مختلف انتخاب شده باشند هم‌بستگی یا پیوستگی بین آنها کم خواهد بود و مؤلفه‌های اصلی بیشتری برای توجیه تغییرات کل واریانس داده‌ها لازم است (۲۹). نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ۳ جفت آغازگر AFLP استفاده شده دارای توزیع مناسب ژنومی بوده‌اند. هم‌چنین به دلیل وجود تعداد مناسب باندهای پلی‌مورفیک برای گروه‌بندی ارقام گندم و مشاهده تنوع زیاد در بین ارقام مورد مطالعه ضرورتی برای افزایش تعداد آغازگرها تشخیص داده نشد.

در این تحقیق به دست آمدن تعداد بالای باندهای پلی‌مورف در مقابل تعداد کم باندهای مونومورف در مجموع ترکیبات پرایمری نشان داد که تجزیه و تحلیل AFLP پتانسیل بالایی برای یافتن تنوع ژنتیکی در میان اکوتیپ‌های گندم سرداری را دارد. نتایج مشابهی در بررسی‌های گذشته بر روی گندم به دست آمده است، ویرا و همکاران، با استفاده از ۶ ترکیب آغازگر نشانگر AFLP، میانگین ۹۱/۲ درصد باند پلی‌مورف را در میان ۱۹ ژنوتیپ گندم به دست آوردند (۴۰). آلمانزا و همکاران، تنوع ژنتیکی را میان نژادهای گندم نان بهاره بررسی کرده و میانگین ۵۹ درصد باند پلی‌مورف را گزارش کرده‌اند (۷). روی و همکاران، میانگین باندهای پلی‌مورف را در گندم نان، ۴۷ درصد به دست آورده‌اند (۳۲). هم‌چنین در این مطالعه مشخص شد که روش AFLP یک ابزار سریع و قدرتمند است زیرا تنها نیاز به حداقل کار اولیه دارد ولی تنوع ژنتیکی مناسبی را در جمعیت نمایان می‌نماید که دستیابی به

اکوتیپ‌های گندم سرداری نمودند سایر جفت آغازگرها یا هیچ‌گونه باندهای تولید نکردند و یا این‌که محصولات تکثیر شده آنها وضوح و قابلیت تکرارپذیری کافی نداشتند لذا برای انجام آزمایش‌های بعدی مورد توجه قرار نگرفتند و حذف گردیدند. نتایج حاصل از داده‌های AFLP نشان داد که مجموعاً ۲۴۳۱ قطعه (لوکوس) DNA به دست آمد که از بین آنها ۱۵۸۲ قطعه در بین تمام اکوتیپ‌ها چندشکل می‌باشند (۷۳/۹۲٪) که این نشان‌دهنده درصد بالای چند شکلی در بین اکوتیپ‌هاست. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف، متفاوت می‌باشد. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده که قدرت وضوح بالاتری هم داشت، ۷۷۶ عدد باند داشته و مربوط به ترکیب آغازگر E+GCC/M+GCG و کمترین آن، ۴۰۳ عدد و مربوط به ترکیب آغازگر E+CGG/M+GGA می‌باشد. علاوه بر آن بیشترین درصد چندشکلی مربوط به ترکیب آغازگر E+GCC/M+GCG بوده است. اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگرها در محدوده ۸۰۰-۳۰۰ جفت باز تخمین زده شد. یکی از پارامترهای مهم در مقایسه و بررسی تنوع ژنتیکی، تنوع ژنی می‌باشد، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، میانگین تنوع ژنی ( $\pm$  انحراف معیار) در بین اکوتیپ‌های گندم سرداری ۰/۲۳±۰/۱۷ می‌باشد و این مقدار در ترکیب پرایمری E-CAC / M-CAT برابر با ۰/۲۸ بوده و بیشتر از دو ترکیب پرایمری دیگر است هم‌چنین شاخص نشانگری که به عنوان یک معیار کارایی نشانگر در تعیین پلی‌مورفیسم استفاده می‌گردد نیز در این ترکیب پرایمری برابر با ۱۹۴/۳۲ و بیشتر از بقیه می‌باشد هم‌چنین میانگین جایگاه‌های پلی‌مورف و درصد آنها به ترتیب برابر با ۱۵۸ و ۰/۵۲/۶ بوده است.

در این پژوهش تعداد کمی از ترکیبات پرایمری (۳ ترکیب) برای بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌ها استفاده شد، اگرچه استفاده از تعداد زیاد پرایمر در افزایش دقت گروه‌بندی ارقام مؤثر است ولی در مواردی که بتوان با تعداد کمی پرایمر تنوع موجود بین ارقام یک گونه گیاهی را تشخیص داد نیازی به استفاده زیادتر از پرایمرها، دیگر نیست. به طور مثال در یک تحقیق تمایز ۱۱

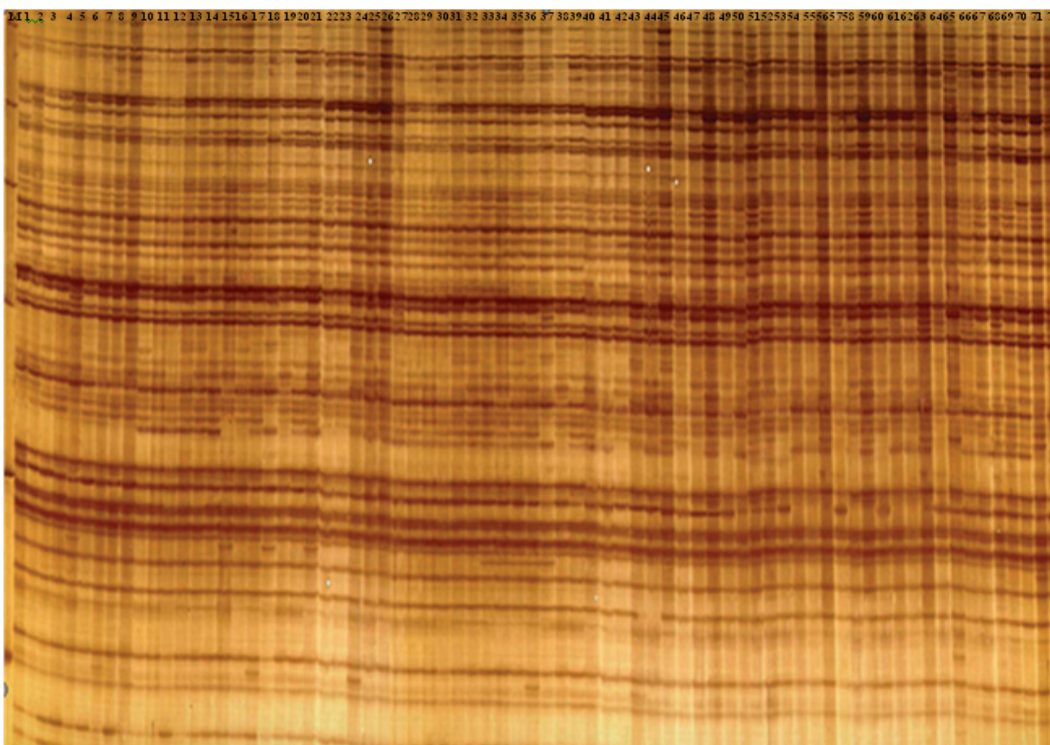
آنها با روش‌های دیگر در همان زمان و با همان مقدار هزینه مشکل و یا غیر ممکن است. و از آن جهت به‌طور گسترده استفاده می‌شود که اطلاعات زیادی را فراهم می‌آورد، تکنیک AFLP به دلیل تکرارپذیری بالا و لوکوس‌های زیادی که در یک زمان کوتاه و در یک آزمون مورد سنجش قرار می‌گیرد، یک تکنیک مفید و قابل اعتماد است چرا که تکرارپذیری یکی از معیارهای مهم برای یک مارکر خوب می‌باشد که می‌توان خوشه‌بندی صحیحی بر اساس داده‌های حاصل از آن برای ارقام متفاوت انجام داد (۲۴ و ۳۰). در تحقیقی که توسط جونز و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که تکنیک AFLP تکرارپذیری بالایی در بین هفت آزمایشگاه اروپایی داشته است، این آزمایش‌ها تنها در یک باند با هم تفاوت داشتند (۱۷). ولی با این وجود نشانگر AFLP به‌عنوان یک نشانگر غالب محسوب می‌شود و در نتیجه نمی‌توان هتروزیگوت‌ها را از هموزیگوت‌ها تشخیص داد، ولی با استفاده از نرم‌افزارهای مخصوص می‌توان هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها را از هم تفکیک کرد (۱۰).

در این مطالعه محاسبه تشابه بین افراد بر اساس نوارهای چندشکل است و نوارهای مونومورف گروه‌بندی را به دلیل این‌که فاقد اطلاعات هستند، تغییر نمی‌دهند و در محاسبه تشابه وارد نمی‌شوند که به دلیل خصوصیات فرمول محاسباتی جاکارد است. به همین دلیل فاصله ژنتیکی را معمولاً بیش از اندازه واقعی آن نشان می‌دهد که به دلیل استفاده از تفاوت‌ها جهت دسته‌بندی است و شباهت‌ها تأثیر چندانی در این دسته‌بندی ندارند. به دلیل دشواری امتیازبندی نوارهای AFLP و تغییرات ناشی از رنگ‌آمیزی ژل با حذف نوارهای بسیار ضعیف و یا نادر و تکرار آزمون می‌تواند از بروز خطا در محاسبه تشابه بین افراد جلوگیری کند که این کار نیز صورت گرفت.

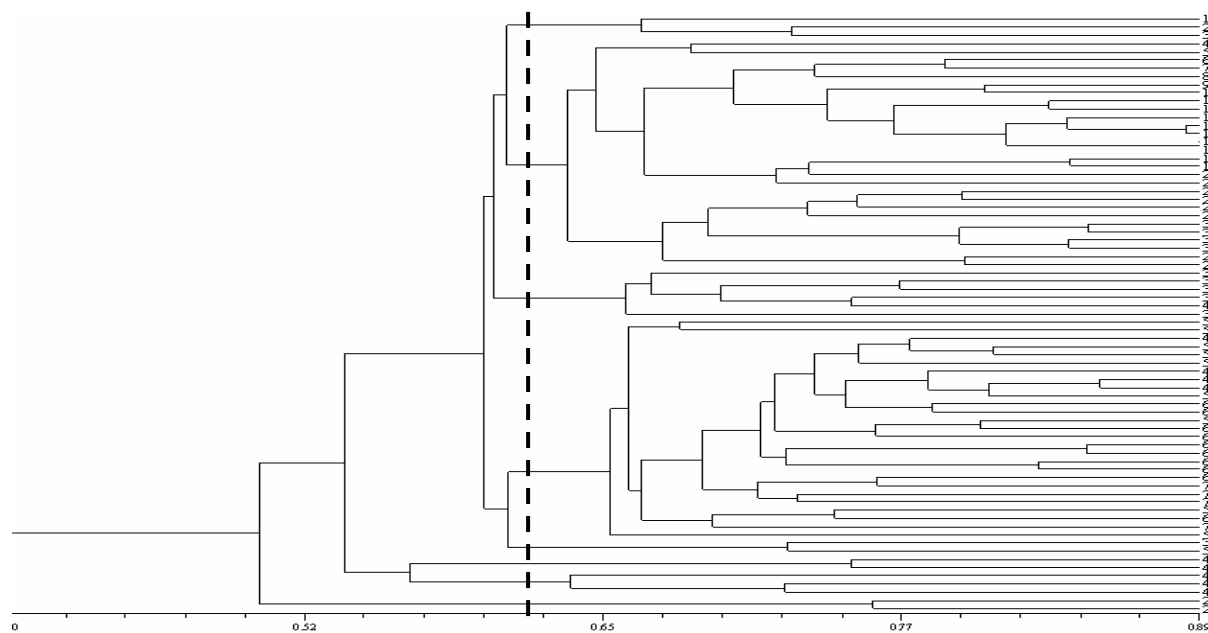
تجزیه خوشه‌ای ارقام بر اساس داده‌های AFLP با استفاده از آزمون مانتل و ضرایب تشابه جاکارد، دایس و نی‌ولی به روش UPGMA مورد مقایسه قرار گرفت، ضریب تشابه

جاکارد با ضریب کوفتتیک ۰/۹۸ نسبت به دو روش دیگر ضریب بالاتری را به خود اختصاص داد، در نتیجه می‌توان نتیجه گرفت که دندروگرام مربوط به ضریب هم‌بستگی جاکارد شباهت افراد را بهتر از بقیه نشان داده است در نتیجه برای ادامه کار جهت گروه‌بندی اکوتیپ‌ها از این ضریب استفاده شد، سپس دندروگرام مربوط به آنها ترسیم شده و مورد مقایسه قرار گرفت. شکل ۴ و ۵ به ترتیب ژل و دندروگرام حاصل را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این دندروگرام مشاهده می‌شود ۷۲ اکوتیپ مورد بررسی در این تحقیق در سطح تشابه ۶۲ درصد به ۸ گروه تقسیم شده‌اند. دامنه تشابه در بین این اکوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر AFLP بر اساس ضریب جاکارد از ۰/۵۰ تا ۰/۸۹ بود. چون تشابه ژنتیکی با فاصله ژنتیکی رابطه معکوس دارد، لذا دو اکوتیپ ۱۶ و ۱۷ که بیشترین تشابه ژنتیکی را نشان دادند دارای کمترین فاصله یا اختلاف ژنتیکی هستند. هم‌چنین دو اکوتیپ ۲۳ و ۲۴ کمترین شباهت را با سایر اکوتیپ‌ها نشان دادند چون در سطح تشابه ۵۰ درصد با سایر گروه‌ها مرتبط می‌شوند. بیشترین درصد اکوتیپ‌ها در کلاستر ۲ (۳۸/۳۵) درصد) و سپس در کلاستر ۴ (۳۶/۹۸ درصد) واقع شدند و کمترین درصد آنها در کلاسترهای ۵، ۶ و ۸ (هر کدام ۲/۷۳ درصد) قرار داشتند.

در این مطالعه تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌منظور بررسی توزیع مناسب ژنومی نشانگرهای AFLP استفاده شده با استفاده از نرم‌افزار SAS ver 8.2 انجام شد. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که بردارهای مشخصه مربوط به ۴۱ ریشه مشخصه بزرگ‌تر از یک مهم‌ترین بردارهای متعامد بودند. این ۴۱ مؤلفه جمعاً ۹۰/۳۸ درصد از کل تنوع ژنتیکی را توجیه نمودند. کل تنوع توسط ۷۲ مؤلفه اول توجیه شد. از این میان دو مؤلفه اول بیشترین واریانس کل (۱۸٪) بین اکوتیپ‌ها را توجیه می‌کنند. در صورتی که نشانگرهای مولکولی از کروموزوم‌های مختلف انتخاب شده باشند هم‌بستگی و پیوستگی بین آنها کم خواهد بود و مؤلفه‌های بیشتری برای توجیه تغییرات کل واریانس داده‌ها لازم است. نتایج تجزیه به



شکل ۴. الگوی نواری آغازگر E-CAC & M-CAT به منظور بررسی نوارهای چندشکل بین اکوتیپ‌های گندم سرداری روی ژل پلی‌اکریل‌آمید توالی‌یاب و با استفاده از نشانگر مولکولی 1kb ladder، در این ژل ۷۲ اکوتیپ به ترتیب شماره از چپ به راست قرار گرفته‌اند.



شکل ۵. دندروگرام حاصل از ترکیب داده‌های سه جفت پرایمر E-CAC / M-CAT، E-GCC / M-GCG و E-CGG / M-GGA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش دسته‌بندی UPGMA. خط‌چین در این نمودار خط برش را در سطح تشابه ۶۲ درصد نشان می‌دهد.

اکوتیپ ۱۶ و ۱۷ بیشترین تشابه ژنتیکی و دو اکوتیپ ۲۳ و ۲۴ کمترین شباهت را با سایر اکوتیپ‌ها نشان دادند. در حالی که بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی صفات کمی در این تحقیق دو اکوتیپ ۶ و ۵۶ بیشترین شباهت و اکوتیپ ۴۳ بیشترین اختلاف را با بقیه اکوتیپ‌های گندم سرداری داشته است. در سایر دسته‌ها نیز هم‌بستگی دیده نشد.

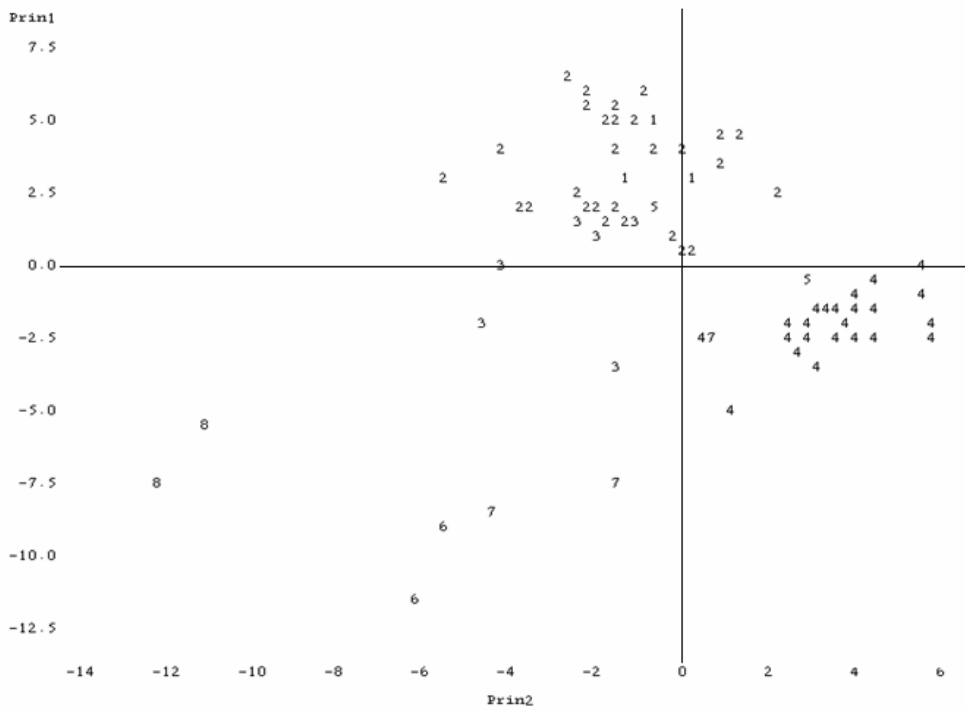
توزیع و فراوانی نشانگرهای AFLP در طول ژنوم یک‌نواخت نیست و همانند سایر غلات انتخاب ترکیب آغازگرها به‌طور مستقیم روی توزیع مکانی نشانگرهای AFLP تأثیر می‌گذارد. دلیل توزیع غیریک‌نواخت این نشانگر به مکانیسم‌های ایجاد چندشکلی در این نشانگر نسبت داده می‌شود، وقایعی مانند موتاسیون (Mutation)، حذف (Deletion) و اضافه شدن (Insertion) قطعات در ایجاد چند شکلی در این نشانگر دخیل هستند (۱۵) اکثر این وقایع به‌طور تصادفی در طول ژنوم به وقوع می‌پیوندند و بنابراین می‌توان انتظار داشت که مکان‌های نشانگر AFLP نیز به‌صورت تصادفی در طول ژنوم قرار گرفته باشند (۱۴). عموماً نشانگرهای AFLP که با ترکیب‌های مختلف آنزیم‌های برشی حاصل شده‌اند توزیع مناسب‌تری در طول ژنوم داشته‌اند. اگرچه تجمع نشانگرها به‌خصوص AFLP در نواحی سانترومری اغلب گزارش شده است (۱۴ و ۳۹). تجمع نشانگرهای AFLP و RFLP در نواحی سانترومری شاید به‌دلیل کاهش یا ممانعت از نوترکیبی در این مناطق باشد (۱۴ و ۲۱) و این عقیده در مورد سایر نقشه‌های ژنتیکی منتشر شده در سایر غلات نیز صادق است (۱۴).

به‌دست آوردن هم‌بستگی ۰/۱۲ میان فواصل ژنتیکی به‌دست آمده توسط نشانگر RAPD و ۱۲ صفت مورفولوژیکی در گندم (۲۵)، و هم‌بستگی ۰/۰۷۲ در مطالعه دیگری روی گندم میان فواصل ژنتیکی به‌دست آمده از نشانگرهای AFLP و ۱۴ صفت مورفولوژیکی (۲۰) و سایر گزارش‌های موجود (۱۸، ۲۶ و ۴۳) مؤید پایین بودن هم‌بستگی میان نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی می‌باشد. توجه به این مسأله مهم است که اگر بین

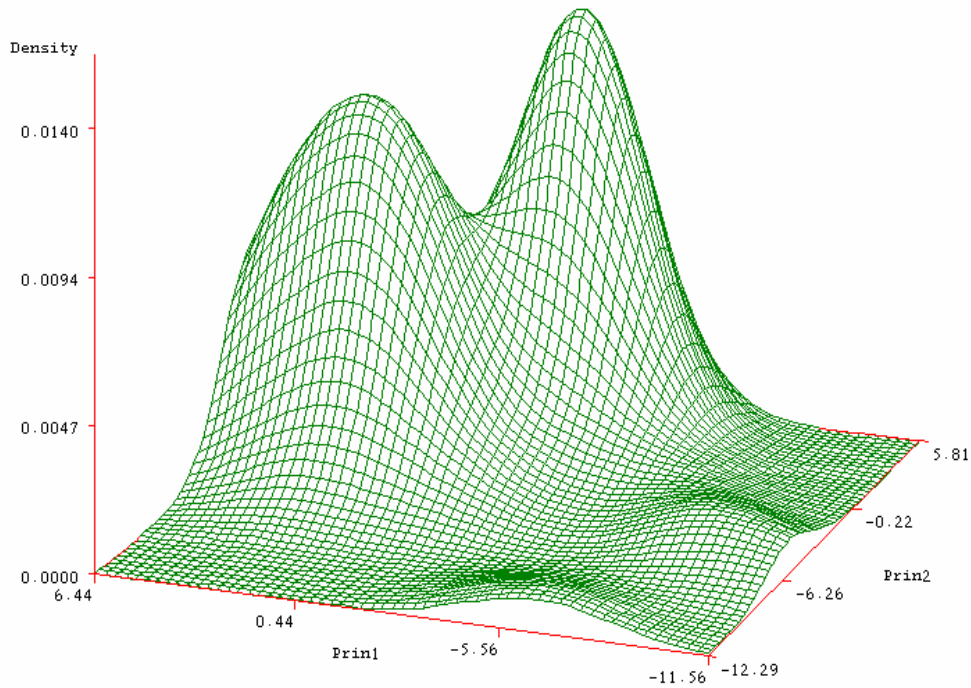
مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ۳ جفت نشانگر AFLP مورد استفاده دارای توزیع مناسب ژنومی بوده است. نمودار پراکنش گروه‌ها بر مبنای مؤلفه اول و دوم و تصویر سه بعدی حاصل از آن به ترتیب در شکل ۶ و ۷ نشان داده شده است. قرار گرفتن اکوتیپ‌های دسته‌بندی شده در هر کلاستر، در کنار هم، نتایج تجزیه کلاستر را تأیید می‌کند.

هم‌چنین تجزیه تابع تشخیص جهت تعیین فاصله بین کلاسترها و میزان خطای گروه‌بندی کلاسترهای به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای، با استفاده از نرم‌افزار SAS Ver 8.2 انجام شد. بر این اساس درصد اشتباه گروه‌بندی برای تمام کلاسترها صفر درصد بوده در نتیجه تمام کلاسترها ۱۰۰ درصد درست گروه‌بندی شده‌اند. هم‌چنین نتایج حاصل از این تجزیه نشان داد که کلاستر پنجم از کلاستر هشتم بیشترین فاصله را داشته (۱/۱۵۸۰) و پس از آن کلاستر اول و کلاستر هشتم بیشترین فاصله را از هم داشته‌اند (۱/۰۵۲۸۷). از آنجائی که هر چه فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها بیشتر باشد می‌توان به هتروزیس بیشتری دست یافت. در نتیجه از طریق تلاقی اکوتیپ‌های کلاستر پنجم و هشتم و یا کلاستر اول و هشتم بیشترین هتروزیس حاصل می‌شود. کلاستر دوم و سوم کمترین فاصله را از هم داشتند (۰/۲۰۰۳۱).

برای تعیین ارتباط بین صفات زراعی و مولکولی آزمون مانتل با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc ver 2/02 انجام شد به این ترتیب که با استفاده از دستور MxComp هم‌بستگی بین ماتریس تشابه داده‌های کیفی و کمی محاسبه شد و میزان هم‌بستگی ۰/۰۲ به‌دست آمد، سپس با استفاده از دستور Consen دو نمودار خوشه‌ای مربوط به داده‌های مولکولی و کمی ترکیب شدند با این هدف که دسته‌بندی اکوتیپ‌ها هم بر اساس داده‌های مولکولی و هم کمی انجام شود ولی از آنجائی که هم‌بستگی بین آنها بسیار پایین و نزدیک به صفر می‌باشد در نتیجه نموداری حاصل نشد. نتایج حاصل از دو نمودار خوشه‌ای نیز هم‌بستگی پایین بین صفات زراعی و مولکولی را تأیید می‌کند. در نمودار خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی دو



شکل ۶. نمودار پراکنش گروه‌ها بر مبنای دو مؤلفه اول و دوم حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر AFLP در اکوتیپ‌های گندم سرداری



شکل ۷. نمودار چگالی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر AFLP در اکوتیپ‌های گندم سرداری

۴ نشانگر AFLP از میان ۴۰ نشانگر پلی مورف مکان یابی شده روی قطعات جابجا شده کروموزوم های گندم کافی است که به طور اشتباهی کلاستر ۱۰۱ لاین خواهری، تنها در حضور قطعات جابجا شده ایجاد شود و با حذف این ۴ نشانگر از آنالیز این کلاستر نیز تفکیک پیدا کرد (۲۶). کوئینر و همکاران اظهار کرده است که فقدان هم بستگی میان تنوع زراعی و مولکولی در گیاهان کشت شده به این دلیل است که ماهیت آنها نامعلوم است و بنابراین یکی از آنها توسط اصلاح کنندگان انتخاب نمی شود در حالی که ممکن است بعدی در معرض انتخاب قرار گیرد (۱۹). به علاوه دونینی و همکاران استدلال کرده است که صفات زراعی بر اساس سودمندی آنها در آزمون وضوح (Distinctness testing) در گندم، انتخاب می شوند در حالی که نشانگرهای مولکولی به این صورت نیستند (۱۲). هر چند مطلوب ترین صفت در اصلاح نباتات نتیجه اثر متقابل میان ژن های بیان شده می باشند، مطالعات زراعی هنوز هم در توصیف ژرم پلاسما ضروری بوده و تعیین تنوع مولکولی نباید به عنوان جایگزین تعیین صفات مرسوم شود بلکه باید مکمل هم باشند. تضاد میان اندازه گیری های تنوع بر اساس صفات زراعی و AFLP استراتژی جدیدی را در جمع آوری و اصلاح ژرم پلاسما خواهان است. اساساً، ژرم پلاسما بر اساس صفات زراعی و مورفولوژیکی به اضافه منشأ جغرافیایی طبقه بندی می شود و اصلاح کنندگان تلاقی هایی را که بر اساس این داده ها باید انجام شوند، تعیین می کنند. با وجود این، عدم هم بستگی معنی دار میان اندازه گیری های تنوع مولکولی و زراعی در این گزارش و سایر گزارش های موجود نشان می دهد که بهره برداری و طبقه بندی ژرم پلاسما نباید بر اساس یک روش اندازه گیری تنوع انجام شود بلکه تعیین گروه های هتروتیک بر اساس داده های چندگانه یعنی مولکولی و مورفولوژیکی باشد.

از تنوع ژنتیکی بالای به دست آمده میان اکوتیپ های بررسی شده در این تحقیق می توان جهت معرفی ژن های جدید در داخل خزانه ژنی گندم نان استفاده کرد. تنوع بالای به دست آمده نشان می دهد که اکوتیپ های گندم در ایران تنوع گسترده ای

دسته بندی حاصل از نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی هماهنگی وجود نداشته باشد، ایرادی به دندروگرام حاصل از آزمایش های مولکولی وارد نمی شود. چرا که صفات کمی از توارث پذیری بسیار پایینی برخوردار هستند و محصول اثر کل ژنوم به همراه تأثیر محیط می باشند در حالی که در نشانگرهای مولکولی مانند AFLP، به دلیل ماهیت تصادفی بودن و کاربرد تعداد محدود آغازگر، احتمال ارزیابی بخش بسیار کوچکی از ژنوم گیاه وجود دارد که احتمال این که ژن های مورد نظر ما را پوشش دهد بسیار کم است. هم چنین امکان دارد بخشی از ژنوم که توسط آغازگرهای AFLP تکثیر می گردد، حاوی ژن های کد کننده صفات مورفولوژیک نباشد (۳۸). سمگان دو دلیل را برای هم بستگی پایین میان نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی بیان کرده است: نشانگرهای مولکولی نسبت به صفات زراعی درصد بیشتری از ژنوم از جمله نواحی کد کننده و غیر کد کننده را پوشش می دهند و دلیل دیگر این که نشانگرهای مولکولی در مقایسه با صفات مورفولوژیکی در معرض انتخاب مصنوعی قرار نمی گیرند (۳۶). در مطالعه ای در گندم مشخص شده است که توزیع نشانگرهای AFLP در این گیاه در نزدیک نواحی ساترومری متمرکز می باشد (۳۸). این موضوع هم می تواند دلیلی برای عدم تطابق داده های مولکولی و مورفولوژیک اکوتیپ های مختلف سرداری باشد. نتایج به دست آمده در تحقیق ما نشان می دهد که برای درک کامل تری از درجه اختلافات ژنوتیپی لازم است که داده های مورفولوژیکی و مولکولی به طور هم زمان بررسی شوند. فرانکو و همکاران پیشنهاد کرده اند که تمایز ژنوتیپی بهتر به وسیله ترکیبی از داده های مورفولوژیکی و مولکولی به دست آمده است (۱۴). هر چند وارپورتون و همکاران به این مسأله اشاره کرده اند که این مسأله ممکن است منجر به اشتباه شود زیرا حضور قطعات جابجا شده روی کروموزوم اکوتیپ های مطالعه شده می تواند منجر به فواصل ژنتیکی خارج از حد خود شود، خصوصاً زمانی که اطلاعاتی درباره حضور یا عدم حضور قطعات جابجا شده وجود نداشته باشد (۴۲). آنها هم چنین نشان دادند که تنها



گزارشی توسط مدلانگ و کومال ارائه شده است (۲۳). اگر فرض شود که گندم سرداری یک رقم باشد زمانی که توده‌های مختلف آن از لحاظ ژنتیکی مورد بررسی قرار می‌گیرند باید شباهت زیادی میان آنها مشاهده شود اما نتایج به‌دست آمده از درصد پلی‌مورفیسم در این تحقیق نشان‌دهنده تنوع بسیار زیاد میان توده‌های مورد بررسی می‌باشد برخلاف نظراتی که درباره این مجموعه از توده‌ها وجود دارد نمی‌توان سرداری را یک رقم دانست. لذا می‌توان نتیجه گرفت که سرداری یک توده از اکوتیپ‌ها می‌باشد که با شرایط جغرافیایی مناطق مختلف کشور سازگار شده است.

بر اساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق توصیه می‌شود که در بررسی‌های آینده با مطالعه بر این توده از اکوتیپ‌ها چه از لحاظ ژنتیکی با شناسایی ژن‌های مقاوم در آن و چه از لحاظ مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی اکوتیپ‌های برتر شناسایی شده و معرفی شوند تا در آینده بتوان اکوتیپ‌های برتر را جایگزین این توده از اکوتیپ‌ها کرد و بتوان از این محصول باارزش و مهم که توانسته است ۹۵٪ از سطح زیر کشت گندم دیم استان کردستان و ۶۵٪ تولید کل گندم استان را تأمین کند به شیوه بهتر و مؤثرتری بهره جست.

دارند، به‌طوری‌که از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری شده‌اند، احتمالاً شرایط محیطی در مناطق مختلف کشور نیز می‌تواند به ایجاد چنین تنوعی در بین اکوتیپ‌ها کمک بزرگی نماید در این میان مبادله بین مزارع و مراحل توسعه‌ای ارقام نو ترکیب جدید می‌تواند در ایجاد تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها نقش مهمی را ایفا نماید. احتمالاً انتخاب اعمال شده توسط کشاورزان، عمدتاً سبب انتخاب بخش بزرگی از ژنوم گیاه شده است و یا ممکن است که بر اثر تغییر ژنتیکی کوچک در ژنوم، گیاه دارای صفت مطلوبی شده باشد و به ایجاد تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها کمک نموده است. از طرفی تنوع ژنتیکی بالا در اکوتیپ‌های گندم سرداری منعکس کننده طولانی بودن تاریخ کشت این گیاه است که در طی آن موتاسیون و هیبریداسیون‌های طبیعی اختلاف‌هایی را در این سلسله گیاهی ایجاد کرده است. با وجود این‌که در طی سه دهه اخیر گندم سرداری توسط اصلاح‌کنندگان بذور دیم به‌عنوان یک رقم خالص معرفی شده است، اما نتایج به‌دست آمده از میزان تنوع در گزارش پیرسید و همکاران، و آنچه که در گزارشات ما ارائه شد تنوع بالا را میان اکوتیپ‌های گندم سرداری ثابت می‌کند که ممکن است در نتیجه شرایط تنش‌زای محیطی باشد که این اکوتیپ‌ها در آنجا کشت شده‌اند. اثرات گسترده تنش روی ساختار ژنومی به‌طور مفصل در

## منابع مورد استفاده

۱. ارزانی، ا. ۱۳۷۸. اصلاح گیاهان زراعی (ترجمه). انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان.
۲. خدابنده، ن. ۱۳۷۱. غلات. انتشارات دانشگاه تهران.
۳. سعیدی، ع. ۱۳۷۸. استراتژی و کاربرد روش‌های به‌نژادی گندم در بخش تحقیقات غلات، گذشته، حال و آینده. مقالات کلیدی پنجمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. نشر آموزش کشاورزی، کرج.
۴. صادق‌زاده اهری، د.، ح. کتاتا و م. روستایی. ۱۳۸۳. ارزیابی تنوع ژنتیکی صفات و خصوصیات زراعی در گندم سرداری. مجله علوم کشاورزی، ۲۷:۲.
۵. قره‌یاضی، ب. ۱۳۷۱. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.
۶. کریمی، ه. ۱۳۷۱. گندم. مرکز نشر دانشگاهی تهران.
7. Almanza-Pinzón, M. I., M. Hairallah, P. N. Fox and M. L. Walburton. 2003. Comparison of molecular markers and coefficients of parentage for the analysis of genetic diversity among spring bread wheat accessions. Euphytica

- 130:77-86.
8. Banisadr, N. and M. Tahir. 1991. Heat and cold tolerance in *Triticum aestivum* L. and *T. turgidum* Var. Durum from Iran. 8th wheat genetic symposium. Beijing, China.
  9. Blum, A. and A. Ebercon. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.* 21: 43-47.
  10. Breyne, P., W. Boerjan, T. Gerates, M. Van Monague and A. Van Gysel. 1997. Applications of AFLP in plant breeding, molecular biology and genetics. *Belgian J. Bot.* 129: 107-117.
  11. Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 4:19- 21.
  12. Donini, P., J. R. Law, R. M. D. Koebner and J. C. Reeves, 2000. Temporal trends in the diversity of UK wheat. *Theoret. and Appl. Genet.* 100: 912-917.
  13. Ellis, R. P., J. W. McNicol, E. Baird, A. Booth and P. Lawrence. 1997. The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. *Mol. Breed.* 3:359-369.
  14. Franco, J; J. Crossa, J.M. Ribaut, J. Bertran, M.L. Warburton and M. Khairallah. 2001. A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. *Theor. and App. Genet.* 103:944-952.
  15. Greg, A. P. 1998. An AFLP based genome map of wheat (*Triticum aestivum*). Plant and Animal Genome VI Conference. San Diego., CA.
  16. Jaap Buntjer. 1999. Cross Cheker Software to Analyze AFLP Data. Ver 2.91. Wageningen Uni, The Netherlands.
  17. Jones, C. J., K. J. Edwards, S. Castaglione, M. O. Winfield, F. Sala, C. Van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez and A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3:381-390.
  18. Kjar, A., S.A. Barfod, C.B. Asmussen and O. Seberg. 2004. Investigation of genetic and morphological variation in the Sago plum (*metroxylon sagu*, *Arecaceae*) in Papua New Guinea. *Ann. Bot.* 94: 109-117.
  19. Koebner, R.M.D., P. Donini, J. Reeves, R.J. Cooke and J.R. Law. 2002. Temporal flux in the morphological and molecular diversity of UK barley. *Theor. and Appl. Genet.* 106: 550-558.
  20. Lage, J; M.L. Warburton, J. Crossa, B. Skovmand and S.B. Andersen. 2003. Assessment of genetic diversity in synthetic hexaploid wheats and their *Triticum dicoccum* and *Aegilops tauschii* parents using AFLPs and agronomic traits. *Euphytica* 134: 305-317.
  21. Langridge, P., E.S. Lagudah, T.A. Holton, R. Apples, P.J. Sharp and K. Chalmers. 2001. Trends in genetic and genome analysis of wheat: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 52:1043-1077.
  22. Li, M. and D.J. Midmore. 1999. Estimating the genetic relationship of chinese water chestnut (*Eleocharie dulcis*) cultivated in australia, using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *J. Hort. Sci. and Biotechnol.* 74: 224-231.
  23. Madlung, A. and L. Comal. 2004. The effect of stress on genome regulation and structure. *Ann. Bot.*, 94: 481-495.
  24. Mace, E. S., C. G. Gebhardt and R N. Lester. 1999. AFLP analysis of genetic relationships in the tribe Datureae (solanaceae). *Theoretical and Appl. Genet.* 99:634-641.
  25. Mária, S., S. Larić, J. Artincic, I. Pejic and V. Kozumplick. 2004. Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage. *Plant Breed.* 123:366-369.
  26. Martinez, L; P. cavagnaro and R. Masuelli. 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electronic J. Biotechnol.* 6: 0717-3458.
  27. Masoum Akond, A.S.M.G. and N. Watanabe. 2005. Genetic variation among Portuguese landraces of 'Arrancada' wheat and *Triticum petropavlovskyi* by AFLP-based assessment. *Genetic Resour. and Crop Evol.* 52: 619-628.
  28. Pejic, I., P. Ajmone-Marsan, M. Morganet, V. Kozumplick, P. Castiglioni, G. Taramino and M. Motto. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLP, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoret. and Appl. Genet.* 97: 1248-1255.
  29. Pirseyedi, S.M; M. Mardi, M.R. Naghavi, H.P. Iran Doost, D. Sadeghzadeh, S.A. Mohammadi and B. Ghareyazie. 2006. Evaluation of genetic diversity and Identification of informative markers for morphological characters in Sardari derivative wheat lines. *Pakistan J. Biol. Sci.* 9: 2411-2418.
  30. Plaschke, J., M. W. Ganal and M. S. Röder. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoret. and Appl. Genet.* 91: 1001-1007.
  31. Rohlf, F.J. 1998. NTSYS- pc ver 2.02. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Exeter Software, setauket, New York.
  32. Roy, J.K., M.S. Lakshmikumaran, H.S. Balyan and P.K. Gupta. 2004. AFLP-based genetic diversity and its comparison with diversity based on SSR, SAMPL, and phenotypic traits in bread wheat. *Biochem. Genet.*

- 42(1,2): 43-59.
33. Sambrook, J., B. F. Fritscl and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York.
  34. SAS institute. 2002. SAS User Guide Statics. Version 8.2 ed. SAS institute Inc., Cary, N. C.
  35. Sasanuma, T., K. Chabane, T. R. Endo and J. Valkoun. 2002. Genetic diversity of wheat wild relatives in the Near East detected by AFLP. *Euphytica* 127: 81-93.
  36. Semgan, K. 2002. Genetic relationships among ten endod types as revealed by a combination of morphological, RAPD and AFLP markers. *Heretidas* 137: 149-156.
  37. Singh, M., J.P. Srivastava and A. Kumar. 1992. Cell membrane stability in relation to drought tolerance in wheat genotypes. *J. Agron. and Crop Sci.* 168: 186-190.
  38. Soleimani, V.D., B.R. Baum and D.A. Jonson. 2002. AFLP and pedigree- based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp durum (Desf.) Husn.]. *Theoret. and Appl. Genet.* 104: 350-357.
  39. Staub, J. E. and C. Serquen. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort. Sci.* 31:729-740.
  40. Vieira, E.A; F.I.F. de. Carvalho, I. Bertan, M.M. Kopp, P.D. Zimmer, G. Benin, J.A.G. de. Silva, I. Hartwig, G. Malone and A.C. de. Oliveira. 2007. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. *Genetics and Mol. Biol.* 30: 392-399.
  41. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, D. L. Theovan, M. Hornes, A. Frijers, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 23: 4407-4414.
  42. Warburton, ML., B. Skovmand and Mujeeb-Kazi. 2002. The molecular genetic characterization of the 'Bobwhite' bread wheat family using AFLPs and the effect of the T1BL.1RS translocation. *Theoret. and Appl. Genet.* 104: 868-873.
  43. Wollmann, J; H. Grausgruber, G. Stift, V. Dryzhyruk and T. Lelley. 2005. Genetic diversity in camelina germplasm as revealed by seed quality characteristics and RAPD polymorphism. *Plant Breed.* 124: 446-453.
  44. Yeh, F.C., R. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE: Microsoft Windows Based Freeware for Population Genetic Analysis. Version 1.31. University of Alberta, Edmonton.