

الگوی توزیع و چندشکلی ادغامی رتروترانسپوزون‌ها در جمعیت‌های *Linum austriacum* L.

Distribution Pattern and Insertional Polymorphism of Retrotransposons in *Linum austriacum* L. Populations

حسین عباسی هولاسو^۱، بابک عبدالهی مندولکانی^{۲*}، مراد جعفری^۳ و ایرج برنوسی^۴

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۲/۰۸

چکیده

رتروترانسپوزون‌ها عناصر رایج در ژنوم گیاهان می‌باشند که فراوانی، فعالیت و توزیع یکنواخت آنها در ژنوم، استفاده از آنها را به عنوان نشانگرهای مولکولی ایده‌آل می‌سازد. به منظور مطالعه فعالیت، الگوی توزیع و چندشکلی ادغامی برخی رتروترانسپوزون‌های LTR (Long terminal repeat) در گیاه *Linum austriacum* L. از نشانگرهای IRAP (Inter-retrotransposon amplified polymorphism) و REMAP (Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) استفاده شد. نتایج نشان داد که رتروترانسپوزون‌های LTR مورد استفاده به لحاظ انتقالی در ژنوم *L. austriacum* فعال بوده و در داخل یکدیگر به حالت آشیانه‌ای و همچنین در نواحی نزدیک ریزماهواره‌ها ادغام می‌شوند. از ۵۸ آغازگر منفرد و ترکیب آغازگری بررسی شده، ۲۰ آغازگر (۷ آغازگر IRAP و ۱۳ آغازگر REMAP) الگوی بانندی واضح و قابل امتیازدهی تولید نمودند. در مجموع ۱۹۹ مکان توسط ۲۰ آغازگر تکثیر شد که از این تعداد ۱۲۹ مکان (۶۴/۸ درصد) چندشکل بودند. آغازگرهای LTR1868 و LTR1854-A13 به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد مکان چندشکل را تولید نمودند. براساس آزمون مانتل همبستگی بین ماتریس‌های کوفنتیک IRAP و REMAP معنی‌دار نبود. تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های حاصل از ترکیب دو نشانگر (IRAP+REMAP) به روش Minimum evolution بر پایه ضریب Number of differences، ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه منتسب کرد. افراد مربوط به هر جمعیت در گروه‌های مشابه قرار گرفت. براساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان اظهار داشت که نشانگرهای IRAP و REMAP توسعه یافته براساس رتروترانسپوزون‌های فعال در جنس *Linum* می‌توانند به عنوان ابزار نسبتاً جدیدی در برنامه‌های اصلاحی گونه‌های مختلف این جنس مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: رتروترانسپوزون، *Linum austriacum*، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای IRAP و REMAP

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۲، ۳ و ۴. دانشیاران گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir

*: نویسنده مسوول

مقدمه

بشر از گذشته‌های دور گیاهان دارویی را به‌عنوان موهبت‌های طبیعی دانسته و به‌عنوان ابزاری مؤثر در پزشکی استفاده کرده است. با گذشت زمان و مشخص شدن عوارض و اثرات سوء داروهای شیمیایی، توجه زیادی به‌سوی طبیعت و استفاده از گیاهان دارویی جلب شد /مید بیگی (Omidbaig, 2000). گیاهان دارویی و معطر در مقایسه با سایر گیاهان زراعی، اراضی کمی را به خود اختصاص می‌دهند. با این وجود، این گیاهان تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی را شامل می‌شوند که دارای بیشترین تنوع در صفات و خصوصیات بیولوژیکی می‌باشند. البته با وجود تنوع کافی، اصلاح گیاهان دارویی نسبت به گیاهان زراعی با روند کندتری صورت گرفته است. اما به-نژادگران سعی نمودند تا با بهره‌برداری از تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان دارویی، میانگین تولید و پایداری اکولوژیکی را در این گیاهان بهبود بخشند پنک (Pank, 2006).

جنس کتان دارای حدود ۲۳۰ گونه است که ۱۶ گونه آن در ایران یافت می‌شوند، رچینگر (Rechinger, 1974) که دانه‌های بسیاری از آنها از جمله *Linum austriacum* L. منابع غنی از اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶ هستند رنی و دیدریچسن (Raney and Diederichsen, 2002). در اکثر فارماکوپه‌های معتبر از کتان به‌عنوان یک گیاه دارویی یاد شده است و خواص درمانی آن مورد بررسی قرار گرفته است. *L. austriacum* یکی از گونه‌های وحشی جنس کتان با $2n=18$ کروموزوم دیدریچسن و فو (Diederichsen and Fu, 2008) و چند ساله برافراشته به ارتفاع ۲۰ تا ۶۰ سانتی‌متر می‌باشد. منشأ کتان نامعلوم می‌باشد. بعضی از محققین *L. bienne* حاوی دانه‌های کوچک را به‌عنوان جد کتان در نظر می‌گیرند. این گونه از کردستان ایران منشأ گرفته است. بعضی دیگر از محققین *L. angustifolium* حاوی روغن بالا و وزن دانه بیشتر را به‌عنوان جد کتان در نظر گرفته‌اند که از نواحی مدیترانه منشأ گرفته است مور (Murre, 1955). اخیراً مطالعه با نشانگرهای مولکولی نشان داد که این سه گونه از یک جد مشترک منشأ گرفته‌اند و *L. angustifolium* قدیمی‌ترین جد می‌باشد مور/ونکو و همکاران (Muravenko et al., 2003).

جمع‌آوری ژرم‌پلاسما اولین مرحله در اصلاح گیاهان می‌باشد. موفقیت اصلاح‌گر در برنامه‌های اصلاحی به انتخاب مواد ژنتیکی مناسب و تنوع کافی در آنها بستگی دارد لی و همکاران (Li et al., 2006). کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر در برنامه‌های اصلاحی، امکان سازماندهی ذخایر توارثی و نمونه-

گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها و بهره‌برداری بهتر از تنوع در برنامه-های اصلاحی را فراهم می‌سازد شارما و همکاران (Sharma et al., 2002). به همین منظور از نشانگرهای مختلفی مانند نشانگرهای مورفولوژیکی، سیتوژنتیکی و نشانگرهای DNA استفاده می‌شود. نشانگرهای مبتنی بر DNA با ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و با حذف اثرات ناشی از عوامل محیطی، توانسته است بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی را برطرف نماید شکرپور و همکاران (Shokrpour et al., 2008). همچنین با استفاده از نشانگرهای DNA امکان شناسایی و جداسازی ژن‌های مسؤل در مراحل مختلف چرخه‌های متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی وجود دارد کومار و کومار گوپتا (Kumar and Kumar Gupta, 2008). در کتان از نشانگرهای مولکولی مختلفی مانند RAPD فو (Fu, 2005)، AFLP وان ترورن و همکاران (Van Treuren et al., 2001) و ISSR یوژوال و همکاران؛ شیدایی و همکاران (Uysal et al., 2010; Sheidai et al., 2014) و همکاران (Smykal et al., 2011) و SSAP ملنیکو و همکاران (Melnikova et al., 2014) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده شده است. ولی استفاده از نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها در این گیاه بسیار محدود بوده است. رتروترنسپوزون‌ها عناصر اصلی متحرک در ژنوم گیاهان هستند و از طریق یک RNA حدواسط در ژنوم جابه‌جا می‌شوند فلاول و همکاران (Flavell et al., 1992). این عناصر ژنتیکی متحرک هم در نواحی هتروکروماتینی و هم در نواحی یوکروماتینی جابه‌جا شده و با ادغام متفاوت در نواحی مختلف باعث ایجاد چندشکلی و تنوع در ژنوم‌های گیاهی می‌شوند و می‌توانند به‌عنوان یک منبع ژنومی عالی جهت توسعه نشانگرهای مولکولی چندشکل مطرح باشند کلندر و همکاران؛ شولمن و همکاران (Kalendar et al., 1999; Schulman et al., 2004). در ذرت ۵۰-۸۰ درصد فلاول (1986) و در سورگوم و کتان حدود ۵۵ درصد ژنوم از رتروترنسپوزون‌های مختلف تشکیل شده است پاترسون و همکاران (Paterson et al., 2009). اخیراً نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها مانند SSAP واف و همکاران (Waugh et al., 1997)، IRAP و REMAP کلندر و همکاران (1999) و RBIP فلاول و همکاران (1998) به‌طور گسترده‌ای در مطالعه تنوع ژنتیکی گیاهان مختلفی از قبیل جو کلندر و همکاران (1999)، گندم کاروالو و همکاران؛ نصری و همکاران (Carvalho et al., 2010; Nasri et al., 2013)، خانواده مرکبات بیسواس و همکاران (Biswas et al., 2010) و یونجه عبدالهی مندولکانی و همکاران

آزمایشگاه ژنومیکس دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انتقال یافتند. شناسایی نمونه‌ها با استفاده از فلور ایرانیکا رچینگر (1982) در هرباریوم انجام و مشخص شد که همه ژنوتیپ‌ها متعلق به گونه *L. austriacum* می‌باشند. ابتدا برای از بین بردن موسیلاژ بذور، آنها را به مدت پنج الی ده دقیقه در اسیدسولفوریک ۱۰٪ تیمار کرده و سپس بذرها را به خوبی در آب شستشو داده تا آثار اسید سولفوریک زدوده شود. برای جوانه‌زنی بهتر این گونه، بذور به مدت دو هفته با اسید جیبرلیک در داخل یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، سپس بذور در ظروف پتری جوانه‌دار شده و به گلدان منتقل شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها در داخل گلخانه از هر جمعیت ۱۰ نمونه به‌طور تصادفی انتخاب و از برگ‌های سالم و سبز هر گیاه برای استخراج DNA به روش CTAB/سیبیل و همکاران (Ausubel et al., 2010) استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتری ارزیابی شد. DNAهای ژنومی با کیفیت مطلوب برای انجام واکنش‌های PCR در غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. پس از رقیق‌سازی DNA، ۴ توالی رتروترانسپوزونی/اسمایکل و همکاران (2011) و ۸ آغازگر ISSR (جدول ۲) جهت توسعه نشانگرهای IRAP و REMAP مورد استفاده قرار گرفت.

(Abdollahi Mandoulakani et al., 2012) استفاده شده است. اسمایکل و همکاران (2011)، دو گروه از رتروترانسپوزون‌های LTR ژنوم کتان زراعی (*L. usitatisimum*) را جداسازی و توالی‌یابی نموده و سپس آغازگرهایی را جهت توسعه نشانگرهای IRAP به‌منظور بررسی تنوع بین و درون‌گونه‌ای در ۱۰ گونه کتان و مقایسه کتان فیبری و روغنی طراحی نمودند و گزارش کردند که این نشانگرها کارایی مؤثری در مطالعه فعالیت رتروترانسپوزون‌ها و تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف جنس *Linum* دارند. تاکنون الگوی توزیع، فعالیت و چندشکلی ادغامی رتروترانسپوزون‌ها در گونه‌های وحشی و زراعی جنس *Linum* در ایران از جمله *L. austriacum* مطالعه نشده است. بنابراین هدف از این تحقیق بررسی تحرک و چندشکلی برخی رتروترانسپوزون‌های LTR در ژنوم *L. austriacum* و ارزیابی امکان استفاده از این رتروترانسپوزون‌ها به‌عنوان نشانگرهای مولکولی IRAP و REMAP در گونه مذکور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی شامل ۳۰ ژنوتیپ از سه جمعیت گونه وحشی *L. austriacum* می‌باشد که از نقاط مختلف استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شد (شکل ۱ و جدول ۱). از هر رویشگاه ده نمونه گیاهی در فصل گلدهی و بعد از گلدهی انتخاب و پس از تهیه نمونه‌های هرباریومی از کل گیاه به

جدول ۱: محل جمع‌آوری جمعیت‌های مورد استفاده در این مطالعه

Table 1: The origins of the populations used in the current study

ارتفاع از سطح دریا Altitude	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	محل جمع‌آوری Origin	کد جمعیت Population code
1332	45.04	37.52	ارومیه-سرو	Urmia-Sero
1360	42.10	36.55	ارومیه-سیلوانا	Urmia-Silvana
1180	44.97	38.42	خوی	Khoy

پلیمرز شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه، سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بود و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. تفکیک محصولات تکثیر با استفاده از ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر TBE نیم برابر با ولتاژ ۸۰ انجام شد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

واکنش‌های PCR

چهار آغازگر منفرد و شش ترکیب آغازگری IRAP و ۴۸ ترکیب آغازگری REMAP برای مطالعه الگوی توزیع، فعالیت و چندشکلی ادغامی رتروترانسپوزون‌های LTR در ۳۰ ژنوتیپ از سه جمعیت *L. austriacum* استفاده شد. واکنش‌های PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۴۵ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR یک برابر (۱۰ میلی‌مول Tris-HCL، ۵۰ میلی‌مول KCL، pH=۸/۳، ۱/۵ میلی‌مول MgCl₂، ۰/۲ میکرومول از هر dNTP، ۰/۵ واحد Taq DNA پلیمرز (شرکت سیناژن) و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر در دستگاه ترموسایکلر Bio-RAD (شرکت BioRAD آمریکا) انجام شد. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای

تجزیه‌های آماری

امتیازدهی باندها براساس وجود (۱) و عدم وجود باند (۰) انجام گرفت. ماتریس تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها برای نشانگرهای IRAP، REMAP، IRAP+REMAP براساس ضریب تشابه دایس تشکیل شد. تجزیه کلاستر به روش Minium evolution بر پایه ضریب Number of differences با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 تامورا و همکاران (Tamura et al., 2007) انجام گرفت. جهت تعیین همبستگی بین ماتریس کوفنتیک حاصل از داده‌های IRAP، REMAP و IRAP+REMAP از آزمون مانتل با ۱۰۰۰ جایگشت در نرم‌افزار NTSYS نسخه ۲/۱ راف (Rohlf, 2000) استفاده شد. پارامترهای مقادیر متوسط هتروزیگوسیتی (He)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، ضریب شانن (I)، میزان تمایز ژنتیکی (PhiPT)، میزان مهاجرت بین جمعیت‌ها (Nm) و درصد چندشکلی و همچنین خصوصیات مکان‌های تکثیری برای آغازگرها و جمعیت‌های مورد مطالعه براساس نشانگرهای IRAP، REMAP و IRAP+REMAP با استفاده از نرم‌افزار GenAlix نسخه ۶/۴ پیکال و اسموس (Peakall and Smouse, 2006) برآورد شد. به‌منظور تفکیک تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، و همچنین برای تعیین فاصله ژنتیکی بین هر جفت از جمعیت‌های مورد

مطالعه ماتریس فاصله ژنتیکی Nei با استفاده از این نرم‌افزار برای نشانگرهای IRAP، REMAP و ترکیب آنها انجام گرفت.

نتایج

نشانگرهای IRAP و الگوی توزیع خانواده‌های

رتروترنسپوزونی در ژنوم *L. austriacum*

چهار آغازگر منفرد و شش ترکیب آغازگری IRAP برای بررسی الگوی توزیع رتروترنسپوزون‌ها و تنوع ژنتیکی در سه جمعیت گونه *L. austriacum* مورد استفاده قرار گرفت. از این تعداد، ۷ آغازگر الگوی نواری واضح و قابل امتیازدهی تولید کردند. همه-ی آغازگرهای منفرد IRAP، الگوی نواری چندشکل و قابل امتیازدهی تولید کردند (جدول ۳ و شکل ۲). در کل ۷ آغازگر، ۸۶ مکان تکثیر کردند که از این تعداد، ۷۰ مکان چندشکل بودند. آغازگر منفرد LTR1868 بیشترین تعداد مکان (۱۴) و مکان‌های چندشکل (۱۴) و ترکیب آغازگری LTR1833- LTR1868 کمترین تعداد مکان (۸) و همچنین کمترین تعداد مکان چندشکل (۶) را تولید نمود. دامنه باندهای تولید شده از ۷۵ تا ۳۰۰ جفت باز متغیر بود. بیشترین میزان میانگین هتروزیگوسیتی (۰/۲۱)، تعداد آلل‌های مؤثر (۱/۳۷) و شاخص شانن (۰/۳۲) توسط آغازگر LTR1854 تولید شد (جدول ۳).

جدول ۲: توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 2: Sequence of the primers used in the current study

توالی (5'-3')	آغازگر	توالی (5'-3')	آغازگر
Sequence 5'-3'	Primer	Sequence 5'-3'	Primer
ACACACACACACACACT	UBC443	CTTGCTGGAAGTGTGTGAGAGG	LTR1833
CTCTCTCTCTCTCTT	UBC815	GCATCAGCCTGGACCAGTCTCGTCC	LTR1854
ACACACACACACACACT	UBC825	CACTTCAAATTTGGCAGCAGCGGATC	LTR1868
ACACACACACACACACC	UBC826	ATTCTCGTCCGCTGCGCCCCTACA	LTR1886
CACACACACACACARG	UBC848	GTGTGTGTGTGTCC	A13
ACACACACACACACACYG	UBC855	GAGAGAGAGAGACC	UBC425

R: پورین (A/G)، Y: پیریمیدین (C/T)

R: purine (A/G), Y: pyrimidine (C/T)

جدول ۳: آغازگرهای IRAP مورد استفاده و خصوصیات آنها در جمعیت‌های *Linum austriacum*

Table 3: IRAP primers used and their properties in *Linum austriacum* populations

اندازه باندها (جفت باز) Band size (bp)	ضریب شانن Shannon's information index	تعداد آلل‌های موثر Number of effective alleles	میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار Mean of expected heterozygosity	درصد چندشکلی Percentage of Polymorphism	مکان‌های چندشکل Polymorphic loci	تعداد کل مکان Total loci	آغازگر Primer
100-2000	0.21	1.23	0.14	77	10	13	LTR1833
300-2000	0.32	1.37	0.21	71	10	14	LTR1854
75-2000	0.20	1.19	0.12	100	14	14	LTR1868
300-3000	0.27	1.34	0.19	69	9	13	LTR1886
75-1000	0.21	1.24	0.14	75	6	8	LTR1833-LTR1868
75-1500	0.25	1.29	0.17	77	10	13	LTR1854-LTR1868
200-3000	0.23	1.21	0.14	100	11	11	LTR1868-LTR1886
		1.27	0.16	81.3	10	12.29	میانگین Mean

حداقل میزان مهاجرت ($Nm=1/1$) بین جمعیت‌های ارومیه-سیلوانا و ارومیه-سرو و حداکثر آن ($Nm=1/63$) بین جمعیت‌های ارومیه-سرو و خوی بود. حداقل فاصله ژنتیکی نی ($0/05$) بین جمعیت‌های ارومیه-سیلوانا و خوی، و حداکثر فاصله ژنتیکی ($0/08$) بین جمعیت‌های ارومیه-سرو و ارومیه-سیلوانا به دست آمد (جدول ۷). میانگین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها برابر با $0/06$ بود. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به روش Minimum evolution و ضریب فاصله Number of differences براساس نشانگرهای IRAP افراد مورد مطالعه را در چهار خوشه اصلی گروه‌بندی نمود (شکل ۳).

درصد مکان‌های چندشکل در جمعیت‌ها براساس نشانگرهای IRAP از ۵۰ (خوی) تا ۵۳/۴۹ (ارومیه-سرو) با میانگین ۵۱/۵۵ متغیر بود. فراوانی تمام مکان‌های تکثیری بیش از ۵ درصد بود. اکثر باندهای تکثیر شده در بین جمعیت‌ها مشترک بودند. باند اختصاصی جمعیت نیز در جمعیت‌های ارومیه-سرو و خوی با استفاده از آغازگرهای LTR1854، LTR1868 و LTR1886 تولید شد. میانگین هتروزایگوتی جمعیت‌ها از $0/15$ (جمعیت ارومیه-سیلوانا) تا $0/17$ (جمعیت خوی) متغیر و میانگین آن $0/16$ بود (جدول ۴). میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۸۵ درصد) براساس نشانگرهای IRAP بیشتر از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها (۱۵ درصد) بود.

جدول ۴: ویژگی مکان‌های IRAP تکثیر شده در جمعیت‌های *Linum austriacum*

Table 4: Characteristics of amplified IRAP loci in *Linum austriacum* populations

خوی Khoy	ارومیه-سیلوانا Urmia-silvana	ارومیه-سرو Urmia-sero	جمعیت Population
81	78	80	تعداد مکان Number of loci
50	51.16	53.49	درصد مکان چندشکل Percentage of polymorphic loci (%)
81	78	80	تعداد مکان با فراوانی بیشتر از ۵ درصد Number of loci with frequency $\geq 5\%$
4	0	2	تعداد مکان اختصاصی Number of private loci
0.17±0.02	0.15±0.02	0.16±0.02	میانگین هتروزایگوسیتی Mean of heterozygosity (He)
1.28±0.04	1.26±0.04	1.27±0.04	تعداد آلل‌های موثر Number of effective alleles (Ne)
0.25±0.03	0.23±0.03	0.247±0.03	ضریب شانن Shannon's information index (I)

جدول ۵: آغازگرهای REMAP و خصوصیات آنها در جمعیت‌های *Linum austriacum*
 Table 5: REMAP primers and their properties in *Linum austriacum* populations

اندازه باندها (جفت باز) Band size (bp)	ضریب شانن Shannon's information index	تعداد آل‌های مؤثر Number of effective alleles	میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار Mean of expected heterozygosity	درصد چندشکلی Percentage Polymorphic	مکان‌های چندشکل Polymorphic loci	تعداد کل مکان Total loci	آغازگر Primer
75-1500	0.19	1.24	0.13	60	6	10	LTR1886-UBC425
200-2000	0.36	1.47	0.25	83	10	12	LTR1854-UBC443
300-1500	0.22	1.30	0.16	60	6	10	LTR1886-UBC443
300-2000	0.25	1.31	0.17	67	6	9	LTR1854-UBC815
75-2000	0.15	1.20	0.10	50	5	10	LTR1868-UBC825
75-3000	0.14	1.18	0.10	37	3	8	LTR1868-UBC826
300-1500	0.30	1.40	0.21	50	3	6	LTR1854-UBC848
100-1500	0.27	1.38	0.20	56	5	9	LTR1868-UBC848
100-1500	0.26	1.33	0.18	44	4	9	LTR1868-UBC855
100-3000	0.22	1.28	0.15	50	3	6	LTR1886-UBC855
200-3000	0.16	1.20	0.11	33	3	9	LTR1886-A13
100-1500	0.15	1.19	0.11	33	3	9	LTR1868-A13
400-1500	0.21	1.27	0.15	33	2	6	LTR1854-A13
	0.22	1.30	0.16	50.46	4.5	8.7	میانگین Mean

تکثیری بیشتر از ۵ درصد بود. باند اختصاصی با استفاده از نشانگر REMAP در جمعیت‌های مورد مطالعه تکثیر نشد. میانگین هتروزایگوسیتی در جمعیت‌ها از ۰/۱۴ (ارومیه-سیلوانا) تا ۰/۱۸ (ارومیه-سرو) متغیر و میانگین آن برابر با ۰/۱۶ بود (جدول ۶). میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۸۳ درصد) بیشتر از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها (۱۷ درصد) بود. حداقل میزان مهاجرت ($Nm=0/99$) بین جمعیت‌های ارومیه-سیلوانا و خوی و حداکثر آن ($Nm=1/36$) بین جمعیت‌های ارومیه-سرو و خوی مشاهده شد. حداقل فاصله ژنتیکی نی (۰/۰۷) بین جمعیت‌های ارومیه-سرو و خوی و حداکثر فاصله ژنتیکی (۰/۰۹) بین جمعیت‌های ارومیه-سرو و ارومیه-سیلوانا به دست آمد. میانگین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها برابر با ۰/۰۸ بود (جدول ۷). دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به روش Minium evolution و ضریب فاصله differences براساس نشانگرهای REMAP، افراد مورد مطالعه را در سه خوشه اصلی گروه‌بندی کرد (شکل ۴).

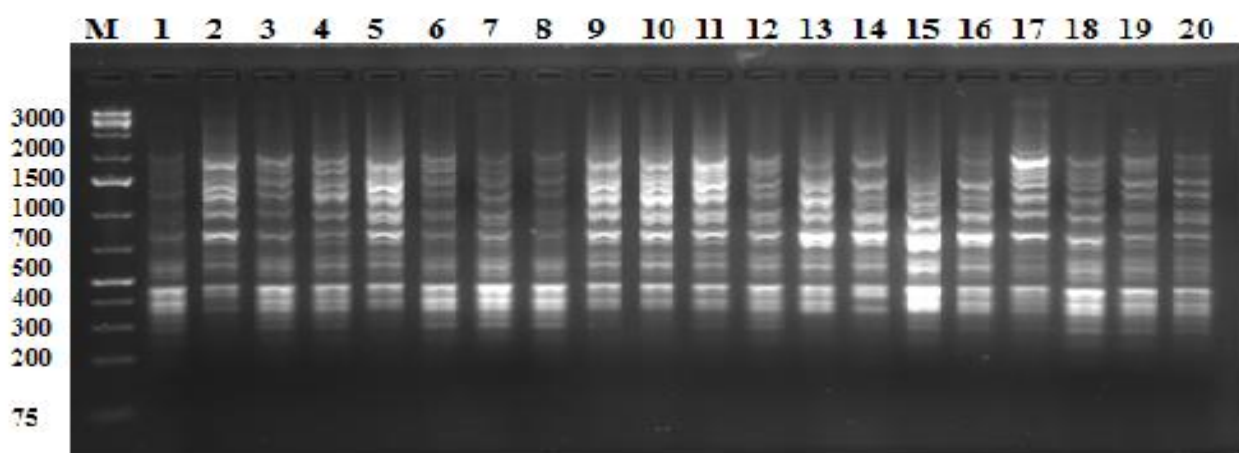
نشانگرهای REMAP

در کل ۴۸ ترکیب آغازگری REMAP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در سه جمعیت از گونه *L. austriacum* استفاده شد. از این تعداد، ۱۳ ترکیب آغازگری (جدول ۵) مکان‌های چندشکل و قابل امتیازدهی تولید کردند. ترکیب آغازگری LTR1854-UBC443 بیشترین تعداد مکان (۱۲) و همچنین بیشترین تعداد مکان‌های چندشکل (۱۰) را تکثیر نمود. ۱۳ ترکیب آغازگری در مجموع ۱۱۳ مکان را تکثیر کردند که از این تعداد ۵۹ مکان چندشکل بودند. میانگین تعداد مکان‌های چندشکل برای هر آغازگر ۴/۵ بود. بیشترین میزان میانگین هتروزایگوسیتی، تعداد آل‌های مؤثر و ضریب شانن (به ترتیب ۰/۲۵، ۱/۴۷ و ۰/۳۶) مربوط به آغازگر LTR1854-UBC443 بود. دامنه باندهای تکثیر شده از ۷۵ تا ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود (جدول ۵).

درصد مکان‌های چندشکل براساس نشانگرهای REMAP در جمعیت‌ها از ۳۰/۹۷ (ارومیه-سیلوانا) تا ۳۸/۰۵ (ارومیه-سرو) با میانگین ۳۴/۸۱ متغیر بود. فراوانی تمام مکان‌های



شکل ۱: نقشه توزیع جغرافیایی جمعیت‌های مورد مطالعه گونه *Linum austriacum*
 Fig. 1: Distribution map of *Linum austriacum* populations studied



شکل ۲: الگوی بانندی مربوط به آغازگر منفرد LTR1854، M: نشانگر وزن مولکولی برحسب bp، اندازه باندها برحسب جفت باز می‌باشد، ۱۰ نمونه اول از سمت راست مربوط به جمعیت خوی و ۱۰ نمونه دوم مربوط به جمعیت ارومیه-سرو می‌باشد

Fig. 2: Polymorphism detected by IRAP primer LTR1854, lanes from left to right: M: DNA ladder, in base pairs; 1 to 10: individuals from population Khoy; 11 to 20: individuals from population Urmia-sero

REMAP باهم همبستگی معنی‌داری ندارند ($r=0/07$). بنابراین برای افزایش اطمینان به گروه‌بندی، داده‌های حاصل از نشانگرهای IRAP و REMAP باهم ترکیب و برای تجزیه کلاستر مورد استفاده قرار گرفت. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به روش Minium evolution و ضریب فاصله Number of differences، افراد مورد مطالعه را در چهار خوشه اصلی گروه‌بندی کرد. گروه اول، دوم و سوم به ترتیب شامل افراد

تجزیه ترکیبی نشانگرهای IRAP و REMAP
 بررسی همبستگی بین ۳ ماتریس کوفنتیک حاصل از نشانگرهای IRAP، REMAP، IRAP+REMAP نشان داد که ماتریس‌های IRAP و REMAP همبستگی معنی‌داری (به ترتیب $r=0/54$ و $r=0/59$) با ماتریس IRAP+REMAP دارد. همچنین آزمون مانتل بین ماتریس‌های کوفنتیک حاصل از نشانگرهای IRAP و REMAP نشان داد که دو نشانگر IRAP و

ارومیه- سرو و خوی مشاهده شد. حداقل فاصله ژنتیکی نی (۰/۰۶) بین جمعیت‌های ارومیه-سیلوانا و خوی، و حداکثر فاصله ژنتیکی (۰/۰۸) بین جمعیت‌های ارومیه- سرو و ارومیه- سیلوانا به دست آمد. میانگین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۰/۰۷ بود (جدول ۷).

مربوط به جمعیت‌های ارومیه- سرو، خوی و ارومیه- سیلوانا می‌باشد. در گروه چهار دو فرد از جمعیت خوی و دو فرد از جمعیت ارومیه- سیلوانا قرار گرفتند (شکل ۵). حداقل میزان مهاجرت (Nm=۱/۱۹) بین جمعیت‌های ارومیه- سیلوانا و ارومیه- سرو و حداکثر آن (Nm=۱/۴۹) بین جمعیت‌های

جدول ۶: ویژگی مکان‌های تکثیری REMAP در جمعیت‌های *Linum austriacum*
Table 6: Characteristics of amplified REMAP loci in *Linum austriacum* populations

خوی Khoy	ارومیه- سیلوانا Urima-silvana	ارومیه- سرو Urmia-sero	جمعیت Population
112	111	113	تعداد مکان Number of loci
35.40	30.97	38.05	درصد مکان چندشکل Percentage of polymorphic loci (%)
112	111	113	تعداد مکان با فراوانی بیشتر از ۵ درصد Number of loci with frequency \geq 5%
0.16 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.18 \pm 0.02	میانگین هتروزیگوسیتی Mean of heterozygosity (He)
1.28 \pm 0.04	1.25 \pm 0.04	1.33 \pm 0.04	تعداد آلل‌های موثر Number of effective alleles (Ne)
0.22 \pm 0.03	0.20 \pm 0.03	0.25 \pm 0.03	ضریب شانن Shannon's information index (I)

جدول ۷: تمایز ژنتیکی، فاصله ژنتیکی نی و میزان مهاجرت بین هر جفت از جمعیت‌های گونه *Linum austriacum*
Table 7: Genetic differentiation (PhiPT), Nei genetic distance (GD) and number of migrants (Nm) between each pair-wise of *Linum austriacum* populations

IRAP+REMAP			REMAP			IRAP			جمعیت ۲ Population 2	جمعیت ۱ Population 1
Nm	GD	PhiPT	Nm	GD	PhiPT	Nm	GD	PhiPT	ارومیه-سیلوانا Urima-silvana	ارومیه-سرو Urmia-sero
1.19	0.08	0.17	1.28	0.09	0.16	1.1	0.08	0.18	ارومیه-سرو Urmia-sero	ارومیه-سرو Urmia-sero
1.49	0.07	0.14	1.36	0.07	0.15	1.63	0.06	0.133	خوی Khoy	ارومیه-سرو Urmia-sero
1.24	0.06	0.17	0.99	0.08	0.20	1.62	0.05	0.134	خوی Khoy	ارومیه-سیلوانا Urima-silvana

PhiPT: ضریب تمایز، GD: فاصله ژنتیکی و Nm: میزان مهاجرت
PhiPT: Genetic differentiation, GD: Genetic distance and Nm: number of migrants

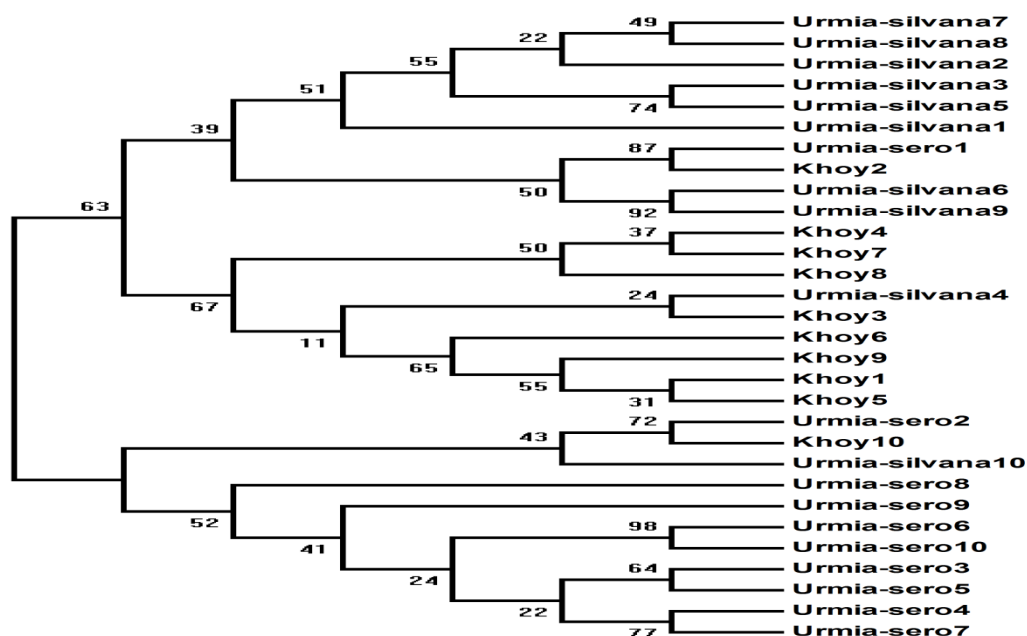
بحث

چندشکل و قابل امتیازدهی در جمعیت‌های مورد مطالعه تولید کردند که نشان می‌دهد این رتروترنسیپوزون‌ها در ژنوم کتان حضور فعال داشته و در نواحی نزدیک به هم و قابل تکثیر قرار گرفته‌اند. مجاورت رتروترنسیپوزون‌های مربوط به یک خانواده در ژنوم و تکثیر با تک آغازگرهای مبتنی بر این خانواده‌ها در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (عبدالهی مندولکانی و همکاران، 2012 and 2014؛ کلندر و همکاران، 1999؛ نصری و همکاران، 2013). تعداد باندهای تولید شده حاصل از این آغازگرها زیاد بود که بیانگر تعداد زیاد کپی‌های این رتروترنسیپوزون‌ها در ژنوم *L. austriacum* می‌باشد. اسمایکل و

در این تحقیق برای اولین بار الگوی توزیع و چندشکلی ادغامی برخی خانواده‌های رتروترنسیپوزونی LTR که از *L. usitatissimum* جدا شده بودند / اسمایکل و همکاران (2011)، با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP در گونه *L. austriacum* مطالعه شد. در کل چهار آغازگر منفرد و ۶ ترکیب آغازگری IRAP و ۱۳ ترکیب آغازگری REMAP برای بررسی تنوع ژنتیکی سه جمعیت کتان از گونه *L. austriacum* مورد استفاده قرار گرفت. تمام آغازگرهای منفرد IRAP، شامل LTR1833، LTR1854، LTR1868 و LTR1886 الگوی باندی

رتروترنسپوزون‌های LTR به‌ویژه خانواده LTR1868 چندشکلی ادغامی بالایی در گونه *L. usitatissimum* دارد / اسمایکل و همکاران (2011). بنابراین احتمالاً این خانواده رتروترنسپوزونی و سایر رتروترنسپوزون‌های LTR در سازماندهی و تکامل ژنوم کتان نقش اساسی دارند. به‌طور کلی درصد بالای چندشکلی شناسایی شده به‌وسیله آغازگرهای IRAP (۸۱/۳٪) و REMAP (۵۰/۵٪) در این مطالعه نشان‌دهنده فعالیت بالای خانواده‌های رتروترنسپوزونی مورد استفاده در ژنوم گونه *L. austriacum* می‌باشد. در مطالعه / اسمایکل و همکاران (2011) و *ملنیکیو* و همکاران (2014) نیز تنوع ژنتیکی بالایی در گونه‌های وحشی نسبت به ارقام زراعی کتان گزارش شد. ایجاد باندهای REMAP بیانگر حضور خانواده‌های رتروترنسپوزونی مورد مطالعه در نزدیکی ریزماهورها می‌باشد. آغازگر منفرد LTR1833 در ترکیب با آغازگرهای SSR الگوی بانندی واضحی تولید نکرد که بیانگر عدم حضور رتروترنسپوزون‌های LTR1833 در نزدیکی موتیف‌های ریزماهوره‌ای می‌باشد. درج خانواده‌های رتروترنسپوزونی در نزدیکی توالی‌های SSR در گیاهان مختلفی مانند جو ویسینت و همکاران (Vicent *et al.*, 2005)، مرکبات بیسواس و همکاران (2010)، گندم *عبداللهی* مندولکانی و همکاران (2014) و خرما لگو و همکاران (Guo *et al.*, 2006) گزارش شده است.

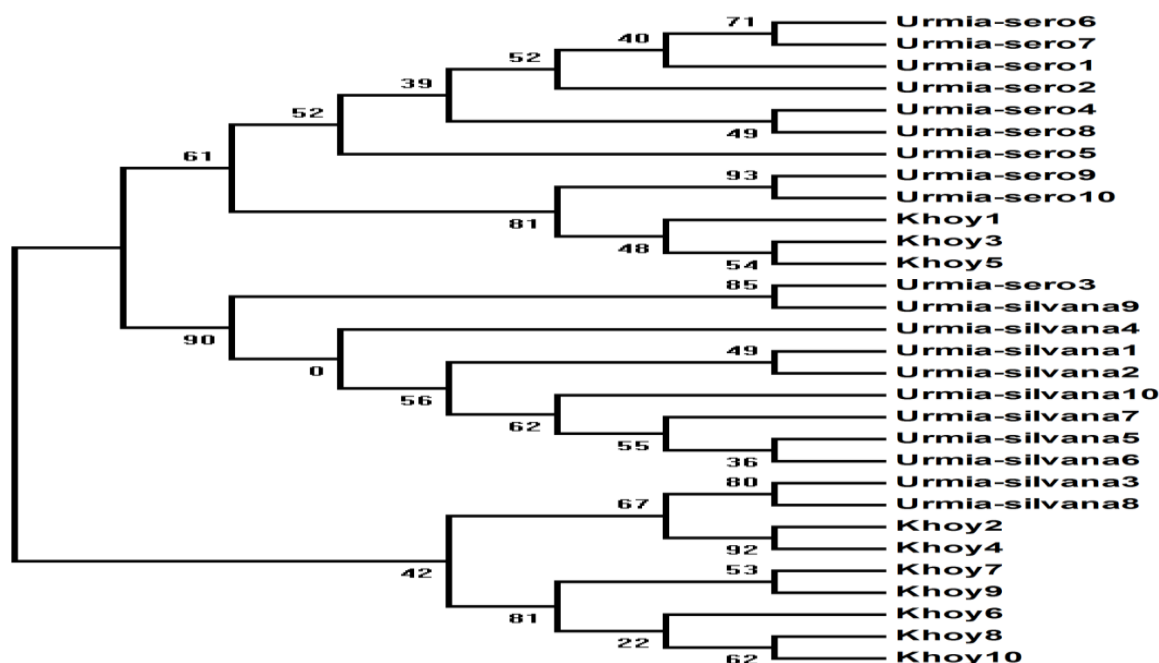
همکاران (2011) با استفاده از روش iPBS حدود ۹۰ خانواده رتروترنسپوزونی LTR دار را از کتان (*L. usitatissimum*) شناسایی و گزارش نمودند که این رتروترنسپوزون‌ها در گونه‌های مختلف جنس *Linum* فعال بوده و چندشکلی قابل توجهی نشان می‌دهند و می‌توان از آنها به‌عنوان نشانگرهای مولکولی در این جنس استفاده نمود. در مطالعه *ملنیکیو* و همکاران (2014)، از بین آغازگرهای مورد مطالعه دو آغازگر 1845 و 1899 به‌عنوان آغازگرهای منحصر به فرد شناخته شده و برای بررسی تنوع ژنتیکی واریته‌های کتان مورد استفاده قرار گرفتند. از ترکیبات آغازگری IRAP مورد بررسی در این مطالعه، سه ترکیب آغازگری LTR1868-LTR1833، LTR1854-LTR1868 و LTR1886-LTR1868 الگوی بانندی قابل امتیازدهی و چندشکل تولید نمودند بنابراین می‌توان بیان نمود که این عناصر رتروترنسپوزونی در ژنوم *L. austriacum* در نزدیکی هم و یا در داخل یکدیگر به‌صورت آشیانه‌ای ادغام شده‌اند. همچنین تعداد زیاد باندهای تولیدی توسط این ترکیبات رتروترنسپوزونی دلیل دیگری بر تعداد زیاد کپی‌های آنها در ژنوم این گونه می‌باشد. در هر سه ترکیب آغازگری مذکور، رتروترنسپوزون LTR1868 حضور داشت که این موضوع تأییدکننده تعداد کپی بالای آن و فعالیت بیشتر این عنصر در ژنوم این گونه می‌باشد. مطالعات قبلی نیز گزارش نمودند که



شکل ۳: دندوگرام Minimum evolution مربوط به ۳۰ فرد گونه *Linum austriacum* براساس ۸۶ مکان IRAP با استفاده از ضریب

فاصله Number of differences

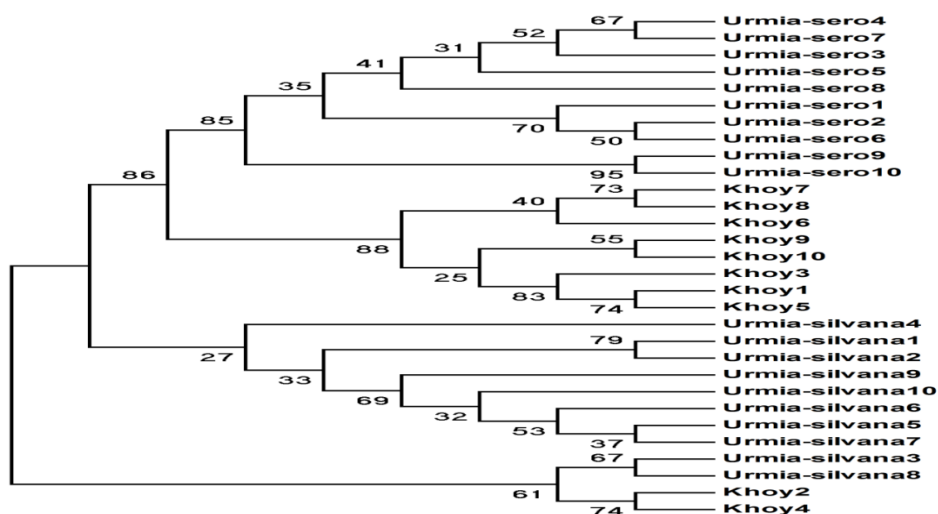
Fig. 3: Minimum evolution dendrogram of 30 *Linum austriacum* genotypes based on 86 IRAP loci using Number of differences coefficients



شکل ۴: دندوگرام Minimum evolution مربوط به ۳۰ فرد گونه *Linum austriacum* براساس ۱۱۳ مکان REMAP و ضریب فاصله

Number of differences

Fig. 4: Minimum Evolution dendrogram of 30 *Linum austriacum* genotypes based on 113 REMAP loci using Number of differences coefficients



شکل ۵: دندوگرام Minimum evolution مربوط به ۳۰ فرد گونه *Linum austriacum* براساس ۱۹۹ مکان IRAP+REMAP با

استفاده از ضریب فاصله Number of differences

Fig. 5: Minimum evolution dendrogram of 30 *Linum austriacum* genotypes based on 199 IRAP+REMAP loci using Number of differences coefficients

مورد انتظار است. علاوه بر این، بخش بزرگی از تنوع درون جمعیت‌ها احتمالاً به‌خاطر فعالیت و چندشکلی ادغامی بالای خانواده‌های رتروترنسپوزونی مورد مطالعه در این جمعیت‌ها می‌باشد. چندشکلی بالای این خانواده‌ها در برخی گونه‌های جنس *Linum* توسط اسمایکل و همکاران (2011) نیز گزارش شده است. در گزارشات متعدد در ارتباط با بررسی تنوع

تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در جمعیت‌های مورد مطالعه در مقایسه با تنوع بین جمعیتی بیشتر بود. تنوع کم بین جمعیت‌های گونه مورد مطالعه نشان‌دهنده میزان بالای جریان ژنی بین جمعیت‌ها می‌باشد. از طرفی با توجه به اینکه بذور گونه مورد مطالعه از یک منطقه جغرافیایی یعنی یک استان جمع‌آوری شده، جابه‌جایی بذرها بین مناطق مختلف بدیهی و

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که خانواده‌های رتروترنسیپوزونی LTR هم به حالت منفرد و هم به حالت آشیانه‌ای در ژنوم *L. austriacum* ادغام شده‌اند. همچنین این عناصر دارای فعالیت انتقالی و چندشکلی زیادی در این گونه می‌باشند و می‌توان از نشانگرهای IRAP و REMAP مبتنی بر این عناصر در مطالعات ژنتیکی مانند ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی گروه‌های هتروتیک، بررسی روابط تکاملی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها در گونه‌های مختلف جنس *Linum* استفاده نمود. در این مطالعه هرچند میزان مهاجرت بین سه جمعیت گونه‌ی *L. austriacum* بیشتر از ۱ بود ولی نشانگرهای IRAP و REMAP قادر بودند در هر جمعیت الگوی باندی متفاوتی تولید نموده و در ترکیب با روش‌های موثر تجزیه خوشه‌ای مانند Minimum evolution این جمعیت‌ها را از همدیگر متمایز سازند. تنوع مشاهده شده در نشانگرهای IRAP و REMAP به علت سازگاری گیاه به محل زندگی خود نیست، بنابراین دلیل ممکن برای واگرایی ژنتیکی جمعیت‌های مطالعه شده احتمالاً رانده‌شدگی ژنتیکی می‌باشد شیدایی و همکاران (2014). پیشنهاد می‌شود که جمعیت‌های بیشتری از این گونه و سایر گونه‌های جنس *Linum* از نواحی مختلف کشور جمع‌آوری شود و نسبت به ساماندهی آنها در ژرم‌پلاسما با استفاده از این نشانگرها اقدام شود. با توجه به اینکه هر خانواده رتروترنسیپوزونی تاریخچه و الگوی ادغامی متفاوتی در ژنوم دارد توصیه شود از خانواده‌های مختلف به‌عنوان نشانگر مولکولی استفاده شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت مالی و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر فراهم نمودن امکانات تحقیق قدردانی می‌نماید.

ژنتیکی کتان با استفاده از نشانگرهای IRAP / سمایکل و همکاران (2011) و AFLP رومنس (Vromans, 2006) نیز میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها گزارش شده است. شیدایی و همکاران (2014) با استفاده از نشانگرهای ISSR، ۱۶ جمعیت از ۹ استان مختلف متعلق به گونه *L. austriacum* را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که تنوع ژنتیکی بین جمعیتی (۵۷٪) در مقایسه با تنوع درون جمعیتی (۴۳٪) بیشتر بود. دلیل اختلاف این مطالعه با مطالعه ما را شاید بتوان به استفاده از سیستم‌های نشانگری متفاوت و همچنین مراکز جمع‌آوری این گونه در دو مطالعه نسبت داد. در این مطالعه حداکثر تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های ارومیه- سرو و ارومیه- سیلوانا مشاهده شد (جدول ۷). میزان مهاجرت بین جمعیت‌ها بیش از ۱ بود (جدول ۷) که می‌تواند ناشی از جابه‌جایی بذر توسط دام، انسان و یا فاصله اندک جغرافیایی بین جمعیت‌های مورد مطالعه باشد (جدول ۷). میزان مهاجرت بین جمعیت‌ها که نشان دهنده جریان ژنی بین آنهاست در صورتی که کمتر از ۱ باشد بیانگر ایزوله شدن گروه‌ها از نظر جریان ژنی نسبت به همدیگر است رایت (Wright, 1951). تنوع ژنتیکی به گیاهان کمک می‌کند تا با تغییرات محیطی موجود مقابله کنند. در نتیجه هتروزیگوسیتی و تنوع کم، تولید مثل و بقا موجودات زنده کاهش می‌یابد. گونه‌هایی مانند *L. austriacum* که جمعیت‌های کوچک پراکنده‌ای را در برخی مناطق کشور و به‌خصوص استان آذربایجان غربی، تشکیل داده‌اند و دارای درصد بالای خودگشنی نیز می‌باشند، در معرض هموزیگوسیتی و فرسایش ژنتیکی قرار دارند. بنابراین جمع‌آوری نمونه‌های مربوط به این گونه از نواحی مختلف ایران و ارزیابی تنوع آنها ضروری می‌نماید.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۵-۱۷ متن انگلیسی مراجعه شود.