بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Agropyron cristatum* (L.) Garetn. با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

*رضا تقی‌زاده[۱]، علی‌اشرف جعفری[۲]، علی اصغری[۳]، رجب چوکان[٤]

۱. دانش آموخته دوره دکتری تخصصی رشته اصلاح نباتات، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۲. دانشیار، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۳. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
٤. استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

چکیده

در این پژوهش، از نشانگر مولکولی چندشکلی قطعات تکثیر شده تصادفی DNA (RAPD) برای تعیین تنوع ژنتیکی ۱۰ جمعیت *Agropyron cristatum* (L.) Garetn. استفاده شد. قطعات چندشکلی بوسیله ۱۰ آغازگر اختیاری ۱۰ نوکلئوتیدی از میان ۵۰ آغازگر تولید گردید. در مجموع ۵۸ نوار چندشکل که دارای تکرارپذیری بالایی بودند، انتخاب و وارد محاسبات شدند. ضرایب تشابه ژاکارد بر اساس حضور و عدم حضور باندها محاسبه گردید. دامنه ضرایب تشابه از ۰/۱۷ تا ۰/۳۷ متغیر بود. بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های ۷۸٤٤ (بافت) با ۳۰۲۹ (بجنورد) و کمترین تشابه ژنتیکی بین ٤۳۳٦ (کرمان) با ٤۰٥٦ (چادگان) و ۲۰۸ (اصفهان) با ۱۷۲۷ (گرگان) مشاهده شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌ها معنی‌دار و از مجموع تنوع کل، سهم بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌ها به ترتیب ۱۳/٤٦ و ۸٦/٥٤ درصد بود. میانگین درجه تمایز ژنی (F_{ST}=۰/۱٥) نشان داد که درصد بالایی از تنوع کل مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها بود. تجزیه کلاستر با استفاده از ضرایب تشابه ژاکارد مبتنی بر روش ادغام بر حسب متوسط گروه‌ها (UPGMA) انجام گرفت و جمعیت‌ها در سه گروه مجزا قرار گرفتند. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی به طور قوی نتایج تجزیه کلاستر را تایید کرد. گروه‌بندی جمعیت‌ها با استفاده از تجزیه کلاستر با الگوی جغرافیایی محل رویش آنها مطابقت زیادی نداشت ولی با نتایج مطالعات مورفولوژیکی که قبلا بر روی جمعیت‌ها انجام شده بود همخوانی خوبی داشت و با توجه به نتایج این تحقیق در شرایط آزمایش کنترل شده، نشانگرهای RAPD می‌توانند وسیله‌ای مناسب و مؤثر در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های *A. cristatum* باشند.

کلمات کلیدی: الکتروفورز، تجزیه واریانس مولکولی، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، چندشکلی، *Agropyron cristatum*، F_{ST}، RAPD

*email:taghizadeh.reza@gmail.com

مقدمه

گونه *A. cristatum* (L.) Garetn. متعلق به جنس *Agropyron*، یکی از جنس‌های طایفه Triticeae از تیره Poaceae است که برای اولین بار در سال ۱۷۷۰ توسط Gaertner نامگذاری شد (Rechinger, 1970). این جنس شامل ۱۰ الی ۱۳ گونه و تعدادی زیر گونه است (Dewey, 1969).

خاستگاه گونه *A. cristatum* (L.) Garetn. آسیای مرکزی، نواحی استپی سیبری، روسیه و ایران (Dewey & Asay, 1975; Dillman, 1946) می‌باشد. نواحی انتشار آن، اروپا (مرکزی، جنوب غربی، جنوب شرقی و شرق)، شمال آفریقا، شمال آمریکا (شمال، غرب کانادا، شرق کانادا، شمال مرکزی آمریکا و شمال شرقی آمریکا) و در آسیا، مناطق سیبری، روسیه، آسیای میانه، قفقاز، غرب آسیا، چین و مغولستان، هند و ایران می‌باشد (Clayton et al., 2002). بر اساس دامنه پراکنش این گیاه می‌توان نتیجه‌گیری نمود که *A. cristatum* گیاهی کوسموپولیتن است. قهرمان (۱۳٦٤)، انتشار جغرافیایی آن را در ایران، شمال شرق (گرگان و شاهکوه)، در مازندران (بین گدوک و فیروزکوه)، در آذربایجان (ارتفاعات سبلان، ۲۰ کیلومتری سراب)، در غرب (سنندج و همدان) و در مرکز (اصفهان و درود) گزارش نموده است که مشابه گزارش پراکندگی این گونه توسط BOR (۱۹٦۸) و Dewey & Asay (۱۹۷۵) است.

A. cristatum گیاه فصل سرد با ارتفاع متوسط و چندساله است. گیاهی است مقاوم به خشکی و سرما و بادوام که ریشه‌های عمیق و بسیار منشعب و رشته‌ای آن حداکثر تا عمق ۲/٤ متری نفوذ می‌کنند (Love & Hanson, 1932). این گیاه برای تثبیت خاک مناسب می‌باشد (Ogle, 2002) و به همین دلیل، برای حفاظت خاک و جلوگیری از فرسایش خاک مورد استفاده قرار گرفته است (Allen & Jackson, 1992; Brown et al., 1985). *A. cristatum* گیاهی مناسب برای احداث چراگاه است، و به‌علت آنکه، چند هفته قبل از رویش سایر گیاهان قابل چراست، به عنوان منبع غذایی با ارزشی در اوایل فصل به شمار می‌رود (کریمی، ۱۳٦۹). علاوه بر این می‌تواند منبع علوفه خشک با ارزشی برای جیره اغلب نشخوارکنندگان در طول زمستان باشد (Austin & Urness, 1983; Robertson et al., 1970).

آگاهی دقیق از تنوع ژنتیکی مجموعه‌های ژنتیکی گیاهی ضمن حفظ ذخائر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آنها را در برنامه‌های اصلاحی تأمین می‌کند. همچنین کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی نسبی بین افراد و جمعیت‌ها و روابط خویشاوندی بین آنها، امکان سازماندهی ژرم پلاسم و تهیه جمعیت‌های مناسب برای ترسیم نقشه‌ی ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها را فراهم می‌سازد (Virk et al., 1995). جهت بررسی تنوع ژنتیکی می‌توان از انواع نشانگرها استفاده کرد. به دلیل اینکه نشانگرهای DNA علاوه بر اختلافات موجود در ردیف‌های کد کننده، تفاوت‌های بین ردیف‌های غیر کد کننده و توالی‌های کناری در ژنوم را هم می‌توانند آشکار سازند، دارای قدرت تمایز بیشتری نسبت به نشانگرهای مرفولوژیک و پروتئینی هستند (Smith & Smith, 1992).

Williams و همکاران (۱۹۹۰)، روشی را بر مبنای تکثیر تصادفی قطعات DNA با آغازگرهایی که دارای توالی ۱۰ نوکلئوتیدی اختیاری بود، ارائه دادند. آنها این نشانگر DNA را چندشکلی قطعات تکثیر شده تصادفی DNA (RAPD)، نام نهادند. آنها از آغازگرهای تکی در هر واکنش تکثیر استفاده نمودند و نتایج نشان داد که با این روش می‌توان چند شکلی را بین دو دسته از محصولات تکثیری افراد مختلف، منظور نمود. تنوع در الگوهای RAPD به شکل حضور یا عدم حضور باند در نتیجه تنوع در جایگاه‌های باند شده با آغازگر حاصل می‌شود.

تکنیک RAPD از آنجایی که نیاز به اطلاعات و دانش اولیه در رابطه با توالی نوکلئوتید قطعات DNA برای تکثیر ندارد و همچنین، به خاطر وجود دستجات آغازگری که به شکل تجاری موجود است، به‌عنوان یک وسیله ایده‌آل برای گسترش نقشه‌های ژنتیکی لینکاژی مبتنی بر نشانگر مولکولی

(Joshi & Nguyen, 1993) و ارزیابی و شناسایی منابع ژنتیکی گیاهی (Anderson & Fairbank, 1990) شناخته شده‌اند.

نظر به اینکه استفاده از نشانگرهای مولکولی به‌منظور تعیین قرابت و فاصله بین ژنوتیپ‌های گیاهان علوفه‌ای مخصوصاً گراس‌ها که اکثراً دگرباروری بوده و تولید واریته‌های هیبرید و سنتتیک در آنها مد نظر می‌باشد، می‌تواند بسیار مفید باشد. بنابراین، در این بررسی، ارزیابی و تعیین سطح تنوع ژنتیکی و تعیین فاصله ژنتیکی بین ۱۰ جمعیت از گونه *A. cristatum* با استفاد از نشانگر RAPD انجام خواهد شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق ۱۰ جمعیت از گونهٔ *A. cristatum* موجود در ژرم پلاسم بانک ژن منابع طبیعی انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند که نام و منشاء آنها، در جدول ۱ آمده است.

استخراج DNA ژنومی: برای تهیه نمونه‌های گیاهی بذور ۱۰ جمعیت مورد بررسی به‌صورت جداگانه در گلدان‌های پلاستیکی کشت و برای استخراج DNA، نمونه‌های برگی تازه از ۵ بوته انتخابی مربوط به هر یک از جمعیت‌ها، تهیه و استخراج به روش CTAB که توسط Saghai-Maroof و همکاران (۱۹۸٤) پیشنهاد شده، انجام گردید.

برای تعیین کیفیت، DNA ژنومی استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۸درصد بارگذاری و نمونه‌های با باند شفاف و با وزن مولکولی بالا به‌عنوان DNA سالم و تجزیه نشده انتخاب شدند. علاوه بر این کمیت و کیفیت DAN با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت و نسبت جذب OD260/OD280 و نیز غلظت DNA برحسب نانوگرم بر میکرولیتر، برای هر نمونه ثبت شد. نمونه‌هایی که دارای نسبت جذبی در حدود ۲- ۱/۸ بودند و کیفیت مطلوبی داشتند، انتخاب شدند. پس از تعیین کمیت و کیفیت، نمونه‌های DNA با غلظتی برابر ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند.

جدول ۱: فهرست جمعیت‌های *A. cristatom* مورد مطالعه و مبداء جمع‌آوری آنها

ردیف	کد جمعیت در بانک ژن	منشاء جغرافیایی
۱	۲۰۸	اصفهان
۲	٦۱۹	اصفهان
۳	۱٥٥۰	بجنورد
٤	۱۷۲۷	گرگان
٥	۲۸٥٤	اراک
٦	۳۰۲۹	بجنورد
۷	٤۰٥٦	چادگان
۸	٤۳۳٦	کرمان
۹	۷٥٦٥	گرگان
۱۰	۷۸٤٤	بافت

تکثیر RAPD: برای تکثیر DNA ژنومی از ٥۰ آغازگر تصادفی ساخت شرکت Metabion آلمان استفاده شد. حجم هر واکنش PCR، ۱٥ میکرولیتر بود که اجزای واکنش و غلظت نهایی آنها شامل بافر PCR با غلظت 1X ، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs (شرکت سیناژن)، ۰/۱۳۲ میکرومولار آغازگر، ۱ واحد آنزیم پلیمراز Taq (شرکت سیناژن)، ۳/۳۳ نانوگرم در میکرولیتر DNA و ۱۰/۰۰٤ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود.

چرخه‌های حرارتی واکنش PCR در سه مرحله شامل مرحله اول: واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹٤°C، مرحله دوم: ٤۰ چرخه (هر چرخه شامل واسرشته‌سازی به مدت ۱ دقیقه در ۹٤°C، اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو به مدت ۱ دقیقه در ۳۷°C، بسط رشته DNA توسط پلیمراز به مدت ۲ دقیقه در ۷۲°C) و مرحله سوم: بسط نهایی به مدت ٥ دقیقه در ۷۲°C، انجام گردید.

الکتروفورز فرآورده‌های PCR: فرآورده‌های تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۱/٥٪ جداسازی و به روش رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکارسازی شدند. برای انجام الکترفورز، به هر نمونه ٥ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه شد و از هر نمونه به مقدار ۲۰ میکرولیتر در ژل

بارگذاری شد و عمل الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰، به مدت ۳ ساعت انجام شد. بعد از انجام الکتروفورز، از دستگاه ژل داک (Uvitec) برای مشاهده و عکسبرداری از نوارها استفاده شد. الگوهای نواری حاصل به صورت صفر و یک (وجود یا عدم وجود باند) مورد امتیازدهی قرار گرفتند. برای مشخص شدن اندازه قطعات تکثیر شده از نشانگر وزن مولکولی (Marker, 3-SM0191) با اندازه قطعات ۲۱۲۲۶-۵٦٤ جفت باز استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی: فاصله ژنتیکی بین توده‌ها بر اساس ضریب ژاکارد (Jaccard, 1908) محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA برای گروهبندی جمعیت‌ها رسم شد. به‌منظور تعیین کارایی روش تجزیه خوشه‌ای، از ضریب همبستگی کوفنتیک استفاده شد. برای تشخیص دقیق‌تر روابط ژنتیکی بین جمعیت‌ها، تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی بر اساس فاصله ژنتیکی ژاکارد انجام شد. همچنین تجزیه واریانس مولکولی بر اساس مربع فاصله اقلیدسی، برای تفکیک واریانس کل مولکولی به واریانس بین و درون جمعیت‌ها به‌عمل آمد (Excoffier et al., 1992). برای محاسبات آماری از نرم افزارهای Minitab 15، NTSYSpc 2.02i و Arlequin 3.11 استفاده گردید.

نتایج

تعداد ۱۰ آغازگر از ۵۰ آغازگر ارزیابی شده RAPD، واجد الگوهای نواربندی مناسب و چندشکل با تکرارپذیری بالا بودند، بنابراین از این ۱۰ آغازگر برای بررسی تمام جمعیت‌ها استفاده شد. این آغازگرها در محدوده ۵۰۰ تا ۲۲۰۰ جفت باز در مجموع ٦۱ نوار ایجاد کردند که از این تعداد ۵۷ نوار یعنی ۹۳/٤٤ درصد چندشکل بودند. تعداد نوارها از ۲ نوار برای آغازگرهای ۱۳- Oligo و ۱۸- Oligo تا ۱۲ نوار برای آغازگر ۱-Oligo متغیر بود (جدول ۲). آغازگرهای ۵-Oligo، ۱۳-Oligo، ۱٤-Oligo، ۱٦-Oligo و ۲۳-Oligo صد درصد چندشکلی نشان دادند که بیانگر تنوع بالای جمعیت‌های *A. cristatum* مورد مطالعه و قدرت زیاد این آغازگرها در تفکیک جمعیت‌ها بود. الگوهای نواربندی RAPD با استفاده از آغازگر ۳- Oligo در شکل ۱ ارائه شده است.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌های مورد مطالعه در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). ۱۳/٤٦درصد از تنوع کل مربوط به تنوع بین جمعیت‌ها و ۸٦/٥٤ درصد آن به تنوع درون جمعیت‌ها مربوط می‌شد. میانگین درجه تمایز ژنی (F_{ST}=۰/۱۵)، نشان داد که درصد بالایی از تنوع کل مربوط به تنوع درون جمعیت‌های مورد مطالعه بود.

فاصله ۱۰ جمعیت *A. cristatum* بر اساس فاصله ژنتیکی ژاکارد (Jaccard, 1908)، نشان داد که بیشتر جمعیت‌ها با همدیگر تشابه کمی نشان می‌دهند (جدول ٤). کمترین تشابه (۰/۱۷)، مربوط به جمعیت ٤۳۳٦ (کرمان) با ٤۰٥٦ (چادگان) و ۲۰۸ (اصفهان) با ۱۷۲۷ (گرگان) و بیشترین تشابه (۰/۳۷) مربوط به جمعیت‌های ۷۸٤٤ (بافت) با ۳۰۲۹ (بجنورد) بود. میانگین تشابه بین جمعیت‌ها نیز ۰/۳۲ بدست آمد که بیانگر تفاوت نسبی خوب در سطح مولکولی بین جمعیت‌ها می‌باشد.

برای انتخاب روش طبقه‌بندی، ضریب کوفنتیک با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.02i محاسبه شد. که بیشترین ضریب کوفنتیک (r=۰/۷٦) مربوط به دندروگرام حاصل از تجزیه داده‌ها به روش UPGMA بر اساس ماتریس شباهت ژاکارد (Jaccard, 1908)، بود. ۱۰ جمعیت مورد بررسی بر اساس تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، گروهبندی شدند (شکل۲). جمعیت ۱٥٥۰ در گروه اول، جمعیت‌های ٤۰٥٦ (چادگان)، ۱۷۲۷ (گرگان) و ٦۱۹ (اصفهان) در گروه دوم و بقیه در گروه سوم قرار گرفتند.

به‌منظور تعیین روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و نیز مشاهده فواصل بین جمعیت‌ها تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی نیز به‌عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای، انجام گرفت نتایج نشان داد که سه مؤلفه اصلی اول مجموعاً ٤٥/٥ درصد تغییرات داده‌ها را توجیه کردند. مؤلفه اول ۱۷/٥ درصد از تنوع کل را تبیین نمود. این مقدار برای مؤلفه‌های دوم و

سوم به ترتیب ۱٤/۷ و ۱۳/٤درصد بود (داده‌ها نشان داده نشده است). برخلاف داده‌های مورفولوژیک تبیین درصد کم تغییرات توسط چند مؤلفه نشان‌دهنده توزیع مناسب نشانگرهای مورد استفاده در ژنوم و نمونه برداری از قسمت‌های مختلف ژنوم است (محمدی، ۱۳۸۱). در این تجزیه نیز پراکنش خوب نشانگرهای مورد استفاده و نمونه‌برداری مناسب از کل ژنوم با توجه به کمی تغییرات توجیه شده توسط سه مؤلفه، مشاهده شد. نمایش دو بعدی ارقام بر اساس دو مؤلفه اصلی اول گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد (شکل ۳). بر اساس اطلاعات حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی، بر روی داده‌های مولکولی، تطابق خوبی بین مبدأ جغرافیایی وتنوع ژنتیکی مشاهده نشد. مشابه این نتایج، در مطالعات مورفولوژیکی قبلی (تقی‌زاده، ۱۳۸۷) نیز تطابقی بین تنوع جغرافیایی و تنوع مورفولوژیکی این جمعیت‌ها وجود نداشت.

جدول ۲: نام و توالی آغازگرها، تعداد کل باندهای چند شکل و درصد چندشکلی

شماره آغازگر	آغازگر		درصد GC	تعداد کل نوارها	تعداد نوارهای چند شکل	درصد چندشکلی
	نام آغازگر	۵' ⟶ ۳'				
۱	Oligo-۱	CCT GGG CTT C	۷۰	۱۳	۱۲	۹۲/۳۱
۲	Oligo-۲	CCT GGG CTT G	۷۰	٦	٦	۸۳/۳۳
۳	Oligo-۳	CCT GGG CTT A	٦۰	۱۱	۱۰	۹۰/۹۱
٤	Oligo-۵	CCT GGG TTC C	۷۰	۳	۳	۱۰۰
۵	Oligo-۹	CCT GCG CTT A	٦۰	۹	۸	۸۸/۸۹
٦	Oligo-۱۳	CCT GGG TGG A	۷۰	۲	۲	۱۰۰
۷	Oligo-۱٤	CCT GGG TTT C	٦۰	۳	۳	۱۰۰
۸	Oligo-۱٦	GGT GGC GGG A	۸۰	۲	۲	۱۰۰
۹	Oligo-۱۸	GGG CCG TTT A	٦۰	۱۰	۹	۹۰
۱۰	Oligo-۲۳	CCC GCC TTC C	۸۰	۳	۳	۱۰۰

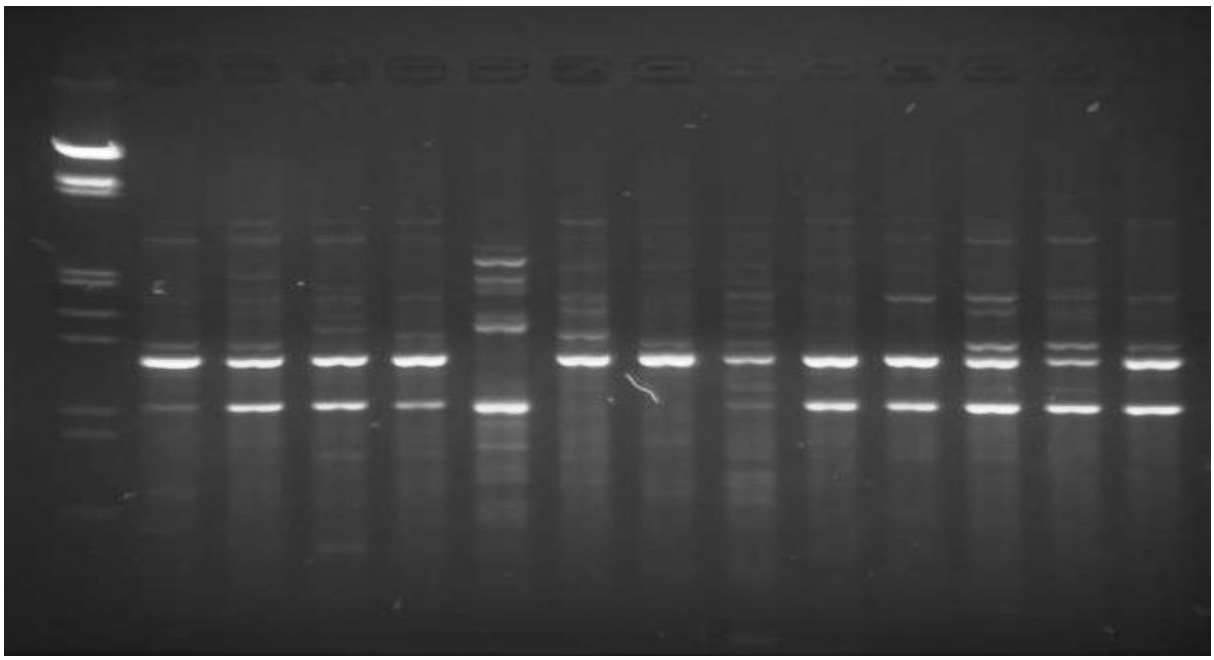
جدول ۳: تجزیه واریانس مولکولی و میانگین درجه تمایز ژنی برای ۵۰ گیاه نمونه‌گیری شده از جمعیت‌های *A. cristatum* بر اساس نشانگرهای RAPD

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات انحرافات	اجزاء واریانس	درصد واریانس	درجه تمایز ژنی
بین جمعیت‌ها	۹	۱۵٤/٤	۱/۵۰**	۱۳/٤٦	
درون جمعیت‌ها	٤۰	۳۸٦	۹/٦۵**	۸٦/۵٤	F_{ST} = ۰/۱۵

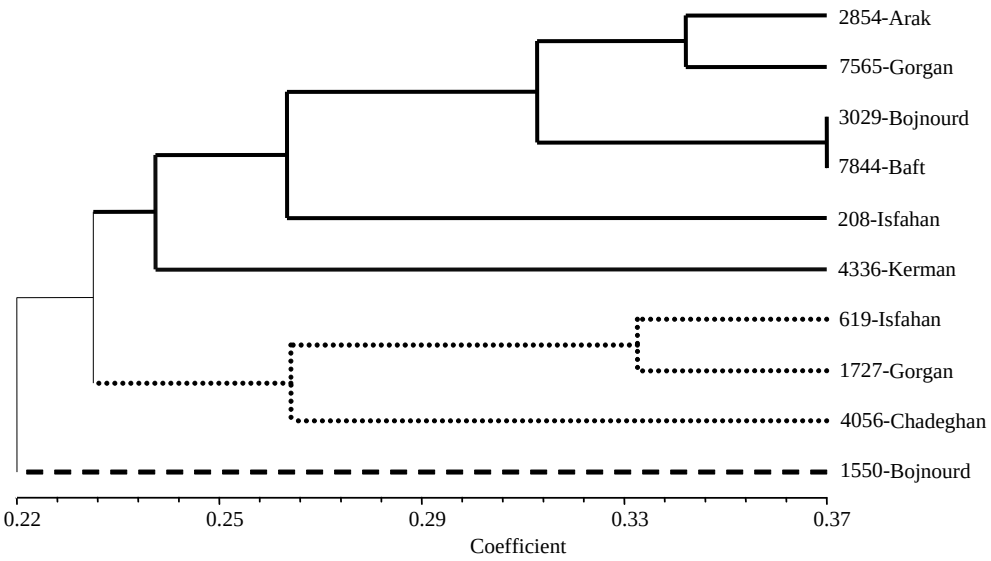
** = معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ٤: ضریب تشابه ژنتیکی Jaccard بین جمعیت‌های مورد مطالعه *A.cristatum*

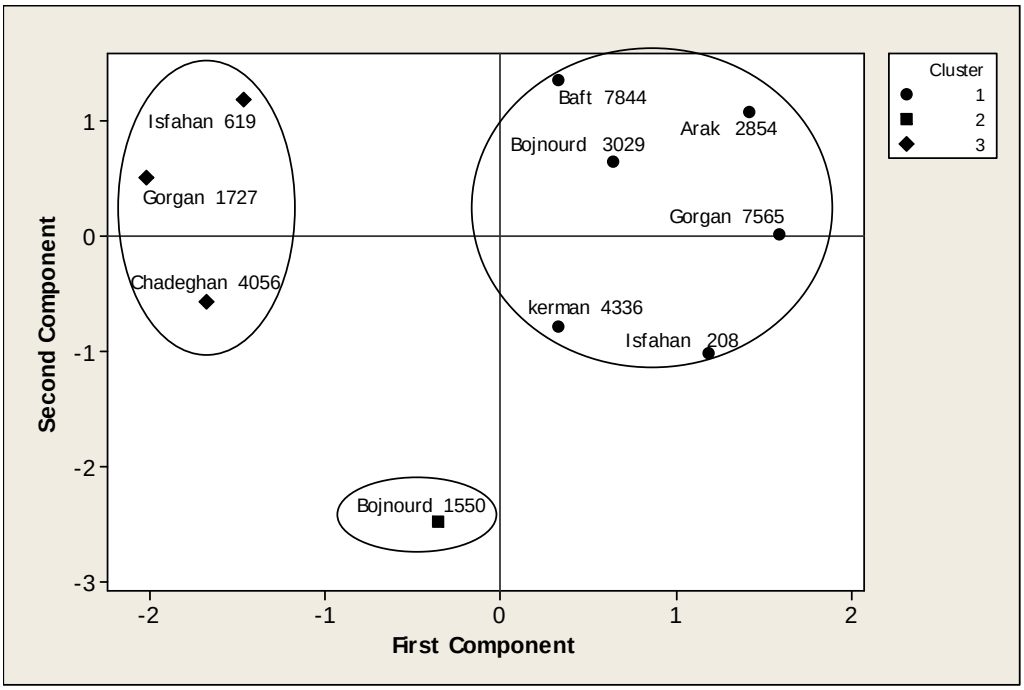
جمعیت	٢٨٥٤	٣٠٢٩	٧٨٤٤	١٥٥٠	٤٣٣٦	٧٥٦٥	٦١٩	٤٠٥٦	١٧٢٧	٢٠٨
٢٨٥٤	١									
٣٠٢٩	٠/٣٣	١								
٧٨٤٤	٠/٣٣	٠/٣٧	١							
١٥٥٠	٠/١٩	٠/٢٧	٠/٢٣	١						
٤٣٣٦	٠/٢٨	٠/٢٤	٠/٢٨	٠/٢٣	١					
٧٥٦٥	٠/٣٤	٠/٢٧	٠/٣٢	٠/٢٣	٠/٢٣	١				
٦١٩	٠/٣٠	٠/٢٦	٠/٣١	٠/٢٠	٠/٢٣	٠/٢٣	١			
٤٠٥٦	٠/٢٢	٠/٢٢	٠/٢٧	٠/٢١	٠/١٧	٠/٢٠	٠/٢٨	١		
١٧٢٧	٠/١٩	٠/٢٣	٠/٣١	٠/٢٠	٠/٢١	٠/٢٢	٠/٣٣	٠/٢٦	١	
٢٠٨	٠/٢٦	٠/٢١	٠/٢٩	٠/٢٠	٠/١٩	٠/٣١	٠/١٩	٠/٢١	٠/١٧	١



شکل ١: الگوی نواربندی بر اساس آغازگر Oligo-٣ در ١٣ نمونه از ٥٠ نمونه متعلق به ١٠ جمعیت مورد بررسی (چاهک اول از سمت چپ متعلق به سایز مارکر می‌باشد)



شکل ۲: گروه‌بندی جمعیت‌های *A. cristatum* بر اساس داده‌های حاصل از نشانگرهای RAPD



شکل ۳: پراکنش جمعیت‌های *A. cristatum* مورد بررسی بر اساس دو مؤلفه اول و دوم تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی روی داده‌های RAPD

بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی، با وجود اینکه تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌های مورد مطالعه معنی‌دار بود ولی بیشترین تنوع (۸٦/۵ درصد) از کل تنوع به درون جمعیت‌ها مربوط بود. این نتیجه چندان تعجب‌آور نیست، چون *A. cristatum* گیاهی دگرباروری بوده و در گیاهان دگرباروری تنوع درون جمعیت‌ها، چنانچه Mellish و همکاران (۲۰۰۲) در ارقام و گونه‌های آگروپیرون ۸۸٪ و Rajasekar و همکاران (۲۰۰۵) در *Poa trivialis* L.، ۸۷/۲٤ گزارش نمودند، بیشتر از گیاهان خودباروری به‌عنوان مثال *Hordeum spontaneum* K. Koch که ٤۳درصد گزارش شده (Dawson *et al.*, 1993)، می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان اظهار داشت که برخی از جمعیت‌های مورد بررسی منبع بالقوه برای ژن‌های مختلف هستند. میانگین درجه تمایز ژنی(F_{ST} =۰/۱۵) نیز نشان داد که درصد بالایی از تنوع کل مربوط به تنوع درون جمعیت‌های مورد مطالعه بوده است. این نتیجه در گونه‌های با دگرباروری بالا مورد انتظار است در این گونه‌ها سطح پایینی از تمایز جمعیتی دیده می‌شود (Hamrick, 1990). مطالعات اخیر در مورد الگوهای تنوع ژنتیکی بین جوامع، دلالت بر همبستگی واریانس ژنتیکی بین جمعیتی با ویژگی‌های خاص سیستم زادآوری، به‌ویژه دگرباروری (Hamrick et al., 1997) و دگرگرده افشانی با تبادل ژنی (Sork et al., 1998) دارد. گزارشات متعدد (Huff, 1997; Garcia, 2002; Rajasekar et al., 2005; Casler et al., 2003 و ایمانی ۱۳۸۷)، در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی در گراس‌های علوفه‌ای دگرباروری با استفاده از نشانگر RAPD، نیز حاکی از آن است که، تنوع درون جمعیت‌های مورد مطالعه بیشتر از تنوع بین جمعیت‌هاست.

نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی بر اساس ماتریس تشابه ژاکارد نیز تنوع مناسب جمعیت‌ها را نشان داد. این گروه‌بندی‌ها بر اساس تجزیه خوشه‌ای (شکل ۲) و تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (شکل ۳) نشان داد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهرهای مختلف از نظر مولکولی با همدیگر تفاوت دارند. از لحاظ جغرافیایی کمترین تشابه (۰/۱۷)، بین نمونه‌های کرمان و چادگان و بیشترین تشابه (۰/۳۷) بین نمونه‌های بافت و بجنورد مشاهده شد به همین جهت همبستگی خوبی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی مشاهده نمی‌شود، بنابراین در این تحقیق نمونه‌هایی که از نظر جغرافیایی نزدیک به همدیگر می‌باشند لزوما از نظر ژنتیکی تشابه بیشتری را نشان نمی‌دهند. طالبی و همکاران (۱۳۸٦)، نیز همچون نتایج این بررسی، نشان دادند که، در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های باریجه با استفاده از نشانگرهای مولکولیRAPD عدم انطباق تشابه مبدأ جغرافیایی و تشابه ژنتیکی وجود داشت. بحرائی (۱۳۷۵)، نیز در بررسی گوناگونی ژنتیکی گونه‌های *Triticum boeoticum* و *Triticum urartu* با استفاده از هفت آغازگر، گزارش نمود که فاصله ژنتیکی بین اجتماعات مستقل از شرایط جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌ها بود و پیشنهاد کرد که برای یافتن اینچنین ارتباطی باید از تعداد بیشتری آغازگر استفاده نمود. با این وجود، در مطالعات مورفولوژیکی که بر روی جمعیت‌های این تحقیق توسط تقی‌زاده (۱۳۸۷) انجام شده است. همخوانی خوبی بین گروهبندی جمعیت‌ها به دو روش مورفولوژیکی و مولکولی مشاهده گردید. که نشان‌دهنده این است که تکنیک RAPD می‌تواند در زمان کم الگوی ژنتیکی جمعیت‌های *A. cristatum* را نسبت به همدیگر مشخص سازد. از این تکنیک برای بررسی تنوع در بسیاری از گیاهان استفاده شده است. تمامی این مطالعات نشان داده‌اند که مارکرهای RAPD ابزاری مناسب برای تجزیه ژنوم گیاهان هستند. هرچند به منظور غلبه برمشکل تکرارپذیری کم شرایط PCR بایستی کاملاً کنترل شده باشد (نقوی و همکاران، ۱۳۸٤). با توجه به ارتباط بین نتایج مولکولی و ارزیابی مورفولوژیکی امکان شناسایی جمعیت‌های مناسب جهت توسعه و بهره‌گیری از آنها در برنامه‌های اصلاحی وجود خواهد داشت.

از گروه‌بندی‌های حاصل از این تحقیق می‌توان در برنامه‌های تلاقی آینده به‌منظور بهره‌گیری از پدیده هتروزیس

یا تفکیک متجاوز استفاده نمود. در صورتی که انتقال و تثبیت یک مشخصه خاص بدون تغییر در صفات مطلوب دیگر مد نظر باشد، می‌توان از جمعیت‌هایی که فاصله ژنتیکی کمی با جمعیت مطلوب داشته و واجد صفت مورد نظر نیز باشند به‌عنوان والد در تلاقی استفاده نمود. علاوه بر این، از نتایج حاصل از این تجزیه می‌توان در تولید واریته‌های سنتتیک سود جست.

نتیجه‌گیری نهایی

در بین و درون جمعیت‌های مورد مطالعه تنوع کافی برای انجام عمل گزینش وجود داشت. وجود تنوع بالا، درون جمعیت‌ها بیانگر آن است جمعیت‌های مورد مطالعه درصد دگرباروری بسیار بالایی دارند و می‌توانند منبع بالقوای از ژن‌های مفید به منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی آینده باشند. جمعیت‌های مورد بررسی بر اساس نشانگرهای RAPD در سه گروه مجزا قرار گرفتند، که در برنامه‌های تلاقی و تولید واریته‌های سنتتیک می‌توان در انتخاب والدین از این گروه‌بندی‌ها استفاده نمود. همچنین، با توجه به ارتباط بین نتایج مولکولی و ارزیابی مورفولوژیکی، اگر شرایط آزمایش کنترل شده باشد، RAPD می‌تواند وسیله‌ای مناسب و مؤثری در ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی جمعیت‌های مناسب *A. cristatum* جهت توسعه و بهره‌گیری از آنها در برنامه‌های اصلاحی آینده باشد.

منابع

ایمانی، ع. ا. (۱۳۸۷). بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *Festuca arundinacea* Schreb. بر اساس نشانگرهای مرفولوژیکی و مولکولی(RAPD). رساله دکترای تخصصی اصلاح نباتات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

بحرائی، ص. (۱۳۷۵). استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD در بررسی گوناگونی ژنتیکی گونه‌های *Triticum boeoticum* و *T. urartu* . مجله نهال و بذر. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. جلد ۱۲. شماره ۱. صفحه ۳۱-۴۳.

تقی‌زاده، ر. (۱۳۸۷). بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های دو گونه *Agropyron cristatum* و *Agropyron desertorum* بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی (RAPD). رساله دکترای تخصصی اصلاح نباتات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

طالبی کویخی ا.، م. محمدعلیها و م. ر. تقوی (۱۳۸٦). بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های باریچه (*Ferula gummosa* Boiss.) ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD. فصلنامهٔ علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۳. شماره٤. صفحه۵۲۲-۵۱٤.

قهرمان، ا. (۱۳٦٤). فلور ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. جلد هفتم. تهران. ایران.

کریمی، ه. (۱۳٦۹). مرتعداری. انتشارات دانشگاه تهران. ٤۰۸ صفحه.

محمدی، س. ا. (۱۳۸۱). روش‌های آماری در ژنتیک. مجموعه مقالات ششمین کنفرانس بین المللی آمار. ایران. دانشگاه تربیت مدرس. ٦-٤ شهریور. ص ۳۹٤-۳۷۱.

نقوی، م.ر.، ب. قره یاضی و ق. حسینی سالکده (۱۳۸٤). نشانگرهای مولکولی. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۳٤۲ صفحه.

Allen, E.B. and Jackson, L.L. (1992). The arid West. Restoration plans and Management Notes. 10(1): 56-59.

Anderson, W.R. and Fairbank, D.J. (1990). Molecular markers: important tools for plant genetic resources characterization. Diversity. **6:** 51-53.

Austin, D.D. and Urness, P.J. (1983). Overwinter forage selection by mule deer on seeded big sagebrush-grass range. Journal of Wild Life Management. 47(4): 1203-1207.

Bor, N.L. (1968). Gramineae. *Triticeae*. In Townsend, C.C., Guest, E. and Al-Rawi, A. (ed.) Flora of Iraq. Vo1.9. Republic of Iraq. P. 208-219.

Brown, J. C., Evans, R. A. and Young, J. A (1985). Effects of sagebrush control methods and seeding on runoff and erosion. Journal of Range Management. 38(3): 195-199.

Casler, M.D., Rangel, Y., Stier, J.C. and Jung, G. (2003). RAPD marker diversity among creeping bentgrass clones. Crop Science. 43:688-693.

Clayton, W.D., Harman, K.T. and Williamson, H. (2002). World Grass Species: Descriptions, Identification, and Information Retrieval. http://www.kew.org/data/grasses-db.html. [accessed 08 November 2007; 15:30 GMT].

Dawson, I.K., Chalmers, K.J. Waugh, R. and Powell, W. (1993). Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers. Molecular Ecology. 2:151–159.

Dewey, D.R. (1969). Synthetic hybrids of *Agropyron albicas, A. dasystachyum*, *Sitanion hystrix* and *Elymus canadensis*. American Journal of Botany. 56: 664-670.

Dewey, R.D. and Asay, K. H. (1975). The crested wheatgrass of Iran. Crop Science. 15: 844 -849.

Dillman, A.C. 1946. The beginnings of crested wheatgrass in North America. Journal of the American Society of Agronomy. 38(3): 237-250.

Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 131: 479–491.

Garcia, P., Monte, J-V., Casanova, C. and Soler, **C. (2002).** Genetic similarities among Spanisch populations of *Agropyron*, *Elymus* and *Thinopyrum*, using PCR-based markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 49: 103–109.

Hamrick, J.L. (1990). Isozime and the analysis of genetic structure in plant population. In: Soltis, E.D. and Soltis, P.S. (eds). Iszymes in Plant Biology. Chapman and Hall, London. PP. 87-90.

Hamrick, J.L., and Godt., M.J.W. (1997). Allozyme diversity in cultivated crops. Crop Science. 37:26–30.

Huff, D.R. (1997). RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. Crop Science. 37: 557-594.

Jaccard, P. (1908). Nouvelles researches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles. 44: 223-270.

Joshi, C.P. and Nguyen., H.T. (1993). Application of the random amplified polymorphic DNA technique for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats. Genome. 39:603- 609.

Love, L.D. and Hanson, H.C. (1932). Life history and habits of crested wheatgrass. Journal of Agricultural Research. 45(6): 371-383.

Mellish, A., Coulman, B. and Ferdinandez, Y. (2002). Genetic relationships among selected crested wheatgrass cultivars and species determined on the basis of AFLP markers. Crop Science. 42:1662-1668.

Ogle, D.G. (2002). Crasted Weatgrass *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn. Plant fact Sheet. USDA NRCS. Idaho State Office.

Rajasekar, S., Fei, S.-h. and Nick, E.C. (2005). Analysis of genetic diversity in rough bluegrass determined by RAPD markers. Crop Science. 46:162-167.

Rechinger, K.H. (1970). Flora Iranica.Vol.70, Graze,Austria.

Robertson, J.H., Neal, D.L., McAdams, K.R. and Tueller, P.T. (1970). Changes in crested wheatgrass ranges under different grazing treatments. Journal of Range Management. 23: 27-34.

Saghai- Maroof, M.A., Soleiman, K.M., Jorfenden, R.A. and Allars, R. (1984). Ribosomal DNA Spacer-Length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A. 81:80114-8018.

Smith, J.S.C. and Smith, O.S. (1992). Finger printing crop varieties. Advances in Agronomy. 47:140-149.

Sork, V.L., Campbell, D.R., Dyer, R.J., Fernandez, J.F., Nason, J., Petit, R., Smouse, P.E., and Steinberg, E. (1998). Proceedings from a workshop on gene flow in fragmented, managed, and continuous populations. National Center for Ecological Analysis and Synthesis, Santa Barbara, California. Research Paper No. 3: Available at "http://www.nceas.ucsb.edu/nceas-web/projects/2057/nceas-paper3".

Virk, P.S., Zhu, J., Newbury, H.J., Bryan, G.J., Jackson, M.T. and Ford-Lloyd, B.V. (2000). Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. Euphytica. 112, 275–284.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18: 6531–6535.

Investigation of genetic diversity in crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* (L.) Garetn.) populations using RAPD molecular markers

Taghizadeh, R[1]., Jafari, A.A[2]., Choukan, R[3]., Asghari, A.[4]

1. Corresponding author, Ph.D. of Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University (IAU), Tehran, I.R.Iran
2. Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
3. Assis. Prof., Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, I.R.Iran
4. Assis. Prof., Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, I.R.Iran

Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers have been used to characterize the genetic diversity of 10 Iranian populations of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*)**.** Ten out of 50 tested RAPD primers produced 57 polymorphic bands with presence or absence of patterns. Genetic distance among populations based on Jaccard's genetic similarity coefficients ranged from 0.17 to 0.37. The highest similarity was found between 7844 (Baft) vs. 3029 (Bojnourd) populations, whereas the lowest was among 4336 (Kerman) vs. 4056 (Chadegan) and 208 (Isfahan) vs. 1727 (Gorgan). Molecular variance analysis showed significant variation among populations and within populations, with average values of 13.46% and 86.54%, respectively. Analysis of population structure based on F-statistics revealed a higher values (F_{ST}=0.15) of variation within populations. The molecular data were subjected to unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) cluster analysis and populations were partitioned into three groups. Results of principal coordinate analysis strongly supported cluster analysis results. The interpopulation genetic distance showed no association with the geographic distance between the population sites of origin. However, they were in good agreement with the cluster pattern of morphological data that were obtained in the previous experiment. In general, RAPD marker data proved to be a good method of assessing genetic variation among populations of crested wheatgrass.

Key words: *Agropyron cristatum*, AMOVA, cluster analysis, Electrophoresis, F_{ST}, Genetic variation, polymorphism, RAPD