دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۸، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱۵۳-۱۴۳ (۱۳۸۹)

بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌هایی از آگروپیرون (*Agropyron* Gaertn.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

علی اصغری*[۱]، علی اشرف جعفری[۲]، مجید شکرپور[۳] و حمیدرضا محمددوست چمن‌آباد[۳]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات،استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
پست الکترونیک: ali_asgharii@yahoo.com
۲- دانشیار، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران
۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۱

چکیده

گونه‌های مختلف *Agropyron* در تولید علوفه در مراتع ایران نقش مهمی داشته و مقاوم به تنش‌های محیطی هستند. در این پژوهش تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Agropyron desertorum*، *Ag. cristatum*، *Ag. pectiniforme* و *Ag. elongatum* با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور از ۵۰ آغازگر تصادفی استفاده شد که از بین آنها ۱۲ آغازگر نوارهای مشخص و با وضوح بالا تولید کرده و مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت ۱۴۲ نوار چند شکل در محدوده‌ی ۲۰۰ - ۳۰۰۰ جفت باز تولید شدند. میانگین تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها براساس تنوع ژنی از ۰/۰۹ تا ۰/۳۰ برآورد گردید. بیشترین میانگین سطح این تنوع در جمعیت شماره ۱۵۵۰ از گونه *Ag. cristatum* با مقدار ۰/۳۰ و کمترین مقدار آن (۰/۰۹) در جمعیت شماره ۲۲۵ از گونه *Ag. elongatum* مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده تنوع زیاد در درون جمعیت‌های مختلف اگروپیرون بود. میانگین تنوع ژنتیکی درون (HS) و کل (HT) به‌ترتیب ۰/۱۸ و ۰/۳٤ و میانگین درجه تمایز ژنی (GST) بین جمعیت‌ها در تمام مکان‌ها ۰/٤۷ برآورد شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها، بین جمعیت‌های درون هر گونه و درون جمعیت‌ها معنی‌دار بود. براساس این تجزیه، فقط ۱۹/۳۱ درصد از تنوع کل مربوط به تنوع بین گونه‌ها بود. میزان ۲۲/۲۳ درصد آن به تنوع بین جمعیت‌های درون هر گونه و ٥٨/٤٦ درصد آن مربوط به درون جمعیت‌ها بود. تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه نی به روش UPGMA جمعیت‌های مورد مطالعه را در چهار گروه قرار داد. جمعیت‌های دو گونه *Ag. desertorum* و *Ag. cristatum* در دو گروه مجزا قرار گرفتند. جمعیت‌های دو گونه *Ag. pectiniforme* و *Ag. elongatum* در گروه دیگر قرار گرفته و از هم متمایز نشدند. در حقیقت این نشانگرها قادر به تمایز جمعیت‌های این دو گونه نبودند. یک جمعیت از گونه *Ag. elongatum* تشکیل یک گروه مجزا داد. برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی نیز استفاده شد و نتایجی مشابه با تجزیه خوشه‌ای حاصل شد. نتایج حاصل نشان داد که در بین و درون گونه‌ها و جمعیت‌های آگروپیرون تنوع زیادی وجود دارد که می‌توان از آن در برنامه‌های اصلاح این گونه استفاده نمود.

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

مقدمه

آگروپیرون به خشکی و سرما بسیار مقاوم بوده و به شرایط شوری و قلیایی متحمل است. این گیاه از نظر عملکرد و کیفیت علوفه مطلوب (Vogel & Moore, 1998; Jafari *et al.*, 2007) و برای احیای مراتع و تولید علوفه در کشور مناسب می‌باشد. حدود ۱۹ گونه از آن در ایران یافت می‌شود و تنوع گسترده‌ای در سطح بین و درون گونه‌ها در کشور وجود دارد (Bor, 1970). با بررسی تنوع و توان ژنتیکی این گیاه می‌توان از آن در برنامه‌های اصلاحی، برنامه‌های تلاقی به منظور تولید هیبرید و حتی در تلاقی‌های بین گونه‌ای (با قرابت زیاد) به منظور انتقال ژن‌های مطلوب استفاده کرد. گیاهانی مانند گندم، جو و چاودار قرابت زیادی با آگروپیرون دارند و می‌توان از این گیاه به‌عنوان یک مخزن ژنی ارزشمند جهت انتقال ژن‌های مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به گونه‌های مذکور بهره جست (Cauderon, 1996). گونه‌های آگروپیرون، علاوه‌بر تحمل تنش‌های غیرزیستی، مقاوم به زنگ و سایر عوامل بیماری‌زای گندم شناخته شده‌اند که می‌توانند به‌عنوان یک منبع ژنی برای اصلاح گندم بکار روند. موفقیت در به دست آوردن هیبرید بین گندم و گونه‌های آگروپیرون، انتقال ژن‌های مفید از ژنوم P آگروپیرون به گندم را امکان‌پذیر ساخته است (Cui *et al.*, 2009). در سال‌های اخیر، متخصصین ژنتیک گیاهی برای شناسایی گونه‌های مختلف آگروپیرون و انتقال ژن‌های مفید آنها به ارقام زراعی کوشش زیادی کرده‌اند (Bor, 1980; Baden, 1991; Jiang *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009).

ارزیابی و تعیین تنوع ژنتیکی معمولا براساس صفات فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام می‌گیرد. هر یک از این سه دسته صفات نقاط ضعف و قوت مختلفی دارند که باید به آن‌ها توجه شود. در بسیاری از موارد میزان تنوع ارزیابی شده با استفاده از صفات یاد شده نتایج یکسانی تولید می‌کند. با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و شیمیایی، تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف اگروپیرون مورد ارزیابی قرار گرفته و گونه‌های مورد مطالعه در پنج گروه مختلف طبقه‌بندی شدند (Farshadfar & Farshadfar, 2004). طبق گزارش این محققان، از این نشانگرها نتایج مشابهی حاصل شده است. محققان دیگری برای مشخص کردن محل کروموزومی نشانگرهای فیزیولوژیکی مقاومت به خشکی از لاین‌های دیزومیک آگروپیرون استفاده کرده و با ارزیابی آنها در مزرعه، گلخانه و آزمایشگاه برای این شاخص‌ها تنوع ژنتیکی بالایی گزارش کردند که نشان‌دهنده امکان انتخاب برای اصلاح مقاومت به خشکی در این گیاه می‌باشد (Farshadfar & Mohammadi, 2003). در این مطالعه، کروموزوم‌های ۳، ۵ و ۷ از ژنوم E دارای بیشترین مکان‌های ژنی کنترل کننده (QTL= Quantitative Trait Loci) برای صفات فیزیولوژیکی مرتبط با مقاومت به خشکی بودند. همچنین Asghari و همکاران (۲۰۰۷) شاخص‌های سیتوژنتیکی و کروموزومی چهار گونه آگروپیرون را مطالعه کرده و تنوع گسترده‌ای از نظر وجود و عدم وجود ماهواره، کروموزوم‌های B و حتی حالت‌های مختلف آنیوپلوئیدی را در این چهار گونه مشاهده کردند. از نشانگرهای مولکولی ازجمله نشانگرهای پروتئینی (Rafezi *et al.*, 2008)، نشانگرهای RAPD و آیزوزایم (Pilar *et al.*, 2002; Refoufi & Esnault, 2008, Taghizadeh, 2008) و نشانگرهای ریزماهواره (SSR) (Che *et al.*, 2008) نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی

آگروپیرون به طور گسترده استفاده شده است. همینطور Refoufi و Esnault (۲۰۰۸) با استفاده از نشانگرهای RAPD و آیزوزایم جمعیت‌های آگروپیرون را براساس سطح پلوئیدی از هم جدا کردند و سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در درون جمعیت‌ها گزارش کردند. محققان دیگری نظیر Che و همکاران (۲۰۰۸)، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه *Ag. critatum* را با استفاده از نشانگرهای SSR بررسی کرده و مشاهده نمودند که بیشترین مقدار تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد. این محققان همچنین بین تنوع ژنتیکی و جغرافیایی انطباق خوبی مشاهده کردند.

نشانگرهای RAPD به دلیل هزینه کم، سادگی، راحت بودن و تصادفی بودن و مزایای زیاد دیگر، در بررسی تنوع ژنتیکی کاربرد زیادی دارد. با وجود این‌که، این نشانگرها غالب بوده و تکرارپذیری کمی دارد، ولی با بهبود شرایط آزمایشگاه، تکرار آزمایش و استفاده از نوارهای با وضوح بالا می‌توان تکرارپذیری آن را تا حد قابل قبولی افزایش داد (Somers *et al.*, 1998). با توجه به تنوع بین و درون گونه‌ای آگروپیرون در کشور، در این مطالعه از نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی موجود در بین و درون جمعیت‌های چهار گونه مختلف اگروپیرون استفاده شد.

مواد و روشها

در این تحقیق ۳۰ جمعیت مختلف از چهار گونه اگروپیرون (*Ag. desertorum*، *Ag. cristatum*، *Ag. pectiniforme* و *Ag. elongatum*)، تهیه شده از بانک بذر مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). ابتدا این جمعیت‌ها در گلخانه کاشته شدند. پس از رشد کافی، نمونه‌های برگی از هر یک از جمعیت‌ها تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. DNA ژنومی هر نمونه از ۰/۲ گرم بافت تازه برگی به روش CTAB استخراج گردید (Saghai-Maroof *et al.*, 1984). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش اسپکتروفتومتری مشخص شد. نمونه‌های با کیفیت مطلوب و بالا انتخاب و پس از رقیق کردن مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۵۰ آغازگر تصادفی (تهیه شده از شرکت metabion آلمان) بکار گرفته شد. از این تعداد، ۱۵ آغازگر نوار تشکیل دادند و تعداد ۱۲ عدد از آن‌ها که دارای نوارهای واضح‌تر و با تکرارپذیری بالا بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۵ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۰۵ میلی‌مولار از هر dNTP، ۰/۱۳۲ میکرومول آغازگر، یک واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase و بافر واکنش به مقدار 1x) انجام شد. چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز عبارت بود از: یک چرخه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و یک چرخه نهایی شامل ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. برای آشکارسازی و رنگ‌آمیزی نوارها از ژل آگارز با غلظت ۱/۵٪ و اتیدیوم بروماید استفاده شد. امتیازدهی به نوارها به صورت صفر و یک انجام شد. برای انجام تجزیه واریانس مولکولی از نرم‌افزار $ARLIQUIN_{1.31}$، تجزیه ژنتیکی داده‌ها از نرم‌افزار $POPGEN_{3.11}$ و تجزیه خوشه‌ای و مؤلفه‌های هماهنگ اصلی از نرم‌افزار $NTSYS\ pc_{2.1}$ استفاده گردید.

نتایج

از مجموع ۵۰ آغازگر استفاده شده، ۱۲ آغازگر، چند شکلی قابل توجهی را نشان داده (شکل ۱) و در مجموع ۱٤۲ نوار تولید کردند. میانگین نواردهی برای هر آغازگر ۱۱/۸۳ بود. اسامی، توالی و تعداد نوار چندشکل تولید شده توسط هر آغازگر در جدول ۲ ارائه شده است.

میانگین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها براساس تنوع ژنی نی (Nei, 1978)، از ۰/۰۹ تا ۰/۳۰ برآورد گردید. بیشترین میانگین سطح این تنوع در جمعیت شماره ۱۵۵۰ از گونه *A. cristatum* با مقدار ۰/۳۰ و کمترین مقدار آن (۰/۰۹) در جمعیت شماره ۲۲۵ از گونه *A. elongatum* مشاهده شد (جدول ۱). این نتایج نشان‌دهنده تنوع زیاد در بین و درون جمعیت‌های مختلف اگروپیرون بود. میانگین تنوع ژنتیکی درون (H_S) و کل (H_T) به‌ترتیب ۰/۱۸ و ۰/۳٤ و میانگین درجه تمایز ژنی (G_{ST}) بین جمعیت‌ها در تمام مکان‌های نشانگری ۰/٤۷ برآورد شد.

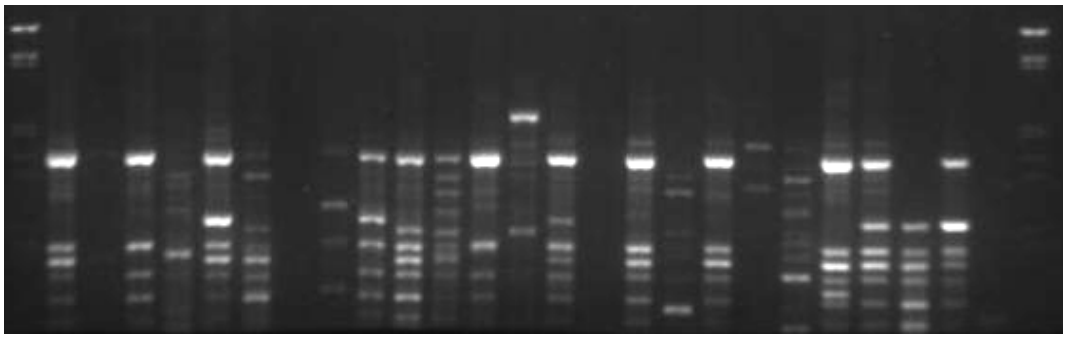
نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها، بین و درون جمعیت‌ها معنی‌دار بود. ۱۹/۳۱ درصد از تنوع کل مربوط به تنوع بین گونه‌ها، ۲۲/۲۳ درصد آن به تنوع بین جمعیت‌های درون هر گونه و ۵۸/٤٦ درصد آن مربوط به درون جمعیت‌ها بود (جدول ۳). نتایج حاصل نشان داد که تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی بین گونه‌ها، بین جمعیت‌های درون هر گونه و درون جمعیت‌ها وجود دارد، ولی بیشترین مقدار این تنوع (بیش از دو برابر) مربوط به درون جمعیت‌های مورد مطالعه بود. از این تنوع می‌توان در برنامه‌های اصلاح و برنامه‌های گزینش در این گیاه بهره جست.

در این مطالعه جمعیت‌ها با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی شدند. برای این منظور از روش UPGMA با استفاده از ماتریس ضرایب تشابه نی استفاده گردید (شکل ۲). در گروه‌بندی، جمعیت‌ها در چهار گروه قرار گرفتند. جمعیت‌های مربوط به دو گونه *Ag. desertorum* و *Ag. cristatum* در دو گروه مجزا قرار گرفتند. جمعیت‌های دو گونه دیگر (*Ag. pectiniforme* و *Ag. elongatum*) در گروه دیگر قرار گرفته و از هم تفکیک نشدند. این نشانگرها نتوانستند جمعیت‌های این دو گونه را به طور کامل از هم تفکیک نمایند. یک جمعیت از گونه *Ag. elongatum* تشکیل یک گروه مجزا داد (شکل ۲). نشانگرهای مورد استفاده توانستند جمعیت‌های دو گونه *Ag. Cristatum* و *Ag. desertorum* را از یکدیگر و از دو گونه دیگر متمایز کنند ولی جمعیت‌های دو گونه دیگر به خوبی از هم تفکیک نشدند و این نشان‌دهنده قرابت بالای ژنتیکی این دو گونه می‌باشد. در این مطالعه، الگوی تنوع ژنتیکی با توزیع جغرافیایی جمعیت‌ها تطابق نداشت.

از روش تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی نیز به‌عنوان روشی مکمل با تجزیه خوشه‌ای، برای گروه‌بندی استفاده شد. سه مؤلفه اصلی اول مجموعاً ٤۱/٤ درصد تغییرات داده‌ها را توجیه کردند. نمایش دو بعدی ارقام (شکل ۳) براساس دو مؤلفه اصلی اول گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد و توانست ژنوتیپ‌های مورد بررسی را همانند تجزیه خوشه‌ای از هم تفکیک نماید.

جدول ۱- مشخصات و میانگین تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های مورد مطالعه در گونه‌های *Ag. desertorum*، *Ag. cristatum*، *Ag. pectiniforme* و *Ag. elongatum* با استفاده از ضریب تنوع ژنی نی (Nei, 1978)

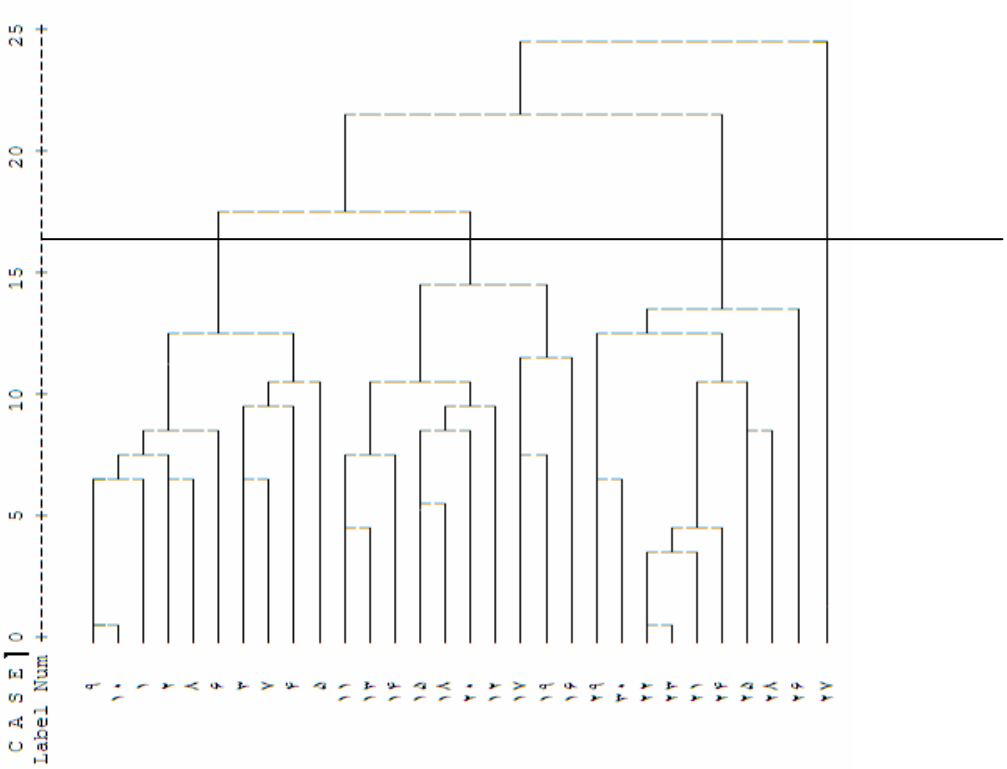
گونه	شماره	کد نمونه	محل جمع‌آوری	میانگین تنوع ژنی	گونه	شماره	کد نمونه	محل جمع‌آوری	میانگین تنوع ژنی
A. cristatum	۱	۲۸٥٤	اراک	۰/۲۳	*A. desertorum*	۱۱	۳۹۷٤	کرج	۰/۲۹
	۲	۳۰۲۹	بجنورد	۰/۲٤		۱۲	۷٤۲	همدان	۰/۱٥
	۳	٦۱۹	اصفهان	۰/۲٦		۱۳	۳٤۱	بانک ژن	۰/۲٥
	٤	٤۰٥٦	چادگان	۰/۱۹		۱٤	٦۳۱	قروه	۰/۱۹
	٥	۱۷۲۷	گرگان	۰/۲۱		۱٥	۳٤۷۷	بانک ژن	۰/۲۱
	٦	۷۸٤٤	بافت	۰/۱۹		۱٦	۲۱۳	بانک ژن	۰/۱۸
	۷	۱٥٥۰	بجنورد	۰/۳۰		۱۷	۱۳٦۹	دماوند	۰/۲۰
	۸	٤۳۳٦	کرمان	۰/۲۱		۱۸	۳۹٦٥	دماوند	۰/۱٥
	۹	۲۰۸	اصفهان	۰/۲۳		۱۹	۳٤۷	بوئین زهرا	۰/۲۱
	۱۰	۷٥٦٥	گرگان	۰/۲۳		۲۰	٤۰۰	اردبیل	۰/۱۸
A. elongatum	۲۱	٦۹۹۰	رقم خارجی	۰/۱٤	*A. pectiniforme*	۲٦	٦۲	رقم خارجی	۰/۱۲
	۲۲	۳۲۰۲	قزوین	۰/۱۳		۲۷	۷۸٥۲	تهران	۰/۱۲
	۲۳	۲۲۳	قزوین	۰/۱۱		۲۸	۷۸۱۹	کرمان	۰/۱٥
	۲٤	۲۲٤	مازندران	۰/۰۹		۲۹	٦۹٥۱	کرمان	۰/۱۳
	۲٥	۲۲٥	چهارمحال بختیاری	۰/۱		۳۰	۸۷٥٤	چهارمحال بختیاری	۰/۱۳



شکل ۱- چند شکلی حاصل از آغازگر Oligo-1 در پنج جمعیت مربوط به گونه *Ag. elongatum* (پنج فرد از هر جمعیت).

جدول ۲- اسامی آغازگرها، توالی و تعداد نوار چند شکل تولید شده توسط هر آغازگر

نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد نوار چند شکل	نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد نوار چند شکل
Oligo-1	CCTGGGCTT C	۱۱	Oligo-17	CCTGGGCCT C	۱۷
Oligo-2	CCTGGGCTT G	۱۱	Oligo-19	GCCGGGTTT A	۱۲
Oligo-3	CCTGGGCTT A	۱۵	Oligo-23	CCCGCCTTC C	۷
Oligo-5	CCTGGGTTC C	۹	Oligo-24	ACAGGGGTG A	۱۲
Oligo-6	CCTGGGCCT A	۱۵	Oligo-25	ACAGGGCTC A	۸
Oligo-12	CCTGGGTCC A	۱۳	Oligo-29	CCGGCCTTA C	۱۲



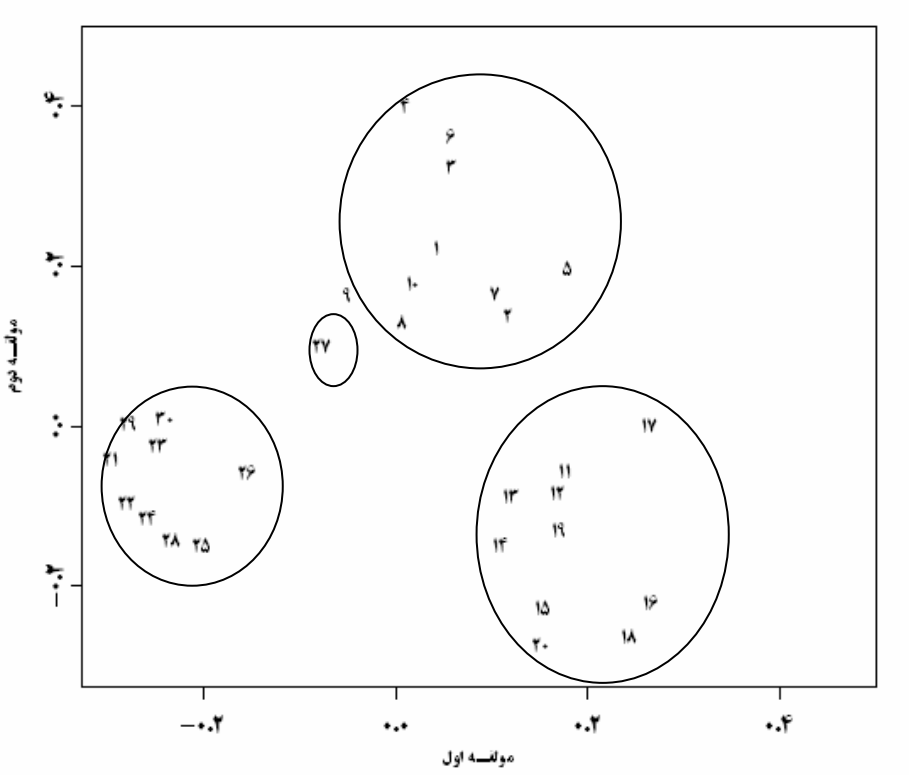
شکل ۲- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نشانگرهای چند شکل RAPD.

(شماره‌های ۱ تا ۱۰ مربوط به جمعیت‌های گونه *Ag. cristatum*، شماره‌های ۱۱ تا ۲۰ مربوط به گونه *Ag. desertorum*، شماره‌های ۲۱ تا ۲۵ مربوط به گونه *Ag. Elongatum* و شماره‌های ۲۶ تا ۳۰ مربوط به گونه *Ag. pectiniforme* می‌باشد).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس مولکولی برای جمعیت‌های آگروپیرون مورد مطالعه براساس داده‌های حاصل از کاربرد نشانگرهای مولکولی RAPD

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	اجزاء واریانس	درصد واریانس	درجه تمایز ژنی
بین گونه‌ها	۳	۳۲۷/۸۶	۲/۴۳**	۱۹/۳۱	F_{CT}=۰/۱۹
جمعیت‌های درون هر گونه	۲۶	۵۵۵/۷۸	۲/۸۰**	۲۲/۲۳	F_{SC}=۰/۲۷
درون جمعیت‌ها	۱۲۰	۸۸۴/۲۰۰	۷/۳۷**	۵۸/۴۶	F_{ST}=۰/۴۱

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل۳- گروه‌بندی جمعیت‌های مورد بررسی آگروپیرون با استفاده از دو مؤلفه اول و دوم حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی. شماره‌های ۱ تا ۱۰ مربوط به جمعیت‌های گونه *Ag. cristatum*، (شماره‌های ۱۱ تا ۲۰ مربوط به گونه *Ag. desertorum*، شماره‌های ۲۱ تا ۲۵ مربوط به گونه *Ag. elongatum* و شماره‌های ۲۶ تا ۳۰ مربوط به گونه *Ag. pectiniforme* می‌باشد).

بحث

نشانگرهای RAPD ازجمله نشانگرهایی هستند که به طور گسترده در بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند و قادرند با استفاده از مقدار جزئی DNA اختلاف موجود بین گیاهان را در سطح DNA نشان دهند. مطالعه تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های آگروپیرون با استفاده از نشانگرهای RAPD نشان داد که تنوع زیادی در بین و درون جمعیت‌ها وجود دارد. به طوری‌که، امکان استفاده از آن‌ها در تلاقی‌ها جهت بهره‌برداری از حداکثر هتروزیس و تولید نسل‌های در حال تفرق برای گزینش ژنوتیپ‌های برتر میسر می‌باشد. تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها، بین جمعیت‌های درون هر گونه و درون جمعیت‌ها معنی‌دار بود و ۵۸/٦٤ درصد از کل تنوع موجود به درون جمعیت‌ها مربوط می‌شد که تقریباً بیش از دو برابر تنوع موجود در بین جمعیت‌های درون هر گونه بود (جدول ۳). در گونه‌های دگربارور این نتایج مورد انتظار است. چون، سطح پایینی از درجه تمایز ژنی در آنها دیده می‌شود و بیشترین مقدار تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد (Hamrick, 1990). مطالعات اخیر در مورد الگوهای تنوع ژنتیکی بین جوامع، دلالت بر همبستگی واریانس ژنتیکی بین جمعیتی با ویژگی‌های خاص سیستم زادآوری، به ویژه دگرباروری و نیز دگرگرده‌افشانی با تبادل ژنی دارد (Hamrick & Godt, 1997).

در گزارشات متعدد در ارتباط با بررسی تنوع ژنتیکی در گراس‌های علوفه‌ای با استفاده از نشانگرهای RAPD، میزان تنوع درون جمعیت‌ها بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها ذکر شده است (Huff, 1997;Garcia *et al*., 2002; Casler *et al*., 2003; Rajasekar *et al*., 2005; Imani *et al*., 2008; Taghizadeh, 2008). با استفاده تجزیه خوشه‌ای مؤلفه‌های هماهنگ اصلی جمعیت‌های مورد مطالعه گروه‌بندی شدند و جمعیت‌های مربوط به دو گونه *Ag. desertorum* و *Ag. cristatum* از دو گونه دیگر جدا شدند، ولی جمعیت‌های دو گونه دیگراز هم تفکیک نشدند (شکل ۲). این نشانگرها نتوانستند، جمعیت‌های دو گونه دیگر را به طور کامل از هم تفکیک نمایند و این نشان‌دهنده قرابت بالای ژنتیکی این دو گونه می‌باشد. هرچند که تفاوت زیادی بین دو گونه *Ag. pectiniforme* و *Ag. elongatum* از نظر خصوصیات ظاهری و مورفولوژیکی وجود دارد. باید توجه داشت که نشانگرهای DNA می‌توانند تشابهات ژنتیکی را در سطح قسمت‌های ژنومی بدون رمز (هتروکروماتینی) نیز نشان دهند. بنابراین، ممکن است جمعیت‌های دوگونه از لحاظ خصوصیات ظاهری متفاوت باشند ولی از لحاظ کل ژنوم با هم شباهت زیادی داشته باشند (Buckler & Thornsherry, 2002). شباهت‌های زیادی نیز بین دو گونه *Ag. desertorum* و *Ag. Cristatum* از نظر خصوصیات مورفولوژیکی وجود دارد. گونه *Ag. pectiniforme* نیز از لحاظ شکل سنبله و بذر به این دو گونه شبیه است ولی با وجود این شباهت‌های ظاهری، نشانگرهای RAPD توانست جمعیت‌های مربوط به این سه گونه را از هم متمایز نمایند. سایر محققان ازجمله Taghizadeh (۲۰۰۸)، نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های دو گونه *Ag. desertorum* و *Ag. cristatum* از صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای RAPD استفاده کرده و جمعیت‌های مورد مطالعه را برحسب گونه تا حدودی تفکیک نمودند و تطابق نتایج حاصل از این دو سری نشانگر را گزارش کردند.

بین جمعیت‌های مربوط به هر گونه نیز تنوع وجود داشته و در هر گونه جمعیت‌های موجود به گروه‌های مختلف تقسیم شدند. در این مطالعه هیچ‌گونه تطابقی بین الگوی تنوع ژنتیکی و جغرافیایی مشاهده نشد. البته این عدم تطابق قابل انتظار بود. چون، جمعیت‌ها به چهار گونه مختلف تعلق داشتند و اختلاف بین گونه‌ها تا حدودی زیاد و گروه‌بندی جمعیت‌ها برحسب گونه منطقی‌تر از گروه‌بندی براساس مبدأ جغرافیایی بود.

منابع مورد استفاده

– Asghari, A., Agayev, Y. and Fathi, S.A.A., 2007. Karyological study of four species of wheatgrass (*Agropyron* sp.). Pakistan Journal of Biological Sciences, 10: 1093-1097.
– Baden, C., 1991. Taxonomic revision of Psythyrostachys (poaceae), Nordic. Bot., 11: 3-26.
– Bor, N.L., 1970. Gramineae, in: Rechinger K. H. (ed.), Flora Iranica, No. 70, Akademische Deyek.ll, Verlagsoa Nstalt Granz, Austria.
– Bor, N.L., 1980. Gramineae, in: Rechinger. K. H. (ed.): Flora Iranica, No. 70, Akademische Deyek.ll, Verlagsoa Nstalt Granz, Austria.
– Buckler, E.S. and Thornsherry, J.M., 2002. Plant molecular diversity and application to genomics. Current Opinion in Plant Biology, 5: 107-111.
– Casler, M.D., Rangel, Y., Stier, J.C. and Jung, G., 2003. RAPD Marker Diversity among Creeping Bentgrass Clones. Crop Sci., 43: 688-693.
– Cauderon, Y., 1996. Genome analysis in the genius Agropyron. *Hereditas Supple*. **2:** 218-234.
– Che,Y.H., Li, H.J., Yang, Y.P. and Yang, X.M., 2008, On the use of SSR markers for the genetic characterization of the *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn. In Northern China. Genet. Resour. Crop Evol., **55:** 389-396.
– Cui, H., Yu, Z., Deng, J., Gao, X., Sun, Y. and Xia, G., 2009. Introgression of bread wheat chromatin into tall wheatgrass *via* somatic hybridization. Planta, 229: 323-330.
– Farshadfar, M. and Farshadfar, A., 2004. Study genetic diversity of different *Agropyron* Gaertn species based on morphological and biochemical indices. Journal of Science and Technology of Agricalture and Natural Resorces, 2: 243-250.
– Farshadfar, M. and Mohammadi, R., 2003. Evaluating physiological indices for drought resistance of *Agropyron* using multiple selection indices. Irannian Journal of Agriculture Science, 34: 635-646.
– Garcia, P., Monte, J.V., Casanova, C. and Soler, C., 2002. Genetic similarities among Spanish populations of *Agropyron*, *Elymus* and *Thinopyrum* using PCR-based markers. Genet. Resour. Crop Evol., 49: 103–109.
– Hamrick, J.L., 1990. Isozimes and the analysis of Genetic structure in plant population. 87-90. In: Solitis J. and Solitis, P.S., (eds.). Isozymes in Plant Biology. Chapman and Hall, 260 p.
– Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W., 1997. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. 102-118. In: Silvertown J., (ed.). Plant Life Histories. Ecology, Phylogeny and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 307 p.
– Huff, D.R., 1997. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. Crop Sci. 37: 557-594.
– Imani, A.A., 2008. Study genetic diversity of *Festuca arundinacea* Schreb using morphological and molecular markers. PhD Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran.
– Jafari, A.A., Saied Mohammadi, A.R., and Abdi, N., 2007. Study seed yield and yield components diversity of 31 *Agropyron desertorum* genotypes using factor analysis method. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15: 211-221.
– Jiang, L., Friebe, B. and Dhaliwal, H., Martin, Y.J. and Gill, B.S., 1993. Molecular cytogenetic analysis of *Agropyron elongatum* chromatin in wheat germplasm specifying resistance to wheat streak virus, Theor. Appl. Genet., 5: 89-111.
– Liu, H., Gao, X. and Xia, G., 2008. Characterizing HMW-GS alleles of decaploid *Agropyron elongatum* in relation to evolution and wheat breeding. Theor. Appl. Genet., 116: 325-334.
– Liu, H., Liu, S.H. and Xia, G., 2009. Generation of high frequency of novel alleles of the high molecular weight glutenin in somatic hybridization between bread wheat and tall wheatgrass. Theor. Appl. Genet. 10: 1007-1012.
– Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.
– Pilar, A., Juan-Vicente, M. Carlos, C. and Consuelo, S., 2002. Genetic similarities among Spanish populations of *Agropyron*, *Elymus* and *Thinopyrum*, using PCR-based markers. Genet. Resour. Crop Evol., 49: 103-109.
– Rafezi, A., Farshadfar, M. and Farshadfar, A., 2008. Using biochemical markers (proteins) for study interspecies diversity at 17 populations of *Agropyron elongatum* L. Iranian Journal of

Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 16: 248- 253.
– Rajasekar, S., Fei, S.H. and Nick, E.C., 2005. Analysis of genetic diversity in rough bluegrass determined by RAPD markers. Crop Sci. 46: 162-167.
– Refoufi, A. and Esnault, M.A., 2008. Population genetic diversity in the polypolid complex wheatgrass using isoenzym and RAPD data. Biologia Plantarum, 52: 543-547.
– Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M. Jorgensen, R.A. and Allard, R.W., 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 8014-8018.
– Somers, D.J., Friesen, K.R.D. and Rakow, G., 1998. Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in Brassica napus. Theor. Appl. Genet., 96: 897-903.
– Taghizadeh, R., 2008. Study genetic diversity of Agropyrone cristatum and Agropyrone desertorum populations using morphological and RAPD markers. PhD. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran.
– Vogel, K.P., Moore, K.J., 1998. Forage yield quality of tall wheatgrass accessions in USDA germplasm collection. Crop Sci., 38: 509-511.

Genetic variation between and within populations of *Agropyron* Gaertn. using RAPD markers

A. Asghari[1*], A.A. Jafari[2]., M. Shokrpour[3] and H.R. Mohammaddoust-e-Chamanabad[3]

1*– Corresponding author, Assis. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: ali_asgharii@yahoo.com
2- Assos. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands.
3- Assis. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Received: 16.09.2009 Accepted: 22.11.2009

Abstract

Agropyron species as important range plant species in Iran are resistant to various environmental stresses. This research was conducted to analyze genetic variation in *Agropyron desertorum, Ag. Cristatum, Ag. pectiniforume* and *Ag. elongatum* by RAPD markers. Fifty random primers were used and 12 primers were selected, by which, 142 polymorphic bands with lengths ranged from 200 to 3000 bps. Were obtained. On the basis of Nei's gene index, average genetic diversity within populations varied from 0.09 to 0.30. The largest and the smallest values were obtained in population 1550 (from *Ag. cristatum*; 0.30) and population 225 (from *Ag. elongatum*; 0.09), respectively. Results showed high variation within populations. Mean of genetic variation within (H_S), Total (H_T) and degree of genetic differentiations (G_{ST}) were 0.18, 0.34 and 0.47, respectively. Analysis of molecular variance (AMOVA) displayed significant variation within and among *Agropyron* species and populations. The results showed that only 19.31 present of total variation belong to between species. Between and within populations variations were 22.23 and 58.46 present, respectively. Cluster analysis based on Nei's genetic similarity and UPGMA method, categorized the entries into four clusters. Populations of *Ag. Desertorum* and *Ag. Cristatum* grouped in two separate clusters. Populations of *Ag. elongatum* and *Ag. pectiniforme* grouped in another cluster and obtained markers could not separate the populations of the two species. One population from *Ag. elongatum* formed a distinct group. Classifying the populations using principle coordinate analysis (PCoA), verified the results of cluster analysis. Results showed that enough variation exist between and within *Agropyron* species and populations that can be used in breeding programs of the species.

Key words: *Agropyron*, genetic variation, cluster analysis, molecular marker and RAPDs.