Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Evaluation of genetic diversity of native and non-native *Dactylis glomerata* L. ecotypes using ISSR molecular markers

Shabnam Sabouri Azar

MSc Graduated of Genetics and Plant Breeding, Department of Plant Genetics and Production, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran. E-mail: shabnamsabouriazar@gmail.com

Reza Mohammadi

Assistant Professor, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran. E-mail: r.mohammadi@abrii.ac.ir

Mojtaba Nouraein

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Plant Genetics and Production, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran. E-mail: mojtabanouraein@yahoo.com

Abstract

Objective

Orchard Grass (*Dactylis glomerata* L.) is a perennial forage and cross-pollinating grass, has wide genetic distribution in Iran. Although the genus Dactylis has been studied quite well within the past decades, little is known about the genetic diversity and population patterns of natural populations in grassland regions. The aim of this study is to identify the genetic diversity of this species in the East Azerbaijan, Iran.

Materials and methods

In this study, seeds of 25 ecotypes of *Dactylis glomerata* L. were planted in the research farm of the Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Northwest & West region in Tabriz as a randomized complete block design with 3 replications. Then 34 selected genotypes (single plant) were examined using 22 ISSR markers.

Results

According to the results of ISSR markers, a total of 424 loci were amplified in the genome, of which 34 loci among all studied genotypes were monomorphic and 390 loci were polymorphic. The mean percentage of polymorphisms for *D. glomerata* L. in ISSR markers was estimated to be 70.39%. Also, the mean PIC value (polymorphic information content) for ISSR markers was equal to 0.288, the minimum PIC value for ISSR14 marker (0.175) and the maximum PIC value belonged to ISSR22 marker (0.341). Grouping of *D. glomerata* L. genotypes based on ISSR markers was performed using Mega 4.0.2 and Structure software, which grouped the results of Mega 4.0.2 genotypes into 4 groups, and Structure software grouped the genotypes into 2 groups.

Conclusions

The results indicate that the using of ISSR markers to differentiate close kin populations has a high advantage and plays a significant role in the differentiation of individuals. Also, the high allelic diversity of ISSR markers indicate a large level of diversity in *D. glomerata* L. populations and it's a suitable tool for studying the genetic diversity of *D. glomerata* L.

Keywords: Cluster analysis, Genetic diversity, Orchard grass, ISSR markers.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Sabouri Azar S, Mohammadi R, Nouraein M (2022) Evaluation of genetic diversity of native and non-native *Dactylis glomerata* L. ecotypes using ISSR molecular markers. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 133-154.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (2), 133-154. DOI:10.22103/jab.2022.18454.1352

Received: March 12, 2022. Received in revised form: April 24, 2022.

Accepted: April 25, 2022. Published online: May 5, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی و غیر بومی *Dactylis glomerata* L. با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

شبنم صبوری آذر

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و به نژادی گیاهی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. رایانامه: shabnamsabouriazar@gmail.com

رضا محمدی

استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران. رایانامه: r.mohammadi@abrii.ac.ir

مجتبی نورآئین

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. رایانامه: mojtabanouraein@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۲/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۵

چکیده

هدف: علف باغ (Orchard Grass) با نام علمی *Dactylis glomerata* L. گونه‌ای از گراس‌های پایا و دگر گرده‌افشان می‌باشد که در ایران از پراکنش مطلوبی برخوردار است. اگرچه جنس Dactylis طی دهه‌های گذشته به میزان زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است، لیکن اطلاعات کمی در مورد تنوع ژنتیکی و الگوهای جمعیتی جمعیت‌های طبیعی این گیاه در مناطق مرتعی وجود دارد. هدف از این پژوهش شناسایی تنوع ژنتیکی این گونه در منطقه آذربایجان شرقی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، بذور ۲۵ جمعیت *Dactylis glomerata* L. در مزرعه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور در تبریز به صورت طرح آزمایشی بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار کشت گردید. سپس ۳۴ ژنوتیپ (تک بوته) توسط ۲۲ نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: با توجه به نتایج حاصل از نشانگرهای ISSR، در مجموع ۴۲۴ جایگاه در ژنوم مورد تکثیر قرار گرفت که از این تعداد، ۳۴ جایگاه در بین تمام ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، تک شکل و ۳۹۰ جایگاه نیز دارای چندشکلی یا پلی مورف بودند. میانگین درصد

چندشکلی ژنوتیپ‌های *D. glomerata* L. مورد بررسی توسط نشانگرهای ISSR، ۷۰/۳۹ درصد برآورد شد. همچنین مقدار میانگین PIC (محتوای اطلاعات چندشکل) برای نشانگرهای ISSR، برابر با ۰/۲۸۸، حداقل مقدار PIC برای نشانگر ISSR14 (۰/۱۷۵) و حداکثر مقدار PIC متعلق به نشانگر ISSR22 (۰/۳۴۱) بود. گروه بندی ژنوتیپ‌های *D. glomerata* L. بر اساس نشانگرهای ISSR، توسط نرم افزارهای Mega 4.0.2 و Structure انجام گرفت. نتایج حاصل از گروه‌بندی توسط نرم افزار Mega 4.0.2، ژنوتیپ‌ها را در ۴ گروه و توسط نرم افزار Structure ژنوتیپ‌ها را در ۲ گروه قرار داد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که کاربرد نشانگر ISSR جهت تمایز جمعیت‌های خویشاوندی نزدیک دارای مزیت بالایی بوده و نقش بسزایی در تفکیک و تمایز افراد دارد. همچنین میانگین تنوع آللی بالا در نشانگرهای ISSR بیانگر سطح وسیع تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *D. glomerata* L. است. در کل می‌توان گفت که نشانگر مولکولی ISSR تنوع بالایی را میان ژنوتیپ‌ها نشان داده و ابزار مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی *D. glomerata* L. می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، علف باغ، نشانگرهای ISSR.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: صبوری آذر شبنم، محمدی رضا، نورآئین مجتبی (۱۴۰۱) بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی و غیر بومی *Dactylis glomerata* L. با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۲)، ۱۵۴-۱۳۳.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

علف باغ (Orchard Grass) با نام علمی *Dactylis glomerata* L. گونه‌ای از گراس‌های پایا و دگر گرده‌افشان می‌باشد که تعداد کروموزوم پایه آن X=7 است و در اکثر موارد خود ناسازگار می‌باشد. علف باغ حاوی کمپلکس‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و جمعیت کمیابی از هگزاپلوئیدها می‌باشد به همین دلیل یکی از برترین نمونه‌های پلی‌پلوئیدی است (Stebbins 1959). این گونه بومی اروپای مرکزی و غربی است. همچنین در نواحی معتدله اروپا و آفریقا، آسیا، استرالیا و آمریکا رشد و نمو دارد. برحسب منابع موجود *D. glomerata* و *D. glomerrata* subsp در قسمت شمالی ایران (گرگان)، غرب (آذربایجان)، جنوب (فارس) و مرکز (تهران) دارای پراکندگی می‌باشد (Mizianty 1990). عوامل ژنتیکی و محیطی به صورت ترکیبی، صفات فنوتیپی در یک گیاه را تعیین می‌کنند و نشانگرهای ژنتیکی تفاوت‌های بین موجودات را که از والدین به ارث رسیده است، بیان می‌کنند. در به‌نژادی

گیاهی نشانگرهایی برتر هستند که دارای وراثت پذیری بالا بوده و پیوستگی نزدیک با ژن‌های مورد مطالعه داشته باشند و همچنین قابل رؤیت و ثبت باشند (Ghareyazie 1996). برای بروز تفاوت بین صفات دو فرد لزوماً باید بین توالی‌های DNA کروموزومی این افراد تفاوت وجود داشته و از طرفی این تفاوت‌ها قابلیت توارث داشته باشند. به طور کلی زمانی می‌توان از این صفات به عنوان نشانگر استفاده کرد که چهار ویژگی مهم را دارا باشند: اول اینکه بین دو فرد متفاوت باشند یعنی دارای چندشکلی باشند، دوم اینکه قابلیت توارث داشته باشند، سوم اینکه بررسی و تجزیه و تحلیل آنها آسان باشد و چهارم اینکه، نتایج حاصل از آنها قابل مقایسه با مطالعات دیگران باشد (Ghareyazie 1996; Naghavi et al. 2005). نشانگر ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌باشد و بدلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA جهت طراحی و ساخت آغازگرها به وفور استفاده می‌شود (Jabbarzadeh et al. 2010). در این روش از آغازگرهای مبتنی بر توالی‌های SSR که در سراسر ژنوم گیاه پراکنده‌اند، استفاده می‌شود (Wang et al. 2013). آغازگرهای ISSR نیمه اختیاری بوده و بوسیله PCR در حضور یک آغازگر مکمل با توالی SSR در ژنوم تکثیر می‌شوند (Godwin et al. 1997). ماهیت ISSR به گونه‌ای است که از مزایای ریزماهواره‌ها (SSRها) و نشانگرهای تصادفی (مانند AFLP و RAPD) شامل اختصاصی بودن، چندشکلی زیاد و تکرارپذیری بالا بهره می‌برد (Virk et al. 2000). نشانگر ISSR مانند RAPD یک نشانگر غالب است، اما نسبت به RAPD تکثیرپذیری و تنوع پذیری بالاتری داشته، سریع بوده و روشی آسان است (Mohammadabadi et al. 2021). این نشانگرها به DNAی الگو کمی نیاز دارند (Bahador et al. 2016). همچنین تکرارپذیری نشانگرهای ریز ماهواره (SSR) را به دلیل طویل بودن طول نشانگرهایشان دارا می‌باشند (Mohammadabadi et al. 2017). در واقع این تکنیک اغلب مزایای ریزماهواره‌ها را دارد و روش‌های AFLP و RAPD را در هم می‌آمیزد (Ghasemi et al. 2010). آغازگرهای ISSR غیراختصاصی بوده و این تکنیک ساده، سریع و نیازی به کاربرد مواد رادیواکتیو و هزینه ساختن کتابخانه ژنومی ندارد (Mohammadabadi and Askari 2012). این نشانگرها در دامنه وسیعی از گیاهان و جانوران، از جمله گاو، گوسفند، بز، ماهی و زنبور عسل برای تعیین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Askari et al. 2010; Bahador et al. 2016; Ghasemi et al. 2010; Mohammadabadi and Askari 2012; Mohammadabadi et al. 2017; Mohammadabadi et al. 2021; Zamani et al. 2011; Zamani et al. 2015). مهم‌ترین محدودیت استفاده از آغازگرها، تکرارپذیری کم RAPD، زیاد بودن هزینهٔ AFLP و نیاز به دانستن توالی‌های جانبی برای طراحی آغازگرهای خاص هر گونه در SSR است، که نشانگر ISSR این محدودیت‌ها را ندارد (Belaj et al. 2003). در مطالعه Rahmati and Shirvani (2018) تحت عنوان بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های *D. glomerata* L. با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR، تنوع متوسطی بین DNAی اکوتیپ‌های *D. glomerata* L. گزارش کردند، از آنجا که این اکوتیپ‌ها نماینده توده‌های موجود در بانک ژن می‌باشند، لذا بین کل اکوتیپ‌های موجود در بانک ژن نیز تنوع وجود دارد. در پژوهشی Last et al. (2013) با استفاده از ۲۹ نشانگر SSR، بین ۱۸۶۱ گیاه *D. glomerata* L. به طور انحصاری افراد تتراپلوئید را شناسایی کردند. جمعیت گراس‌های منتخب

مورد بررسی، تنوع بالایی داشته و حجم بزرگی از منابع ژنتیکی را ذخیره کرده و منابع ارزشمندی را برای برنامه‌های اصلاحی علوفه‌های زراعی ارائه می‌نمایند. با توجه به اهمیت گونه علف باغ به عنوان گونه‌ای با ارزش و لزوم شناسایی تنوع ژنتیکی این گونه در منطقه آذربایجان شرقی و مزایای نشانگرهای مولکولی ISSR در بررسی‌های تنوع ژنتیکی، این پژوهش به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: مواد ژنتیکی این پژوهش شامل ۲۵ جمعیت *D. glomerata* L. بود، که در مزرعه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور (ایران) در تبریز، به صورت طرح آزمایشی بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار کشت گردید. بذر اولیه توده‌های ایرانی از بانک بذر ایستگاه شهید فزوه، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان و بذر توده‌های مجارستان از بانک ژن انستیتو اگروبوتانی مجارستان (Gene bank of the Hungarian Institute of Agrobotany (HIFA), Tapioszele, Hungary)) تهیه شده بود (جدول ۱). به منظور بررسی تنوع ژنتیکی تک بوته‌ها، تعداد ۳۴ ژنوتیپ برتر *D. glomerata* L. از جمعیت‌های کشت شده انتخاب شدند. جهت تهیه ماده گیاهی برای استخراج DNA، نمونه‌های برگی جوان از بوته‌های انتخابی در مرحله سه تا چهار برگی در مزرعه برداشت شد. محل جمع آوری ژنوتیپ‌های مورد بررسی علف باغ جهت ارزیابی مولکولی در جدول ۱ گزارش شده‌است.

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته برای هر ژنوتیپ در آزمایشگاه ژنومیکس مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی شمالغرب و غرب کشور انجام گرفت. پس از استخراج DNA، کیفیت نمونه‌ها با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۵ درصد در بافر ۰/۵x TBE و کمیت آن‌ها با استفاده از روش اسپکترفتومتری تعیین شد. محلول‌های پایه DNA تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ۲۲ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲).

تکثیر DNA: برای تکثیر DNA استخراج شده به وسیله دستگاه ترموسایکلر، آغازگرها براساس دستوری که توسط شرکت ژن فن‌آوران جهت رقیق نمودن آنها توصیه نموده بود، به وسیله آب استریل به حجم مناسب رسانده شدند که در این غلظت درصد ترکیب آغازگر برابر با ۱۰۰ است. با توجه به در اختیار داشتن دمای اتصال آغازگرها، پیشبرد پژوهش تسهیل گردید.

مواد مورد نیاز برای تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل آب دیونیزه، مسترمیکس، پرایمرها و DNAها بودند. در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از یک بافر ثابت یا همان مسترمیکس با نام Super Master mix 2x (dye puls) استفاده شد که حاوی آنزیم DNAپلیمراز Taqplus است که در فعالیت اگرونوکلئازی نقش دارد. همچنین این محلول شامل ترکیبات مورد نیاز برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از قبیل dNTP، سیستم بافری آمونیومی، کلرید منیزیم، پایدارکننده و بافر رنگ آمیزی می‌باشد. غلظتی که از ترکیبات مورد استفاده در واکنش برای هر نمونه به کار می‌رود، در جدول۳ آورده شده است. در این پژوهش برای مراحل

تکثیری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشانگرهای ISSR، با توجه به مطالعات انجام شده قبلی روی این گیاه (Rahmati and Shirvani 2018) برنامه دمایی زیر در نظر گرفته شد (جدول ۴).

جدول ۱. لیست ژنوتیپ‌های مورد بررسی علف باغ (*Dactylis glomerata* L.) جهت ارزیابی مولکولی

Table 1. List of studied genotypes of orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) for molecular evaluation

کد ژنوتیپ Genotype No	کد جمعیت Population No	کد توده Ecotype No.	محل جمع آوری و تهیه بذر توده Origin of collection and preparation of bulk seeds
Dg-G1	Dg-1	RCAT041111	Foreign – Hungary- Zalatarnok خارجی- مجارستان-
Dg-G2	Dg-2	44/4000	Semnan, Shahroud, seed سمنان، شاهرود، ایستگاه تولید بذر
Dg-G3	Dg-5	RCAT041051	Foreign – Szarvas خارجی- مجارستان- Szarvas
Dg-G4	Dg-7	25/4000	اصفهان- بانک بذر ایستگاه شهید فزوه- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان Isfahan - Seed Bank of Shahid Fozveh Station - Agricultural and Natural Resources Research Center of Isfahan Province
Dg-G5	Dg-9	25/4000	اصفهان- بانک بذر پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی Isfahan - Seed Bank of Agricultural Biotechnology Research Institute, Central Region
Dg-G6	Dg-11	RCAT041052	Foreign – Hungary- Felsodinnye خارجی- مجارستان-
Dg-G7	Dg-14	4000/24	اصفهان- بانک بذر ایستگاه شهید فزوه- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان Isfahan - Seed Bank of Shahid Fozveh Station - Agricultural and Natural Resources Research Center of Isfahan Province
Dg-G8	Dg-16	4000/25	اصفهان- بانک بذر ایستگاه شهید فزوه- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان Isfahan - Seed Bank of Shahid Fozveh Station - Agricultural and Natural Resources Research Center of Isfahan Province
Dg-G9	Dg-18	RCAT041052	Foreign – Hungary- Felsodinnye خارجی- مجارستان-
Dg-G10	Dg-20	4000/44	Semnan, Shahroud, seed سمنان، شاهرود، ایستگاه تولید بذر
Dg-G11	Dg-22	RCAT041111	Foreign – Hungary- Zalatarnok خارجی- مجارستان-
Dg-G12	Dg-24	4000/31	Isfahan- Najafabad- Lavark اصفهان- نجف‌آباد- مزرعه لورک
Dg-G13	Dg-24	4000/31	Isfahan- Najafabad- Lavark اصفهان- نجف‌آباد- مزرعه لورک
Dg-G14	Dg-12	4000/26	اصفهان- بانک بذر ایستگاه شهید فزوه- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان Isfahan - Seed Bank of Shahid Fozveh Station - Agricultural and Natural Resources Research Center of Isfahan Province
Dg-G15	Dg-13	4000/31	Isfahan- Najafabad- Lavark اصفهان- نجف‌آباد- مزرعه لورک
Dg-G16	Dg-10	4000/29	Foreign خارجی
Dg-G17	Dg-11	RCAT041052	Foreign – Hungary- Felsodinnye خارجی- مجارستان-

Semnan, Shahroud, seed	سمنان، شاهرود، ایستگاه تولید بذر	4000/44	Dg-20	Dg-G18
Semnan, Shahroud, seed	سمنان، شاهرود، ایستگاه تولید بذر	4000/44	Dg-2	Dg-G19
Isfahan - Seed Bank of Shahid Fozveh Station - Agricultural and Natural Resources Research Center of Isfahan Province	اصفهان- بانک بذر ایستگاه شهید فزوه- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان	4000/2	Dg-19	Dg-G20
Isfahan - Seed Bank of Shahid Fozveh Station - Agricultural and Natural Resources Research Center of Isfahan Province	اصفهان- بانک بذر ایستگاه شهید فزوه- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان	4000/2	Dg-19	Dg-G21
Foreign – Hungary- Zalatarnok	خارجی- مجارستان- Zalatarnok	RCAT041111	Dg-25	Dg-G22
Foreign – Hungary- Felsodinnye	خارجی- مجارستان- Felsodinnye	RCAT041052	Dg-18	Dg-G23
Shahrekord - Koohrang - Second Tunnel Road	شهرکرد- کوهرنگ- جاده تونل دوم	4000/U-2	Dg-8	Dg-G24
Foreign – Hungary- Mosonmagyarovar	خارجی- مجارستان- Mosonmagyarovar	RCAT041050	Dg-6	Dg-G25
Isfahan - Seed Bank of Shahid Fozveh Station - Agricultural and Natural Resources Research Center of Isfahan Province	اصفهان- بانک بذر ایستگاه شهید فزوه- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان	4000/24	Dg-14	Dg-G26
Isfahan - Seed Bank of Shahid Fozveh Station - Agricultural and Natural Resources Research Center of Isfahan Province	اصفهان- بانک بذر ایستگاه شهید فزوه- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان	4000/24	Dg-14	Dg-G27
Foreign – Hungary- Zalatarnok	خارجی- مجارستان- Zalatarnok	RCAT041111	Dg-1	Dg-G28
Foreign – Hungary- Zalatarnok	خارجی- مجارستان- Zalatarnok	RCAT041111	Dg-22	Dg-G29
Foreign – Hungary- Mosonmagyarovar	خارجی- مجارستان- Mosonmagyarovar	RCAT041050	Dg-4	Dg-G30
Semnan, Shahroud, seed production station	سمنان، شاهرود، ایستگاه تولید بذر	4000/44	Dg-15	Dg-G31
Foreign – Szarvas	خارجی- مجارستان- Szarvas	RCAT041051	Dg-5	Dg-G32
Isfahan- Najafabad- Lavark	اصفهان- نجف‌آباد- مزرعه لورک	4000/31	Dg-3	Dg-G33
Isfahan - Seed Bank of Shahid Fozveh Station - Agricultural and Natural Resources Research Center of Isfahan Province	اصفهان- بانک بذر ایستگاه شهید فزوه- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان	4000/2	Dg-23	Dg-G34

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول۲. اسامی نشانگرها، توالی نوکلئوتیدی و دمای اتصال آنها

Table 2. Names of markers, nucleotide sequences and their annealing

نام نشانگرها Markers name	توالی نشانگرها Markers sequences	دمای اتصال Annealing temperature
ISSR1	CACACACACACACACARG*	52
ISSR3	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	52
ISSR5	AGAGAGAGAGAGAGAGT	52
ISSR6	GAGAGAGAGAGAGAGAT	52
ISSR8	CCCGTGTGTGTGTGTGT	52
ISSR9	CACACACACACACACAA	52
ISSR11	TCTCTCTCTCTCTCTCC	52
ISSR12	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	52
ISSR13	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	52
ISSR14	GTGTGTGTGTGTGTGTYA	52
ISSR15	ACACACACACACACACYT	52
ISSR16	ACACACACACACACACYA	52
ISSR18	ACACACACACACACACYG	52
ISSR19	GGAGAGGAGAGGAGA	52
ISSR20	GAGAGAGAGAGAGAGARC	52
ISSR21	GGGGTGGGGTGGGGT	52
ISSR22	ACACACACACACACACGCT	52
ISSR23	ACACACACACACACAC	52
ISSR25	TCCTCCTCCTCCTCCTG	52
ISSR28	GAGAGAGAGAGAGAGAGCC	52
ISSR29	ACTACGACTTGTGTGTGTGTGTG	52
ISSR31	CGTAGTCGTCACACACACACACA	52

*R= A+G; Y= C+T

جدول۳. غلظت ترکیبات یک نمونه در واکنش PCR

Table 3. Compounds concentration of a sample in PCR reaction

ترکیبات Compounds	غلظت Concentration	برای یک واکنش (میکرولیتر) For one reaction (Microliters)
H_2O	-	5.25
Master mix	2 X	6.25
Primer	10 µM	1
DNA	250 ng	1
حجم کل یک واکنش Total volume of a reaction	-	13.5

به منظور ارزیابی کیفی محصولات بدست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از ژل آگارز ۱/۳ درصد استفاده شد. هر نمونه در داخل چاهک‌ها قرار داده و جریان مغناطیسی الکتروفورز روی ۷۳ ولت به مدت ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه تنظیم شد. برای قابل تشخیص بودن جایگاه هر یک از نوارهای تکثیری روی ژل، از وزن مولکولی DNAی استاندارد ساخت شرکت سیناکلون (Plus

DNA Ladder(RTU) - SinaClon 100bp) استفاده شد. در نهایت جهت مشاهده نوارها، ژل درون دستگاه ژل داک قرار داده شد و توسط اشعه ماوراء بنفش رؤیت گردید.

جدول ٤. برنامه دمایی تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نشانگرهای ISSR

Table 4. Polymerase chain reaction amplification temperature program for ISSR markers

مراحل واکنش Reaction steps	تعداد چرخه Number of cycles	(سانتی‌گراد) دما Temperature (ºC)	زمان (ثانیه) Time (second)
واسرشته سازی اولیه Initial denature	1	94	240
واسرشته سازی Denature	30	94	45
اتصال Annealing	30	52	45
بسط Extension	30	72	60
بسط نهایی Final extension	1	72	420

تجزیه و تحلیل داده‌ها: امتیازدهی نوارها در ژل بر اساس صفر و یک (صفر، عدم وجود نوار و یک، وجود نوار) صورت پذیرفت. تعداد نوارهای تکثیر شده، تعداد نوارهای چندشکل و درصد چندشکلی برای هر آغازگر بدست آمد و ماتریس صفر و یک به‌دست آمده برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با نرم‌افزار Mega 4.0.2 و بر اساس الگوریتم Neighbor Joining مورد استفاده قرار گرفت. برای ارزیابی شاخص‌های تنوع ژنتیکی از نرم افزار PowerMarker 3.25 و برای تفکیک واریانس مولکولی به واریانس بین و درون اکوتیپ‌ها از نرم‌افزار GenAlEx 6.5 استفاده شد. تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیرجمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های اختلاط یافته با استفاده از مدل Bayesian در نرم افزار Structure (Pritchard et al. 2000) انجام گرفت. در این روش، هر یک از ژنوتیپ‌ها با یک احتمال و طوری به زیر جمعیت‌های فرضی منتسب می‌گردند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد (Rezaeizad 2011).

نتایج و بحث

در این پژوهش از ٣٤ ژنوتیپ *D. glomerata* L. و ٢٢ نشانگر ISSR استفاده گردید. تمام نشانگرهای مورد استفاده چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها را نشان داده و برای تجزیه‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. نشانگرهای ISSR در مجموع ۴۲۴

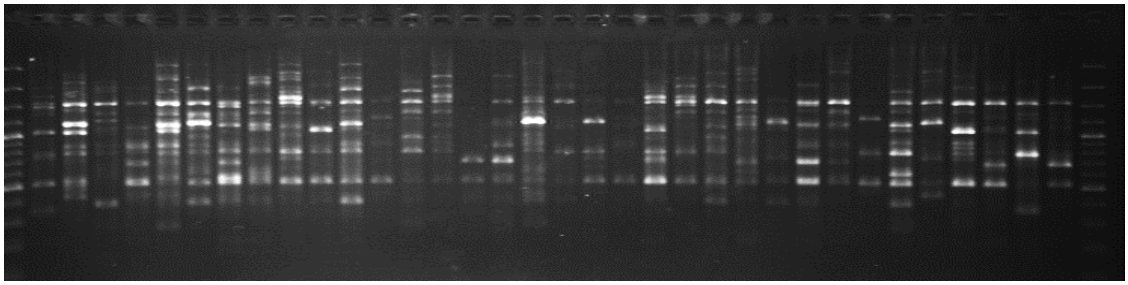
جایگاه را در ژنوم تکثیر کردند که از این تعداد، ۳۴ جایگاه در بین تمام ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، تک شکل و ۳۹۰ جایگاه چندشکل یا پلی‌مورف بودند. در شکل ۱ الگوی نواری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از آغازگرهای ISSR11 و ISSR13 نشان داده شده است. میانگین درصد چندشکلی برای ژنوتیپ‌های *D. glomerata* L. در نشانگرهای ISSR، ۷۰/۳۹ درصد برآورد شد. مقادیر بالای درصد چندشکلی در این پژوهش دال بر وجود الل یا الل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. چندشکلی بالای نشانگرهای ISSR توسط سایر محققین در گیاهانی مانند فستوکای بلند (Shahabzadeh et al. 2020)، آفتابگردان (Garayalde et al. 2011)، توتون (Mohsenzadeh Golfezani et al. 2012) و پسته (Tagizad et al. 2011) نیز گزارش شده است. بیشترین تعداد جایگاه چندشکل در نشانگر ISSR6 با ۳۰ جایگاه و کمترین آن در نشانگر ISSR14 با ۵ جایگاه ثبت شد. در یک بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های علف باغ (*D. glomerata* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ۴۰ آغازگر ارزیابی شده و ۷۳ نوار چندشکل با استفاده از ۸ آغازگر تولید شد (Asghari et al. 2011). تعداد کل نوارهای چندشکل بین ۲۵ تا ۴۹ متغیر بود. در بررسی تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های علف باغ (*D. glomerata* L.) با استفاده از نشانگرهای RAPD و SRAP توسط Zeng و همکاران (2008) سطح بالایی از تنوع بر اساس هر دو نشانگر گزارش گردید. در مطالعه‌ای Rahmati and Shirvani (2018) نیز تنوع ژنتیکی ۱۵ اکوتیپ علف باغ (*D. glomerata* L.) را با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام داده و ۶۷ جایگاه چندشکل گزارش نمودند. در بررسی ۹۰ جمعیت فستوکای بلند (*Festuca arundinacea* Schreb.) توسط نشانگرهای EST-SSR و ISSR، به ترتیب ۹۲ آلل و ۳۳۵ جایگاه چندشکل تکثیر شدند (Shahabzadeh et al. 2020). همچنین Mohammadi et al. (2020) در بررسی ۴۸ اکسشن علف بره (*Festuca ovina* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR، ۱۸۹ جایگاه چندشکل را شناسایی نمودند.

میزان اطلاعات چند شکلی (PIC)، یک پارامتر برای نشان دادن میزان چند شکلی یک نشانگر است، همچنین معیاری برای قدرت تمایز جفت آغازگر محسوب می‌شود که در کل میزان هتروزیگوسیتی برابر با محتوای اطلاعات چندشکلی در ژنوتیپ‌های *D. glomerata* L. می‌باشد. مقدار PIC در نشانگرهای غالب نظیر ISSR بین یک تا ۰/۵ متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر بوده و به ۰/۵ نزدیکتر باشد، بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای اکوتیپ‌های مورد بررسی است. در این پژوهش مقدار میانگین PIC برای نشانگرهای ISSR، برابر با ۰/۲۸۸، حداقل مقدار PIC برای نشانگر ISSR14 (۰/۱۷۵) و حداکثر مقدار PIC متعلق به نشانگر ISSR22 (۰/۳۴۱) بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نیز نشان داد که تنوع ژنتیکی بین و درون ژنوتیپ‌ها معنی‌دار است (جدول ۶). از کل تنوع موجود در بین و درون ژنوتیپ‌ها، ۷ درصد مربوط به بین ژنوتیپ‌ها و ۹۳ درصد مربوط به درون ژنوتیپ‌ها بود

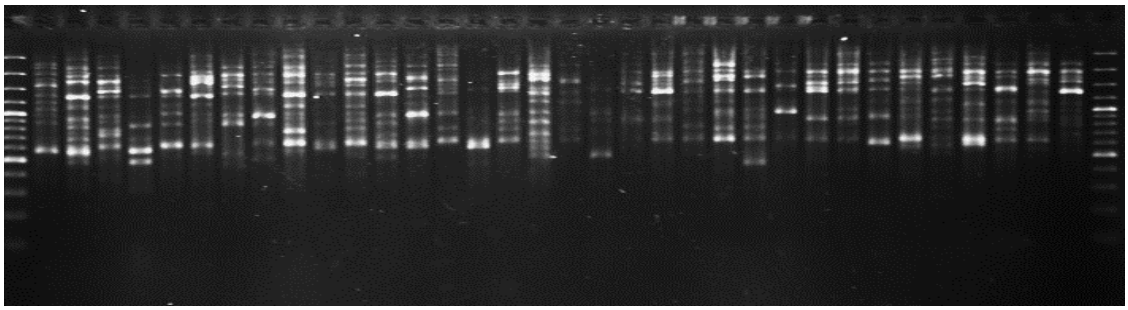
$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^{n} P_{ij}^2$$

که در آن P_{ij} فراوانی الل jام در آغازگر iام است.

در پژوهشی Tuna et al. (2004) با استفاده از نشانگرهای مولکولی، تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف علف باغ (*D. glomerata* L.) را بررسی و سطح بالایی از تنوع میان جمعیت‌ها را گزارش نمودند. با توجه به اینکه محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف، از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود، مقادیر بالای این شاخص، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. بنابراین، نشانگرهایی با محتوای اطلاعات چندشکلی بالا برای متمایز نمودن ژنوتیپ‌های دارای قرابت، مؤثر می‌باشند (Thimmappaiah et al. 2008) و پیشنهاد می‌شود از نشانگرهای دارای محتوای اطلاعات چندشکلی بالا برای مطالعه سایر اکوتیپ‌های علف باغ استفاده گردد. میانگین تنوع اللی بالا در نشانگرهای ISSR بیانگر سطح وسیع تنوع در جمعیت‌های *D. glomerata* L. با استفاده از نشانگرهای ISSR است. با توجه به اینکه در نشانگر ISSR تعداد زیادی مکان ژنی بطور همزمان شناسایی می‌شوند، این نوع نشانگرها می‌توانند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های دارای درجات مختلفی از شباهت و بویژه بین ژنوتیپ‌های با فاصله ژنتیکی کم و نیز اشباع‌تر نمودن نقشه‌های پیوستگی گیاه *D. glomerata* L. مورد استفاده قرار گیرند. در جدول ۵ تعداد کل باندها، تعداد باندهای چندشکل، درصد چندشکلی، تعداد الل‌ها و محتوای اطلاعات چندشکلی آورده شده است.



A



B

شکل۱. نمونه‌هایی از بارگذاری نشانگرهای ISSR در ژل آگارز ۱/۳ درصد، ISSR : A شماره ۱۳ و ISSR : B شماره ۱۱

Fuigure 1. Examples of loading ISSR markers in 1.3% agarose gel, A: ISSR No.13 B: ISSR No. 11

جدول ۵. تعداد کل باندها، تعداد الل‌های چندشکل، درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکلی

Table 5. Total number of bands, number of polymorphic alleles, percentage of polymorphism and polymorphic information content

نشانگر Marker	تعداد الل‌ها Number of bands	تعداد الل‌های چندشکل number of polymorphic alleles	درصد چندشکلی percentage of polymorphism	PIC
ISSR1	17	16	94.11	0.269
ISSR3	29	29	100	0.272
ISSR5	28	28	100	0.24
ISSR6	31	30	96.77	0.278
ISSR8	26	25	96.15	0.293
ISSR9	21	18	85.71	0.284
ISSR11	18	17	94.44	0.269
ISSR12	22	19	86.36	0.309
ISSR13	27	26	96.29	0.282
ISSR14	6	5	83.33	0.175
ISSR15	21	19	90.47	0.314
ISSR16	13	12	92.30	0.3
ISSR18	8	7	87.5	0.268
ISSR19	15	15	100	0.294
ISSR20	15	13	86.66	0.308
ISSR21	22	20	90.90	0.327
ISSR22	17	14	82.35	0.341
ISSR23	22	22	100	0.308
ISSR25	18	15	83.33	0.296
ISSR28	19	19	100	0.267
ISSR29	15	13	86.66	0.315
ISSR31	14	8	57.14	0.3

جدول ٦. تجزیه وایانس مولکولی بین و درون ٣٤ ژنوتیپ علف باغ بر اساس نشانگرهای ISSR

Table 6. Analysis of molecular variances within and among 34 Orchard grass genotypes based on ISSR markers

%	برآورد واریانس Est. Var.	میانگین مربعات MS	مجموع مربعات SS	درجه آزادی df	منبع تغییرات SV
7	5.188	124.593	249.186	2	بین ژنوتیپ‌ها Among genotypes
93	69.51	69.51	2154.814	31	درون ژنوتیپ‌ها Within genotypes
100	74.698	28	2404	33	کل Total

گروه‌بندی براساس نشانگرهای ISSR: گروه‌بندی ژنوتیپ‌های .D. glomerata L بر اساس نشانگرهای ISSR، با بکارگیری نرم افزار Mega 4.0.2 و الگوریتم Neighbor Joining صورت پذیرفت. بر اساس گروه‌بندی انجام شده، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ۴ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های Dg-G15، Dg-G20، Dg-G25، Dg-G18، Dg-G19، Dg-G14، Dg-G34، Dg-G4، Dg-G32، Dg-G10، Dg-G8 و Dg-G30 و گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های Dg-G22، Dg-G21، Dg-G26، Dg-G16، Dg-G28، Dg-G29، Dg-G7، Dg-G33 و Dg-G31 بودند. در گروه سوم تنها دو ژنوتیپ Dg-G3 و Dg-G6 قرار گرفتند. در نهایت گروه چهارم را ژنوتیپ‌های Dg-G13، Dg-G12، Dg-G1، Dg-G17، Dg-G24، Dg-G11، Dg-G27، Dg-G5، Dg-G2، Dg-G23 و Dg-G9 تشکیل دادند که در شکل ۲ آورده شده است. در مطالعه‌ای Jahani و همکاران (2013) تنوع ژنتیکی جمعیت‌های علف باغ (.D. glomerata L) را با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR بررسی نموده و آنها را در ۳ گروه دسته بندی کردند. علیرغم اینکه تنوع بالایی در میان جمعیت‌ها وجود داشت، نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی همبستگی ندارد و این نتایج با یافته‌های پژوهش اخیر همخوانی دارد. در حالیکه Rahmati and Shirvani (2018) با بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ اکوتیپ علف باغ (.D. glomerata L) توسط ۲۰ آغازگر ISSR، آنها را در ۴ گروه قرار دادند که این گروه بندی توانست تا حدودی بر اساس توزیع جغرافیایی و تشابهات اقلیمی برخی از اکوتیپ‌ها را از هم تفکیک نماید.

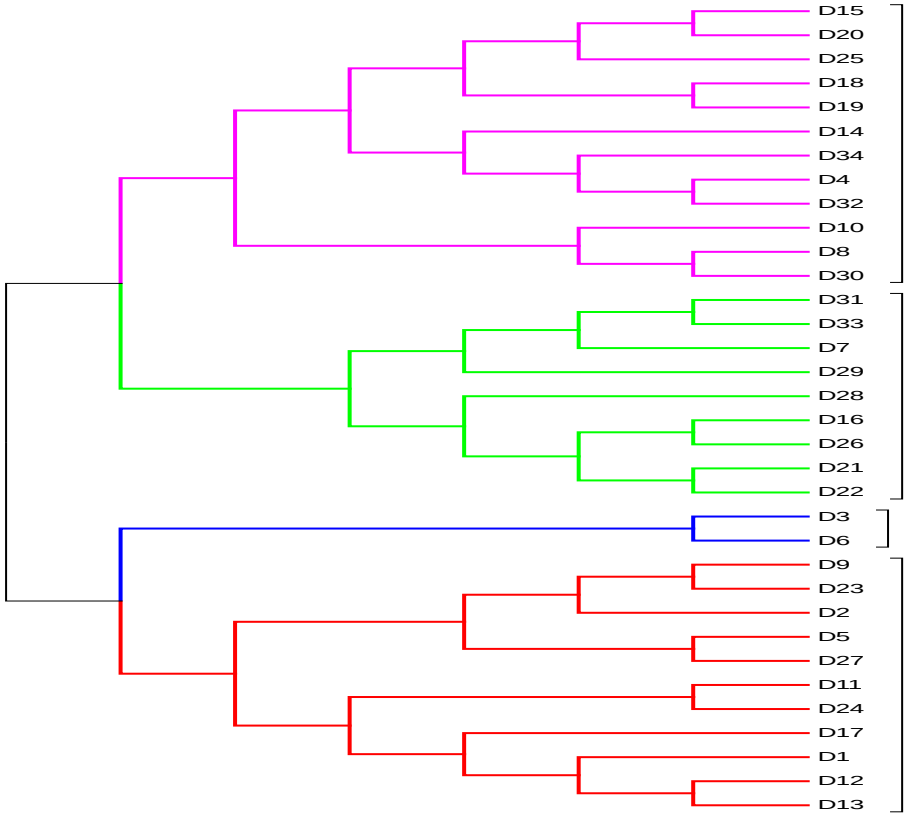
در نرم‌افزار Structure، برای هر تعداد زیر جمعیت احتمالی (k) که بین ۱۰-۱ انتخاب شده بود، ۵ تکرار در نظر گرفته شد. برای دست‌یابی به منحنی حداکثر درست نمایی از مدل Admixture و استقلال فراوانی اللی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) استفاده شد. همچنین تعداد تکرارهای زنجیره مارکوف–مونت کارلو نیز روی ۱۰۰۰۰۰ تنظیم گردید. تعداد واقعی زیر جمعیت‌ها، Δk به صورت آنلاین از سایت Structure harvester محاسبه شد. با توجه به اینکه زیرجمعیت k=2 از نظر پارامتر Δk حداکثر مقدار عددی را داشت (شکل ۳)، بنابراین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به ۲ گروه مجزا تقسیم بندی شدند و k=2 به عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس Q) در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات (شکل ۴) از ۳۴ ژنوتیپ مورد مطالعه بر اساس نشانگرهای ISSR، ۱۷ ژنوتیپ (۵۰ درصد) به ساختار اول (قرمز)، ۹ ژنوتیپ (۲۶/۴۷ درصد) به ساختار دوم (سبز) و ۸ ژنوتیپ (۲۳/۵۳ درصد) به ساختار مخلوط تعلق داشتند که در شکل ۴، درصد عضویت هر ژنوتیپ در گروه‌ها مشخص شده است. تجزیه ساختار جمعیت به زیرجمعیت‌ها (شکل ۴)، شناسایی ژنوتیپ‌های اختلاط یافته را امکانپذیر می‌سازد (Dadras et al. 2013). مقادیر عددی ماتریس Q در جدول ۷ گزارش شده است. برخی از ژنوتیپ‌ها مانند Dg-G22، Dg-G17، Dg-G14، Dg-G7، Dg-G4، Dg-G32، Dg-G28 و Dg-G27 که دارای مقادیر Q کمتر از ۷۰ درصد می‌باشند، به گروه مخلوط تعلق دارند. زمانی که درصد عضویت یک ژنوتیپ کمتر از مقدار ۷۰ درصد باشد، به عنوان ژنوتیپ

ترکیبی (مخلوط شده) تعریف می‌شود (Spataro et al. 2011). گروه اول با ۱۷ ژنوتیپ دارای بیشترین عضو است. همچنین گروه دوم با ۹ ژنوتیپ در رده دوم قرار دارد. در نهایت گروه مخلوط دارای ۸ ژنوتیپ می‌باشد.

جدول ۷. نام گروه ژنتیکی و مقدار عددی ماتریس Q

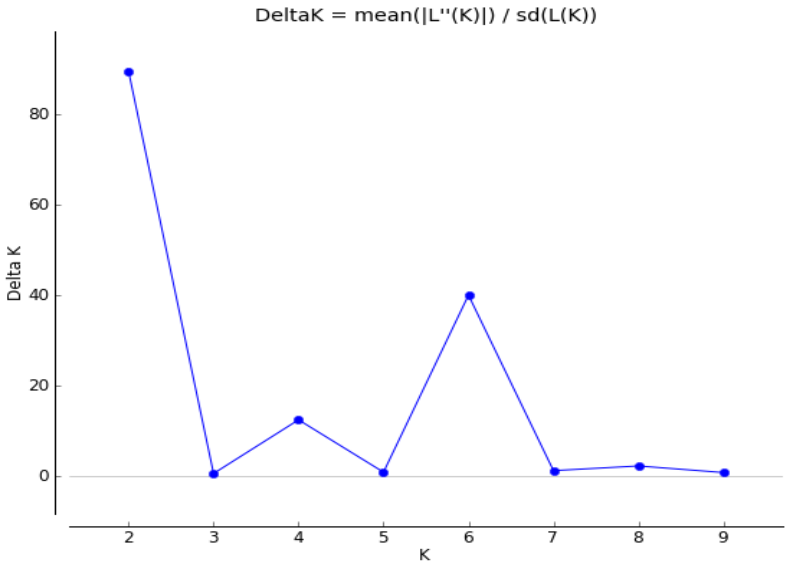
Table 7. Genetic group name and numerical value of Q matrix

ژنوتیپ Genotype	ماتریس Q Q Matrix		گروه ژنتیکی Genetic group
	Q1	Q2	
Dg-G1	0.972	0.028	قرمز Red
Dg-G2	0.982	0.018	قرمز Red
Dg-G3	0.89	0.11	قرمز Red
Dg-G4	0.452	0.548	مخلوط Mixed
Dg-G5	0.969	0.031	قرمز Red
Dg-G6	0.876	0.124	قرمز Red
Dg-G7	0.465	0.535	مخلوط Mixed
Dg-G8	0.925	0.048	قرمز Red
Dg-G9	0.973	0.027	قرمز Red
Dg-G10	0.157	0.843	سبز Green
Dg-G11	0.971	0.029	قرمز Red
Dg-G12	0.804	0.196	قرمز Red
Dg-G13	0.945	0.055	قرمز Red
Dg-G14	0.663	0.337	مخلوط Mixed
Dg-G15	0.092	0.908	سبز Green
Dg-G16	0.152	0.841	سبز Green
Dg-G17	0.544	0.456	مخلوط Mixed
Dg-G18	0.083	0.917	سبز Green
Dg-G19	0.099	0.901	سبز Green
Dg-G20	0.016	0.984	سبز Green
Dg-G21	0.055	0.945	سبز Green
Dg-G22	0.362	0.638	مخلوط Mixed
Dg-G23	0.969	0.031	قرمز Red
Dg-G24	0.734	0.266	قرمز Red
Dg-G25	0.203	0.797	سبز Green
Dg-G26	0.161	0.839	سبز Green
Dg-G27	0.622	0.378	مخلوط Mixed
Dg-G28	0.591	0.409	مخلوط Mixed
Dg-G29	0.884	0.116	قرمز Red
Dg-G30	.0901	0.099	قرمز Red
Dg-G31	0.951	0.049	قرمز Red
Dg-G32	0.556	0.444	مخلوط Mixed
Dg-G33	0.939	0.061	قرمز Red
Dg-G34	0.833	0.167	قرمز Red



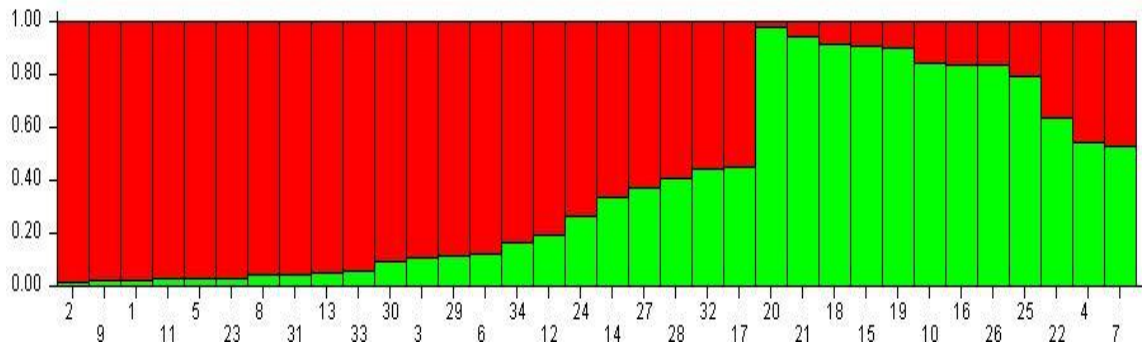
شکل ۲. گروه‌بندی ۳٤ ژنوتیپ *Dactylis glomerata* L. با استفاده از نشانگرهای ISSR بر اساس الگوریتم Neighbor joining

Figure 2. Grouping of 34 *Dactylis glomerata L.* Genotypes using ISSR markers according to Neighbor Joining algorithm



شکل۳. نمودار Δk برای تعیین تعداد زیر جمعیت‌ها (K)

Figure 3. Δk diagram to determine the number of subpopulations (K)



شکل ٤. طبقه‌بندی ۳٤ ژنوتیپ *Dactylis glomerata* L. با نرم افزار Structure

Figure 4. Classification of 34 *Dactylis glomerata* L. genotypes using Structure software

نتیجه‌گیری: نشـــانگرهای ISSR در کل ۴۲۴ جایگاه ایجاد کردند که که تعداد ۳۹۰ جایگاه آن چندشـــکل یا پلی‌مورف بودند. میانگین در صد چند شکلی در نشانگرهای ISSR، ۷۰/۳۹ ٪ بود که بیشترین و کمترین تعداد جایگاه مربوط به ISSR6 با ۳۰ جایگاه و ISSR14 با ۵ جایگاه بود. مقدار میانگین PIC (محتوای اطلاعات چندشـــکل) برای نشـــانگرهای ISSR، برابر با ۰/۶۹۷ بود. نشـــانگر ISSR5 با میانگین PIC ۰/۹۲۰، بالاترین مقدار میانگین چندشـــکلی را دارا بود که جهت تمایز جمعیت‌های خویشاوندی نزدیک مفید بوده و نقش بسزایی در تفکیک و تمایز افراد دارد. این نشانگر می‌توانند مناسب برای بررسی‌های بعدی در مورد اکوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک با *D. glomerata* L. باشد. گروهبندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای ISSR توسط نرم‌افزار Mega 4.0.2 و Structure به ترتیب آنها را در ۴ و ۲ گروه طبقه‌بندی کرد. نتایج حاصـــل نشـــان داد که تنوع قابل توجهی میان ژنوتیپ‌های مورد بررسـی وجود دارد. تجزیه سـاختار جمعیت نیز بیانگر وجود اختلاط در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود. تنوع ژنتیکی شـــناســـایی شـــده در این مطالعه، بیانگر ارزشـــمند بودن ذخایر ژنتیکی این گونه گیاهی و لزوم توجه بیشـــتر در حفظ، نگهداری، ارزیابی و شناسایی آنها می‌باشد.

سپاسگزاری: از ریاست محترم دانشگاه مراغه و ریاست محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور به خاطر فراهم نمودن هزینه و امکانات در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

اصغری علی، پناهی الهام، شکرپور مجید و همکاران (۱۳۸۹) بررسی تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های علف باغ (*Dactylis glomerata* L.) با استفاده از نشانگرهای RAPD. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۸، ۲۲۶-۲۱۴.

بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیتهای زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهش‌های تولیدات دامی ۱۳، ۱۸۶-۱۹۲.

تقی‌زاد آیدا، احمدی جعفر، حداد رحیم، ضرابی مهدی (۱۳۹۰) مطالعه تنوع ژنتیکی پسته ایرانی با استفاده از چند نشانگر بین ریزماهواره‌ای ISSR. نشریه علمی علوم باغبانی، ۲۵، ۴۶۰-۴۵۳.

جهانی حمید، فرشادفر محسن، صفری هوشمند، شیروانی هومن (۱۳۹۲) ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای *Dactylis glomerata* با استفاده از نشانگر ISSR. هشتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران و چهارمین همایش ملی امنیت زیستی، ۱۵-۱۷ تیر، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دادرس احمدرضا، صبوری حسین، محمدی نژاد قاسم و همکاران (۱۳۹۲) بررسی تنوع ژنتیکی ارقام توتون دسته بارلی و ویرجینیا با استفاده از چندشکلی طولی قطعات تکثیری. بیوتکنولوژی کشاورزی، ۵، ۴۴-۲۹.

رحمتی هوشنگ، شیروانی هومن (۱۳۹۷) بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های *Dactylis glomerata* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران)، ۳۱، ۷۸-۶۷.

عسکری ناهید، باقی‌زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۵۶-۴۹.

قره‌یاضی بهزاد (۱۳۷۵) کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. ۹-۴ شهریور، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران، ص ۳۸۰-۳۲۸.

محسن زاده گلفزایی محمد، سمیع زاده لاهیجی حبیب، اعلمی علی و همکاران (۱۳۹۱) بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف توتون گرمخانه‌ای با استفاده از نشانگر ISSR و رتروترانسپوزون. علوم گیاهان زراعی ایران، ۴۳، ۳۸۰-۳۷۱.

نقوی محمدرضا، قره‌یاضی بهزاد، حسینی سالکده قاسم (۱۳۸۴) نشانگرهای مولکولی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، تهران، ایران.

References

Asghari A, Panahi E, Shokrpour M et al. (2011) Evaluation of genetic diversity of *Dactylis glomerata* L. ecotypes using RAPD markers. Iran J Rang Plant Breed Genet Res 18, 214-226 (In Persian).

Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 5, 49-56 (In Persian).

Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A et al. (2016) Study of genetic diversity in honey bee populations in Kerman province using ISSR markers. Res Anim Prod 7, 186-192 (In Persian).

Belaj A, Satovic Z, Cipriani G et al. (2003) Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theor Appl Genet 107, 736-744.

Dadras AR, Sabouri H, Mohammadi Nezhad G et al. (2013) Investigation of genetic diversity of Barley and Virginia tobacco varieties using amplified fragment length polymorphism. Agric Biotec J 5, 29-44 (In Persian).

Garayalde AF, Poverene M, Cantamutto M, Carrera AD (2011) Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. Ann Appl Biol 158, 305-317.

Ghareyazie B (1996) Application of DNA markers in plant breeding. Proc. of 4th Iranian crop science congress. Aug. 25-31, Isfahan university of technology, Isfahan, Iran. pp. 328-380 (In Persian).

Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Aus J Basic Appl Sci 4, 5758-5760.

Godwin ID, Aitken EA, Smith LW (1997) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis 18, 1524-1528.

Jabbarzadeh Z, Khosh-Khui M, Salehi H, Saberivand A (2010) Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as reproducible and specific tools for genetic diversity analysis of rose species. Afric J Biotechnol 9, 6091-6095.

Jahani H, Farshadfar M, Safari H, Shirvani H (2013) Evaluation of genetic variation for *Dactylis glomerata* by ISSR markers. Proc. of 8th national biotechnology congress of I.R. Iran & 4th national conference on biosecurity, July, 6-8, Tehran University, Tehran, Iran (In Persian).

Last L, Widmer F, Fjellstad W et al. (2013) Genetic diversity of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations in three regions in Europe. BMC Genet 14, 102.

Mizianty M (1990). Biosystematic studies on Dactylis L. l. Review of the previous studies. 1.2. Cytology, genetics, experimental studies, and evolution. Acta Soc Bot Pol 59, 105-118.

Mohammadabadi MR, Askari N (2012) Characterization of genetic structure using ISSR-PCR markers: cattle, goat and sheep populations. LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrusken, Germany. 120pp.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in Kermani sheep. J Res Dev 5, 154.

Mohammadabadi MR, Oleshko V, Oleshko O et al. (2021) Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in Guppy fish. Turk J Fish Aquatic Sci 21, 603-613.

Mohammadi R, Panahi B, Amiri S (2020) ISSR based study of fine fescue (*Festuca ovina* L.) highlighted the genetic diversity of Iranian accessions. Cytol Genet 54, 257-263. https://doi.org/10.3103/S0095452720030123

Mohsenzadeh Golfezani M, Samizadeh Lahiji H, Alami A et al. (2012) Study of genetic diversity of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genotypes using ISSR and Retrotransposon markers. Iranian J Field Crop Sci 43, 371-380 (In Persian).

Naghavi MR, Ghareyazie B, Hosseini Salekdeh G (2005) Molecular markers (1st edn), Tehran University press, Tehran, Iran (In Persian).

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multi locus genotype data. Genetics 155, 945-959.

Rahmati H, Shirvani H (2018) The study of genetic diversity *Dactylis glomerata* ecotype using ISSR molecular marker. J Cell Mol Res (Iranian J Biol) 31, 67-78 (In Persian).

Rezaeizad A, Wittkop B, Snowdon R et al. (2011) Identification of QTLs for phenolic compounds in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by association mapping using SSR markers. Euphytica 177, 335-342.

Shahabzadeh, Z, Mohammadi R, Darvishzadeh R et al. (2020) Genetic structure and diversity analysis of tall fescue populations by EST-SSR and ISSR markers. Mol Biol Rep 47, 655-669. https://doi.org/10.1007/s11033-019-05173-z

Spataro G, Tiranti B, Arcaleni P et al. (2011) Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. Theor Appl Genet 122, 1281-1291. https://doi.org/10.1007/s00122-011-1530-y

Stebbins GL, Zohary D, (1959) Cytogenetic and evolutionary studies in the genus Dactylis. I. morphology, distribution and inter relationships of the diploid subspecies. University of California Publications in Botany 31. California Univ. Press, Berkeley, Los Angeles, USA, 1-40.

Tagizad A, Ahmadi J, Haddad R, Zarrabi M (2011) Study of genetic diversity in Iranian Pistachio cultivars with inter-microsatellite ISSR markers. J Hortic Sci 25, 453-460 (In Persian).

Thimmappaiah W, Santhosh G, Shobha D, Melwyn GS (2008) Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Sci Hortic 120, 411-417.

Tuna M, Khadka DK, Shrestha M et al. (2004) Characterization of natural orchardgrass (*Dactulis glomerata* L.) population of the Thrace region of Turkey based on ploidy and DNA. Euphytica 135, 39-46.

Virk PS, Zhu J, Newbury HJ et al. (2000) Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. Euphytica 112, 275-284.

Wang Z, Liao L, Yuan X et al. (2013) Genetic diversity analysis of *Cynodon dactylon* (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers. Biochem syst ecol 46, 108-115.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of inter-simple sequence repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. Small Rumin Res 132, 123-127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR et al. (2011) Genetic variation of Mehraban sheepusing two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Afric J Biotechnol 10, 1812-1817.

Zeng B, Zhang XQ, Lan Y (2008) Assessment of genetic diversity among *Dactylis glomerata* L. as determined by RAPD and SRAP. Acta Hortic 783, 407-418.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500