Archive of SID

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد 18، شمارهٔ 2، صفحهٔ 226-214 (1389)

بررسی تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های علف‌باغ (*Dactylis glomerata* L.) با استفاده از نشانگرهای RAPD

علی اصغری[1*]، الهام پناهی[3]، مجید شکرپور[2]، حمیدرضا محمددوست چمن آباد[2]، علی اکبر ایمانی[4] و امید سفالیان[2]

1*- نویسنده مسؤل مکاتبات، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی
پست الکترونیک: ali_asgharii@yahoo.com
2- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی
3- کارشناس‌ارشد، اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی
4- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل

تاریخ دریافت: 89/01/22 تاریخ پذیرش: 89/09/21

چکیده

تعیین تنوع ژنتیکی مواد گیاهی قبل از شروع برنامه‌های اصلاحی و مطالعات ژنتیکی ضروریست. در این مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین 15 اکوتیپ داخلی به همراه 7 اکوتیپ خارجی و 3 اکوتیپ با مبدأ نامشخص علف‌باغ با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد مطالعه قرار گرفتند. از 40 آغازگر مورد ارزیابی، 8 آغازگر 73 نوار چندشکل تولید کردند. تعداد کل نوارهای چندشکل در درون اکوتیپ‌ها از 25 تا 49 نوار متغیر بود. میانگین تنوع ژنتیکی کل و درون اکوتیپ‌ها به‌ترتیب 0/291 و 0/181 و ضریب تمایز ژنی 0/378 برآورد شد. تجزیه واریانس مولکولی نیز نشان داد که بخش اعظم تغییرپذیری در درون اکوتیپ‌ها (78/28٪) می‌باشد. براساس تجزیه خوشه‌ای، 25 اکوتیپ علف‌باغ در 8 گروه مجزا قرار گرفتند. گروه‌بندی براساس داده‌های مولکولی انطباقی با گروه‌بندی جغرافیایی اکوتیپ‌ها نداشت. در تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی، سه مؤلفه اول 59/48 درصد از تغییرات را توجیه کردند. گروه‌بندی اکوتیپ‌ها با استفاده از دو مؤلفه هماهنگ اول و دوم نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تا حدودی تأیید کرد. تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مورفولوژیکی، اکوتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد ولی تطابق زیادی بین نتایج حاصل از داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی مشاهده نشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، می‌توان گفت تنوع ژنتیکی زیادی در درون اکوتیپ‌های علف‌باغ وجود دارد و در گزینش ارقام مطلوب می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. از اکوتیپ‌های با فاصله ژنتیکی بیشتر نیز می‌توان به منظور تلاقی در جهت تولید نسل‌های در حال تفرق، جمعیت‌های پایه برای مکان‌یابی ژن‌ها و بهره‌مندی از پدیده هتروزیس استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: علف‌باغ، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، RAPD.

مقدمه

گراس‌ها از مهمترین گیاهان مرتعی هستند که به لحاظ تولید علوفه، احداث چراگاه‌ها، حفاظت و جلوگیری از فرسایش خاک اهمیت زیادی دارند (Moradi & Jafari, 2006). علف‌باغ (*Dactylis glomerata* L.) یکی از مهمترین گراس‌های علوفه‌ای دگرگرده‌افشان است که به طور وسیعی در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری جهان رشد می‌کند (Stratton & Sleper, 1979). امروزه کشت و زرع

www.SID.ir

Archive of SID

این گیاه به‌عنوان علوفه خالص، ایجاد چراگاه‌های طبیعی به صورت مخلوط با سایر گرامینه‌های مرتعی یا با یک یا دو نوع از لگوم‌ها در برنامه‌های احیای مراتع قرار گرفته است. علف‌باغ به صورت علوفه نیز برداشت می‌شود. بعد از چرا یا برداشت به‌سرعت رشد می‌کند و عملکرد علوفه خوبی در سال‌های دوم و سوم دارد. این گیاه به طور نسبی به سرما مقاوم است و در سایه و خاک‌های فقیر و کم عمق به خوبی رشد می‌کند (Sanderson & Elwnger, 2002; Dabkeviciene *et al.*, 2007). این در حالی است که در ایران سطح وسیعی از مراتع استان‌های شمالی، رشته کوه‌های البرز و زاگرس واجد این گیاه بوده و از آن به منظور چرای مستقیم دام و یا برداشت علوفه استفاده می‌شود. آگاهی در مورد تنوع ذخایر توارثی و ارتباط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها، کمک بزرگی در راستای توسعه برنامه‌های به‌نژادی می‌باشد و ارزیابی جمعیت‌های زراعی و وحشی در نگهداری و به کارگیری شایسته از ذخایر توارثی با ارزش ضروری به نظر می‌رسد. در واقع پیشبرد ژنتیکی هر موجودی وابسته به وجود و وسعت تنوع ژنیتکی آن است (Dellaporta *et al.*, 1993; Santalla *et al.*, 1998). بررسی تنوع ژنتیکی با روش‌های مختلفی امکان‌پذیر است که از میان این روش‌ها نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR (Polymerase Chain Reaction) روش‌های قدرتمندی برای شناسایی چندشکلی DNA و بررسی تنوع ژنتیکی هستند. نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند و تعداد زیادی از این نشانگرها را می‌توان به راحتی در کل ژنوم جستجو نمود (Chawla, 2000).

تکنیک RAPD نیز یکی از روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌باشد که به علت عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی DNA الگو جهت طراحی و ساخت آغازگرها، عدم نیاز به مواد رادیواکتیو، نیاز به مقدار نسبتاً کم DNA، هزینه کم، سهولت اجرا، قابل مشاهده بودن نتایج در زمان کوتاه و سطح بالای چند شکلی، در بررسی تنوع ژنتیکی بیشتر گونه‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Mackill, 1995). هرچند باید خاطر نشان کرد که در شرایط آزمایشی غیر استاندارد، تکرارپذیری نشانگرهای RAPD کاهش می‌یابد (Chawla, 2000; Manual, 2002). با وجود این، مطالعاتی در رابطه با تنوع ژنتیکی و توارث صفات در جمعیت‌های علف‌باغ با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام شده است (Tuna, *et al.*, *et al.*, 2008; Kolliker *et al*., 1999; 2004; Zeng,).

در ایران اکوتیپ‌های مختلفی از علف‌باغ وجود دارند که تا کنون خصوصیات و قرابت ژنتیکی آن‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی مطالعه نشده است. این مطالعه به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون اکوتیپ‌های علف‌باغ و گروه‌بندی آن‌ها برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی انجام شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل 15 اکوتیپ از مناطق مختلف ایران (ساری، قزوین، مرند، کرج، بیجار، تبریز، گرگان، ملایر، همدان)، 7 اکوتیپ خارجی از کشورهای آمریکا، اسپانیا، استونی و روسیه و 3 اکوتیپ با مبدأ نامشخص بود (جدول 1). بذر اکوتیپ‌های مورد بررسی در گلخانه کشت و 5 بوته از هر اکوتیپ انتخاب و در مرحله چهار برگی از هر کدام به طور جداگانه نمونه برگی برداشت شد. استخراج DNA به روش CTAB مطابق با روش Krizman و همکاران (2006) انجام گردید. کیفیت

www.SID.ir

Archive of SID

و کمیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین شد. غلظت DNAهای استخراج شده به میزان 25 نانوگرم در میکرولیتر رقیق و برای واکنش PCR استفاده شد. در واکنش‌های PCR برای تکثیر DNA ژنومی از آغازگرهای تصادفی RAPD شماره یک تا40 (شرکت Metabion آلمان) استفاده شد. واکنش PCR در حجم 15 میکرولیتر شامل: (6/31 میکرولیتر از محلول Master mix red (2x) شرکت Ampliqon، 6/31 میکرولیتر آب، 2 میکرولیتر DNA (25 نانوگرم در میکرولیتر)، 0/392 میکرولیتر آغازگر (5 میکرومول) انجام شد.

چرخه‌های حرارتی به‌ترتیب شامل: واسرشته سازی اولیه 10 دقیقه در 94 درجه سانتی‌گراد و سپس 40 چرخه مشتمل بر واسرشته‌سازی DNA (1 دقیقه در 94 درجه سانتی‌گراد)، اتصال آغازگر (1 دقیقه در 34 درجه سانتی‌گراد) و بسط آغازگر (2 دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد) و در نهایت یک چرخه 5 دقیقه‌ای در 72 درجه سانتی‌گراد به منظور بسط نهایی بودند. محصولات تکثیر شده توسط PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز 1/5 درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکارسازی شدند. وجود و عدم وجود نوار با اعداد صفر و یک برای افراد مورد مطالعه، کدگذاری شد. به این ترتیب تعداد کل نوارهای چندشکل، تعداد نوارهای چندشکل در هر اکوتیپ محاسبه گردید. تنوع ژنتیکی کل (H_T) و درون (H_S) اکوتیپ‌ها و درجه تمایز ژنی ($G_{st}=(H_T-H_S)/H_T$)، میزان تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌ها برای هر نشانگر براساس شاخص تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانون با استفاده از نرم‌افزار POPGENE برآورد گردیدند. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) براساس مربع فاصله اقلیدسی، برای تفکیک واریانس مولکولی به واریانس بین و درون اکوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار ARLEQUIN انجام شد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از فاصله ژنتیکی نی و تجزیه به مؤلفه-های هماهنگ اصلی نیز براساس همین فاصله با استفاد از نرم‌افزار NTSYS انجام شدند.

در این مطالعه برای اطمینان از وجود تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها از نظر صفات مورفولوژیکی، از میانگین صفات عملکرد خشک و تر علوفه در واحد کرت (کیلوگرم)، ارتفاع بوته (سانتی‌متر) و تعداد روز تا مرحله گلدهی که طی سال‌های 1387 و 1388 در مزرعه مرکز تحقیقات کشاورزی اردبیل اندازه‌گیری شده بودند، استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از فاصله‌های اقلیدسی و روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج

در این پژوهش تعداد 8 آغازگر از 40 آغازگر ارزیابی شده RAPD الگوی نواربندی مناسبی ایجاد کردند. این آغازگرها در مجموع 73 نوار چندشکل در محدوده 564 تا 4268 جفت باز با میانگین 9/125 نوار به‌ازای هر آغازگر تولید کردند. تعداد نوار به‌ازای هر آغازگر از 7 نوار برای آغازگرهای 25 و 16 تا 13 نوار برای آغازگر 9 متغیر بود (جدول 1). تعداد کل نوارهای چند شکل درون اکوتیپ‌های مورد بررسی علف‌باغ از 25 نوار تا 49 نوار متغیر بود، به‌طوری که میانگین تعداد نوار از 3/13 نوار در اکوتیپ 1453 تا 6/13 نوار در اکوتیپ‌های 1261 و 10112 متفاوت بود (جدول 1). در بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر شماره 9 بیشترین تعداد نوار چند شکل را تولید کرد. به‌طوری که، از 2 نوار چند شکل در اکوتیپ

www.SID.ir

Archive of SID

197 تا 11 نوار چند شکل در اکوتیپ‌های 1053 و 1058 متغیر بود. از طرف دیگر آغازگرهای 25 و 16 کمترین تعداد نوار چند شکل را تولید کردند و آغازگرهای 25، 13 و 1 در برخی از اکوتیپ‌ها چندشکلی نشان ندادند (جدول 1).

براساس شاخص تنوع ژنی نی (Nei, 1973) تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌های علف‌باغ براساس 8 آغازگر RAPD برآورد گردید. بیشترین میانگین سطح این تنوع در اکوتیپ 1261 مشاهده شد (0/23) و کمترین میزان آن در اکوتیپ 1453 بود (0/12). از نظر شاخص اطلاعات شانون نیز بیشترین مقدار به اکوتیپ 1094 (با میانگین تنوع ژنی نی برابر 0/22) و کمترین مقدار آن (0/12) مربوط به اکوتیپ 1453 بود. سطح تنوع ژنتیکی بقیه اکوتیپ‌های مورد مطالعه بین این دو مقدار بود (جدول 2). نتایج نشان دادند که تنوع نسبتاً خوبی در درون اکوتیپ‌های علف‌باغ وجود دارد. به‌طوری که میانگین تنوع ژنتیکی کل (H_T) و درون (H_s) اکوتیپ‌های علف‌باغ به‌ترتیب 0/291 و 0/181 و میانگین درجه تمایز ژنی (G_{st}) بین اکوتیپ‌ها براساس 8 آغازگر (0/378) برآورد شدند. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نیز نشان داد که تنوع ژنتیکی بین و درون اکوتیپ‌های علف‌باغ معنی‌دار است (جدول 3). از کل تنوع موجود در درون و بین اکوتیپ‌ها، 21/62 درصد از آن مربوط به بین اکوتیپ‌ها و 78/38 درصد آن مربوط به درون اکوتیپ‌ها بود.

در این بررسی، تجزیه خوشه‌ای براساس فاصله ژنتیکی نی (Nei, 1972) و به روش UPGMA انجام گرفت. فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها از 0/05 بین اکوتیپ‌های 1053 از کرج و 783 از قزوین، تا 0/24 بین اکوتیپ‌های 455 از تبریز و 1261 از آمریکا، با میانگین 0/126 متغیر بود (جدول 5). نمودار درختی به‌دست آمده در ضریب فاصله 0/13 قطع شد که در این حالت اکوتیپ‌ها به 8 گروه تقسیم شدند (شکل 1). گروه اول شامل اکوتیپ‌های 1773 (ساری)، 255 (مرند)، 197 (کرج)، 1072 (کرج)، 1250 (نامشخص)، 10155 (نامشخص)، 265 (قزوین) و 10112 (کرج)، گروه دوم شامل اکوتیپ‌های 628 (بیجار)، 1053 (کرج)، 783 (قزوین) و 1058 (اسپانیا)، گروه سوم شامل اکوتیپ 1668 (آمریکا)، گروه چهارم شامل اکوتیپ‌های10- 10095 (ساری)، 10113 (کرج)، 10505 (گرگان) و 1455 (ملایر)، گروه پنجم شامل اکوتیپ‌های 1094 (نامشخص) و 1261 (آمریکا)، گروه ششم شامل اکوتیپ‌های 1557 (روسیه)، 1551 (روسیه)، 1453 (همدان) و 1556 (استونی)، گروه هفتم شامل اکوتیپ 455 (تبریز) و گروه هشتم شامل اکوتیپ 1054 (اسپانیا) بود. سه اکوتیپ 455، 1054 و 1668 که در سه گروه مجزا قرار گرفتند، در فواصل ژنتیکی بالاتر به گروه‌های دیگر می‌پیوندند. در این گروه‌بندی، مطابقتی بین الگوی تنوع ژنتیکی و الگوی توزیع جغرافیایی مشاهده نشد. در مطالعه‌ای که توسط Tuna و همکاران (2008)، روی 57 جمعیت علف‌باغ انجام شد، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و با استفاده از شاخص فاصله ژنتیکی نی (Nei) نتوانست به وضوح جمعیت‌های مورد بررسی را از هم تفکیک کند.

تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی نیز بر روی داده‌های حاصل از نشانگرهای RAPD انجام شد و سه مؤلفه هماهنگ اول تنها 59/48 درصد از کل واریانس را توجیه کردند. سهم سه مؤلفه هماهنگ اول به‌ترتیب برابر 27/25، 18/17 و 14/1 درصد بود. سهم کم مؤلفه‌های اول در توجیه واریانس کل بیانگر این است که نشانگرهای RAPD، به اندازه کافی در ژنوم پراکنده بوده و در واقع نمونه‌برداری از قسمت‌های مختلف ژنوم انجام شده است و

www.SID.ir

Archive of SID

همبستگی بین نشانگرها پایین می‌باشد. گروه‌بندی اکوتیپ‌ها با استفاده از دو مؤلفه هماهنگ اصلی تا حدودی توانست اکوتیپ‌های مورد مطالعه را مطابق با روش تجزیه خوشه‌ای از هم جدا کند (شکل 3).

www.SID.ir

جدول 1- تعداد نوارهای چندشکل تولید شده توسط 8 آغازگر RAPD در اکوتیپ‌های علف‌باغ

اکوتیپ	آغازگر شماره 24 5`ACAGG GCTCA3`	آغازگر شماره 25 5`ACAGG GGTGA3`	آغازگر شماره 6 5`CCTGG GCCTA3`	آغازگر شماره 13 5`CCTGG GTGGA3`	آغازگر شماره 18 5`GGGCC GTTTA3`	آغازگر شماره 16 5`GGTGG CGGGA3`	آغازگر شماره 1 5`CCTGG GCTTC3`	آغازگر شماره 9 5`CCTGC GCTTA3`	تعداد کل نوارهای چندشکل	میانگین نوارهای چند شکلی
1773 (ساری)	8	5	9	1	6	3	2	9	43	5/38
1668 (آمریکا)	5	1	6	0	6	1	2	6	27	3/38
265 (قزوین)	4	3	7	6	7	5	4	3	39	4/88
255 (مرند)	10	2	7	5	5	4	4	8	45	5/63
197 (کرج)	5	2	4	3	3	4	3	2	26	3/25
628 (بیجار)	6	2	8	2	9	4	3	9	43	5/38
1053 (کرج)	10	1	3	1	7	3	3	11	39	4/88
783 (قزوین)	5	1	4	1	8	7	2	6	34	4/25
455 (تبریز)	6	3	4	2	7	6	3	3	34	4/25
1058 (اسپانیا)	10	4	8	4	1	3	4	11	45	5/63
1094 (نامشخص)	4	5	8	4	7	2	5	9	44	5/5
1261 (آمریکا)	6	3	8	8	7	6	4	7	49	6/13
1072 (کرج)	10	4	5	3	7	2	2	7	40	5
1250 (نامشخص)	7	3	5	4	6	4	2	6	37	4/63
1054 (اسپانیا)	6	2	4	4	1	2	2	8	29	3/63
10112 (کرج)	9	6	9	8	3	4	3	7	49	6/13
10155 (نامشخص)	8	4	6	3	8	6	0	5	40	5
10095-10 (ساری)	9	5	7	2	7	3	4	5	43	5/38
10113 (کرج)	8	3	2	3	6	3	4	8	37	4/63
10505 (گرگان)	8	3	5	2	3	3	7	4	35	4/38
1455 (ملایر)	4	3	5	2	8	5	5	5	37	4/63
1557 (روسیه)	9	3	3	2	4	5	1	6	33	4/13
1551 (روسیه)	8	4	3	1	5	3	3	4	31	3/88
1556 (استونی)	7	3	3	3	2	2	4	3	27	3/38
1453 (همدان)	5	0	2	3	3	3	4	5	25	3/13
تعداد نوار چندشکل در اکوتیپ‌ها	11	7	10	8	9	7	8	13	73	9/125

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2- میانگین تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌های علف‌باغ با استفاده از شاخص تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانون براساس73 نشانگر RAPD

اکوتیپ‌ها	میانگین تنوع	شاخص شانون	اکوتیپ‌ها	میانگین تنوع	شاخص شانون	اکوتیپ‌ها	میانگین تنوع	شاخص شانون	اکوتیپ‌ها	میانگین تنوع	شاخص شانون
1773	0/21	0/32	783	0/17	0/19	1250	0/18	0/24	10505	0/17	0/26
1668	0/14	0/21	455	0/16	0/24	1054	0/14	0/27	1455	0/19	0/28
265	0/19	0/29	1058	0/22	0/28	10112	0/22	0/32	1557	0/16	0/25
255	0/21	0/26	1094	0/22	0/35	10155	0/19	0/29	1551	0/15	0/22
197	0/13	0/19	1261	0/23	0/19	10095	0/19	0/29	1556	0/14	0/20
628	0/20	0/27	1072	0/19	0/27	10113	0/20	0/29	1453	0/12	0/16
1053	0/21	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

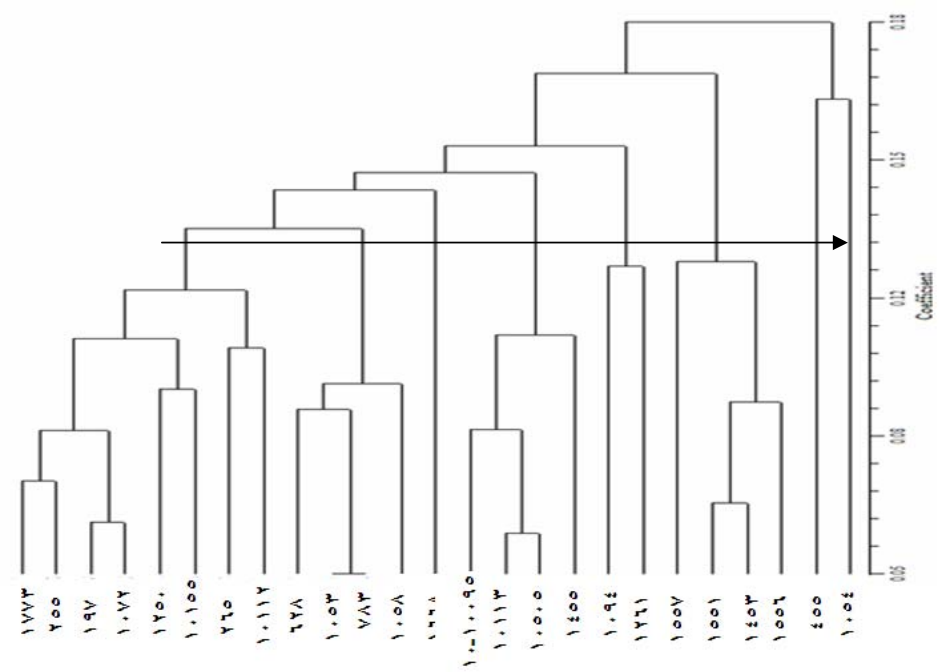
جدول 3- تجزیه واریانس مولکولی برای 25 اکوتیپ علف‌باغ براساس 73 نشانگر RAPD

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	اجزای واریانس	درصد واریانس	F
بین اکوتیپ‌ها	24	72/984	0/3526**	21/62	
درون اکوتیپ‌ها	100	128/8	1/278**	78/38	0/22

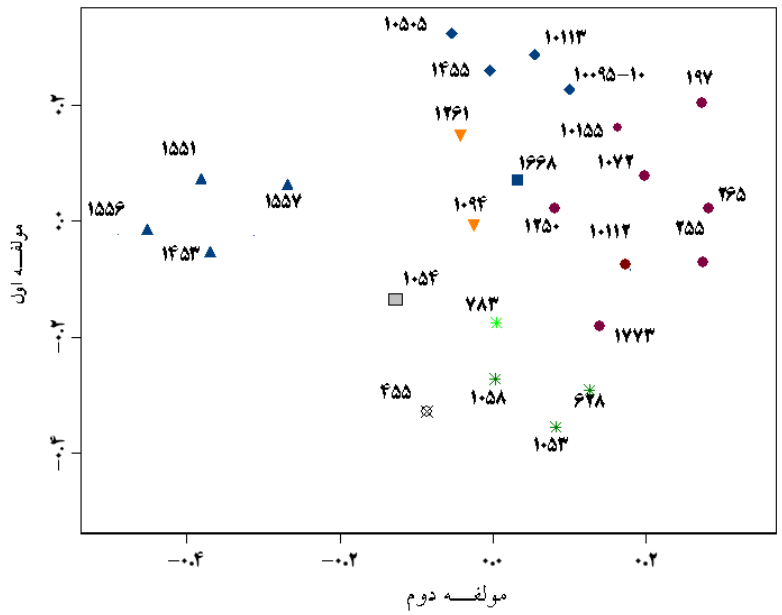
** معنی دار در سطح احتمال 1٪

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 1- گروه‌بندی اکوتیپ‌های علف‌باغ براساس داده‌های RAPD با استفاده از روش UPGMA و فاصله ژنتیکی نی



شکل2 - نمایش دو بعدی اکوتیپ‌های علف‌باغ براساس دو مؤلفه هماهنگ اول و دوم

www.SID.ir

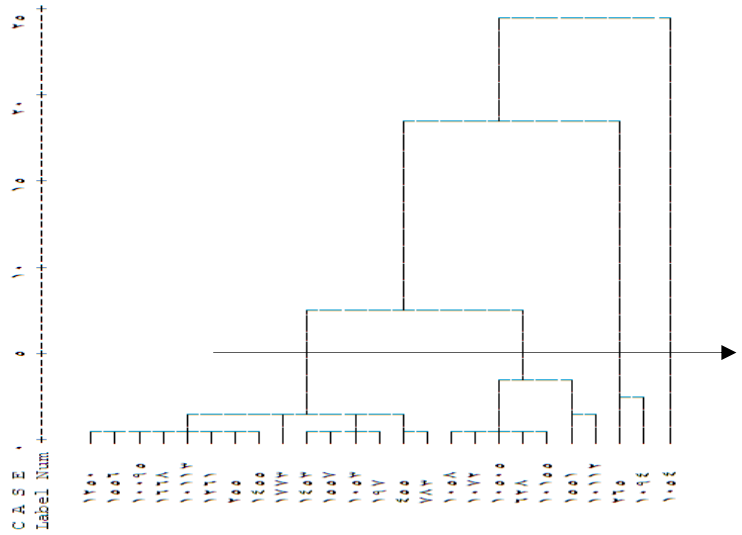
Archive of SID

تجزیه خوشه‌ای با بکار بردن صفات مورفولوژیکی، اکوتیپ‌های مورد مطالعه را به چهار گروه مجزا تقسیم کرد (شکل 3). این چهار گروه در تجزیه واریانس چند متغیره اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0/01$) با هم داشتند. در تجزیه واریانس تک متغیره نیز بین اکوتیپ‌ها بجز در صفت وزن تر علوفه، در سه صفت دیگر در سطح احتمال 1 درصد اختلاف معنی‌دار مشاهد شد (نتایج آورده نشد). گروه اول شامل 15 اکوتیپ بود (جدول 4) که عملکرد علوفه خشک، تر و ارتفاع کمتری نسبت به میانگین کل داشتند و زمان لازم برای گلدهی آنها بیشتر بود. گروه دوم شامل اکوتیپ‌های با عملکرد و ارتفاع بیشتر بود که زودتر به گل می‌فتند. در گروه سوم اکوتیپ‌های با عملکرد بالا و پاکوتاه قرار گرفتند که دیرتر به گل می‌رفتند و در گروه چهار تنها اکوتیپ 1054 از اسپانیا قرار گرفت که یک اکوتیپ پابلند و با عملکرد بالا بود که به طور متوسط زودتر از بقیه اکوتیپ‌ها به گل می‌رفت (شکل 3 و جدول 4). در این مطالعه ارتباطی بین تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌ها و تنوع جغرافیایی آن‌ها مشاهده نگردید. در مطالعه دیگری نیز که توسط Mohammadi و همکاران (2008)، روی 21 جمعیت علف‌باغ انجام شده است، در تجزیه خوشه‌ای براساس صفات مورفولوژیکی تطابق خوبی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی مشاهده نشد. هرچند که، برای این نوع مطالعات باید تعداد اکوتیپ بیشتر با منشاء اقلیمی مشخص مورد بررسی قرار گیرد. قرار گرفتن اکوتیپ‌های خارجی با اکوتیپ‌های داخلی در یک گروه نیز ممکن است ناشی از شباهت ژنتیکی آنها به دلیل داشتن منشاء مشترک و یا به دلیل مشابهت اقلیمی این مناطق باشد.

در این مطالعه همچنین ماتریس فاصله‌ی حاصل از داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از آزمون مانتل با هم مقایسه شدند و همبستگی معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد که این مطلب در نتایج حاصل از گروه‌بندی اکوتیپ‌ها براساس دو سری داده نیز دیده می‌شود (شکل‌های 3 و 4). یکی از دلایل این مسئله می‌تواند این باشد که، داده‌های مولکولی هم به نقاط کد شونده و هم به نقاط غیر کد شونده ژنوم مربوط می‌شوند، در حالی‌که داده‌های مربوط به صفات مورفولوژیکی فقط شامل قسمت‌های کد شونده ژنوم (ژن‌ها) هستند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 3- گروه‌بندی اکوتیپ‌های علف‌باغ براساس میانگین صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده در طی دو سال (1387 و 1388) با استفاده از روش UPGMA.

جدول 4- گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس صفات مورفولوژیکی و آماره‌های مربوط به هر گروه

گروه	آماره	وزن خشک (kg)	وزن تر (kg)	ارتفاع بوته (cm)	تعداد روز تا گلدهی
گروه 1: 1250، 1556، 10095، 1668، 10113، 1261، 255، 1455، 1773، 1453، 1557، 1053، 197، 455، 783	میانگین	2/04	3/36	101/27	54/33
	خطای استاندارد	0/11	0/17	1/39	0/65
	انحراف از میانگین کل	-0/1	-0/14	-1/89	0/57
گروه 2: 1058، 1072، 10505، 628، 10155، 1551، 10112	میانگین	2/14	3/66	109/30	51/71
	خطای استاندارد	0/05	0/06	0/91	0/86
	انحراف از میانگین کل	0/1	0/16	6/14	-2/05
گروه 3: 265، 1094	میانگین	2/15	3/55	85/5	57/5
	خطای استاندارد	0/23	0/29	0/83	0/57
	انحراف از میانگین کل	0/01	0/50	-17/66	3/74
گروه 4: 1054	میانگین	2/9	4/3	124	52
	خطای استاندارد	0/08	0/13	1/76	0/64
	انحراف از میانگین کل	0/76	0/70	20/84	-1/76
میانگین کل		2/14	3/50	103/16	53/76

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

تولید تعداد نوار زیاد و میزان چند شکلی بالا در اکوتیپ-های مورد مطالعه نشان دهنده کارآیی نشانگرهای RAPD در ارزیابی تنوع درون و بین اکوتیپ‌ها در گیاه علف‌باغ بود. در این خصوص Tuna و همکاران (2004) تعداد 57 جمعیت علف‌باغ را با استفاده از نشانگرهای RAPD ارزیابی کردند. از 125 نوار تولید شده توسط 12 آغازگر، 40 نوار چندشکل بودند. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA سطح بالایی از جریان ژنی را در میان جمعیت‌های علف‌باغ نشان داد و کارآیی نشانگرهای RAPD در شناسایی تنوع درون و بین جمعیت‌های علف‌باغ مناسب بود. همچنین Zeng و همکاران، (2008) در ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های علف‌باغ، گزارش نمودند که نشانگرهای SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) و RAPD به‌ترتیب با نشان دادن 84/38 و 80/83 درصد چندشکلی، به خوبی توانستند جمعیت‌های مورد مطالعه را از هم تفکیک کنند. در این مطالعه چندشکلی نشانگرهای SRAP بیشتر از نشانگرهای RAPD بود. از این نشانگرهای مولکولی Kolliker و همکاران (1999) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی علف‌باغ استفاده کرده و کارآیی نشانگرهای RAPD در شناسایی تنوع بین و درون جمعیت-های علف‌باغ را به خوبی صفات مورفولوژیکی دانستند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت که تمایز اکوتیپ‌های علف‌باغ نسبتاً کم بوده و بیشترین مقدار تنوع مربوط به درون اکوتیپ‌ها می‌باشد و می‌توان از این اکوتیپ-ها به‌عنوان منبع بالقوه برای ژن‌های مختلف در برنامه‌های گزینش استفاده کرد. این نتیجه در گونه‌های با دگرگرده-افشانی بالا مورد انتظار است. ضمنا Kolliker و همکاران، (1999) در ارزیابی ساختار ژنتیکی واریته‌های سه گونه گراس علوفه‌ای مهم با استفاده از نشانگرهای RAPD نشان دادند که، بخش اعظم تنوع در درون واریته‌های هر یک از سه گونه می‌باشد. آن‌ها همچنین نشان دادند که تغییرپذیری ژنتیکی در درون واریته‌های *Festuca pratensis* (64/6٪) کم‌تر از تغییرپذیری ژنتیکی در درون واریته‌های *D. glomerata* (85/1٪) و *Lolium perenne* (82/4٪) می-باشد. آن‌ها علت این امر را میزان کم دگرگرده‌افشانی واریته-های *F. pratensis* نسبت به واریته‌های دو گونه دیگر دانستند. در این ارتباط Peng و همکاران، (2008) با استفاده از نشانگرهای AFLP اکوتیپ‌های با سطوح پلوئیدی متفاوت گیاه علف‌باغ را از هم تفکیک کرده و گزارش کردند که بیشترین مقدار تنوع ژنتیکی در درون سطوح پلوئیدی است.

نظر به این که اجرای هر برنامه اصلاحی متکی به وجود تنوع بوده و افزایش عملکرد کمی و کیفی علوفه نیز هدف اصلی برنامه‌های به‌نژادی و به‌زراعی می‌باشد، پس انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های تلاقی برای تولید هیبریدهایی با حداکثر هتروزیس امری ضروری می‌باشد. از آنجا که تلاقی بین ژنوتیپ‌های یک گروه از تجزیه خوشه‌ای تفرق مطلوبی از نظر صفات مطلوب و عملکرد نشان نمی‌دهد، پس برای تنظیم برنامه‌های تلاقی باید والدین دور از هم را که از گروه‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای هستند، انتخاب کرد. با افزایش فاصله ژنتیکی بین والدین، هتروزیس بیشتری در برنامه‌های تلاقی حاصل می‌شود (Humphreys, 1991). هم چنین تنوع زیادی در نتاج حاصل از تلاقی در نسل‌های در حال تفرق ایجاد می‌شود که در برنامه‌های گزینش برای صفات مطلوب مورد استفاده قرار می‌گیرد.

www.SID.ir

جدول 5 - ماتریس فاصله ژنتیکی نی بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه

اکوتیپ	1453	1556	1551	1557	1455	10505	10113	10095-10	10155	10112	1054	1250	1072	1261	1094	2058	455	783	1053	628	197	255	256	1668	1773
1773	0/187	0/168	0/149	0/120	0/149	0/189	0/155	0/124	0/104	0/098	0/176	0/104	0/076	0/172	0/125	0/098	0/174	0/134	0/118	0/075	0/101	0/073	0/120	0/126	0
1668	0/193	0/197	0/137	0/160	0/178	0/159	0/144	0/176	0/137	0/198	0/178	0/129	0/123	0/210	0/195	0/144	0/192	0/180	0/148	0/124	0/105	0/132	0/162	0	
256	0/220	0/225	0/204	0/183	0/163	0/183	0/115	0/153	0/162	0/105	0/199	0/121	0/112	0/161	0/150	0/159	0/178	0/150	0/168	0/153	0/092	0/116	0		
255	0/224	0/218	0/171	0/174	0/167	0/165	0/137	0/114	0/119	0/103	0/199	0/116	0/0783	0/186	0/158	0/109	0/202	0/142	0/134	0/111	0/088	0			
197	0/198	0/194	0/157	0/154	0/136	0/167	0/121	0/120	0/114	0/123	0/178	0/111	0/064	0/147	0/153	0/105	0/226	0/149	0/150	0/140	0				
628	0/140	0/178	0/152	0/151	0/145	0/187	0/149	0/134	0/124	0/140	0/155	0/126	0/127	0/170	0/125	0/101	0/091	0/083	0/097	0					
1053	0/162	0/175	0/155	0/143	0/151	0/150	0/139	0/150	0/153	0/172	0/117	0/146	0/142	0/181	0/163	0/088	0/161	0/051	0						
783	0/128	0/142	0/128	0/151	0/113	0/154	0/141	0/147	0/126	0/155	0/124	0/121	0/144	0/165	0/143	0/101	0/132	0							
455	0/185	0/238	0/182	0/193	0/218	0/218	0/196	0/223	0/195	0/226	0/164	0/178	0/198	0/244	0/205	0/174	0				0				
2058	0/189	0/149	0/155	0/129	0/136	0/177	0/165	0/130	0/137	0/137	0/170	0/113	0/101	0/133	0/123	0				0					
1094	0/149	0/149	0/153	0/162	0/151	0/157	0/140	0/139	0/139	0/146	0/179	0/138	0/114	0/124	0				0						
1261	0/233	0/177	0/215	0/178	0/150	0/174	0/145	0/135	0/159	0/177	0/172	0/126	0/142	0				0							
1072	0/175	0/176	0/130	0/123	0/142	0/164	0/122	0/121	0/098	0/125	0/163	0/089	0												
1250	0/146	15120	0/126	0/115	0/129	0/164	0/125	0/142	0/095	0/124	0/151														
1054	0/188	0/182	0/179	0/174	0/194	0/181	0/152	0/186	0/136	0/220	0														
10112	0/196	0/223	0/215	0/152	0/149	0/200	0/150	0/104	0/129	0															
10155	0/198	0/167	0/147	0/156	0/133	0/135	0/133	0/126	0																
10095-10	0/236	0/203	0/1990	0/168	0/096	0/099	0/072	0																	
10113	0/186	0/184	0/149	0/140	0/105	0/061	0																		
10505	0/212	0/177	0/156	0/183	0/122	0																			
1455	0/104	0/161	0/150	0/159	0																				
1557	0/068	0/120	0/116	0																					
1551	0/140	0/080	0																						
1556	0/186	0																							
1453	0																								

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

میانگین تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌هایی مانند 1094 و 1261 بیشترین مقدار بود (جدول 2) و این دو اکوتیپ در تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی در یک گروه قرار گرفتند (شکل 1). از این اکوتیپ‌ها می‌توان در برنامه‌های اصلاحی برای گزینش ارقام پرمحصول و حاوی صفات مطلوب استفاده کرد. به شرط این‌که، بین داده‌ها و صفات مورفولوژیکی رابطه وجود داشته باشد. در مطالعه مورفولوژیکی، اکوتیپ 1094 عملکرد تر و خشک بیشتری نسبت به میانگین اکوتیپ‌ها داشت. لذا می‌تواند به‌عنوان جمعیت پایه در برنامه‌های اصلاح بر مبنای گزینش مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به نتایج حاصل، می‌توان گفت که اگر شرایط آزمایشی کنترل شده باشند، نشانگرهای RAPD می‌توانند، وسیله مناسب و مؤثر در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های علف‌باغ و تکمیل‌کننده ارزیابی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی باشند. ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از این نشانگرها نشان داد که اکوتیپ‌های مورد بررسی منبع بالقوه برای ژن‌های مختلف هستند. به‌طوری که، می‌توان از تنوع موجود در بین و درون اکوتیپ‌ها در برنامه‌های اصلاح و گزینش علف‌باغ مانند گزینش ژنوتیپ‌های پر محصول، تلاقی به منظور تولید نسل‌های در حال تفرق، تولید جمعیت‌های مناسب برای مکان‌یابی ژن‌های صفات کمی و غیره استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

- Chawla, H.S., 2000. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers. Inc. USA.
- Dabkeviciene, G., Paplauskiene, V., Trakanovas, P., Lemeziene, N. and Liatukiene, M., 2007. Wild population of *Dactylis polygama* L. for the formation of genetic collection and breeding. Biology, 53: 12-15.
- Dellaporta, S.F., Wood, J. and Hick, J.B., 1993. A plant DNA miniperpartion, Version II. Plant Mol. Biol. Rep., 1: 19-21.
- Humphreys, M.O., 1991. A genetic approach to the multivariate differentiation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. Heredity, 66: 437-443.
- Krizman, M., Jakse, J., Baricevic, D., Javornik, B. and Prosek, M., 2006. Robust CTAB- activated charcoal protocol for plant DNA extraction. Acta Agriculturae Solvenica, 87: 427- 433.
- Kolliker, R., Stadelmann, F.J., Reidy, B. and Nosberger, J., 1999. Genetic variability of forage grass cultivars: A comparisom of *Festuca pratensis* Huds, *Lolium perenne* L. and *Dactylis glomerata* L. Euphytica, 106: 261- 270.
- Mackill, D.J., 1995. Classifying Japonica rice cultivars with RAPD markers. Crop Sci., 35: 889- 894.
- Manual, A., 2002. Mutant germplasm characterization using molecular markers. International atomic energy agency, Vienna. Joint FAO/ AEA Division of Nuclear Techniques IN Food and Agriculture.
- Mohammadi, R., Khaiam Nikouyi, M., Mirlohi, A., and Razmjou, Kh., 2008, Study genetic diversity of different population of *Dactylis glomerata* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 16: 14-36.
- Moradi, P. and Jafari, A.A., 2006. Comparative study of forage quality in 26 *Dactylis glomerata* genotypes in order to produce synthetic varieties in Zanjan provienc. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14: 175-180.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: 283-292.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Prov. Nat. Acad. Sci. USA. 70: 3321-3323.
- Peng, Y., Zhang, X., Deng, Y. and Ma, X., 2008. Evaluation of genetic diversity in wild orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) based on AFLP markers. Hereditas, 145: 174- 181.
- Sanderson, M.A. and Elwnger, G.F., 2002. Plant density and environment effects on orchardgrass- white clover mixture. Crop Sci., 42: 2055-2063.
- Santalla, M., Power, J. and Band, D., 1998. Genetic diversity in mung bean gerplasm revealed by RAPD marker. Plant Breeding, 117: 473-487.
- Stratton, S.D. and Sleper, D.A., 1979. Genetic variation and interrelations of several orchardgrass herbage. Crop Sci., 19: 477-481.
- Tuna, M., Khadka, D.K., Shrestha, M., Arumuganathan, K. and Golan- Goldhirsh, A., 2004. Characterization of natural orchardgrass (*Dactulis glomerata* L.) population of the Thrace Region of Turkey based on ploidy and DNA. Euphytica, 135: 39- 46.
- Zeng, B., Zhang, X.Q. and Lan, Y., 2008. Assessment of genetic diversity among *Dactylis glomerata* L. as determined by RAPD and SRAP. Acta Horticulturae, 783: 407-418.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of genetic diversity of *Dactylis glomerata* L. ecotypes using RAPD markers

A. Asghari[1*], E. Panahi [3], M. Shokrpou[2], A.A. Imani[4] and O. Sofalian[2]

1*- Corresponding author, Assis. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: ali_asgharii@yahoo.com

2- Assis. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

3- M.Sc., plant breeding, University of Mohaghegh Ardabili,

4- Assis. Prof, Islamic Azad University of Ardabil.

Received: 11.04.2010 Accepted: 12.12.2010

Abstract

Determining genetic diversity of plant materials is necessary in the beginning of any breeding program. In this study, genetic diversity within and among 15 orchardgrass ecotypes collected from different parts of Iran, 7 foreign ecotypes (USA, Russia, Stonia, Spain) and 3 ecotypes with unknown origin were evaluated using RAPD markers. Eight primers from 40 tested RAPD primers produced 73 polymorphic bands. The total number of polymorphic bands within ecotypes varied from 25 to 49 bands. The averages of total and within ecotypes genetic diversity and the degree of genetic differentiation were estimated 0.291, 0.181 and 0.378, respectively. Molecular variance analysis based on squared Euclidean distances indicates that larger proportions of variability existed within ecotypes (78.37 %). Cluster analysis of molecular data, grouped the entries under study into 8 cluster. The grouping based on molecular data had not correspondence with the geographical pattern. Using principal coordinate analysis, the first tree coordinates determined 59.48% of the total variation. Grouping of ecotypes using the first two coordinates confirmed the results of cluster analysis. Cluster analysis of morphological data, grouped the entries into 4 cluster, but great match between the results of morphological and molecular data weren't observed. In this study, a great amount of genetic diversity observed between and within orchardgrass ecotypes that could be used for selection suitable varieties and the ecotypes with exceeding genetic distance could be used in crossing programs for producing heterosis, mapping populations and disperse generations.

Key words: Cluster analysis. Genetic diversity, Molecular markers, Orchardgrass, RAPDs.

www.SID.ir