دانشکده کشاورزي
گروه زراعت و اصلاح نباتات

بررسي تنوع ژنتيکي اکوتيپهاي علف باغ (*Dactylis glomerata* L.) بر اساس نشانگرهاي RAPD

اساتيد راهنما:
دکتر علي اصغري
دکتر مجيد شکرپور

اساتيد مشاور:
دکتر حميد رضا محمد دوست چمن آباد
دکتر علي اکبر ايماني

توسط:
الهام پناهي ترکمبور

مهر- 1388

نام خانوادگي دانشجو: پناهي ترکمبور **نام:** الهام	
عنوان: بررسي تنوع ژنتيک بوتيپهاي علف باغ (*Dactylis glomerata* L.) بر اساس نشانگرهاي RAPD	
اساتيد راهنما: دکتر علي اصغري - دکتر مجيد شکرپور **اساتيد مشاور:** دکتر حميد رضا محمد دوست چمن‌آباد – دکتر علي اکبر ايماني	
مقطع تحصيلي: کارشناسي **گرايش:** اصلاح نباتات **دانشگاه:** محقق اردبيلي	**رشته:** اصلاح نباتات **تاريخ فارغ التحصيلي:** 1388/07/07 **تعداد صفحه:** 78
واژه‌هاي کليدي: علف باغ، تجزيه خوشه‌اي، تجزيه واريانس مولکولي، تنوع ژنتيکي، RAPD	

الف

چکیده

به منظور برآورد تنوع ژنتیکي درون و بین اکوتیپهاي علف باغ با استفاده از نشانگرهاي RAPD، بذر 18 اکوتیپ داخلي و 7 اکوتیپ خارجي در گلخانه دانشکده کشاورزي دانشگاه محقق اردبیلي کشت شدند. براي استخراج DNA نمونه برگي از ژنوتیپها در مرحله 4 برگي از برگهاي جوان تهیه شد. در تجزیه RAPD، 8 آغازگر RAPD از 40 آغازگر مورد ارزیابي، 73 نوار چندشکل تولید کردند. تعداد کل نوارهاي چندشکل در درون اکوتیپها از 25 تا 49 نوار متغیر بود. فاصله ژنتیکي بین اکوتیپها بر اساس ضریب ني بین 0/051 تا 0/245 برآورد شد. میانگین تنوع ژنتیکي کل، درون اکوتیپها و درجه تمایز ژني به ترتیب 0/291، 0/181 و 0/378 برآورد گردیدند که نشان مي‌داد تنوع درون اکوتیپها بیشتر از بین اکوتیپها است. تنوع ژنتیکي درون اکوتیپها با استفاده از شاخص ژني ني در محدوده صفر تا 0/5 برآورد شد. تجزیه واریانس مولکولي بر اساس مربع فاصله اقلیدسي، تنوع معني‌داري را بین و درون اکوتیپها نشان داد. به طوري که، بخش اعظم تغییرپذیري در درون اکوتیپها (78/38 %) بود. بر اساس تجزیه خوشه‌اي داده‌هاي مولکولي، 25 اکوتیپ علف باغ در 8 گروه قرار گرفتند. گروه‌بندي بر اساس داده‌هاي مولکولي انطباقي با گروه‌بندي جغرافیایي اکوتیپها نداشت. در تجزیه به مولفه‌هاي هماهنگ اصلي، سه مولفه اول 59/48 درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه کردند. گروه‌بندي اکوتیپها با استفاده از دو مولفه اصلي اول و دوم تا حدودي نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌اي را تائید کرد.

ج

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

تقديم ..... الف
تقدير و تشكر ..... ب
چكيده ..... ج
فهرست مطالب ..... د
فهرست شكل‌ها ..... ح
فهرست جداول ..... ط
1- مقدمه و مروري بر تحقيقات گذشته
1-1- مقدمه 2
1-2- اهميت علف باغ 5
1-3- طبقه بندي علف باغ 5
1-4- مشخصات گياه شناسي علف باغ 7
1-5- اكوتيپ 8
1-6- اهداف اصلاحي در علف باغ 8
1-7- تنوع زيستي 12
1-8- اهميت مطالعه تنوع ژنتيكي 13
1-9- روشهاي برآورد تنوع ژنتيكي 13
1-10- انواع نشانگرها 13
1-10-1- نشانگرهاي مورفولوژيكي 14
1-10-2- نشانگرهاي بيوشيميايي 14
1-10-3- نشانگرهاي DNA 15
1-1-10-3- واكنش زنجيره اي پليمراز (PCR)..... ... 16
1-10-3-2- چند شكلي طولي قطعات برشي (RFLP) 17

فهرست مطالب

عنوان

د

صفحه

1-10-3-3- تعداد متفاوت ر ـ ـ كراري يا ماهوارك‌ها (VNTR) 18
1-10-3-4- چند شكلي قطعات DNA تكثير شده تصادفي (RAPD) 19
1-10-4- تكثير انتخابي قطعات تكثيرشده (AFLP) 20
1-11- روشهاي تجزيه و تحليل آماري 21
1-11-1- فاصله ژنتيكي 21
1-1-11-2- فاصله اقليدسي..... 22

2-2-11-1- روش گوور..... 22
2-11-1-3- ضريب پنروز..... 23
2-2-11-1- فاصله ماهالانوبيس..... 23
2-11-1-5- فاصله اقليدسي..... 24
2-11-1-6- فاصله روگر..... 24
2-2-11-1- فاصله تغيير يافته روگر..... 25
2-2-11-1- ضريب عدم تشابه رينولدز..... 25
2-2-11-1- ضريب استاندار ني..... 26
2-11-1-10- فاصله ژنتيكي كاوالي- اسفورزا و ادواردز... 26
11-2-11-1- ضريب تطابق ساده..... 26
12-2-11-1- ضريب شباهت ژاكارد..... 27
13-2-11-1- ضريب شباهت دايس..... 27
1-11-1- تمايز ژنتيكي جمعيتها 28
2-11-1- يكساني ژنها و فاصله ژنتيكي 31
3-11-1- تجزيه خوشه اي 32
4-11-1- انتخاب روش گروه‌بندي 34

فهرست مطالب

عنوان هـ صفحه

5-11-1- تجزيه به مولفه‌هاي اصلي (PCA) و تجزيه به مولفه‌هاي هماهنگ اصلي(PCoA)..... 35
12-1- مطالعات مربوط به بررسي تنوع ژنتيكي در علف باغ .. 36
13-1- اهداف 41
2- مواد روش‌ها
1-2- مواد گياهي 43
2-2- محل اجرا 44
3-2- ارزيابي ژنوتيپي..... 44
1-2-2- استخراج DNA 44
2-2-2- طرز تهيه محلول‌ها 45
3-2-2- تعيين كميت و كيفيت DNA 47
1-3-2-2- تعيين كميت و كيفيت DNA با استفاده از الكتروفورز ژل آگارز 47
2-3-2-2- تعيين كميت و كيفيت DNA با استفاده اسپكتروفتومتر 48
4-2-2- واكنش RAPD 49
5-2-2- الكتروفورز فرآوردهاي PCR 50

6-2-2- امتيازدهي باندها 50
7-2-2- تجزيه و تحليل داده‌ها 51
3- نتايج
1-3- برآورد سطح تنوع ژنتيكي بر اساس نشانگرهاي مولكولي . 53
1-1-3- چند شكلي نشانگرهاي RAPD..... 53
2-1-3- برآورد تنوع ژنتيكي درون وبين اكوتيپها 54
3-1-3- تجزيه واريانس مولكولي 56
4-1-3- برآورد فاصله ژنتيكي بين اكوتيپهاي علف باغ 57

فهرست مطالب

عنوان و صفحه

5-1-3- تجزيه خوشه‌اي بر اس ـ اي مولكولي 57
6-1-3- تجزيه به مولفه‌هاي هماهنگ اصلي بر اساس داده‌هاي مولكولي 57
4- بحث
1-4- بحث 66
نتيجه‌گيري كلي 65
پيشنهادات..... 66
منابع مورد استفاده..... 68
چكيده انگليسي.....

فهرست شکل‌ها

عنوان | صفحه

شکل1-1- نماي کلي از گياه علف باغ **7**

شکل2-1- نمونه‌اي از نوارهاي DNA ژنومي علف باغ در روي ژل آگارز **0/8** درصد **48**

شکل3-1- الگوي نواربندي برخي از اکوتيپ‌هاي علف باغ با استفاده از آغازگرهاي الف)
شماره **24** و ب) شماره **6** **53**

شکل3-2- گروه‌بندي اکوتيپ‌هاي علف باغ بر اساس داده‌هاي رپيد با استفاده از روش
UPGMA و فاصله ژنتيکي ني..... **60**

شکل3-3- نمايش دو بعدي اکوتيپ‌هاي علف باغ بر اساس دو مولفه هماهنگ اصلي **60**

فهرست جداول

عنوان | صفحه

جدول2-1- شماره اکوتیپهاي مورد مطالعه در بانک ژن ملي گیاه ایران 43
جدول2-2- نحوه تهیه بافر استخراج CTAB 46
جدول2-3- نحوه تهیه بافر TAE با غاظت 50 برابر (50X) 46
جدول2-4- نحوه تهیه محلول شستشو (اتانول 76 درصد و استات آمونیوم 10 میلیلیتري) 46
جدول3-1- تعداد نوارهاي چندشکل در اکوتیپهاي علف باغ 55
جدول3-2- میانگین تنوع ژنتیکي درون اکوتیپهاي علف باغ با استفاده از شاخص تنوع ژني
ني بر اساس 8 آغازگر رپید 56
جدول3-3- تجزیه واریانس مولکولي براي 125 گیاه علف باغ بر اساس 7 آغازگر رپید 56
جدول3-4- ماتریس فاصله ژنتیکي ني 58

فصل اول: مقدمه و مروري بر تحقيقات گذشته

1-1- مقدمه

انسان از ديرباز به دنبال بهره‌وري بيشتر و بهتر از منابع موجود در جهان بوده است. پيشرفت علم و تكنولوژي و دستيابي بشر به بسياري از دستاوردهاي نوين، وي را ياري نمود تا به بسياري از رويا‌هاي خود جامه عمل بپوشاند. يكي از مهم‌ترين منابعي كه در تمامي اين موارد الهام‌بخش انسان بوده، استفاده از الگوهايي است كه طبيعت در اختيار ما نهاده است. بدون شک دخالت‌هاي نابخردانه انسان گاه منجر به بروز خسارات جبران ناپذيري مي‌شود كه جبران آن‌ها نياز به هزاران سال گذر زمان دارد. عواقبي چون فرسايش ژنتيكي، انقراض ژنتيكي، كاهش تنوع زيستي و بسياري ديگر كه همگي پيامدهايي از دخالت نابخردانه انسان هستند. در اين ميان بررسي تنوع ژنتيكي و ارتباط ژنتيكي ميان ژنوتيپ‌ها كمک بزرگي در راستاي توسعه برنامه‌هاي به‌نژادي است و ارزيابي جمعيت-هاي زراعي و وحشي در نگهداري و به كارگيري شايسته ژرم-پلاسم‌هاي مناسب ضروري بنظر مي‌رسد (38 و 96). در واقع بهبود وضع ژنتيكي هر موجود وابسته به وجود و ميزان تنوع ژنتيكي آن است (110). برنامه‌هاي اصلاحي فعلي و آينده نه تنها نيازمند دسترسي به اين تنوع مي‌باشند، بلكه وابسته به نگهداري و مديريت صحيح حفظ و استفاده از آن‌ها نيز هستند. بررسي تنوع ژنتيكي، متخصص اصلاح نباتات را در شناسايي ظرفيت ژنتيكي صفات مرتبط با اهداف اصلاحي مهم آن ياري مي‌نمايد و مطالعه الگوپذيري و تبعيت تنوع ژنتيكي از تنوع جغرافيايي و اقليمي ژنوتيپ-ها، نشان دهنده سازگاري احتمالي آن‌ها با محيط‌هاي متفاوت مي‌باشد (60). از منظر ديگر مي‌توان اظهار داشت كه تنوع ژنتيكي از ملزومات اصلاح نباتات است كه ريشه در تكامل طبيعي موجودات داشته و مهم‌ترين عنصر در ثبات نظام‌هاي زيستي است و بقاي موجودات را در شرايط مختلف

تضمين مي‌نمايد. حفاظت و استفاده از منابع ژنتيكي براي بقا و حتي بهبود توليدات گياهي ضروري بوده و نيازي اساسي در توسعه پايدار و كاهش فقر در جهان محسوب مي-شود. با توجه به اين كه امروزه اكثر گياهان زراعي و بويژه اكثر گياهان مرتعي و دارويي در عرصه‌هاي منابع طبيعي، در معرض شرايط نامناسب محيطي و تنش‌هاي زيستي و غير زيستي قرار دارند، آگاهي از تنوع ژنتيكي و مديريت اين منابع، بيش از پيش حايز اهميت است. آگاهي از تنوع ژنتيكي موجود در ارقام اهلي و خويشاوندان وحشي يک گونه گياهي در به كارگيري آن در يک برنامه اصلاحي از اهميت زيادي برخوردار است. روش مرسوم تعيين تنوع ژنتيكي بر مبناي خصوصيات مورفولوژيكي است كه به مشاهدات مزرعه‌اي زيادي نياز دارد. بعلاوه، خصوصيات مورفولوژيكي به دليل تاثير عوامل محيطي، پوشش ژنومي ضعيف و وابستگي به بافت و مرحله رشدي گياه، كاربرد محدودي دارند. از اواسط دهه 1950 ميلادي نشانگرهاي بيوشيميايي شامل آيزوزايم‌ها و پروتئين كل و ذخيره‌اي ارائه شدند كه مفيد بودن آن‌ها در تجزيه و تحليل تنوع ژنتيكي به اثبات رسيده است. اين روش‌ها تفاوت بين پروتئين‌هاي ذخيره‌اي دانه يا آنزيم‌هاي رمزشده توسط آلل-هاي مختلف يک مكان ژني يا چند مكان ژني را شناسايي مي-كنند. استفاده از روش‌هاي بيوشيميايي تا حدي اثر محيط را حذف مي‌كند، اما مفيد بودن آن‌ها به علت توزيع غيرتصادفي، تعداد محدود آن‌ها در گونه‌هاي گياهي و تغييرات پس از ترجمه محدود است (49). امروزه نشانگرهاي مولكولي به عنوان يک وسيله و ابزار مفيد و دقيق براي بررسي تنوع ژنتيكي مورد استفاده قرار مي‌گيرند. اين روش‌ها به عنوان مكمل روش‌هاي مرسوم و كلاسيک در سرعت بخشيدن به فعاليت‌هاي به‌نژادي، افزايش دقت و صرفه‌جويي در نيروي كار و هزينه‌ها نقش چشم‌گيري دارند. تكنيک‌هاي مبتني بر DNA چند شكلي‌هاي حاصل از تفاوت افراد در توالي‌هاي DNA را نشان مي‌دهند. يعني اين تكنيک‌ها تنوع را در سطح DNA مورد بررسي قرار مي‌دهند و مستقل از

شرايط محيطي هستند. تجزيه DNA مي‌تواند در تمام مراحل رشد، با مقدار كم مواد گياهي و با استفاده از هر بافت گياهي انجام شود. انواع مختلفي از نشانگرهاي مولكولي DNA تا به امروز معرفي شده‌اند و دقيق‌ترين ابزار را براي بررسي ساختار ژنتيكي موجودات فراهم نموده‌اند. از نشانگرهاي DNA مي‌توان چند شكلي قطعات تكثير شده تصادفي[1](RAPD) را نام برد. اين روش به رغم محدوديت‌هايي كه دارد، به دليل سرعت و سادگي، به طور وسيع در ارزيابي تنوع ژنتيكي، برآورد تشابهات و فواصل ژنتيكي، شناسايي و گروه‌بندي جوامع در گونه‌هاي گياهي از جمله گراس‌هاي علوفه‌اي مثل علف باغ استفاده شده است (40، 64 و 103).

در ايران اكوتيپ‌هاي متفاوتي از علف باغ كه جزء گراس‌هاي علوفه‌اي و مهم مرتعي هستند، وجود دارد كه تاكنون خصوصيات و قرابت ژنتيكي آن‌ها با استفاده از نشانگرهاي مولكولي در سطح DNA مطالعه نشده است. اين پژوهش به منظور ارزيابي تنوع ژنتيكي بين و درون اكوتيپ‌هاي علف باغ و گروه‌بندي آن‌ها جهت استفاده در برنامه‌هاي اصلاحي با استفاده از نشانگرهاي RAPD انجام شد.

1- Randomly Amplified Polymorphic DNA

1-2- اهمیت علف باغ

گراس‌ها از مهمترین گیاهان مرتعي هستند که به لحاظ تولید علوفه، احداث چراگاه‌ها، حفاظت و جلوگیري از فرسایش خاک اهمیت زیادي دارند (8). علف باغ (*Dactylis glomerata* L.) یکي از مهمترین گراس‌هاي علوفه‌اي دگرگرده-افشان مي‌باشد که به طور وسیعي در مناطق معتدل و نیمه گرمسیري جهان کشت مي‌شود. این گیاه، بومي مناطق مدیترانه‌اي اروپا است. در حالي که، امروزه دامنه پراکنش آن کلیه مناطق معتدل اروپا، افریقا، آسیا، استرالیا و آمریکا را در بر مي‌گیرد (8 و 89). امروزه کشت و زرع این گیاه به عنوان علوفه خالص، ایجاد چراگاه‌هاي طبیعي به صورت مخلوط با سایر گرامینه‌هاي مرتعي یا با یک یا دو نوع از لگوم‌ها در برنامه‌هاي احیاي مراتع قرار گرفته است. بعد از چرا یا برداشت، علف باغ به سرعت رشد مي‌کند و عملکرد علوفه‌ي خوبي در سال‌هاي دوم و سوم دارد (35 و 37). این گیاه به طور نسبي به سرما مقاوم است و در سایه و خاک‌هاي فقیر و کم عمق به خوبي رشد مي‌کند. همچنین در برابر خشکي متحمل مي‌باشد. به طوري که علف باغ به خاطر متحمل بودن در برابر خشکي و عملکرد خوب در مراتع شمال شرقي آمریکا و کانادا مورد استفاده قرار مي‌گیرد (90). این گیاه خوشخوراک و ارزش غذایي زیادي دارد. به طوري که، میزان ماده خشک قابل هضم و درصد پروتئین خام در مرحله گلدهي در این گیاه به ترتیب 8/2 و 61/3 درصد مي‌باشد (35). این گیاه در ایران در سطح وسیعي از مراتع استان‌هاي شمالي، سلسله جبال البرز و زاگرس رشد مي‌کند و از آن به عنوان چراي مستقیم دام و یا برداشت علوفه استفاده مي-شود (10).

1-3- طبقه‌بندي علف باغ

از جنبه گیاه شناسي، سلسله مراتب تقسیم‌بندي علف باغ به قرار زیر مي‌باشد (20)

- شاخه Magnoliophyta

- رده Liliopsida
- زیر رده Commelinidae
- راسته Cyperales
- تیره Gramineae
- زیرتیره Pooideae
- طایفه Festuceae
- جنس *Dactylis*
- گونه *glomerata*

علف باغ با نام انگلیسي orchardgrass یا cocks foot، یکي از مهمترین گراس‌هاي مرتعي چند ساله مي‌باشد. *glomerata* تنها گونه‌ي جنس *Dactylis* است که به قبیله فستوکا تعلق دارد (103). علف باغ یکي از بهترین مثال‌هاي کمپلکس پلي-پلوئیدي درون گونه‌اي طبیعي مي‌باشد (92). این کمپلکس از سه سطح پلوئیدي شامل 15 زیر گونه دیپلوئیدي (2n=2x=14)، سه زیر گونه تتراپلوئیدي غالب (2n=4x=28)، و تعداد کمي زیر گونه تتراپلوئید بومي و یک زیر گونه‌ي هگزاپلوئیدي (2n=6x=42) تشکیل یافته است (103). تتراپلوئیدها متداول-ترین و عمومي‌ترین اشکال علف باغ مي‌باشند. دیپلوئیدها در مناطق ویژه‌اي یافت مي‌شوند و زیرگونه‌ي هگزاپلوئید تنها در دو ناحیه از Cyrenaica رشد مي‌کند (67). این جنس در ایران داراي یک گونه با چندین زیر گونه مي‌باشد (5). تعیین روابط تکاملي و بیوسیستماتیک بین دیپلوئیدها و تتراپلوئیدهاي علف باغ براي تاکسونومیست‌ها مشکل است. چرا که آن‌ها از لحاظ مورفولوژیکي غیر قابل تشخیص هستند. همچنین تغییرپذیري قابل ملاحظه‌اي که در داخل و بین جمعیت‌هاي علف باغ وجود دارد بسیاري از تاکسونومیست‌ها را جهت توصیف مورفوتیپ‌ها، اکوتیپ‌ها یا نژادهاي جغرافیایي به عنوان گونه‌ها، زیرگونه‌ها یا فرم-هاي جدید مورد توجه قرار داده است (18). سیتوتیپ‌هاي مختلف علف باغ از نظر آب و هوا در گروه‌هاي گرمسیري، مدیترانه‌اي و معتدله قرار مي‌گیرند (94). این گونه در

مناطقي با ارتفاع 500 تا 3000 متر و بارندگي بيش از 300 ميلي‌متر در سال مي‌رويد (35).

1-4- مشخصات گياه شناسي علف باغ

علف باغ جزء گراس‌هاي سردسيري است كه به صورت كپه‌اي رشد مي‌كند. زمان گلدهي اين گياه به طول روز و دما بستگي دارد. گياهچه علف باغ در مقايسه با فستوكا به سرعت رشد مي‌كند، اما سرعت آن به اندازه علف قناري نيست. اين گياه در مرحله نشا، رقيبي براي گونه‌هاي گياهي محسوب نمي‌شود اما در ساير مراحل زيستي مي‌تواند رقيب بسيار خوبي براي گونه‌هاي گياهي به حساب آيد. غلاف صاف و يكدست برگ‌ها از مهمترين مشخصه و ويژگي علف باغ بوده و تشخيص آن را آسان مي‌كند. ليگول پوسته مانند است و طول آن به 8 - 2 ميلي‌متر مي‌رسد. طول پهنک برگ به طور معمول 10- 2 سانتي‌متر و پهناي آن به 25- 5 ميلي‌متر مي‌رسد. اگر چه اين اندازه ممكن است به يک ميلي‌متر نيز برسد. رنگ برگ‌ها ممكن است از سبز روشن به آبي چمني تيره تغيير پيدا كند. ارتفاع گياه گلدار به 1 تا 1/3 متر مي‌رسد. خوشه‌ها 15- 8 سانتي‌متر طول دارند و در هر خوشه‌چه 5-2 گلچه ديده مي‌شود. علف باغ به طور جنسي و به وسيله بذر تكثير مي‌يابد (5، 8 و 68). در زير نماي كلي از علف باغ نشان داده شده است شكل (1-1).

1-5- اكوتيپ

با گذشت زمان محيط با اعمال يكسري مكانيسم‌هاي خاص بر افراد يک گونه موجب پيدايش تغييراتي در آن‌ها

مي‌گردد كه اين تغييرات به صورت موروثي قابل انتقال به نسل‌هاي بعدي مي‌باشد. گونه‌هايي كه داراي يک چنين صفات ارثي هستند، اكوتيپ (نژاد اكولوژيكي) ناميده مي‌شوند. واژه‌ي اكوتيپ در سال1922 توسط تورسون مطرح و بدين شكل تعريف گرديد كه اكوتيپ عبارت است از نتيجه پاسخ ژنتيكي يک گونه به يک بستر خاص. ممكن است اكوتيپ‌ها به صورت جمعيت‌هايي تجلي كنند كه از لحاظ مشخصات ظاهري، كم و بيش از يكديگر متمايز بوده و از اين جهت مي‌توان واژه واريته را در مورد آن‌ها به كار برد. اصولاً عواملي كه در تعيين اكوتيپ موثرند، در دو مقياس كاملاً متفاوت اثر مي‌كنند. اول، در مقياس بزرگ منطقه‌اي كه جميع عوامل اقليمي منطقه در تعيين تغييرات كليني منطقه شركت مي‌كنند. دوم، در مقياس كوچكتر و حوزه‌اي كه عوامل مختلف آن نقطه خاص (مثل ميكروكليما، خاک، رژيم آبي و...) در آن شركت مي‌كنند. بنابراين بر حسب نوع عامل موثر در تشخيص گروه‌هاي مختلف، اكوتيپ‌هاي متفاوتي قابل تشخيص‌اند كه عبارتند از اكوتيپ‌هاي اقليمي، اكوتيپ‌هاي خاكي، اكوتيپ‌هاي زيستي و اكوتيپ‌هاي جغرافيايي (2).

1-6- اهداف اصلاحي در علف باغ

براي يک برنامه اصلاحي كارآمد استفاده از ذخاير ژني و واريته يا اكوتيپ‌هاي بومي اهميت زيادي دارد. از اين جهت براي حفظ و نگهداري نمونه‌ها بايد با ايجاد كلكسيون‌هاي گياهي و بانک‌هاي ژن، خطر از بين رفتن گونه‌هاي وحشي و بومي را كاهش داد، تا اصلاحگران بتوانند از اين ذخاير ژني براي دستيابي به آلل‌ها و ژن‌هاي مفيد در اصلاح واريته‌هاي جديد بهره‌مند شوند. وجود تنوع طبيعي گياهي از بديهي‌ترين و ارزشمندترين ضروريات شروع يک كار اصلاحي مي‌باشد (39 و 75). اصلاح گونه‌هاي علوفه‌اي همانند ساير گياهان زراعي با جمع‌آوري خزانه منابع ذخاير توارثي آغاز مي‌گردد. پس از جمع‌آوري يک خزانه منابع ژني، اصلاح كننده بايد به دنبال موثرترين روش براي استفاده از منابع ژرم‌پلاسم در دسترس، جهت ايجاد يک رقم اصلاح شده باشد. گزينش يک روش اصلاحي علاوه بر هدف-

هاي اصلي برنامه‌هاي اصلاحي، تحت تاثير عوامل مختلفي مي-باشد. مانند وجود ارقام اصلاح شده يا عدم وجود آن، تكثير جنسي يا غير جنسي گونه گياهي مورد نظر و وجود خزانه ژني غني مي‌باشد. هدف‌هاي اصلاحي در گياهان علوفه‌اي با نوع گونه، منطقه توليد و نوع كاربرد گياه به عنوان علوفه خشک، چرا يا ساير منظورها فرق مي‌كند. مهمترين هدف در اصلاح گياهان علوفه‌اي افزايش عملكرد علوفه است. اما افزايش عملكرد دانه به جز گياهاني كه داراي تكثير رويشي هستند، نيز از اهميت ويژه‌اي برخوردار است و به عنوان يكي از اهداف اصلي در معرفي ارقام اصلاح شده مي-باشد. زيرا ارقام علوفه‌اي پر محصول جديد بايد از پتانسيل بذردهي مطلوبي برخوردار باشند، تا بتوان آن‌ها را در سطح وسيعي كشت نمود. گزارشات متعددي مبني بر وجود تنوع براي عملكرد بذر در علف باغ و صفات مورفولوژيكي در گراس‌هاي علوفه‌اي منتشر شده است (39 و 75). گياهان علوفه‌اي براي تغذيه چهارپايان، به صورت چرا يا علوفه‌ي خشک استفاده مي‌شوند. علف باغ هم يكي از گرامينه‌هاي مهم مرتعي چند ساله براي ايجاد چراگاه و توليد علوفه خشک است. كميت و كيفيت علوفه مصرفي در تغذيه حيوان نقش دارد. پيشرفت در اصلاح براي كميت يا عملكرد علوفه را مي‌توان با افزايش كيفيت علوفه تكميل كرد. كيفيت علوفه را مي‌توان با ارزش غذايي بيشتر (ارزش غذايي علوفه با محتواي پروتئين، فيبر، مواد معدني و ويتامين تعيين مي‌گردد)، افزايش جذب و قابليت هضم (توليد شير و گوشت حيوانات چرا كننده با جذب و قابليت هضم علوفه ارتباط دارد) و كاهش محتواي مواد سمي (بعضي از گونه‌هاي علوفه‌اي توليد موادي مي‌كنند كه خوشخوراكي علوفه را كاهش مي‌دهد) بهبود داد (1). علاوه بر موارد فوق كه همگي تابع پتانسيل ژنتيكي گياه مي‌باشند، بايد دانست كه فعاليت‌هاي زراعي، اثرات محيطي، حاصلخيزي خاک، رطوبت خاک، بيماري‌هاي گياهي و عوامل كاهش دهنده‌ي كيفيت، كيفيت و كميت علوفه را تحت تاثير قرار مي‌دهند. زمان رسيدگي گياه موثرترين عامل در تعيين كيفيت علوفه

مي‌باشد. در علف باغ درصد قابليت هضم با پيشرفت رشد رويشي كاهش مي‌يابد و خوشخوراكي و هضم‌پذيري نيز به واسطه افزايش درصد ليگنين، همي سلولز، نسبت نامطلوب k^+/Ca^{2+} و تلخي برگ‌ها كاهش مي‌يابد (24). با پيشرفت رشد رويشي در علف باغ عملكرد علوفه افزايش مي‌يابد، ولي كيفيت علوفه (قابليت هضم[1] و درصد پروتئين خام[2]) كاهش مي-يابد (54 و 55). كاهش رطوبت خاك نيز منجر به كاهش برگ، عملكرد و درصد NDF[3] علف باغ مي‌گردد. اما درصد پروتئين خام افزايش مي‌يابد. افزايش رطوبت خاك هم منجر به خفگي گياه و كاهش عملكرد مي‌گردد. اما اطلاعات بسيار اندكي در رابطه با اثرات آن بر روي كيفيت علوفه وجود دارد (55). علف باغ جزء گياهان متحمل به خشكي است. ولاير و لليير (106) مكانيسم‌هاي مقاومت به خشكي واريته‌هاي Currie، Lutetia و Medly از گياه *Dactylis glomerata* L. و واريته Centurion از گياه *Festuca arundinacea* L. تحت شرايط ريشه‌دهي مشابه در لوله آزمايش مورد مطالعه قرار دادند. نتايج نشان داد كه مكانيسم مقاومت به خشكي در واريته Centurion توسعه سيستم ريشه‌اي گياه مي‌باشد. در حالي كه مكانيسم مقاومت به خشكي در واريته‌هاي علف باغ منفي‌تر بودن پتانسيل اسمزي سلول‌هاي ريشه آن‌ها نسبت به گياهان غير مقاوم بود، كه توان اين واريته‌ها را در جذب آب از خاكي كه پتانسل آبي پايين‌تري دارند، براي مدت زمان طولاني افزايش مي‌داد. اين امر ممكن است در گسترش سيستم ريشه‌اي گياه نيز موثر باشد. فراندسن (41) گزارش نمود كه در مرحله رشد رويشي علف باغ داراي قابليت هضم مشابه با *Phleum pretense* و *Bromus inermis* مي‌باشد. در مرحله گرده‌افشاني درصد قابليت هضم علف باغ و *Bromus inermis* مشابه يكديگراند ولي قابليت هضم آن كمتر از *Phleum pretense* مي‌باشد. پس از اين مرحله، قابليت هضم به سرعت افت مي‌كند و در مرحله رسيدن دانه به 51

1- In – vitro digestibility 2- Crude protein 3-Neutral Detergent Fiber

درصد مي‌رسد. در يک شرايط يکسان، علف باغ به دليل رشد سريع و زودرسي، قابليت هضم و پروتئين کمتري نسبت به *Phleum pretense* و *Bromus inermis* دارد. ديررسي در علف باغ باعث پر برگي، بالا رفتن قابليت هضم و پروتئين اين گياه نسبت به رشد سريع آن مي‌شود. بلوغ زود رس هم، باعث افزايش کميت علوفه در هر برداشت و رشد مجدد سريع بعد از برداشت علوفه نسبت به ارقامي که بلوغ ديررس دارند، مي-شود. با اين حال کولين و کاستر (32) پيشنهاد کردند که ژنوتيپ‌هاي ديررس علف باغ از نظر کيفيت علوفه و ساير خصوصيات در وضعيت مناسبتري قرار دارند. بنابراين، انتخاب ارقام ديررس در برنامه‌هاي اصلاحي حائز اهميت است. تاراکانواس و همکاران (102) در مطالعه صفات مهم اقتصادي از قبيل عملکرد ماده خشک (DM) در چين اول و دوم، ارتفاع گياه، روز تا ظهور خوشه، قابليت هضم، ميزان پروتئين خام و فيبر خام در 18 واريته و جمعيت اصلاحي از علف باغ در دو سال نشان دادند که همبستگي فنوتيپي زيادي بين عملکرد ماده خشک در چين اول با ارتفاع گياه (r =0/78) و ميزان فيبر خام (r =0/828) وجود دارد. آن‌ها همچنين نشان دادند که همبستگي ژنوتيپي منفي زيادي بين عملکرد و صفات مرتبط با کيفيت علوفه از قبيل قابليت هضم و ميزان پروتئين خام وجود دارد. مرادي و جعفري (11) با مطالعه صفاتي نظير عملکرد علوفه، ارتفاع بوته، تاريخ ظهور خوشه، نسبت برگ به ساقه، درصد قابليت هضم، ميزان پروتئين خام، قندهاي محلول در آب، فيبر خام، ديواره سلولي، ديواره بدون همي سلولز و خاکستر کل موجود در علوفه در 26 ژنوتيپ از علف باغ در چين تابستانه نشان دادند که همبستگي مثبت و معني‌داري بين صفت نسبت برگ به ساقه با عملکرد و بين صفات قندهاي محلول در آب و پروتئين خام با کيفيت علوفه وجود دارد. حيدري شريف آبادي و همکاران (4) در مطالعه صفاتي از قبيل تاريخ ظهور خوشه، تاريخ گرده افشاني، ارتفاع بوته، طول خوشه، تعداد ساقه در بوته، وزن بذر در ساقه،

عملکرد بذر، شاخص برداشت، عملکرد علوفه، تعداد بذر در ساقه در 29 رقم و اکوتیپ از علف باغ در طي دو سال نشان دادند که بیوماس کل، شاخص برداشت، تعداد بذر در خوشه، تاریخ ظهور خوشه از جمله صفاتي هستند که بیشترین تاثیر را بر عملکرد بذر علف باغ دارند. برگ و هیل (25) گزارش نمودند که یکي از راه‌هاي افزایش عملکرد بذر در علف باغ افزایش شاخص برداشت است. با این حال ویلکینس (107) گزارش نمود که افزایش عملکرد بذر به تعداد پنجه‌هاي زایشي بستگي دارد و تراکم پنجه‌هاي رویشي در واحد سطح موجب افزایش علوفه خشک مي‌شود. از جمله عواملي که بر میزان هر دو صفت تاثیر مي‌گذارد، کاهش تراکم در طول زمان است که بر اساس کاهش درصد پوشش علوفه در روي زمین بعد از آخرین برداشت علوفه در هر سال اندازه‌گیري مي-شود. در زمینه کشت بافت نیز مطالعاتي روي گیاه علف باغ انجام گرفته است. قطعات برگي علف باغ از پتانسیل خوبي در جنین‌زایي مستقیم از سلول‌هاي مزوفیلي و جنین‌زایي غیرمستقیم به واسطه کالوس را دارا مي‌باشند. الکساندروا و کنگر (17) با کشت برگ ژنوتیپ‌هایي از علف باغ که به جنین‌زایي پاسخ مي‌دهند و ژنوتیپ‌هایي که به جنین‌زایي پاسخ نمي‌دهند، نشان دادند که در ژنوتیپ‌هایي از علف باغ که به جنین‌زایي پاسخ مي‌دهند ژن‌هاي DGEs بیان مي‌شوند. آن‌ها همچنین گزارش کردند که ژن DGE_1 در کشت‌هاي برگي که به منظور جنین‌زایي مستقیم و غیرمستقیم کشت مي‌شوند، بیان مي‌گردد. در حالي که ژن DGE_2 در کشت‌هاي برگي که به منظور جنین‌زایي غیرمستقیم کشت مي‌شوند، بیان مي‌گردد. بل و همکاران (27) با بررسي اثر اسید آبسیزیک در جنین‌زایي سوماتیکي علف باغ نشان دادند که جنین‌زایي سوماتیکي در ژنوتیپ‌هاي علف باغ که به جنین‌زایي پاسخ مي‌دهند، ممکن است با تغییر غلظت و مدت زمان به کارگیري اسید آبسیزیک افزایش یابد. علاوه بر صفات گفته شده، صفات دیگري مانند مقاومت به بیماري‌ها و افزایش مقاومت در برابر تنش‌هاي زمستاني در برنامه‌هاي اصلاحي علف باغ مورد توجه هستند. به طوري که ارقام جدید علف باغ به وسیله اصلاحگران در

مراکز تحقیقاتي دانشگاه‌ها و شرکت‌هاي تجاري کشورهاي مختلف تولید شده‌اند که از لحاظ خصوصیات عملکرد و مقاومت به بیماري‌ها برتري دارند (63 و 89).

1-7- تنوع زیستي

تنوع زیستي به مجموعه گونه‌هاي مختلف از گیاهان، جانوران و شکل‌هاي دیگر موجودات زنده که در یک منطقه به سر مي‌برند، اتلاق مي‌شود. تنوع زیستي اصطلاحي کلي براي نشان دادن درجه تنوع طبیعت است. تنوع زیستي از نظر سلسله مراتب به سه طبقه، ژن، گونه و اکوسیستم تقسیم مي‌شود که هر یک جنبه‌هاي مختلفي از سیستم‌هاي زندگي را بیان مي‌کنند.

- تنوع ژنتیکي: بیانگر تفاوت‌ها و تنوع ژن‌ها در سطح یک گونه است. این طبقه از تنوع، جمعیت‌هاي متمایزي از همان گونه را در بر مي‌گیرد یا تفاوت‌هاي ژنتیکي یک جمعیت را نشان مي‌دهد.
- تنوع گونه‌اي: بیانگر تنوع و فراواني گونه‌هاي مختلف در یک منطقه است.
- تنوع اکوسیستمي: برآورد تنوع اکوسیستمي نسبت به تنوع گونه‌اي و ژنتیکي مشکل‌تر است. زیرا مرزهاي بین اکوسیستم‌ها و اجتماعات (جوامع گونه‌ها) بسیار گمراه کننده است. ولي با این وجود تنوع اکوسیستمي به وسیله رستنگاه‌هاي متنوعي که در داخل یک منطقه به وجود مي‌آید، توصیف مي‌شود (6).

1-8- اهمیت مطالعه تنوع ژنتیکي

ارزیابي تنوع ژنتیکي قبل از شروع کارهاي اصلاحي یا مطالعات ژنتیکي امري ضروري است. به طوري که تجزیه تنوع ژنتیکي ژرم‌پلاسم‌هاي جمع‌آوري شده، طبقه‌بندي نمونه‌ها را آسان مي‌کند و شناسایي زیر مجموعه‌هاي گیاهي را براي اهداف اصلاحي ویژه مفید مي‌سازد. وجود تنوع ژنتیکي کافي در گیاهان امکان تولید واریته‌هاي برتر جدید در برنامه-هاي اصلاح نباتات و کاهش آسیب‌پذیري نسبت به فاکتورهاي زنده و غیر زنده را باعث مي‌شود. دلایل زیادي براي ارزیابي صحیح تنوع ژنتیکي درون و بین و تجانس مواد

اصلاحي به ويژه گياهان زراعي وجود دارد. از اين دلايل مي‌توان به گواهي بذر، حمايت يا نگهداري صحيح تنوع ژنتيكي گياهان، تجزيه تغييرپذيري ژنتيكي در واريته‌ها، توزيع و نگهداري ژرم‌پلاسم‌ها و انتخاب صحيح والدهاي برتر براي تلاقي‌ها اشاره كرد (112).

1-9- روش‌هاي برآورد تنوع ژنتيكي

محققين در تجزيه تنوع ژنتيكي گياهان به ويژه گياهان زراعي از مجموعه متنوعي از داده‌ها استفاده مي‌كنند. مهمترين اين داده‌ها در ميان اين مجموعه متنوع عبارتند از داده‌هاي شجرنامه[1]، داده‌هاي مورفولوژيكي، داده‌هاي بيوشيميايي به دست آمده از تجزيه آيزوزايم‌ها و پروتئين‌هاي ذخيره‌اي و داده‌هاي نشانگرهاي مبتني بر DNA. هر يک از اين مجموعه داده‌ها انواع متفاوتي از اطلاعات را در بر مي‌گيرند. انتخاب روش‌هاي تجزيه، به اهداف آزمايش، سطح تجزيه مورد استفاده، منابع و در دسترس بودن امكانات زيربنايي تكنولوژي، آماده بهره‌برداري بودن آن‌ها و همچنين به زمان مورد نياز بستگي دارد (70، 22 و 105).

1-10- انواع نشانگرها

1-10-1- نشانگرهاي مورفولوژيكي

نشانگرهاي مورفولوژيكي همان صفات فنوتيپي يا صفات ظاهري هستند كه از طريق اندازه‌گيري به دست مي‌آيند (34). اين نشانگرها بدون نياز به تكنيك‌هاي بيوشيميايي و مولكولي خاص قابل تشخيص مي‌باشند. اصولاً اين نشانگرها توسط يک مكان ژني منفرد كنترل مي‌شوند. به عبارت صحيح‌تر پوشش ژنومي بسيار ضعيفي دارند و نشانگرهاي كم هزينه‌اي مي‌باشند. با اين وجود اين نشانگرها داراي معايب متعدد ديگري نيز هستند. بيان اين صفات تحت تاثير شرايط محيطي، اثرات اپيستازي و پليوتروپي مي‌باشند. تعداد اين نشانگرها خيلي كم است. چندشكلي بسيار پايييني دارند و عمل غالبيت ژن‌ها در اكثر اين نشانگرها امكان تشخيص

1- Pedigree data

افراد هتروزيگوت از افراد هموزيگوت را غير ممكن مي‌سازد (29 و 53).

2-10-1- نشانگرهاي بيوشيميايي

نشانگرهاي بيوشيميايي محصول تظاهر ژن هستند. به عبارت ديگر اين نشانگرها چند شكلي را در سطح پروتئين آشكار مي‌كنند (49). نشانگرهاي بيوشيميايي از قبيل آيزوزايم‌ها و پروتئين‌هاي ذخيره‌اي، اولين سيستم‌هاي نشانگري مي‌باشند كه در مقياس وسيعي براي طبقه‌بندي دامنه وسيعي از گياهان مانند ذرت، سويا، جو و گندم استفاده شده‌اند (111). اين نشانگرها در مقايسه با صفات كمي بسيار كم تحت تاثير شرايط محيطي قرار مي‌گيرند. كار با اين نشانگرها ارزان، نسبتاً سريع است و از تكرارپذيري خوبي هم برخوردار مي‌باشند. همچنين برخي از نشانگرهاي بيوشيميايي مانند آلوزايم‌ها (پروتئين‌هاي مختلف توليد شده به وسيله اشكال آللي مربوط به يک مكان ژني با فعاليت كاتاليكي مشابه) و آيزوزايم‌ها (پليمرهاي ايجاد شده از مونومرهاي حاصل از مكان‌هاي ژني جداگانه با فعاليت كاتاليكي مشابه) همبارز هستند به دليل خطاهاي وارد بر مطالعات پروتئين‌ها و آيزوزايم‌ها و همچنين مشكلاتي كه از نظر نامشخص بودن وضعيت قرار گرفتن آلل‌ها در يک يا چند مكان ژني پديد مي‌آيد به نظر مي‌رسد مناسبترين ابزار اين نوع مطالعات آلوزايم‌ها هستند (30، 91 و 111). در مجموع، اين نشانگرها داراي چند شكلي كمي هستند. هم چنين در برگيرنده همه تغييرات ژنتيكي در سطح DNA نبوده و نمي‌توانند نماينده كل ژنوم باشند (97). به طوري كه تغييرات در سطح DNA الزاماً منجر به تغيير در سطح پروتئين نمي‌گردد. مانند تغييرات ايجاد شده در اينترون‌هاي توالي مجاور، تغيير در كدون‌هاي مترادف و همچنين تغيير در آمينو اسيدهايي كه در تغيير بار الكتريكي پروتئين اثري ندارند. تفسير مولكولي بسيار مشكل برخي از پروتئين‌ها، به خاطر پلي‌ژنيک بودن، نياز به بافت‌هاي تازه و مهمتر از همه تعداد محدود آن‌ها در

گونه‌هاي گياهي و تغييرات پس از ترجمه باعث كاربرد محدود آن‌ها گشته است (49).

3-10-1- نشانگرهاي DNA

اين نشانگرها چند شكلي را در سطح DNA آشكار مي‌كنند و در نتيجه تحت تاثير شرايط محيطي يا مراحل رشدي گياه قرار نمي‌گيرند. اصولاً ميزان چندشكلي بين گونه‌ها و مكان‌هاي ژني مورد بررسي متفاوت است (34). به بيان بهتر تنوع نوكلئوتيدي معمولاً به صورت متوسط واگرايي توالي نوكلئوتيدي بين دو فرد در ناحيه معيني از DNA، اندازه‌گيري مي‌شود. عوامل زيادي اين تنوع را تحت تاثير قرار مي‌دهند. طبق تئوري تكامل خنثي[1] ميزان چند شكلي (θ)، نتيجه اندازه موثر جمعيت(N_e) و ميزان جهش (μ)مي‌باشد $(\theta = 4N_e\mu)$. متاسفانه دلايل تجربي كمي از اين رابطه ساده در گياهان وجود دارد. اگرچه نرخ جهش در تيره‌هاي گياهي متفاوت مي‌باشند. انتخاب پس زمينه[2] نيز احتمالاً يكي ديگر از عوامل اصلي در تعيين تنوع نوكلئوتيدي است. در انتخاب پس زمينه، تنوع در نواحي غيركدكننده كاهش مي‌يابد. اين كاهش ناشي از انتخاب بر عليه آلل‌هاي مضر پيوسته با آن‌ها، كه در طي جهش ايجاد شده‌اند، مي‌باشد. بعضي از داده‌ها نيز رابطه بين درجه خودگشني و سطح تنوع را اثبات مي‌كنند. به طوري كه، در گونه‌هاي دگرگشن تنوع نوكلئوتيدي به مراتب بيشتر از گونه‌هاي خودگشن مي‌باشد. در واقع رابطه مثبتي بين تنوع و ميزان دگرگرده افشاني وجود دارد. انتخاب صفات مفيد نيز باعث زوال ژنتيكي[3] در پاره‌اي از گياهان مي‌گردد كه اين هم به نوبه خود تنوع ژنتيكي را كاهش مي‌دهد. علاوه بر موارد فوق انتخاب متعادل[4] يا انتخاب وابسته به فراواني نيز باعث افزايش تنوع ژنتيكي مي‌شود. خطاهاي توالي‌يابي و

1- Neutral theory evolution 2- Background selection 3-Bottleneck effect
4-Balancing selection

نوترکیبي باعث افزایش و انتخاب خطي[1] و خطاهاي PCR[2] باعث کاهش تنوع ژنتیکي مي‌شوند (26).

در کل نشانگرهاي DNA در کلاس‌هاي متفاوتي از جهش‌هاي DNA از قبیل جهش‌هاي جایگزیني (نقطه‌اي)، جهش‌هاي ساختاري (جهش‌هاي حذفي، جهش‌هاي الحاقي) یا خطاهایي که در همانندسازي نواحي از DNA با توالي‌هاي تکراري رخ مي‌دهند، ایجاد مي‌شوند (77). نشانگرهاي DNA خنثي و تقریباً از لحاظ تعداد نامحدود هستند (34). نشانگرهاي DNA کاربردهاي متعددي از قبیل ارزیابي سطح تنوع ژنتیکي درون ژرم‌پلاسم، ترسیم نقشه‌هاي پیوستگي ژنتیکي[3]، نشانمند کردن ژن‌هایي که به لحاظ اقتصادي مفیدانند[4]، انتخاب به کمک نشانگر[5]، کلون‌سازي مبتني بر نقشه[6]، پي‌بردن به روابط خویشاوندي بین ژرم‌پلاسم‌ها[7] و تجزیه نقشه‌یابي مقایسه‌اي[8] دارند (53). نشانگرهاي DNA عموماً به سه دسته بر مبناي روش کشفشان تقسیم مي‌شوند. نشانگرهاي مبتني بر واکنش زنجیرهاي پلیمراز (PCR)، نشانگرهاي مبتني بر دورگگیري، نشانگرهاي مبتني بر توالي‌یابي DNA (34). ولي در کل تقسیم‌بندي نشانگرهاي DNA به دو دسته نشانگرهاي مبتني بر دورگگیري و نشانگرهاي مبتني بر PCR مرسوم‌تر است. انتخاب مناسب جمعیت‌هاي گیاهي و تکنیک‌هاي مبتني بر نشانگرهاي DNA به یک اندازه در تجزیه تنوع ژنتیکي مهم هستند (23).

1-3-10-1- واکنش زنجیره‌اي پلیمراز یا (PCR)

واکنش زنجیره‌اي پلیمراز روشي براي تکثیر توالي‌هایي از DNA مي‌باشد. واکنش زنجیره‌اي پلیمراز یک تکنیک آزمایشگاهي است که به کمک آن مي‌توان ناحیه به خصوصي از اسید دزوکسي ریبونوکلئیک را که بین دو قسمت شناخته شده DNA قرار دارد، تکثیر نمود. تکثیر DNA با استفاده از

1- Line selection
2- Polymerase Chain Reaction
3- Construction of genetic linkage maps
4-Tagging economically important genes
5-Marker Assisted Selected
6-Map-based cloning
7-Understanding germplasm relationships
8-Comparative mapping analysis

آغازگرهاي اوليگونوكلئوتيدي كه به نام آمپليمر معرفي شده اند، در چرخه هاي حرارتي زير انجام مي‌پذيرد (3).
مرحله اول: جداسازي دو رشته DNA به كمك حرارت در حضور آغازگر، چهار نوع dNTP، بافر PCR و DNA پليمراز مقاوم به حرارت. جداسازي دو رشته معمولاً در حرارت 93 - 100 درجه سانتي‌گراد انجام مي‌گيرد.
مرحله دوم: اتصال آغازگرهاي اوليگونوكلئوتيدي به رشته جدا شده با كمك حرارت تا حدود 37 الي 65 درجه سانتي-گراد كه به دماي ذوب[1] آغازگرهاي اوليگونوكلئوتيدي بستگي دارد.
مرحله سوم: گسترش آغازگرها با كمك DNA پليمراز مقاوم به حرارت در 72 درجه سانتي‌گراد . مرحله اول تا سوم يک چرخه PCR را تشكيل مي‌دهد و اين مراحل براي حداقل 20 چرخه تكرار مي‌گردد. در چرخه آخر، مرحله سوم ممكن است چند دقيقه اي افزايش پيدا كند تا تمام رشته هاي سنتز شده تكميل گردند. در زير به تعدادي از نشانگرهاي DNA اشاره مي‌شود.

2-3-10-1- چند شكلي طولي قطعات برشي [2](RFLP)

در ميان نشانگرهاي مولكولي DNA، نشانگرهاي RFLP اولين نشانگرهاي مولكولي توسعه يافته مي‌باشند كه در ابتدا براي نقشه‌يابي ژنوم انساني استفاده شدند. بعدها اين نشانگرها براي نقشه‌يابي ژنوم گياهان از قبيل گندم و *Aegilops tauschii* استفاده شدند (45). چند شكلي طولي قطعات برشي مبتني بر هضم اندونوكلئازي DNA ژنومي توسط آنزيم-هاي برشي، تفكيک قطعات برشي DNA بر حسب اندازه بر روي ژل بوسيله الكتروفورز، انتقال قطعات برشي DNA به غشاء نيتروسلولزي يا نايلوني به روش لكه‌گذاري ساترن، دورگ -سازي قطعات برشي DNA با كاوشگرهاي نشاندار شده توسط مواد راديواكتيو يا مواد فلورسنت و خود پرتونگاري يا رنگ‌آميزي براي مشاهده قطعات دورگ شده، است. چند شكلي طولي قطعات برشي در افراد مختلف ناشي از جهش‌هاي نقطه اي

1- Temperature of melting 2- Restriction fragment length polymorphism

يا جهش‌هاي مبتني بر حذف يا الحاق در جايگاه‌هاي برشي و يا در حد فاصل دو جايگاه برشي مي‌باشد (57، 65، 76 و 99). نشانگرهاي RFLP جزء نشانگرهاي همبارز هستند و مي‌توانند ژنوتيپ هتروزيگوت را از هموزيگوت شناسايي كنند. همچنين تكرارپذيري بالايي دارند به بيان ديگر با يك تركيب آنزيم برشي- كاوشگر در يك سري نمونه‌ها نتايج يكساني حاصل خواهند شد، حتي وقتي كه آزمايش در آزمايشگاه‌هاي مختلف انجام شود. فراواني ژنومي بالا و توزيع تصادفي آن‌ها از ديگر مزاياي اين تكنيک مي‌باشند. پيچيدگي، پرهزينه بودن، استفاده از مواد راديواكتيو، نياز به DNA با كميت و كيفيت بالا، عدم قابليت اتوماسيون، سطح پايين چند شكلي، تعداد كم مكان ژني در هر ارزيابي وابستگي آن به توسعه كتابخانه ژنومي به عنوان مخزن كاوشگري ويژه براي هر گونه، از جمله عوامل محدود كننده استفاده از اين نشانگرها مي‌باشند (60،69 و 96). اين تكنيک براي اهداف متنوعي از قبيل مطالعه ارتباط فيلوژنيک در ميان گروهي از افراد جمعيت‌ها يا گونه‌ها، مطالعه نقشه‌يابي به دليل توزيع ژنومي زياد، وجود آنزيم‌هاي برشي مختلف، توزيع تصادفي در كل ژنوم، مطالعات دورگ گيري و اينتروگرسيون شامل مطالعات جريان ژني در ميان گياهان زراعي و علف‌هاي هرز، آزمون كيفي بذر و تجزيه تفكيک نسل‌ها به طور گسترده استفاده مي‌شوند (76 و 99).

3-3-10-1- تعداد متفاوت رديف‌هاي تكراري يا ماهوارک‌ها[1] (VNTR)

جفريز و همكاران (52) رديف‌هاي تكراري بسيار متغيري را در ژنوم انسان كه واحد تكراري بسيار بزرگي دارند را كشف كردند. تغيير در تعداد نسخه‌هاي تكرار اصلي، اغلب به عنوان تعداد متفاوت رديف‌هاي تكراري در نظر گرفته مي‌شود. به بيان ديگر ماهوارک‌ها يا ($VNTR_s$) از نشانگرهاي مبتني بر تفاوت در تعداد رديف‌هاي DNA

1-Variable number of tandem repeats

Surname: Panahi Torkambor	**Name**: Elham
Tittle of Thesis: Evaluation of genetic diversity of *Dactylis glomerata* L. Ecotypes using RAPD markers	
Surpervisor (s): Dr. Ali Asghari - Dr. Majid Shokrpour **Advisor (s):**Dr. Hamid- Reza Mohammaddoust chamanabad – Dr. Ali- Akbar Imani	
Graduate Degree: MSc **Major:** Plant breeding **Specialty:** Plant breeding University of Mohaghegh Ardabili **Faculty:** Agricultre **Graduation date**:29/9/2009 **Number of page:** 78	
Key words: AMOVA, Cluster analysis. Genetic diversity, Orchardgrass, RAPD	

Abstract:

In order to study the genetic diversity within and between of *Dactylis glomerata* L. ecotypes using RAPD markers, seeds of 18 ecotypes from Iran and 7 ecotypes from other countries were planted in greenhouse at the Agriculture Faculty Mohaghegh Ardabili University. Fresh leaves from plants in 4 leaves stage were harvested for DNA extraction. In RAPD analysis, 8 primers from 40 tested RAPD primers, produced 73 polymorphic bands. The total number of polymorphic bands within ecotypes varied from 25 to 49 bands and genetic distance between entries based on Nei`s formula ranged from 0.051 to 0.245. The averages of total and within genetic diversity ecotypes of and the degree of genetic differentiation were estimated 0.29, 0.181 and .0378, respectively. These results showed that within ecotypes genetic diversity were greater than between ecotypes genetic diversity. Using Nei`s gene index, genetic diversity within ecotypes was estimated in the range of zero to 0.5. Molecular analysis of variance based on squared euclidean distance indicate that diversity between ecotypes were significant and larger proportion of variability existed within ecotypes (78.38 %). Cluster analysis based on molecular data, grouped the 25 *Dactylis* ecotypes into 8 clusters. The grouping based on molecular data showed no correspondence with the geographical pattern. Using principal coordinate analysis, the first three coordinates determined 59.48 % of the total variance. Grouping of ectypes using PCoA confirmed the results of cluster analysis.

Faculty of Agriculture

Department of Agronomy and plant Breeding

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

Supervisor

Dr. Ali Asghari - Dr. Majid Shokrpour

Advisor:

Dr. Hamid- Reza Mohammaddoust chamanabad – Dr. Ali- Akbar Imani

By:

ElhamPanahi Torkambor

University of Mohagegh Ardabili

Sep. 2009