ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحه ۷۸ - ۶۹

بررسی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌های شنبلیله با استفاده از نشانگرهای SCoT و URP

Investigation of genetic diversity among fenugreek ecotypes using SCoT and URP markers

مریم میرزاحسین تبریزی[۱]، رضا عزیزی‌نژاد*[۱]، فرنگیس قنواتی[۲]، علیرضا اطمینان[۳]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

Mirzahosin Tabrizi M[1], Azizi Nezhad R[*1], Ghanavati F[2], Etminan A[3]

1- PhD Student, Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r.azizi@srbiau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۶)

چکیده

گونه‌های مختلف جنس *Trigonella* دارای جنبه‌های دارویی و غذایی بسیار مهمی می‌باشند. ارزیابی تنوع ژنتیکی یکی از اصول اولیه در هر برنامه اصلاحی می‌باشد که موقعیت را جهت بررسی ویژگی‌های ژنتیکی و شناسایی ژن‌های جدید برای به‌نژادگران فراهم می‌آورد. در این پژوهش تنوع ژنتیکی موجود در ۹۰ اکوتیپ شنبلیله با استفاده از نشانگرهای SCoT و URP مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از ده آغازگر SCoT و ده آغازگر URP در مجموع به‌ترتیب ۱۰۰ و ۱۰۹ قطعه تکثیر شد که تمامی آن‌ها چندشکل بودند. متوسط شاخص PIC در هر دو نشانگر ۰/۳۴ برآورد شد. با این حال متوسط شاخص‌های Rp و MI در نشانگرهای URP بیشتر از SCoT بود. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس داده‌های SCoT، URP و SCoT+URP نشان داد میزان تنوع درون جمعیت‌ها نسبت به بین جمعیت‌ها بیشتر است. براساس مقادیر شاخص‌های تنوع ژنتیکی مشخص شد بیشترین تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) و بیشترین میزان شاخص شانون (I)، شاخص تنوع نی (H) و درصد جایگاه‌های چندشکل (PPL) مربوط به گونه‌های *T. foenum-graecum* و *T. monantha* بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس هر یک از نشانگرها و ترکیب داده‌های هر دو نشانگر تمامی اکوتیپ‌های ارزیابی شده را به‌ترتیب در سه گروه اصلی دسته‌بندی کردند. علاوه براین مشخص شد الگوی گروه‌بندی به‌دست آمده بر اساس ترکیب داده‌های هر دو نشانگر به خوبی منطبق با ساختار تاکسونومی گونه‌ها بود. به‌طورکلی نتایج به‌دست آمده نشان داد تنوع ژنتیکی بالایی در درون اکوتیپ‌های شنبلیله وجود دارد. بنابراین این مجموعه می‌تواند به‌عنوان یک منبع ژنی با ارزش جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه خوشه‌ای
تنوع ژنتیکی
شنبلیله
نشانگرهای مولکولی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

مقدمه

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* L. گیاهی یکساله و متعلق به خانواده بقولات است که برگ و بذر آن دارای خواص دارویی با ارزشی می‌باشد و از دیرباز در ایران مورد کشت قرار گرفته است. این گیاه دارای ارزش غذایی بالا و حاوی موادی همچون کلسیم، آهن، فسفر، ویتامین C، کاروتن و همچنین میزان زیادی پروتئین می‌باشد (Omidbaigi 2004). بذرهای شنبلیله حاوی موادی نظیر کولین، آلکالوئید، ساپونین و تریگونلین بوده که نقش مؤثری در کاهش قند خون دارند (Sandor et al. 2004). منشأ این گیاه نواحی آفریقای شمالی و سواحل شرقی مدیترانه گزارش شده است. به‌طوری که بر اساس گزارشات موجود این گیاه در آغاز بومی ایران بوده و سپس به دیگر مناطق مختلف منتقل شده است. به‌طور کلی نواحی از هند، چین، آفریقا، الجزیره، پاکستان، اسپانیا، ترکیه، مصر، اوکراین و ایتالیا محل پراکنش این گیاه مشخص شده است (Hasanzadeh et al. 2010). گستردگی نواحی پراکنش این گیاه سبب شده است تا گوناگونی و یا به‌عبارتی میزان تنوع ژنتیکی بالایی در بین گونه‌های آن وجود داشته باشد. با توجه به اینکه شناسایی توده‌های مختلف یکی از مهم‌ترین اقدامات مهم در زمینه بهبود ژنتیکی و افزایش سطح زیر کشت گیاهان زراعی و باغی می‌باشد، از این‌رو بررسی تنوع ژنتیکی به‌عنوان پایه و اساس برنامه‌های اصلاحی شناخته شده است (Farsi and Zolali 2011).

نشانگرهای مولکولی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ابزارهای اصلی در ارزیابی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی و جانوری شناخته شده‌اند. پیشرفت تکنولوژی در حوزه‌های زیست فناوری در تمامی حوزه‌های زیستی سبب شده است تا امروزه انواعی از این ابزارهای ژنتیکی توسعه و مورد استفاده قرار گیرند. تاکنون انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA مانند RAPD[1]، AFLP[2]، ISSR[3]، SSR[4]، STS[5] و غیره معرفی شده است که هریک نسبت به‌هم دارای معایب و مزایایی هستند. یکی از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA که برای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی نشانگرهای URP[6] می‌باشد که نخستین بار توسط Kang et al. (2002) معرفی و مورد استفاده قرار گرفتند. این نشانگرها توالی‌های تکراری هستند که از بانک ژنوم نوعی برنج بومی کره استخراج شده و برای انگشت‌نگاری از ژنوم‌های گیاهان و جانوران و میکروب‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. نشانگرهای URP تحت شرایط PCR مناسب، قادر به ارائه سطح بالایی از چندشکلی است. گزارش شده است این نشانگر یک ابزار مفید برای آنالیز فیلوژنتیکی در سطح درون گونه‌ای و بین گونه‌ای می‌باشد (Aggarwal et al. 2008). تاکنون آغازگرهای URP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های قارچی *Chaetomtitum* (Aggarwal et al. 2008)، *Macrophomina pharolina* (Jana et al. 2005)، *Bipolart sorokiniana* (Aggarwal et al. 2010)، *Tilletia indica* (Aggarwal et al. 2010)، جدایه‌های پنی‌سیلیوم از گلابی‌های چند ساله داخل انبار (Han et al. 2012)، *Oyster mushroom* (Kang et al. 2002) و بررسی روابط بین گونه‌ای کنجد (Salahlou et al. 2019) مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

در دهه اخیر پیشرفت در ابزارهای بیوتکنولوژی منجر به ظهور انواعی از نشانگرهای مبتنی بر نواحی حفاظت شده ژنوم شده که چندشکلی مبتنی بر نقاط هدفمند ژنوم را نشان می‌دهند. نشانگرهای SCoT[7] از جمله نشانگرهای مولکولی نوظهور بوده که در سال ۲۰۰۹ توسط Collard and Mackill بر مبنی جایگاه ژنی کدون آغاز (ATG) طراحی و معرفی شد. آغازگرهای این نشانگر بر اساس توالی‌های توافقی مجاورت کدون آغاز طراحی می‌شوند و دارای طول ۱۸ نوکلئوتیدی می‌باشند. در واقع وجه تمایز آغازگرها در تفاوت حداقل یک نوکلئوتید در انتهای ′۳ می‌باشد. استفاده از نشانگرهای SCoT در ارزیابی تنوع ژنتیکی و مطالعه روابط بین گونه‌ای در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است. به‌عنوان نمونه، Pour-Aboughadareh (2018) در ارزیابی روابط بین گونه‌ای و برآورد سطح تنوع ژنتیکی در گونه‌های ژرم‌پلاسمی گندم از ۱۵ آغازگر SCoT استفاده نمودند و

[1] Random amplification of polymorphic DNA
[2] Amplified fragment length polymorphism
[3] Inter simple sequence repeat
[4] Simple sequence repeat
[5] Sequence-Tagged Site
[6] Universal rice primer
[7] Start codon targeted polymorphism

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد این نشانگرها قادرند نمونه‌های مربوط به هر گونه را بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها در گروه‌های مجزا از هم تفکیک کنند. در مطالعه‌ای دیگر Etminan et al. (2018) به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های مختلف مریم گلی از مجموعه‌ای از آغازگرهای SCoT و ISSR استفاده کردند. این محققان نشان دادند سودمندی آغازگرهای SCoT نسبت به ISSR در گروه‌بندی نمونه‌های ارزیابی شده بیشتر است. به‌طور کلی کارایی این نشانگرها در بسیاری از مطالعات دیگر گزارش شده است (Collard and Mackil 2009; Gorji et al. 2011; Pour-Aboughadareh et al. 2017; Etminan et al. 2018; Qaderi et al. 2019).

بررسی منابع موجود نشان می‌دهد گزارشات محدودی در رابطه با استفاده از نشانگرهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی شنبلیله وجود دارد. به‌عنوان مثال، Dangi et al. (2004) با بررسی تنوع ژنتیکی ۲۶ ژنوتیپ از دو گونه *T. caerulea* و *T. foenum-graecum* با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD نشان دادند میزان تنوع ژنتیکی در گونه *T. caerulea* نسبت به گونه دیگر بیشتر است. Moradi (2008) در ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در بیست توده شنبلیله بومی مناطق مختلف کشور از نشانگرهای RAPD استفاده نمود و اظهار داشت تنوع مطلوبی در بین توده‌های مورد بررسی وجود دارد. Ahari (2014) نیز از نشانگرهای AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های شنبلیله بومی ایران استفاده کردند و نتایج آن‌ها مشابه سایر گزارشات موجود سطح بالایی از تنوع مولکولی را نشان داد. با توجه به اینکه شناسایی تخمین برآورد تنوع ژنتیکی گامی مهم در جهت تهیه و تدوین برنامه‌های به‌نژادی به‌شمار می‌آید، از این‌رو هدف از این پژوهش ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان خویشاوندی بین اکوتیپ‌های مختلف شنبلیله با استفاده از نشانگرهای SCoT و URP بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل ۹۰ اکوتیپ شنبلیله به‌ترتیب متشکل از ۵۰، ۱۰، ۱۰، ٦، ۵، ۳، ۳ و ۳ اکوتیپ متعلق به گونه‌های *T. foenum-graecum*، *T. monantha*، *T. monspeliaca*، *T. uncata*، *T. persica*، *T. stellata*، *T. anguina* و *T. aurantiaca* بودند. پس از کشت بذور هر یک از اکوتیپ‌ها در شرایط گلخانه و تولید گیاهچه، استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان بر اساس روش CTAB انجام شد (Doyle and Doyle 1987). پس از استخراج DNA ژنومی کیفیت آن با استفاده الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی از ۱۰ آغازگر SCoT و ۱۰ آغازگر URP استفاده و توالی آن‌ها در جدول ۱ درج شده است. پس از بهینه سازی شرایط تکثیر و تعیین دمای اتصال آغازگرها، واکنش PCR با استفاده دستگاه ترموسایکلر BIO RAD مدل T100 انجام شد. نشانگرهای SCoT و URP به‌ترتیب براساس توالی‌های ارائه شده توسط Collard and Mackill (2009) و Kang et al. (2002) طراحی شدند. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت نهایی ۵۰ نانوگرم، ۲ میکرولیتر آغازگر (۱۰ پیکومول برمیکرولیتر)، ٦ میکرولیتر آب دیونیزه و ۱۰ میکرولیتر PCR master Mix (2X) بود. کلیه واکنش‌های تکثیر در برنامه دمایی هر واکنش شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه و ۱۰ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت ٤۵ ثانیه در دمای بهینه شده برای هر آغازگر، توسعه آغازگر به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۲۵ چرخه حرارتی دیگر شامل واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت ٤۵ ثانیه در دمای بهینه شده برای هر آغازگر، توسعه آغازگر به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

پس از انجام واکنش تکثیر، محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل‌ها با Safeview انجام و عکس‌برداری از آن‌ها صورت گرفت. پس از امتیازدهی الگوی قطعات تکثیری براساس معیار یک (وجود باند) و صفر (عدم وجود باند)، مقادیر محتوای چندشکلی (PIC: polymorphism information content)، قدرت تمایز (Rp: resolving power) و شاخص نشانگر (MI: marker index) برای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

هر آغازگر محاسبه شد. برای محاسبه تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و برآورد شاخص‌های تنوع ژنتیکی از نرم‌افزار GenAlEx استفاده شد (Peakall and Smouse 2006). مقادیر فواصل ژنتیکی بین جفت نمونه‌ها بر اساس ضریب فاصله جاکارد محاسبه و به‌منظور گروه‌بندی نمونه‌ها، تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver. 5 صورت گرفت (Tamura et al. 2011).

نتایج و بحث

بررسی الگوی باندی به‌دست آمده از نشانگرهای SCoT نشان داد ۱۰ آغازگر استفاده شده در این پژوهش در مجموع ۱۰۰ قطعه تکثیر نمودند که تمامی آن‌ها چندشکل بودند (جدول ۱). تعداد قطعات تکثیری چندشکل بین ٦ (SCoT-9) و ۱۳ (SCoT-26) با میانگین ۱۰ قطعه متغیر بود. میانگین شاخص PIC برابر با ۰/۳٤ و دو آغازگر SCoT-10 و SCoT-5 به‌ترتیب با مقادیر ۰/٤٤ و ۰/۲۰ نسبت به سایر آغازگرها به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان اطلاعات چندشکل بودند. شاخص PIC یکی از مهم‌ترین معیارهای تعیین کننده کارایی سیستم‌های نشانگری است که قدرت تمایز نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهند (Powell et al. 1996). در واقع این شاخص احتمال تشخیص چندشکلی ایجاد شده توسط یک آغازگر بین دو فرد می‌باشد که به تعداد آلل‌های قابل تشخیص و فراوانی آن‌ها وابسته است. از این‌رو با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد آغازگرهای SCoT-10، SCoT-8 و SCoT-15 قابلیت ویژه‌ای در تمایز اکوتیپ‌های مورد بررسی دارند. شاخص Rp نیز توانایی یک سیستم نشانگری را در ایجاد قطعات قابل امتیازدهی تعیین می‌کند.

جدول ۱- شاخص‌های ژنتیکی آغازگرهای SCoT و URP استفاده شده در ارزیابی اکوتیپ‌های شنبلیله

آغازگر	توالی (′۵ به ′۳)	TAB	NPB	PIC	MI	Rp
SCoT-4	CAACAATGGCTACCACCT	۱۱	۱۱	۰/۳۳	۳/٦۵	۷/۷٦
SCoT-5	CAACAATGGCTACCACGA	۱۱	۱۱	۰/۲۰	۲/۱۸	۱۰/۰٤
SCoT-8	CAACAATGGCTACCACGT	۸	۸	۰/٤۳	۳/٤۵	۸/٤۷
SCoT-9	CAACAATGGCTACCAGCA	٦	٦	۰/۳۱	۱/۸۵	۵/٤۰
SCoT-15	ACGACATGGCGACCGCGA	۸	۸	۰/٤۱	۳/۲٤	۵/۵٦
SCoT-24	CCATGGCTACCACCGCCA	۱۱	۱۱	۰/۲۸	۳/۰٦	۱۰/۲۹
SCoT-26	ACAATGGCTACCACCATC	۱۳	۱۳	۰/۳٤	٤/۳۹	۱٤/۸۹
SCoT-11	AAGCAATGGCTACCACCA	۱۰	۱۰	۰/۳٤	۳/۳۵	۹/۷۸
SCoT-12	ACGACATGGCGACCAACG	۱۱	۱۱	۰/۳۹	٤/۳٤	٦/۹۸
SCoT-10	CAACAATGGCTACCAGCC	۱۱	۱۱	۰/٤٤	٤/۸۲	۱۲/۵۳
	میانگین	۱۰	۱۰	۰/۳٤	۳/٤۳	۹/۱٦
URP-1	ATCCAAGGTCCGAGACAACC	۱۲	۱۲	۰/٤۵	۵/٤۲	۱۲/٤۰
URP-3	CCCAGCAACTGATCGCACAC	۱۰	۱۰	۰/٤۲	٤/۲۳	۱۱/۱۸
URP-4	AGGACTCGATAACAGGCTCC	۱۱	۱۱	۰/۳۸	٤/۱۵	۸/٦۰
URP-6	ATGTGTGCGATCAGTTGCTG	۱۱	۱۱	۰/۳۵	۳/۸۱	۱۲/۲۹
URP-11	GATGTGTTCTTGGAGCCTGT	۸	۸	۰/۳۱	۲/٤۷	٦
URP-12	GGACAAGAAGAGGATGTGGA	۱۱	۱۱	۰/۲۵	۲/۷۰	۱۲/۱۸
URP-13	AAGAGGCATTCTACCACCAC	۱۱	۱۱	۰/۳۵	۳/۸۲	۱۲/۸٤
URP-14	AATGTGGGCAAGCTGGTGGT	۱۱	۱۱	۰/۲٦	۲/۸۸	۱۵/٦۹
URP-15	TACACGTCTCGATCTACAGG	۱۲	۱۲	۰/۳۷	٤/۵۰	۱۳/۳۳
URP-18	GGCAAGCTGGTGGGAGGTAC	۱۱	۱۱	۰/۳۰	۳/۲۹	۱۳/۵۳
	میانگین	۱۰/۸۰	۱۰/۸۰	۰/۳٤	۳/۷۳	۱۱/۸۰

TAB: تعداد کل قطعات تکثیری، NPB: تعداد قطعات تکثیری چندشکل، PIC: محتوای اطلاعات چندشکل، Rp: قدرت تمایز، و MI: شاخص نشانگر.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

با این حال، Prevost and Wilkinson (1999) بیان کردند این شاخص نمی‌تواند اطلاعاتی درباره توانایی یک آغازگر در بازتاب روابط ژنتیکی با تاکسونومی یک گروه ژنوتیپ تحت مطالعه را فراهم کند. با توجه به نتایج مندرج در جدول ۱ متوسط شاخص Rp با میانگین ۹/۱۶ بین ۵/۴۰ (مربوط به آغازگر SCoT-9) و ۱۴/۸۹ (مربوط به آغازگر SCoT-26) متغیر بود.

علاوه براین، دو آغازگر SCoT-10 و SCoT-9 به‌ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر MI را به خود اختصاص دادند. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد بین دو شاخص Rp و MI رابطه مستقیمی دارد به‌طوری که پیش از این Milbourne et al. (1997) گزارش دادند زیاد بودن مقادیر این دو شاخص نشان دهنده تولید تعداد بیشتری قطعات چندشکل و فراهم کردن اطلاعات بیشتری از ژنوم است. در این رابطه نیز به‌عنوان مثال آغازگر SCoT-9 دارای کمترین مقدار هر دو شاخص بودند و در مقابل دو آغازگر SCoT-10 و SCoT-26 دارای بیشترین مقادیر Rp و MI بودند. همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ۱۰ آغازگر URP در مجموع ۱۰۹ قطعه در ۹۰ اکوتیپ مورد بررسی تکثیر نمودند که تمامی قطعات چندشکل بودند. تعداد قطعات چندشکل تکثیر شده توسط آغازگرهای URP-11 (۸ قطعه) و URP-1 و URP-15 (۱۲ قطعه) به‌ترتیب کمترین و بیشترین تعداد قطعات چندشکل را تکثیر نمودند. شاخص PIC بین ۰/۲۵ و ۰/۴۵ با میانگین ۰/۳۴ متغیر بود. آغازگرهای URP-1، URP-3 و URP-4 نسبت به سایر آغازگرها دارای بیشترین مقدار PIC بودند. میانگین شاخص Rp برابر ۱۱/۸۰ بود و آغازگر URP-14 بیشترین مقدار آن را به خود اختصاص دادند و در مقابل آغازگر URP-11 دارای کمترین مقدار Rp بود. شاخص MI نیز دارای میانگین ۳/۷۳ بود. از نظر این شاخص دو آغازگر URP-11 و URP-1 با مقادیر ۲/۴۷ و ۵/۴۲ به‌ترتیب دارای کمترین و بیشترین مقدار MI بود. مقایسه میانگین شاخص‌های تعیین کننده کارایی آغازگرهای مربوط به هر نشانگر نشان داد هر دو سیستم نشانگری تقریباً دارای کارایی یکسانی در ارائه چندشکلی بین اکوتیپ‌های بررسی شده هستند. میانگین شاخص‌های Rp و MI نشانگرهای URP نسبت به SCoT تا حدودی بیشتر بود که دلیل این تفاوت جزیی می‌تواند به قطعات تکثیری بیشتر توسط آغازگرهای مربوط به این نشانگر باشد. اگرچه تعداد قطعات تکثیری توسط هر آغازگر و میانگین این شاخص در نشانگرهای SCoT نسبت به URP کمتر بود با این‌حال میانگین شاخص PIC این دو سیستم یکسان بود که این نتیجه می‌تواند به مکانیسم عمل نشانگرهای SCoT برگردد، زیرا این نشانگرها مبتنی بر نواحی هدف عمل کرده و چندشکلی موجود در این نواحی کدون آغاز را نشان می‌دهد و از طرفی معمولاً تمامی قطعات تکثیری توسط آغازگرهای این نشانگر چندشکل هستند (Ahmadi et al. 2019).

جهت بررسی میزان تنوع ژنتیکی بین و درون اکوتیپ‌های ارزیابی شده تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) انجام و نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود بر اساس هر یک از نشانگرها و ترکیب داده‌های به‌دست آمده از آن‌ها میزان واریانس درون جمعیتی نسبت به بین جمعیتی به مراتب بیشتر بود، به‌عبارت دیگر بیشترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به نمونه‌های موجود در هر جمعیت بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بین جمعیت‌های شنبلیله بر اساس نشانگرهای SCoT و URP

	منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس تخمین زده شده	واریانس کل
SCoT	بین جمعیت‌ها	۷	۴۷۹/۷۶	۶۸/۵۳	۶/۵۸	٪۳۴
	درون جمعیت‌ها	۸۲	۱۰۶۵/۷۴	۱۲/۹۹	۱۲/۹۹	٪۶۶
URP	بین جمعیت‌ها	۷	۴۸۹/۱۹	۶۹/۸۸	۶/۵۷	٪۳۱
	درون جمعیت‌ها	۸۲	۱۱۸۷/۷۰	۱۴/۴۸	۱۴/۸۴	٪۶۹
Pooled	بین جمعیت‌ها	۷	۹۶۸/۹۵	۱۳۸/۴۲	۱۳/۱۶	٪۳۲
	درون جمعیت‌ها	۸۲	۲۲۵۳/۴۴	۲۷/۴۸	۲۷/۴۸	٪۶۸

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

بالا بودن میزان واریانس درون جمعیتی نسبت به بین جمعیتی بیانگر وجود سطح بالایی از تنوع و اختلاف ژنتیکی افراد درون آن جمعیت می‌باشد که به نوبه خود این تنوع می‌تواند شانس دست‌یابی به آلل‌های و یا ژن‌های جدید را بالا ببرد که این خود می‌تواند در مدیریت منابع ژنتیکی و استفاده از آن‌ها در اصلاح جمعیت‌ها و تولید ژنوتیپ‌ها جدید اصلاحی مؤثر باشد. به‌منظور ارزیابی دقیق‌تر میزان تنوع درون جمعیتی، برخی از پارامترهای تنوع ژنتیکی بر اساس هر یک از نشانگرها و همچنین ترکیب داده‌های به‌دست آمده از آن‌ها برآورد و نتایج آن در جدول ۳ ذکر شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد براساس نشانگرهای SCoT، URP و SCoT+URP جمعیت *T. monantha* از نظر کلیه پارامترهای تنوع ژنتیکی نسبت به سایر جمعیت‌های دیگر دارای مقادیر بیشتری بود. گونه *T. monantha* جز خویشاوندان وحشی شنبلیله بوده و دارای خواص دارویی بسیاری است به‌طوری که برای بیماران دیابتی بسیار مؤثر و مفید می‌باشد و باعث کاهش قند خواهد شد (Asghari Lalemi et al. 2013).

جدول ۳- مقادیر برآورده شده پارامترهای ژنتیکی در جمعیت‌های شنبلیله

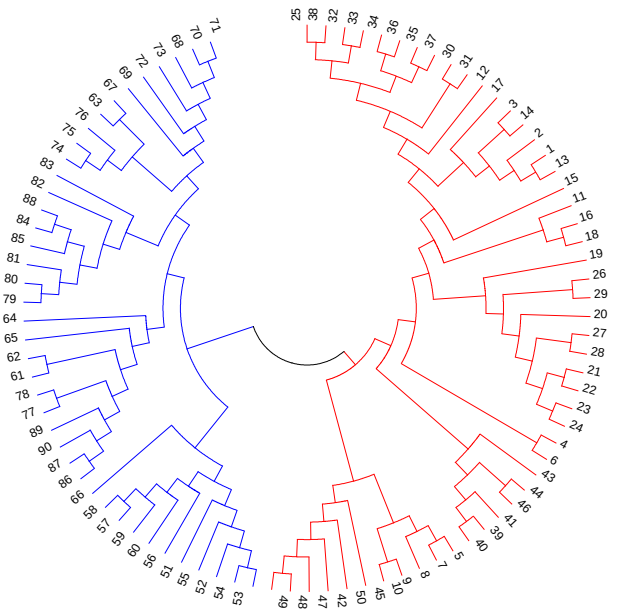
نشانگر	جمعیت	تعداد نمونه	Na	Ne	I	H	PPL
SCoT	*T. anguina*	۳	۰/۶۱	۱/۱۰	۰/۰۹	۰/۰۶	۱۵
	T. aurantiaca	۳	۰/۷۰	۱/۰۸	۰/۰۷	۰/۰۴	۱۲
	T. Foenum-graecum	۵۰	۱/۷۳	۱/۴۳	۰/۳۹	۰/۲۶	۸۵
	T. monantha	۱۰	۱/۸۰	۱/۵۶	۰/۴۷	۰/۳۲	۸۵
	T. monspeliaca	۱۰	۱/۳۶	۱/۴۰	۰/۳۴	۰/۲۳	۶۴
	T. persica	۵	۱/۳۸	۱/۳۵	۰/۳۲	۰/۲۱	۶۱
	T. stellate	۳	۱/۰۵	۱/۲۴	۰/۲۱	۰/۱۴	۳۷
	T. uncata	۶	۱/۳۸	۱/۳۶	۰/۳۲	۰/۲۱	۶۰
	میانگین		۱/۲۵	۱/۳۲	۰/۲۷	۰/۱۸	۵۲/۳۸
URP	*T. anguina*	۳	۰/۷۶	۱/۰۶	۰/۰۶	۰/۰۴	۱۱/۰۱
	T. aurantiaca	۳	۰/۷۲	۱/۰۸	۰/۰۶	۰/۰۴	۱۰/۰۹
	T. Foenum-graecum	۵۰	۱/۷۵	۱/۵۲	۰/۴۴	۰/۲۹	۸۴/۴۰
	T. monantha	۱۰	۱/۷۶	۱/۶۲	۰/۵۱	۰/۳۵	۸۶/۲۴
	T. monspeliaca	۱۰	۱/۶۱	۱/۴۵	۰/۳۹	۰/۲۶	۷۶/۱۵
	T. persica	۵	۱/۳۷	۱/۴۱	۰/۳۴	۰/۲۳	۵۷/۸۰
	T. stellate	۳	۰/۹۹	۱/۲۴	۰/۱۹	۰/۱۳	۳۰/۲۸
	T. uncata	۶	۱/۳۹	۱/۳۴	۰/۳۱	۰/۲۰	۵۷/۸۰
	میانگین		۱/۲۹	۱/۴۳	۰/۲۹	۰/۱۹	۵۱/۷۲
SCoT + URP	*T. anguina*	۳	۰/۶۹	۱/۰۸	۰/۰۷	۰/۰۵	۱۲/۹۲
	T. aurantiaca	۳	۰/۷۱	۱/۰۸	۰/۰۶	۰/۰۴	۱۱
	T. Foenum-graecum	۵۰	۱/۷۴	۱/۴۷	۰/۴۲	۰/۲۸	۸۴/۶۹
	T. monantha	۱۰	۱/۷۸	۱/۵۹	۰/۴۹	۰/۳۳	۸۵/۶۵
	T. monspeliaca	۱۰	۱/۴۸	۱/۴۳	۰/۳۷	۰/۲۵	۷۰/۳۳
	T. persica	۵	۱/۳۷	۱/۳۸	۰/۳۳	۰/۲۲	۵۹/۳۳
	T. stellate	۳	۱/۰۲	۱/۲۴	۰/۱۹	۰/۱۳	۳۳/۴۹
	T. uncata	۶	۱/۳۸	۱/۳۵	۰/۳۱	۰/۲۱	۵۸/۸۵
	میانگین		۱/۲۷	۱/۳۳	۰/۲۸	۰/۱۹	۵۲/۰۳

Na، Ne، I، H، و PPL به‌ترتیب نشان دهنده تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص شانون، شاخص تنوع ژنی نی، و درصد جایگاه‌های ژنی چندشکل می‌باشند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

در رابطه با میزان تنوع ژنتیکی موجود در این گونه مطالعات مختلفی بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی نیز صورت گرفته است که نتایج آن‌ها بیانگر وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون این گونه می‌باشد. به‌عنوان نمونه، Esamaeilinejad (2019) Hasaroeih et al. با ارزیابی ٤٠ اکوتیپ از این گونه با نشانگرهای مورفولوژیکی استفاده کردند و نتایج آن‌ها نشان داد از نظر تعداد برگ، تعداد گل، وزن هزار دانه، رنگ دانه و سایر صفات کمی و کیفی تنوع بالایی در بین اکوتیپ‌های بررسی شده وجود دارد. Asghari Lalami et al. (2013) نیز تنوع ژنتیکی موجود در ۱۵ اکوتیپ *T. monantha* را با استفاده از ۳۰ صفت مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی ارزیابی کردند و نشان دادند سطح بالایی از تنوع در بین اکوتیپ‌های بررسی شده وجود داشت. علاوه بر این گونه، *T. foenum-graecum* دیگر گونه‌ای بود که دارای بیشترین میزان تنوع ژنتیکی بود. Dangi et al. (2004) نیز با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را درون اکوتیپ‌های این گونه گزارش کردند. نتایج مطالعه Ahari (2014) et al. نیز نشان از وجود سطح بالایی از تنوع مولکولی در این گونه از شنبلیله بود. به‌طور کلی از این‌رو، نتایج این پژوهش با سایر نتایج به‌دست آمده در ارتباط با تنوع ژنتیکی مطابقت نشان داد.

گروه‌بندی اکوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه‌ای و بر مبنای ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد انجام شد. دندروگرام به‌دست آمده از ماتریس ضرایب تشابه ژنتیکی از نشانگرهای SCoT نشان داد ۹۰ اکوتیپ بررسی شده در دو گروه اصلی گروه‌بندی شدند. گروه اول خود به دو زیر گروه تفکیک شده است که تمامی ۵۰ اکوتیپ از گونه *T. foenum-graecum* می‌باشد که در این گروه قرار گرفتند. گروه دوم شامل دو زیر گروه اصلی بود که تمامی ۱۰ اکوتیپ از گونه *T. monantha* در اولین زیر گروه در این گروه قرار گرفتند. زیر گروه دوم از گروه دوم شامل چندین زیر گروه بود که اکوتیپ‌های گونه *T. uncata* به همراه دو اکوتیپ از سه اکوتیپ گونه *T. stellate* و دو اکوتیپ از سه اکوتیپ گونه *T. anguina* در یک زیر گروه فرعی قرار گرفتند. هر سه اکوتیپ مربوط به گونه *T. aurantiaca* و تمام اکوتیپ‌های *T. persica* نیز در یک زیر گروه فرعی قرار گرفتند. تعداد نه اکوتیپ از ۱۰ اکوتیپ گونه *T. monspeliaca* به‌همراه یک اکوتیپ از سه اکوتیپ گونه‌های *T. anguina* و *T. stellata* در یک زیر گروه فرعی قرار گرفتند. همچنین یکی از اکوتیپ‌های گونه *T. monspeliaca* به تنهایی در یک زیر گروه فرعی از گروه دوم قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۹۰ اکوتیپ شنبلیله براساس داده‌های نشانگر SCoT.

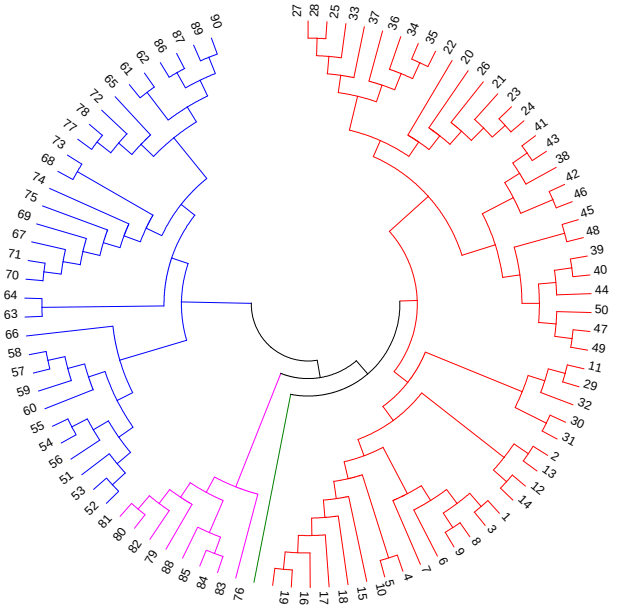
بر اساس نشانگرهای URP نیز کلیه اکوتیپ‌های مورد بررسی در چهار گروه اصلی تفکیک شدند. گروه اول شامل تمامی اکوتیپ‌های مربوط به گونه *T. foenum-graecum* بود. یکی از اکوتیپ‌های گونه *T. monspeliaca* به تنهایی در گروه دوم قرار گرفت. گروه سوم نیز در برگیرنده هر سه اکوتیپ مربوط به گونه *T. aurantiaca* و تمام اکوتیپ‌های *T. persica* بود. گروه چهارم شامل سایر اکوتیپ‌های مربوط به دیگر گونه‌ها بود (شکل ۲). تجزیه خوشه‌ای بر اساس ترکیب داده‌های SCoT و URP الگوی گروه‌بندی بسیار جامع‌تری را نشان داد. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، ۹۰ اکوتیپ شنبلیله در ٤ گروه اصلی جای گرفتند. گروه اول به‌صورت کاملاً مجزا در برگیرنده تمامی اکوتیپ‌های *T. foenum-graecum* بود. مشابه با نشانگر URP،

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

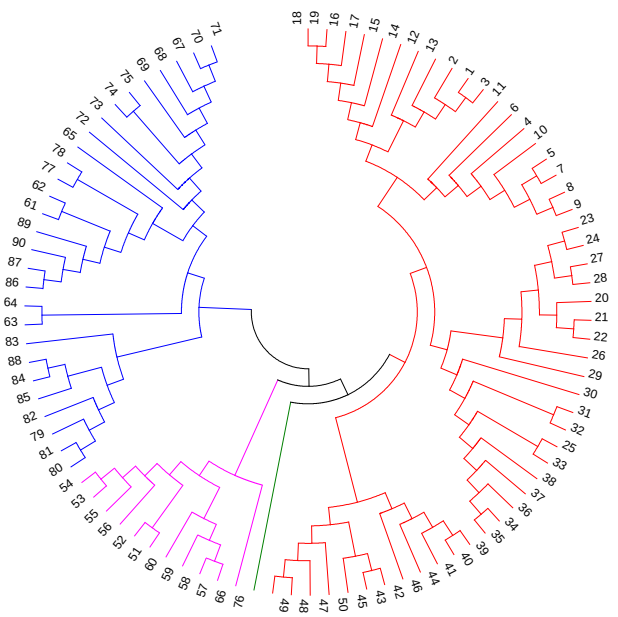
یکی از اکوتیپ‌های گونه *T. monspeliaca* به تنهایی در گروه دوم قرار گرفت. گروه سوم شامل اکوتیپ‌های گونه *T. monantha* بود. سایر اکوتیپ‌های دیگر در گروه چهارم قرار گرفتند. با بررسی نحوه قرارگیری اکوتیپ‌ها در سایر گروه‌های مختلف در این گروه مشخص شد اکوتیپ‌های مربوط به هر گونه به‌صورت کاملاً مجزا در کنار هم و در یک زیر گروه جداگانه از سایر اکوتیپ‌ها متمایز شدند. با بررسی روند توزیع و گروه‌بندی نمونه‌های بررسی شده مشخص است که نشانگرهای SCoT نسبت به URP دارای قابلیت بالاتری از تفکیک نمونه‌ها بر اساس واحدهای تاکسونومی می‌باشد. با این‌حال زمانی که داده‌های به‌دست آمده از این نشانگر با نشانگرهای URP ترکیب شده قدرت تمایزی آن بیشتر شده و در نهایت منجر به گروه‌بندی کاملاً مشخصی بر اساس هر گونه شده است. در واقع با توجه به این نتایج می‌توان اظهار داشت قدرت ترکیب‌پذیری نشانگرهای SCoT با سایر نشانگرهای مولکولی بالا بوده و خود نشان‌دهنده توانایی و کارایی بالایی آغازگرهای SCoT جهت استفاده از آن‌ها در برنامه‌های ژنتیکی همچون اشباع نقشه‌های ژنتیکی، تجزیه ارتباطی و غیره می‌باشد. پیش از این در بسیاری از مطالعات قبلی نیز به قابلیت نشانگرهای SCoT در تفکیک نمونه‌های مختلف بر اساس ساختارهای ژنومی و واحدهای تاکسونومی آن‌ها اشاره شده است (Daneshmand et al. 2017; Pour-Aboughadareh et al. 2017; Pour-Aboughadareh 2018; Etminan et al. 2018; Qaderi et al. 2019).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مشخص شده سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های شنبلیله وجود دارد به‌طوری که این تنوع می‌تواند به‌عنوان سنگ‌بنای اولیه برای برنامه‌های پیش به‌نژادی و ایجاد جمعیت‌های پایه برای اصلاح و یا بهبود ارقام زراعی آن مورد توجه و استفاده قرار گیرد. از دیگر نتایج به‌دست آمده از این پژوهش وجود تنوع درون گونه‌ای بالا در گونه *T. foenum-graecum* و *T. monantha* اشاره کرد که با توجه به دارا بودن خواص دارویی آن‌ها می‌توانند به‌عنوان منبع ژنی برای جستجوی ژن‌ها و حتی آلل‌های مؤثر در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در نظر گرفته شوند. قابلیت بهتر نشانگرهای SCoT نسبت به URP در ارائه چندشکلی بالاتر و تفکیک بهتر گونه‌های مختلف از یکدیگر از دیگر نتایج قابل توجه به‌دست آمده از تحقیق بود.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۹۰ اکوتیپ شنبلیله براساس داده‌های نشانگر URP.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۹۰ اکوتیپ شنبلیله براساس ترکیب داده‌های نشانگر SCoT و URP.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

منابع

Aggarwal R, Sharma V, Kharbikar LL (2008) Molecular characterization of *Chaetomium* species using URP-PCR. Genetics and Molecular Biology 31:943-946.

Aggarwal R, Singh VB, Shukla R, Gurjar MS, Gupta S, Sharma TR (2010) URP-based DNA fingerprinting of Bipolaris sorokiniana isolates causing spot blotch of wheat. Journal of Phytopathology 158:210-216.

Ahari DS, Hassandokht MR, Kashi AK, Amri A (2014) Evaluation of genetic diversity in Iranian fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) landraces using AFLP markers. Seed and Plant Improvement Journal 30:155-171.

Ahmadi J, Fabriki-Ourang S, Pour-Aboughadareh A (2019) Evaluation of genetic diversity in Aegilops populations possessing D genome using SCoT and TRAP markers. Modern Genetic Journal 14:219-228.

Asghari Lalemi S, Naghavi MR, Miri SM (2013) Morphological and trigonellin study of seven ecotypes of *Trigonella monantha* ssp. *noeana* in Iran. pp. 240. In: Proceedings of 1st National Conference of Medicinal Plants and Agriculture. Hamedan.

Collard BCY, Mackill DJ (2009) Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter 27:86-93.

Daneshmand H, Etminan AR, Qaderi A (2017) Diversity evaluation of Trigonella foenum- graecum populations using DNA markers and phytochemical characteristics. Journal of Medicinal Plants 63.

Dangi R, Lagu MD, Choudhary LB, Ranjekar P, Gupta VS (2004) Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenu-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. BMC Plant Biology 4:13.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19:11-15.

Esamaeilinejad N, Ghanavati F, Moradi F, Abbasi Kohpalkani, Rahimizadeh M (2019) Genetic diversity in wild ecotypes of fenugreek (*Trigonella monantha* C. A. Mey.) based on morphological traits. Seed and Plant Improvement Journal 2:211-239.

Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Noori A, Ahmadi Rad A, Shooshtari L, Mahdavian Z, Yousefiazar-Khanian M (2018) Genetic relationships and diversity among wild Salvia accessions revealed by ISSR and SCoT markers. Biotechnology & Biotechnological Equipment 32:610-617.

Farsi M, Zolali J (2011) Principles of Plant Biotechnology. Publications University of Mashhad.

Gorji AM, Poczai P, Polgar Z, Taller J (2011) Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. American Journal of Potato Research 88:226-237.

Han DS, Hong SK, Kang HW (2012) Genetic diversity of *Penicillium* isolates isolated from pears with postharvest decay in storage. The Korean Journal of Mycology 40:11-18.

Hasanzadeh E, Rezazadeh S, Shamsa S, Dolatabadi R, Zarringhalam J (2010) Review on phytochemistry and Therapeutic properties of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*). Journal of Medicinal Plants 9:1-18.

Jana TK, Singh NK, Koundal KR, Sharma TR (2005) Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URPPCR. Canadian Journal of Microbiology 51:159-164.

Kang HW, Park DS, Go SJ, Eun MY (2002) Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. Molecules and Cells 13:281-7.

Kang HW, Park DS, Go SJ, Eun MY (2002) Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. Molecules and Cells 13:281-287.

Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird EM Nonar N, Provan J, Powell, Waugh R (1997) Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Molecular Breeding 3:127-136.

Moradi P (2008) Study on genetic diversity of Iranian fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) landraces. Ph. D. thesis. Sciences and Research Branch, Islamic Azad University. Tehran, Iran.

Omid baigi, R (2004) Production and processing of medicinal plants. Astane Ghodse Razavi Publication. No: 149–Vol: 3–P: 397. (In Farsi).

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6:288-295.

Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etminan A, Moghaddam M (2018) Insight into the genetic variability analysis and relationships among some *Aegilops* and *Triticum* species, as genome progenitors of bread wheat, using SCoT markers. Plant Biosystem 152:694-703.

Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etminan A, Moghaddam M (2017a) Assessment of genetic diversity among Iranian *Triticum* germplasm using agro-morphological traits and start codon targeted (SCoT) markers. Cereal Research Communications 45:574-586.

Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2:225-238.

Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and Applied Genetics 98:107-112.

Qaderi A, Omidi M, Pour-Aboughadareh A, Poczai P, Shaghani J, Mehrafarin A, Nohoori M, Etminan A (2019) Molecular diversity and phytochemical variability in the Iranian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.): A baseline for conservation and utilization in future breeding programmes. Industrial Crops and Products 130:237-247.

Salahlou R, Safaie N, Shams-Bakhsh, M (2019) Using ISSR and URP-PCR markers in detecting genetic diversity among *Macrophomina phaseolina* isolates of sesame in Iran. Journal of Crop Protection 8:293-309.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

Sandor P, Kismanyoky A (2004) Comparative test of fenugreek (*Trigonella foenumgraceum* L.). Journal of Central European Agriculture 4:259-262.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology Evolution 28:2731–2739.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]