بررسی ارتباط بین تنوع ژنتیکی و توزیع جغرافیایی میان ۱۱ جمعیت وحشی *Dactylis glomerata* توسط پروتئینهای کل

علی اشرف جعفری[۱]، پروین صالحی شانجانی*[۱]، لاله کوهی[۲] و غلامرضا بخشی خانیکی[۲]

[۱] تهران، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، بانک ژن منابع طبیعی ایران

[۲] کرج، دانشگاه پیام نور

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۲

چکیده

علف باغ (*Dactylis glomerata*) یکی از گندمیان مهم مرتعی چند ساله برای ایجاد چراگاه و تولید علوفه خشک است. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیتهای وحشی علف باغ و بررسی ارتباط عوامل اکولوژیکی با تنوع پروتئینهای کل ۱۱ جمعیت موجود در بانک ژن منابع طبیعی انتخاب شدند. در این تحقیق الگوی پروتئینی ۱۱۰ ژنوتیپ از ۱۱ جمعیت برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی موجود مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج SDS-PAGE، ۲۵ نوار قابل تکثیر، پپتید پروتئینی، برای مطالعه تنوع ژنتیکی ثبت گردید. نوارها در محدوده وزن مولکولی ۷۶۳۸ تا ۲۷۶۸۸۵۰ دالتون قرار گرفتند. میانگین تعداد نوارهای چندشکل نسبت به کل نوارها در کلیه جمعیتها از ۰/۱۴ در اردبیل، تا۰/۴۱ در ارومیه، متغیر بود. SDS-PAGE پروتئینهای کل، تنوع درون و میان جمعیتی بالایی نشان داد که نشان‌دهنده تمایز مشخصی بر اساس منشاء و رویشگاه نبود. میانگین فاصله ژنتیکی کل بین جمعیتها ۰/۰۴۵ بود که بیشترین فاصله (۰/۱۳۲) بین کرج۳ و پاسند۲ و کمترین فاصله (۰/۰۱۷) بین کرج۱ و اردبیل مشاهده گردید. هیچ ارتباطی بین ویژگیهای ژنتیکی و عوامل جغرافیایی مشاهده نگردید. همبستگی بین ماتریس فاصله‌های ژنتیکی و جغرافیایی به وسیله آزمون مانتل ثابت نشد و ضریب همبستگی بین آنها از نظر آماری معنی دار نگردید (P=۰/۲۸۰ و R=۰/۰۲). این مسئله نیز نشان دهنده عدم وجود شیب محیطی در گوناگونی پروتئینهای کل است. این نتایج نشان می دهند که در برنامه‌های اصلاحی علف باغ می‌بایست تنوع ژنتیکی جمعیتهای علف باغ به وسیله استفاده از والدین مختلف افزایش یابد. افزایش اساس ژنتیکی برای مقاصد اصلاح علف باغ می‌تواند به وسیله کاربرد سیستماتیکی ذخایرتوارثی که الگو پروتئینی متفاوتی داشته و ویژگی‌های کمی بهتری دارند حاصل شود.

واژه های کلیدی: *Dactylis glomerata*، SDS-PAGE، تنوع ژنتیکی، عوامل اکولوژیکی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۵۸۰۲۸۲ ، پست الکترونیکی: Psalehi@rifr-ac.ir

مقدمه

گندمیان از مهم ترین گیاهان مرتعی هستند که به لحاظ تولید علوفه، احداث چراگاه، حفاظت و جلوگیری از فرسایش خاک اهمیت زیادی دارند (۱ و ۳۹). علف باغ (*Dactylis glomerata*) یکی از گرامینه‌های مهم مرتعی چند ساله مناسب مناطق سردسیری است که در مناطق معتدلهٔ جهان و در اروپا، آسیا، اطراف مدیترانه، شمال و جنوب آمریکا، ژاپن، نیوزلند و استرالیا به طور معمول در طبیعت می‌روید (۴۳). در یک قرن اخیر به اهمیت اقتصادی و زراعی علف باغ پی برده شده و امروزه زراعت این گیاه به عنوان علوفه خالص، چراگاههای طبیعی و مخلوط با سایر گرامینه‌های مرتعی در برنامه‌های احیاء مراتع قرار گرفته است (۱۶). پیش‌بینی شده است که نواحی مدیترانه‌ای در آینده به دلیل تغییرات جهانی، آب و هوای گرم تر و خشک‌تر خواهند داشت در نتیجه، ایجاد و توسعه گونه‌ها و انواعی که نیاز کمی به آب دارند در برنامه‌های پرورش گیاهان از اولویت بالایی برخوردار است. بنابراین علف باغ به لحاظ سازگاری و تطابق با

Archive of SID

www.SID.ir

شرایط کمبود آب، می‌تواند یک گزینه مناسب محسوب شود (۳).

مهم ترین شرط کاربرد و اصلاح ذخایر گیاهی شناخت ساختار ژنتیکی آنها است. به طوری که زیر بنای هر برنامه اصلاحی از طریق پارامترهای ژنتیکی پی‌ریزی می‌گردد. بنابراین آگاهی از تنوع و تمایز ژنتیکی ژنوتیپها و اطلاع از نحوه عمل ژنهای مربوطه، برای برنامه ریزیهای به‌نژادی ضروری است (۱۸). در مطالعات بسیاری که در دنیا صورت گرفته، گوناگونی ویژگیهای مورفولوژیکی، سازگاری، اگرونومیکی، ایزوآنزیمی و الگو پراکنش علف باغ بخوبی مطالعه و بررسی شده است (۷، ۱۴، ۱۵، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۶ و ۴۲). کاربرد نشانگرهای مولکولی منجر به موفقیتهای خوبی شده که از آن میان می‌توان به RAPD (۱۹، ۴۴ و ۴۵)، ISSR (۴۶)، SRAP (۴۷) و AFLP (۳۵ و ۳۶) در علف باغ اشاره کرد. پژوهشهای فوق نشان‌دهنده وجود تنوع و تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در میان جمعیتهای علف باغ مطالعه شده بود. این درحالی است که متأسفانه هیچ گونه اطلاعاتی در مورد تنوع ژنتیکی جمعیتهای وحشی علف باغ در ایران وجود ندارد. از میان روشهای مختلف مطالعه تنوع ژنتیکی تکنیک الکترفورز ژل سدیم دودسیل سولفات – پلی‌اکریل‌آمید به دلیل ارزانی و عدم تأثیرپذیری از شرایط محیطی و وجود چندشکلی بالا، کاربرد بالایی در ارزیابی روابط فنوتیپی در بین ذخایر گیاهی داشته و از آن به طور وسیعی در مطالعات رده‌بندی جنسها و نیز ارزیابی تنوع بین گونه‌ها و درون گونه‌ها استفاده می‌شود (۴). بر این اساس مطالعات زیادی روی بسیاری از گونه های گیاهی از جمله تیره Poaceae (۹)، Cucurbitaceae (۳۴)، تیره Fabaceae (۲۸) جمعیتهای پنبه (۳۰)، *Pisum Sativum* (۳۲)، *Avena* (۲۷)، انگور (۲) و جمعیتهای گندم (۲۹) گزارش شده است. این گزارشات کارآیی نشانگر پروتئینی را در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین جمعیتهای گیاهی تأیید کرده و نشان دادند که نشانگر پروتئینی به دلیل عدم تأثیرپذیری از شرایط محیطی اطلاعات تاکسونومیکی مفیدی را فراهم می‌آورد.

جدول ۱ – اطلاعات شناسایی ۱۱ جمعیت علف باغ مورد مطالعه.

ردیف	منشاء ژنوتیپ	کد ژنوتیپ در بانک ژن منابع طبیعی	علامت اختصاری به فارسی	علامت اختصاری به انگلیسی	منشاء ژنوتیپ
۱	کرج	۱۹۷	کرج۱	Karaj1	کرج
۲	کرج	۱۰۷۲	کرج۲	Karaj 2	کرج
۳	کرج	۱۰۱۱۲	کرج۳	Karaj 3	کرج
۴	کرج	۱۰۱۱۳	کرج۴	Karaj 4	کرج
۵	اردبیل	۴۱۱	اردبیل	Ardebil	اردبیل
۶	تبریز	۶۳۳	تبریز	Tabriz	تبریز
۷	ارومیه	۱۷۶۱	ارومیه	Ourmieh	ارومیه
۸	زنجان	۴۹۹	زنجان	Zanjan	زنجان
۹	ساری	۱۷۷۳	پاسند۱	Pasand1	ساری
۱۰	ساری	۱۰۰۹۵	پاسند۲	Pasand2	ساری
۱۱	ملایر	۱۴۵۵	ملایر	Malayer	ملایر

از آنجایی که فشار بر مراتع موجب فرسایش ژنتیکی شده و گرم شدن تدریجی زمین استفاده از انواع اصلاح شده گونه های مرتعی را ضروری می نماید، مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیتهای علف باغ می تواند کمک شایانی به

Archive of SID
www.SID.ir

حفاظت، احیاء و توسعه این گونه با ارزش مرتعی نماید. هدف از انجام این تحقیق ۱) مطالعه تنوع و تمایز ژنتیکی موجود بین جمعیتهای مختلف علف باغ براساس نشانگر پروتئینی و ۲) بررسی وجود ساختار جغرافیایی در داده‌های ژنتیکی می باشد.

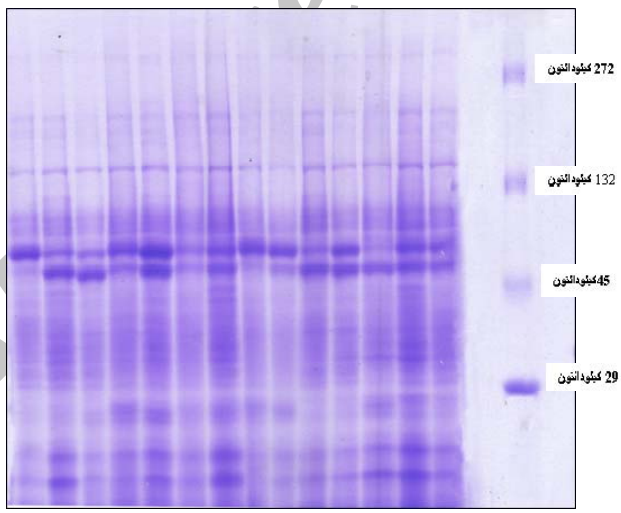
مواد و روشها

علف باغ (*Dactylis glomerata*) در مناطق معتدلهٔ جهان و در سطح وسیعی از مراتع کشور شامل استانهای شمالی و سلسله جبال البرز و زاگرس می‌روید (۱). این تحقیق روی ۱۱ جمعیت علف باغ که از بانک ژن منابع طبیعی تهیه شده بودند، انجام شد (جدول ۱). مشخصات جغرافیایی، اقلیمی و توزیع جمعیتهای علف باغ مورد بررسی در جدول ۲ و شکل ۱ ذکر گردیده است.

جدول ۲ – برخی ویژگیهای منطقه‌ای و آب و هوایی (میانگین ده ساله بدست آمده از ایستگاه‌های آب و هوایی) جمعیت‌های مورد مطالعه.

	میانگین بارندگی سالانه*	میانگین بارندگی ماها نه *	بارندگی کل*	میانگین دما بیشینه**	میانگین دما کمینه **	طول جغرافیایی	عرض جغرافیای	ارتفاع ازسطح دریا (متر)
کرج	۲۰۷/۹۷	۲۲/۵۳۲	۲۷۱۰	۲۱/۷۸	۹/۳۸	۵۱°	۳۵° ۴۹'	۱۳۶۰
زنجان	۳۱۰/۱۲	۴۴/۱۲	۳۱۰۲	۲۰/۱۹	۸/۸	۴۸° ۲۸'	۳۶° ۴۰'	۱۶۵۰
تبریز	۲۴۳/۷۷	۲۰/۳۱۱	۲۴۳۸	۱۹/۲۹	۸/۱۱	۴۶° ۱۷'	۳۸° ۵'	۱۳۶۶
ارومیه	۲۶۰/۲۸	۲۱/۷۴۷	۲۶۰۳	۱۸/۴	۵/۶۳	۴۵° ۲۰'	۳۷° ۳۲'	۱۳۳۲
اردبیل	۲۶۹/۹۵	۲۲/۴۹۱	۲۷۰۰	۱۶/۰۴	۳/۳۵	۴۸° ۱۸'	۳۸° ۱۵'	۱۳۱۱
ملایر	۲۵۹/۸۵	۲۳/۰۷۶	۲۵۹۹	۱۹/۵۶	۷/۲۲	۴۸° ۴۹'	۳۴° ۱۷'	۱۷۵۰
ساری	۴۲۵/۳۸	۳۸/۹۹۹	۴۲۵۴	۲۰/۹۲	۸/۹۸	۵۳° ۵'	۳۶° ۳۴'	۴۰

*، میزان بارندگی بر حسب میلیمتر . **، دما برحسب درجه سانتیگراد



شکل ۱ – نمونه‌ای از تصویر الکتروفورز پروتئینهای کل استخراج شده در جمعیتهای مورد مطالعه علف‌باغ.

در این تحقیق الکتروفورز پروتئینهای کل به روش SDS-PAGE (الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید دودسیل سولفات) انجام شد (۲۰). ۱۱۰ ژنوتیپ (گیاهک) متعلق به ۱۱ جمعیت مورد مطالعه (هر جمعیت ۱۰ ژنوتیپ) به طور تصادفی انتخاب گردید. نمونه‌ها به نسبت یک گیاهک به ۸۰ میکرولیتر از محلول استخراج (Tris-HCl یک مولار (pH=7.5)، Na_2EDTA یک مولار و ۲–مرکاپتواتانل ۰/۰۴ درصد) به خوبی در هاون سرد همگن شدند. پس از ده دقیقه سایش عصاره وارد لوله آزمایش شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

www.SID.ir

سپس عصاره ها جهت صاف کردن به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول صاف شده رویی با محلول بافر نمونه (Tris-HCl نیم مولار (pH=6.8) ، SDS ۰/۲ درصد و ۲–مرکاپتواتانل ۰/۵ درصد گلیسرول ۱ درصد و برموفنل بلو ۰/۰۲ درصد) به نسبت ۱:۱ مخلوط و به میکروتیوپ درب دار اپندروف منتقل و در دستگاه بن ماری در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه جوشانده شد. نمونه تا زمان مصرف در فریزر در دمای ۲۰– درجه سانتی گراد نگهداری گردید. ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه بر روی ژل سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید (۲۰) بارگیری گردید. ژلها پس از انجام الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه داخل محلول تثبیت (شامل ۲۰ گرم تری کلرو استیک اسید در ۱۰۰ میلی لیتر آب) قرار گرفت. سپس به مدت ۴ ساعت در محلول رنگ آمیزی (شامل کماسی بلو ۰/۲۵ درصد ، متانل ۲۵ درصد و اسید اسیتیک ۱۰ درصد) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت ژلها جهت امکان وضوح نوارهای پروتئین به مدت ۱۲ ساعت در دو مرحله در محلول رنگ بر (شامل متانل ۲۵ درصد و اسید استیک ۱۰ درصد) قرار گرفت. دستگاه مولد برق با ولتاژ ۱۸۰ ولت با شدت جریان ۴۰ میلی آمپر تنظیم شد. زمان جدا سازی پروتئین حدود ۵ ساعت و میزان حرکت عصاره در ژل ۱۰ سانتیمتر بود. اطلاعات حاصل از پروتیینهای کل به صورت نوار های مجزای پروتئینی برای گیاهکهای مختلف روی صفحه ژل پلی اکریل آمید نمایان گردید.

تجزیه آماری داده‌ها:

جایگاه هر یک از این نوار ها بر روی ژل از طریق حرکت نسبی آنها مشخص و به صورت اعداد کمی بیان گردید. بر اساس وجود (عدد یک) یا عدم وجود هر نوار (عدد صفر) در فواصل مختلف، نسبت به تشکیل ماتریس داده ها اقدام گردید. فراوانی نوارها، نسبت تعداد نوارهای چندشکل نسبت به تعداد کل نوارها و چندشکلی آنها با نرم افزار NTSYS-pc (۳۷) محاسبه شد. تسهیم واریانس ژنتیکی درون و میان گروهی توسط آزمون واریانس مولکولی (AMOVA؛ ۱۰) و برنامه نرم افزاری ARLEQUIN 1.1 (۱۰) تعیین شد. اهمیت هر جزء واریانس با آزمون permutation (۱۰) مطالعه شد. فاصله ژنتیکی میان جمعیتها و گروههای درختان خوش‌فرم و بدفرم بر اساس معادله نی (۳۱) برآورد شد. از آزمون NJ با نرم افزار NTSYS-pc (۳۷) و از روش PCoA تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (۱۳) برای تفسیر ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد. برای بررسی رابطه بین عوامل ژنتیکی و اکولوژیکی از نرم افزار SPSS و معادله کارل–پیرسون استفاده گردید. برای بررسی همبستگی فاصله صفات با یکدیگر از تست مانتل (۲۵) استفاده شد.

نتایج

در این تحقیق الگوی پروتئینی ۱۱ جمعیت علف باغ برای تعیین تنوع ژنتیکی موجود مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۲۵ نوار در ۱۱ جمعیت علف باغ مورد مطالعه مشاهده گردید. مقایسه تعداد نوار در میان جمعیتهای مختلف علف باغ نشان می‌دهد که اکثر جمعیتها دارای ۲۵ نوار بوده و فقط در میان آنها کرج۱ و کرج۴ دارای ۲۴ نوار بودند (جدول ۳). هیچ نوار نادر در میان جمعیتهای علف باغ مشاهده نشد. نتایج نشان دادند که بیشترین درصد چندشکلی نوارها مربوط به جمعیت ارومیه (۹۲ درصد) و کمترین درصد چندشکلی نوارها مربوط به اردبیل (۳۶ درصد)، با میانگین۶۶/۹۱ درصد می‌باشد. بیشترین و کمترین نسبت تعداد نوارهای چندشکل نسبت به کل نوارها در ارومیه (۰/۴۱۱) و اردبیل (۰/۱۴۱) مشاهده شد. از میان ۲۵ نوار مشاهده شده، شش نوار با وزن مولکولی ۱۳۰۰۴، ۲۴۶۹۴، ۳۷۸۲۶، ۷۷۰۷۲، ۱۸۷۲۸۳ و ۲۴۹۱۱۵ دالتون، نوارهایی هستند که در تمام ژنوتیپها مشترک بوده و چندشکلی نشان ندادند. سایر نوارها، چندشکلی از نوع حضور و عدم حضور را نشان دادند (شکل ۱).

برای تشریح الگوی تمایز، فاصله ژنتیکی بین جمعیتها براساس برآورد نااریب فاصله ژنتیکی Nei در گیاهکهای

Archive of SID

www.SID.ir

جمعیتهای مناطق مختلف محاسبه شد (جدول ۴). مقدار فاصله ژنتیکی از ۰/۰۱۷ (بین جمعیتهای کرج۱ و اردبیل) تا ۰/۱۳۲ (بین جمعیتهای کرج۳ و پاسند۲) با میانگین ۰/۰۴۵ متغیر بود. از فاصله ژنتیکی بین جمعیتها برای تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی(PCoA) استفاده شد. با توجه به اینکه که حدود ۷۶/۶۷ درصد گوناگونی در میان سه مؤلفه اصلی قرار دارد. بنابراین این سه مؤلفه به عنوان مؤلفه‌های اصلی در نظر گرفته می‌شوند. جمعیتهای مختلف فاصله ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای از یکدیگر داشتند. به طوری که توسط مؤلفه اصلی اول که ۳۲/۳۸ درصد از گوناگونی کل را به خود اختصاص می‌دهد از یکدیگر جدا شدند. بر این اساس کلیه جمعیتها به دو گروه تقسیم می‌شوند که گروه اول شامل جمعیتهای کرج۳، کرج۴، پاسند۱، زنجان، تبریز، کرج۱ و اردبیل وگروه دوم شامل کرج۲، ارومیه، ملایر و پاسند۲ می‌باشند. مؤلفه اصلی دوم که ۲۳/۸۰ درصد از گوناگونی کل را به خود اختصاص می‌دهد جمعیتهای کرج۳، کرج۴، کرج۲ و ارومیه را از جمعیتهای اردبیل، تبریز، کرج۱، زنجان، پاسند۱، پاسند۲ و ملایر جدا کرد (شکل ۲). برای تشریح الگوی تمایز از فاصله ژنتیکی بین جمعیتها ازروش NJ نیز استفاده شد. در دندروگرام حاصل، کلیه جمعیتهای مورد بررسی به ۲ گروه عمده تقسیم شدند (شکل ۳)، که این تقسیم بندی مطابق با گروه‌بندی جمعیتها توسط مؤلفه اصلی اول در پلات PCoA بود. همان گونه که مشاهده می‌شود پاسند۲ بیشترین فاصله ژنتیکی را نسبت به سایر جمعیتها نشان داد. بر اساس دندروگرام NJ و پلات PCoA اگرچه ساختار جغرافیایی خاصی در بین جمعیتهای مورد مطالعه مشاهده شد. به طوری که زنجان، تبریز و اردبیل که همگی جزء مناطق سردسیر هستند در یک خوشه نزدیک هم قرار گرفتند ولی استثنائاتی در ارومیه نیز مشاهده شد. در همین ارتباط ضرایب همبستگی جفت ماتریسهای فاصله ژنتیکی و جغرافیایی جمعیتهای علف باغ با استفاده از آزمون مانتل محاسبه شد. همبستگی بین ماتریسهای فاصله پروتئینهای کل گیاهکهای مناطق مختلف و جغرافیایی بسیار کم بود که از لحاظ آماری نیز معنی دار نبود ($R=۰/۰۲$ ، $\rho=۰/۲۸۰$) (شکل۴). پس در نتیجه گیری کلی مشاهده می‌شود که رابطه جغرافیایی با ویژگیهای نوارهای پروتئینهای کل گیاهکهای مناطق مختلف به وسیلهٔ آزمون مانتل ثابت نشد. نتیجه تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) (جدول ۵) نیز سطح نسبت بالایی از تمایز ژنتیکی را در درون جمعیتها (۹۳ درصد) نشان داد و فقط ۷ درصد از گوناگونی، میان جمعیتهای مختلف قرار داشت.

تجزیه و تحلیل رابطه پیرسون نشان داد که بین چهار شاخص پارامترهای تنوع ژنتیکی جمعیتهای مختلف و عوامل اقلیمی رابطه ای وجود نداشت. به علاوه هیچ رابطه‌ای بین ارتفاع از سطح دریا و پارامترهای تنوع ژنتیکی جمعیتهای علف باغ مورد بررسی وجود مشاهده نگردید (جدول ۶).

جدول ۳ – برخی ویژگیهای ژنتیکی در۱۱ جمعیت علف باغ مورد مطالعه براساس پروتئینهای کل.

منشاء	کرج۱	کرج۲	کرج۳	کرج۴	زنجان	تبریز	ارومیه	اردبیل	ملایر	پاسند۱	پاسند۲
میانگین تعداد نوار	۲۴	۲۵	۲۵	۲۴	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵
میانگین تعداد نوار با فراوانی ≤ ۵٪	۲۴	۲۵	۲۵	۲۴	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵
درصدپلی‌مورفیسم	۶۴	۸۴	۸۸	۸۰	۴۴	۶۰	۹۲	۳۶	۶۸	۶۴	۵۶
میانگین تعداد نوارهای چندشکل نسبت به کل نوارها	۰/۲۷۴	۰/۳۸۷	۰/۳۵۹	۰/۳۵۴	۰/۱۸۱	۰/۲۶۸	۰/۴۱۱	۰/۱۴۱	۰/۲۸۱	۰/۲۷۳	۰/۲۳۱
اشتباه استاندارد	۰/۰۴۳	۰/۰۳۷	۰/۰۳۶	۰/۰۴۰	۰/۰۴۳	۰/۰۴۵	۰/۰۲۸	۰/۰۴۱	۰/۰۴۴	۰/۰۴۴	۰/۰۴۵

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴ – ماتریس برآورد نااریب فاصله ژنتیکی بین ۱۱ جمعیت علف باغ بر اساس پروتئینهای کل گیاهک.

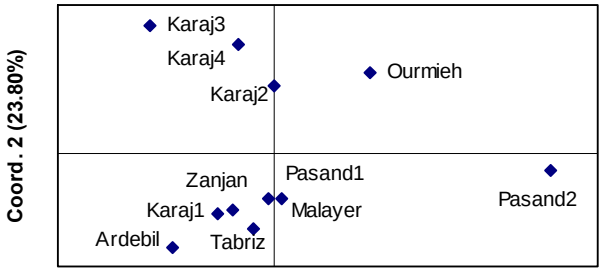
	کرج۱	کرج۲	کرج۳	کرج۴	زنجان	تبریز	ارومیه	اردبیل	ملایر	پاسند۱	پاسند۲
کرج۱	۰										
کرج۲	۰/۰۴۵	۰									
کرج۳	۰/۰۵۲	۰/۰۴۶	۰								
کرج۴	۰/۰۴۷	۰/۰۳۸	۰/۰۲۶	۰							
زنجان	۰/۰۳۶	۰/۰۵۳	۰/۰۵۶	۰/۰۳۸	۰						
تبریز	۰/۰۳۳	۰/۰۳۷	۰/۰۶۳	۰/۰۵۱	۰/۰۱۸	۰					
ارومیه	۰/۰۶۴	۰/۰۳۴	۰/۰۶۵	۰/۰۵۰	۰/۰۵۹	۰/۰۵۰	۰				
اردبیل	۰/۰۱۷	۰/۰۵۶	۰/۰۵۱	۰/۰۵۴	۰/۰۱۸	۰/۰۱۹	۰/۰۷۹	۰			
ملایر	۰/۰۳۵	۰/۰۴۶	۰/۰۶۷	۰/۰۶۸	۰/۰۵۴	۰/۰۴۳	۰/۰۴۲	۰/۰۵۷	۰		
پاسند۱	۰/۰۳۴	۰/۰۳۱	۰/۰۶۴	۰/۰۴۹	۰/۰۳۸	۰/۰۲۶	۰/۰۴۷	۰/۰۳۶	۰/۰۲۲	۰	
پاسند۲	۰/۰۹۳	۰/۰۹۲	۰/۱۳۲	۰/۰۹۲	۰/۰۸۷	۰/۰۸۴	۰/۰۷۳	۰/۱۰۷	۰/۱۰۲	۰/۰۸۸	۰

جدول ۵ – AMOVA داده‌های پروتئین گیاهک ۱۱جمعیت علف باغ مورد بررسی.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد فراوانی	احتمال
بین جمعیتها	۱۰	۵۲/۶۱۸	۵/۲۶۲	٪۷	
درون جمعیتها	۹۹	۳۰۲/۶۰۰	۳/۰۵۷	٪۹۳	۰/۰۱۰

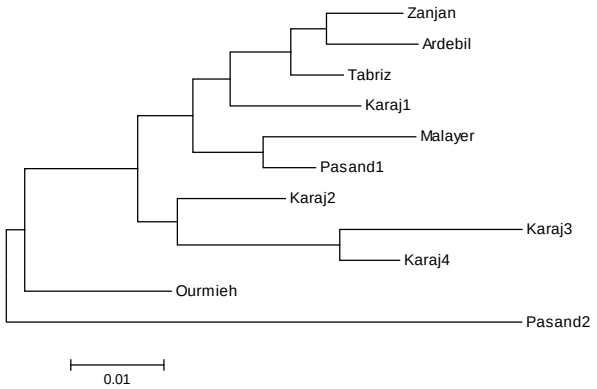
جدول ۶ – همبستگی بین صفات جغرافیایی و صفات ژنتیکی ۱۱جمعیت علف باغ.

	میانگین نوارگی سالانه	میانگین بارندگی ماها نه	میانگین بارندگی کل	میانگین دمای بیشینه	میانگین دمای کمینه	ارتفاع از سطح دریا
تعداد نوارها	−۰/۲۸۵	−۰/۲۴۲	−۰/۲۸۵	۰/۴۵۵	۰/۳۳۱	۰/۱۳
میانگین تعداد نوارهای چندشکل نسبت به کل نوارها	۰/۲۰۶	۰/۲۱۳	۰/۲۰۶	−۰/۴۲۵	−۰/۳۳۶	−۰/۱۵۸
تعداد نوارهایی بافراوانی>=۵٪	−۰/۲۸۵	−۰/۲۴۲	۰/۲۸۵	۰/۴۵۵	۰/۳۳۱	۰/۱۳
درصد چندشکلی نوارها	−۰/۲۶۶	−۰/۲۲	−۰/۲۶۶	۰/۴۸	۰/۳۳۷	۰/۱۲۴

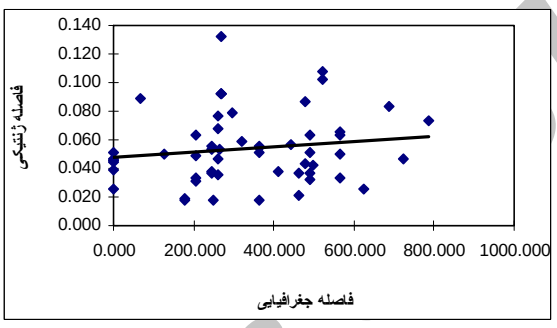


شکل ۲ – نمودار رسته‌بندی ۱۱ جمعیت علف باغ مورد مطالعه براساس فاصله ژنتیکی با استفاده از دو مؤلفه اصلی (واریانس مؤلفه اول۳۸/۳۲٪ و مؤلفه دوم۸۰/۲۳٪).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳ – دندروگرام ۱۱جمعیت علف باغ حاصل از مقادیر داده‌های فاصله ژنتیکی باروش Neighbor-joining.



شکل ۴– لگاریتم ضریب همبستگی بین ماتریس‌های فاصله ژنتیکی پروتئینهای کل جمعیتهای مختلف علف‌باغ با فاصله جغرافیایی

بحث

در این پژوهش گوناگونی ژنتیکی جمعیتهای مختلف علف باغ به عنوان ضرورتی اجتناب ناپذیر برای برنامه‌های اصلاحی مطالعه گردید. نتایج حاکی از وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جمعیتهای مختلف علف باغ است. براساس یافته‌های گاردینر و فورد (۱۱) اختلاف موجود در فراوانی نوارها در افراد و به تبع آن در جمعیتهای مختلف ناشی از تفاوت در تعداد ژنهای کد کننده پروتئینها کل است. اگرچه تحقیقی در مورد بررسی تنوع جمعیتهای علف باغ به وسیله نشانگر پروتئینی انجام نشده ولی پژوهشهای قبلی که بر اساس ویژگیهای مختلف مورفولوژیکی، فنولوژیکی و زیستی در جمعیتهای مختلف علف باغ صورت گرفته حاکی از تنوع ژنتیکی علف باغ در جمعیتهای وحشی ایران است (۱۶). چنین تنوع بالایی در ویژگیهای مختلف این گیاه احتمالاً به علت هتروزیگوتی ناشی از ویژگی دگرگشنی گیاه علف باغ است (۳۸). این موضوع نشان می دهد که اصلاح علف باغ به وسیله انتخاب ساده والدین امکان پذیر بوده و بنابراین در برنامه‌های اصلاحی علف باغ می توان تنوع ژنتیکی جمعیتهای علف باغ را به وسیله استفاده از والدین مختلف افزایش داد. افزایش تنوع ژنتیکی برای اصلاح علف‌باغ می‌تواند به وسیله کاربرد سیستماتیکی ژرم‌پلاسم که الگو پروتئینی متفاوتی داشته و ویژگیهای کمی بهتری دارند حاصل شود.

تسهیم واریانس ژنتیکی درون و میان جمعیتی توسط آزمون واریانس مولکولی AMOVA، سطح نسبتاً بالایی از گوناگونی ژنتیکی را در درون جمعیت‌ها (۹۳ درصد) برآورد نمود، به طوری که فقط ۷ درصد گوناگونی کل در میان جمعیتها قرار داشت. بنابراین اختصاص الگوی پروتئینی خاصی به هر یک از جمعیتها و یا برخی جمعیتها امکان پذیر نگردید. شناسایی جمعیتها و اختصاص الگوی پروتئینی

Archive of SID
www.SID.ir

خاصی به جمعیتهای مختلف گیاهی موضوعی است که بر اساس نوع گونه نتایج ضد و نقیضی در مورد آن منتشر گردیده است. الگوی پروتئینی بذر گیاهان بسیاری تا کنون با اهدافی مثل مطالعه تنوع ژنتیکی و شناسایی جمعیتهای زراعی مطالعه شده است که می‌توان برای نمونه از مطالعاتی که بر روی *Euphorbiaceae Ricinus communis* ، (۴۰)، گونه‌های*Solanaceae Capsicum* ، (۳۳)، برنج *Gramineae* ، (۵)، گونه‌های *Leguminosae Arachis* ، (۸)، جمعیتهای پنبه (۳۰)، *Pisum Sativum* (۳۲)، *Avena fatua* (۲۷) و جمعیتهای گندم (۲۹) انجام شده نام برد که عموماً حاکی از کاربرد بالای نشانگر پروتئین در شناسایی گونه‌ها و جمعیتهای مختلف یک گونه است. نتایج بسیاری نیز وجود دارد که حاکی از عدم جداسازی جمعیتهای مختلف توسط پروتئینهای ذخیره‌ای بذر است (۶، ۱۷، ۲۴ و ۴۱).

از آنجایی که جمعیتهای مورد مطالعه اختلاف قابل ملاحظه‌ای از نظر الگو پروتئینی نشان دادند، پیدا کردن ارتباطی بین منشاء جمعیتها و الگوی گروه‌بندی، بسیار دشوار بود. به طوری که ساختار جغرافیایی در ویژگیهای نوارهای پروتئینهای کل علف باغ مناطق مختلف به وسیله آزمون مانتل مشاهده نگردید و ضریب همبستگی بین ماتریسهای فاصله ژنتیکی و جغرافیایی از نظر آماری معنی دار نگردید (R^2=۰/۰۲ ، ρ =۰/۲۸۰). عدم وجود ارتباط بین تنوع ژنتیکی و توزیع جغرافیایی در گیاهان مختلفی گزارش شده است (۶، ۱۷، ۲۴ و ۴۱). با توجه به این واقعیت که در بسیاری از گیاهان، گوناگونی پروتئینهای ذخیره‌ای بذر ارتباطی با توزیع جغرافیایی و عوامل اکولوژیکی نشان نمی‌دهند، پس این نشانگر می‌تواند ابزار مفیدی برای شناسایی جمعیتهای مناسب برای انجام دورگ‌گیری باشد. تاکنون مطالعات بسیاری صورت گرفته تا نشانگرهای مناسبی برای گیاهان مختلف شناسایی گردد که تحت تأثیر عوامل محیطی نباشند. البته وجود گوناگونی بالا نیز از شروط مهم دیگر کارآیی چنین نشانگری است به طوری که غفور و همکارانش (۱۲) با مطالعه پروتئینهای ذخیره‌ای بذر جمعیتهای مختلف *Vigna mungo*، نه‌تنها هیچ ارتباطی بین تنوع ژنتیکی و توزیع جغرافیایی جمعیتهای مورد مطالعه پیدا نکردند، بلکه تنوع درون جمعیتی بسیار پایینی نیز درون جمعیتها ثبت نمودند. براساس این مشاهدات آنها الگو پروتئینی را صرفاً نشانگر مناسبی برای مطالعه میان گونه‌ای پیشنهاد نمودند. درحالی که با توجه به تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای که در جمعیتهای مورد مطالعه علف باغ مشاهده شد، می‌توان بر اساس نتایج پژوهش حاضر متمایزترین جمعیتها را انتخاب نمود تا به وسیله تلاقی بین آنها بیشترین میزان هتروزیس حاصل گردد. بدین ترتیب جمعیتهای کرج۳ و پاسند۲ که نه تنها بیشترین فاصله ژنتیکی را درمیان ۱۱ جمعیت مورد مطالعه داشتند بلکه دارای میانگین بالایی از تعداد نوارهای پلی مورف نسبت به کل نوارها نیز بودند برای ایجاد تنوع ژنتیکی و آزمایشهای تلاقی پروژه‌های اصلاحی پیشنهاد می شوند. علاوه بر کاربرد نشانگر پروتئینهای کل در اصلاح، این نشانگر می‌تواند ابزار مفیدی برای شناسایی جمعیتهایی که دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند باشد تا از آنها در برنامه‌های حفاظت استفاده شود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که علی‌رغم برداشت بی‌رویه از مراتع، جمعیتهای مختلف علف‌باغ از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردارند که می‌بایست در هر دو برنامه‌های حفاظتی ***in situ*** و ***ex situ***، حفاظت از جمعیتهای وحشی علف‌باغ مورد توجه قرار گیرد.

منابع

۱. مقدم، م.، ۱۳۷۷. مرتع و مرتعداری، انتشارات دانشگاه تهران، ۴۷۰ صفحه.

۲. نظام دوست, م.، محمودزاده ا., جامعی، ر., حیدری، ر., حکیمی، ج.، ۱۳۸۳. مطالعه چند شکلی (پلی مورفیسم) پروتئینهای ذخیره ای بذر ۴۸ رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) استان آذربایجان غربی و طبقه بندی آنها با استفاده از تجزیه خوشه ای مجله

Archive of SID
www.SID.ir

زیست شناسی ایران. ۱۷(۱): ۲۴-۳۳.

3. Abraham, E., Sotira S., Zisimou E., Tsouri K. and Noitsakis B., 2006. Comparable study on hydrodynamic behavior in two different provenance populations of *Dactylis glomerata* L. In: Proc. 5th Panhellenic Rangeland Congress, Heraclion (Greece), 1-3 November, p. 167-172.
4. Ahmed, M.F., 1994. A study of cyto-taxonomy for conservation of genetic resources of forage legumes (*Medicago* species) in Omayed Biosphere Reserve Scientific Report, University of Weir, 1999. Proteomies:quantitative and physical mapping of celluar protein. Trends in Biotechnology. 17**:** 121-127.
5. Aliaga-Morel, J.R., Culianez-Macia, F.A., Clemente-Marin, G. and Primo-Yufera, E., 1987. Differentiation of rice cultivars by electrophoresis of embryo protein. Theoretical and Applied Genetics. 74: 224-232.
6. Alipour, H., Rezai, A., Meibodi, S.A.M. and Taheri, M., 2002. Evaluation of genetic variation in soybean lines using seed protein electrophoresis. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources. 5(4): 85-96.
7. Bretagnolle, F. and Thompson, J.D., 1996. An experimental study of ecological differences in winter growth between sympatric diploid and autotetraploid *Dactylis glomerata*. Journal of Ecology. 84: 343-351.
8. Bianchi-hall, C.M., Keys, R.D., Stalker, H.T. and Murphy, J.P., 1993. Diversity of seed storage protein patterns in wild peanut (Arachis, Fabaceae) species. Plant Systematic and Evolution. 186: 1-15.
9. Duvall, M.R. and Biesboer, DD., 1989. Comparisons of electrophoretic seed protein profiles among North American populations of *Zizania*. Biochemical Systematics and Ecology. 17: 39–43.
10. Excoffier, L., Smouse, P. and Quattro, J., 1992. Analysis of molecular Variances among DNA restriction data. Genetics. 131: 479-491.
11. Gardiner, S.E. and Forde, M.B., 1988. Identification of cultivars and species of pasture legumes by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel genetic diversity in Black gram (*Vigna mungo* L. Hepper). Field Crops Research. 69: 183–190.
12. Ghafoor, A., Zahoor, A., Qureshi, A.S. and Bashir, M., 2002. Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE. Euphytica. 123: 367-372.
13. Gower, J.C., 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. Biometrika. 53**:** 325-338.
14. Gautier, M.F. and Lumaret, R., 1999. Genetic introgression between tetraploid Dactylis glomerata ssp. Reichenbachii and glomerata in the French Alps. Insight from morphological and isoenzyme variation. Plant Systematics and Evolution. 214: 219-234.
15. Gauthier, P., Lumaret, R. and Be´de´carrats, A., 1998. Ecotype differentiation and coexistence of two parapatric tetraploid subspecies of cocksfoot (*Dactylis glomerata*) in the Alps. New Physiologist. 139: 741-750.
16. Jafari, A. and Naseri, H., 2007. Genetic variation and correlation among yield and quality traits in cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). Journal of Agricultural Science. 145: 1-12.
17. Javaid, A., Ghafoor, A. and Anwar, R., 2004. Seed storage protein electrophoresis in groundnut for evaluating genetic diversity. Pakistan Journal of Botany. 30(1): 25-29.
18. Kehr, W.R., 1960. History of germplasm involvement by the national alfalfa improvement conference. Plant breeding Abstracts. 54: 5168.
19. Kolliker, R., Stadelmann, F. J. and Reidy, B., 1999. Genetic variability of forage grass cultivars: a comparison of Festuca pratensis Huds., *Lolium perenne* L. and *Dactylis glomerata* L. Euphytica. 106: 261-270.
20. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
21. Lumaret, L., Guillerm, J.L. and Delay, J., 1987. Polyploidy and habitat differentiation in Dactylis glomerata L. from Galicia (Spain). Oecologia. 73: 436-446.
22. Lumaret, R. and Barrientos, E., 1990. Phylogenetic relationships and gene fow between sympatric diploid and tetraploid plants of Dactylis glomerata (Gramineae). Plant Systematics and Evolution. 169: 81-96.
23. Lindner, R., Lema, M. and GarcõÂa, A., 1999. Ecotypic differences and performance of the genetic resources of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) in north-west Spain. Grass and Forage Science. 54: 336-346.
24. Malik, M.F.A., Qureshi, A.S., Ashraf, M., Khan, M.R. and Javed, A., 2009. Evaluation of genetic diversity in soybean (*Glycine max*) lines using seed protein electrophoresis. Australian Journal of Crop Science. 3(2): 107-112.
25. Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research. 27: 209-220.

Archive of SID

www.SID.ir

26. Metin, T., Akgun, I., Taspinar, M.S. and Kanli, M., 2002. Determination of Variations of Some Enzymes in Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Acta Agriculturae Scandinavica, Section B: Plant Soil Science. 52: 110 - 115.
27. Mirza, B., Shoaib, M., Ahmad, M. and Fu, Y.B., 2007. Genetic diversity in Pakistani populations of *Avena fatua* revealed by seed storage protein polymorphism. Crop Sience. 2(1): 41-48.
28. Misset MT, Fontenelle C. 1992. Protein relationships between natural populations of *Ulex europaeus* and *U. galli* (Faboideae, Genisteae) and their hybrids. Plant Systematics and Evolution 179: 19–25.
29. Mohd, S., Alam, Z., Zahir, A., Weqar, A., Taufiq, A. and Ikhtir, K., 2007. Characterization of wheat varieties by seed strong protein electrophoresis. African Journal of Biotechnology. 6(5): 497-500.
30. Naveed, M., Motomitsu, K. and Ghulam, M.A., 2005. Genetic Differentiation of cotton cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. Centeral European Agriculture. 6(1): 69-76.
31. Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89: 583-590.
32. Nisar, M., Ghafoor, A., Rashid khan, M. and Sharif Qureshi, A., 2006. Screening of *Pisum Sativum* L. germplasm against *Erysiphe pisi* syd. ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica. 48(2): 33-37.
33. Panda, R.C., Kumar, O.A. and Rao, K.G.R., 1986. The use of seed protein electrophoresis in the study of phylogenetic relationship in Chile pepper (*Capsicum* L.). Theoretical and Applied Genetics. 7: 665-670.
34. Pasha, M.K., Sen, S.P., 1991. Seed protein patterns of Cucurbitaceae and their taxonomic implications. Biochemical Systematics and Ecology. 19: 569–576.
35. 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
36. Reeves, G., Francis, D. and Davies, M. S., 1998. Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata*. Annals Journal of Botany. 82: 99-105.
37. Rohlf, J.F., 2004. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.11. Exeter, Setauket, NY.
38. SagÆso z., Tosun, M. and Akgun, I., 1996. Determination of some phenological, morphological and biological characteristics of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) collected from different locations. Turkiy III. C¸ ayõr-Mer'a ve Yembitkileri Kongresi, 17–19 Haziran 1996, Erzurum, pp. 527–534.
39. Sanderson, M.A., Skinner. R.H. and Elwinger, G.F., 2002. Seedling development and field performance of prairie grass, grazing brome grass and orchard grass. Crop Science. 42: 224-230.
40. Sathaiah, V. and Reddy, T.P., 1985. Seed protein profile of caster (*Ricinus communis* L.) and some *Jatropa* species. Genetics In Agriculture. 39: 35-43.
41. Sihag, R., Hooda, J.S., Vashishtha, R.D. and Malik, B.P.S., 2004. Genetic divergence in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Annals of Biology. 20(1): 17-21.
42. Sahuquillo, E. and Lumaret, R., 1995. Variation in the subtropical group of *Dactylis glomerata* L.-1. Evidence from allozyme polymorphism. Biochemical Systematics and Ecology. 23: 407-418.
43. Treharne, K.J. and Eagles, C.F., 1972. Effect of temperature on photosynthetic activity of climatic races of Dactylis glumerata. Photosynthetica. 107 p.
44. Tuna, M., Khadka, D.K. and Shrestha, M.K., 2004. Characterization of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations of the Thrace region of Turkey based on ploidy and DNA polymorphisms. Euphytica. 135: 39-46.
45. Zeng, B., Zhang, X.Q. and Lan, Y., 2006a. Genetic diversity of *Dactylis glomerata* germplasm resources detected by molecular markers. Dissertation of the 2nd China-Japan-Korea Grassland Conf., Lanzhou, China.
46. Zeng, B., Zhang, X.Q. and Fan, Y., 2006b. Genetic diversity of *Dactylis glomerata* germplasm resources detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) molecular markers. Hereditas. 28: 1093-1100.
47. Zeng, B. Zhang, X.Q. Lan, Y., 2008. Assessment of Genetic Diversity among Dactylis glomerata L. as Determined by RAPD and SRAP. Acta Horticulture. 783: 291-302.

Archive of SID
www.SID.ir

Genetic diversity and geographic relationship among 11 *Dactyis glomerata* populations using total protein electrophoresis

Jafari A.A.[1], Salehi Shanjani P.[1], Kouhi L.[2] and Bakhshi khaneki Gh.R.[2]

[1] Research Institutes of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. of Iran

[2] Payam Noor University, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Cocksfoot (*Dactylis glomerata*) is a perennial grass that is used for pastures and hay production. This study evaluated total proteins profiles of 110 genotypes of cocksfoot from 11 populations, to determine the extent of genetic diversity. On the basis of SDS-PAGE, 25 reproducible bands were used for analysis and genetic diversity was estimated based on the number of different protein peptides. Molecular weight of bands ranged from 7638 to 2768850 Dalton. The average of polymorphic band over total bands detected ranged from 0.14 (in population Ardebil) to 0.41 (in population Ourmieh). SDS-PAGE of total proteins showed high inter- and intra-population diversity and no clear differentiation on the basis of origin or source. The mean genetic distance among populations was 0.045, ranging from o.017 between Karaj1 and Ardabil to 0.132 between Karaj3 and Pasand2. The correlation between genetic and geographical distance matrices was not significance (R =0.02, p= 0.280), analyzed with mantel test, indicating lack of clinal trends in variation of total proteins. These results suggested that the genetic base of cultivated cocksfoot should be broadened by involving diverse parents in the breeding program. Expansion of the genetic base for cocksfoot breeding might be accomplished by systematic use of germplasm that differs in protein profiles and has better quantitative traits.

Keywords: *Dactylis glomerata*, SDS-PAGE, Genetic diversity, ecological factors

Archive of SID

www.SID.ir