بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپهای *Dactylis glumerata* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

هوشنگ رحمتی* و هومن شیروانی

تهران، دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۱

چکیده

علف باغ (*Dactylis glomerata*) یکی از گندمیان مهم مرتعی چند ساله برای ایجاد چراگاه و تولید علوفه خشک است. تنوع ژنتیکی ۱۵ اکوتیپ از این گونه مرتعی با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت، که از این ۲۰ آغازگر تنها ۱۲ عدد دارای باندهای واضح و واجد امتیازدهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۹۰ مکان را تکثیر کنند که از این تعداد ۶۷ باند چند شکل مشاهده شد. آغازگر IS5 بیشترین تعداد باند (۱۲) و آغازگرهای IS7، IS12، IS10 و IS15 کمترین تعداد باند (۵) را داشتند. میانگین درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) به ترتیب برابر ۷۵/۴۵ درصد و ۰/۳۳ بود. آغازگرهای IS10 و IS9 بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) را داشتند. تجزیه خوشه‌ای برای اکوتیپها بر اساس ضریب تشابه دایس صورت گرفت که اکوتیپهای مورد بررسی در ۴ گروه قرار گرفتند که تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطابق نداشت. همچنین این نتایج تا حدودی با تجزیه به مختصات اصلی (PCo) مطابقت داشت.

واژه های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی، اکوتیپ، *Dactylis glumerata*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۶۶۰۰۹۴۰ ، پست الکترونیکی: Hoshang.rahmati@yahoo.com

مقدمه

بشر از روزگاران گذشته برای دستیابی به غذا کوششی پی-گیر را آغاز کرده است. آنچه مسلم است این است که انسان، هزاره‌ها و سده‌های بسیاری را با خوردن گیاهان خودرو گذرانده است. در حال حاضر تأمین غذا برای جمعیت ۷ میلیارد نفری جهان کاری بس مشکل است (۱۴). از میان فرآورده‌های غذایی، فرآورده‌های دامی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. بر اثر افزایش جمعیت، نیاز کشور به این فرآورده‌ها روز به روز بیشتر می‌شود. نقش گیاهان علوفه‌ای در تعلیف دام، از اهمیت غیرقابل انکاری برخوردار است، از این رو بذل توجه به کشت محصولات علوفه‌ای با شیوه علمی اهمیت خاصی می‌یابد (۱۴). گراسها از مهمترین گیاهان مرتعی هستند که به لحاظ تولید علوفه، احداث چراگاهها، حفاظت و جلوگیری از فرسایش خاک اهمیت زیادی دارند (۱۱). علف باغ (*Dactylis glomerata*)، یکی از مهمترین گراسهای علوفه-ای است و به علت توانایی تولید علوفه نسبتا مطلوب در خاکهای فقیر و کم عمق، برای احیای مراتع، احداث چراگاه و تولید علوفه مناسب می‌باشد (۱۶). بیشتر به-نژادگران معتقدند که کمبود تنوع ژنتیکی پیشرفتهای اصلاحی را در آینده مختل می‌کند (۱۳). تنوع و انتخاب دو رکن اساسی در هر برنامه اصلاحی بوده که انجام انتخاب منوط به وجود تنوع مطلوب از لحاظ ویژگیهای مورد بررسی است (۱۷). ذخایر توارثی هر گونه گیاهی به‌ویژه اکوتیپها و جمعیتهای وحشی آن گونه، اساس تنوع آن گونه به شمار می‌روند که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی به نژادگران، مورد استفاده قرار گیرند (۵). نشانگرهای مولکولی ابزارهای مفید و قوی در ارزیابی روابط خویشاوندی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا

تفاوت بین نمونه‌های مختلف می‌باشند. نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA کمتر تحت تأثیر شرایط محیط قرار می‌گیرند (۷). در سالهای اخیر، تکنولوژی PCR به توسعه تکنیک ساده و سریع به‌نام بین توالیهای تکرای ساده (ISSR) (۲۳) منجر شد که مستقل از شرایط محیطی هستند و تحت تاثیر مراحل رشد گیاه قرار نمی‌گیرند. این نشانگر هم برای انگشت نگاری DNA (۹) و مطالعه ژنتیک جمعیت (۶) استفاده شده است. این تکنیک به طراحی آغازگر نیاز ندارد و میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تری نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی دارد (۱۸). با استفاده از نشانگرهای مولکولی مطالعاتی بر روی جمعیتهای علف باغ انجام گرفته و گزارشات متعددی مبنی بر این موضوع که نشانگرهای مولکولی کارآیی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی این گونه داشته است منتشر گردیده (۱، ۲، ۲۰، ۲۱ و ۲۲). هدف از تحقیق حاضر بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپهای گونه *Dactylis glomerata* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR می‌باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: در این تحقیق تعداد ۱۵ اکوتیپ *D. glomerata* از بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور تهیه گردید. مشخصات مواد ژنتیکی مورد مطالعه، با ذکر محل دریافت یا جمع‌آوری در جدول ۱ نشان داده شده است.

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته (۸) برای هر اکوتیپ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام گرفت. بعد از انتقال ۲۰ تا ۵۰ میلی‌گرم نمونه خرد شده با ازت مایع به تیوپ، ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج به تیوپها اضافه شد و به مدت یک ساعت نمونه‌ها در حمام آبی با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۸۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه خوب به هم زده شد تا محلول داخل تیوپ یکنواخت شود. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و فاز رویی به یک تیوپ تمیز منتقل گردید و به هر تیوپ مقدار ۶۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت یک ساعت در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس تیوپها به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و بعد از آن فاز مایع به آرامی خالی و به هر تیوپ مقدار ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد سرد اضافه و یک سانتریفیوژ کوتاه صورت گرفت و به آرامی فاز مایع خالی شد، در پایان نیز تیوپها در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شوند و بعد به هر تیوپ میزان ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل اضافه گردید. بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر صورت گرفت.

جدول ۱- لیست اکوتیپهای *D. glomerata* تهیه شده از بانک ژن منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور به همراه منشاء

شماره	منشاء	شماره	منشاء
۱	کرج ۱	۹	سیراچال
۲	بانک ژن	۱۰	بیجار
۳	مرند	۱۱	قزوین ۲
۴	قزوین ۱	۱۲	کرج ۲
۵	اردبیل ۱	۱۳	اسپانیا ۱
۶	اردبیل ۲	۱۴	اسپانیا ۲
۷	تبریز	۱۵	کرج ۳
۸	زنجان		

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی‌مولار MgCl2، ۰/۰۵ میلی‌مولار از هر dNTP، ۰/۲ میکرومول آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر واکنش به مقدار 1x) انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت-

سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود. همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد استفاده شد. به منظور تزریق نمونه در ژل، ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNA های تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهکهای ایجاد شده در ژل آگارز بارگزاری و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت و سپس ژل را جهت رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم برماید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document جهت نمایان شده نوارها استفاده شد.

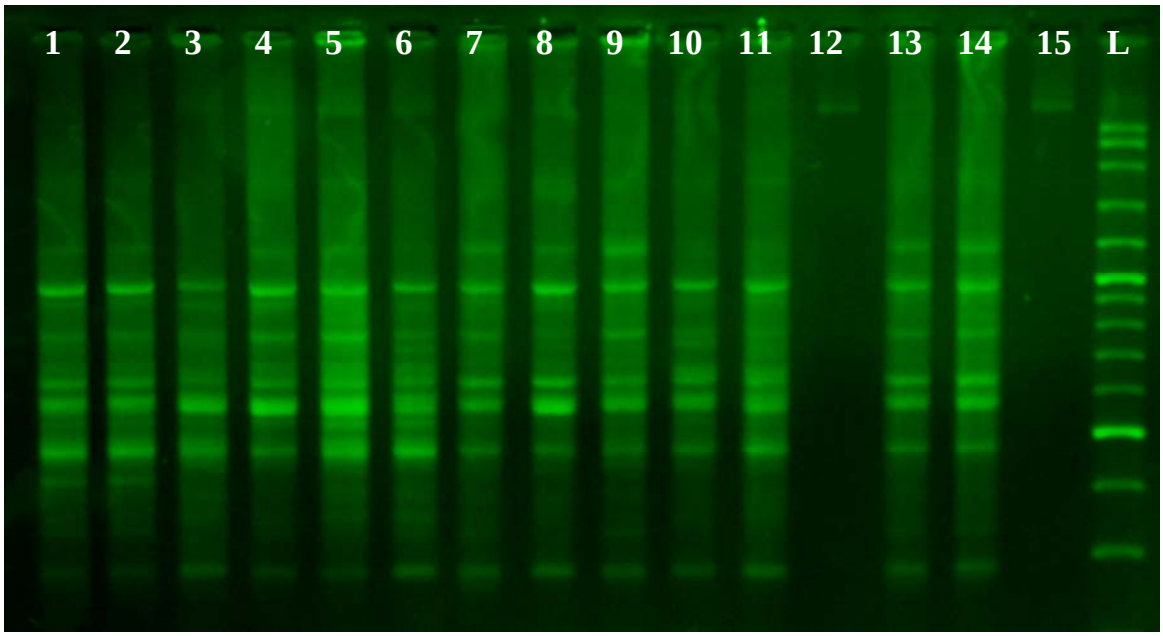
تجزیه و تحلیل داده‌ها: محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) از طریق فرمول $\mathrm{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^{n} Pi^{2}$ محاسبه شد، در اینجا p برابر با مجموع نوارهای هر لوکوس برای کلیه اکوتیپهاست (۱۰). در پایان نیز از نرم افزارهای NTSYSpc 2.02e برای محاسبه ماتریس تشابه و آزمون مانتل (۱۵)، DARwin 6 جهت تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی (PCo) (۱۲) جهت تجزیه داده‌ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

پلی مورفیسم نشانگر ISSR: تنوع ژنتیکی اکوتیپهای جمع‌آوری شده از سراسر کشور با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR موجود در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت که از این ۲۰ آغازگر تنها ۱۲ عدد دارای باندهای واضح و واجد امتیازدهی بودند (جدول۱). آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۹۰ مکان را تکثیر کنند که از این تعداد ۲۳ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند. آغازگر IS5 بیشترین تعداد باند (۱۲) و آغازگرهای IS7، IS12، IS10 و IS15 کمترین تعداد باند (۵) را داشتند. متوسط تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۵ اکوتیپ برابر ۶ به دست آمد. شکل ۱، الگوی باندی ۱۵ اکوتیپ مورد بررسی با استفاده از آغازگر IS11را نشان می‌دهد. اصغری و همکاران (۱۳۸۹) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD تنوع ژنتیکی جمعیتهای علف باغ (*Dactylis glumerata*) را بررسی و گزارش نمودند از ۴۰ آغازگر مورد ارزیابی، ۸ آغازگر ۷۳ نوار چندشکل تولید کردند. تعداد کل نوارهای چندشکل در درون اکوتیپها از ۲۵ تا ۴۹ نوار متغیر بود (۱). Zeng و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از نشانگرهای RAPD و SRAPتنوع ژنتیکی میان جمعیتهای علف باغ (*Dactylis glumerata*) را بررسی و در پایان سطح بالایی از تنوع را در میان جمعیتها بر اساس هر دو نشانگر گزارش نمودند (۲۲).

میانگین درصد چند شکلی برابر ۷۵/۴۵ درصد بود که بالاترین میزان درصد چند شکلی مربوط به آغازگرهای IS16 و IS10 بود و کمترین درصد چند شکلی را آغازگرهای IS15 (۶۰ درصد) و IS11 (۵۰ درصد) داشتند نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول (۲) نشان داده شده است. آغازگرهای IS10 و IS9 بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) را داشتند و برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسم دیگر اکوتیپهای *Dactylis* در تحقیقات بعدی معرفی می‌گردند. آغازگرهای IS15 و IS11 با کمترین میزان چند شکلی توانایی خوبی در جداسازی اکوتیپها نداشت. با توجه به اینکه مقادیر محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC)، یکی از شاخصهای مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف، از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود. مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد. بنابراین، نشانگرهایی با محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) بالا

برای تمایز ژنوتیپهای خویشاوندی نزدیک مفید هستند (۱۹). Zeng و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از نشانگر مولکولی SCOT تنوع ژنتیکی میان اکوتیپهای آمریکایی و اروپایی *Dactylis glomerata* را مورد ارزیابی قرار دادند و در پایان گزارش نمودند که نشانگر مولکولی SCOT کارآیی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی این گونه داشته است (۲۱). عبدالهی و عزیزی (۱۳۹۳) در مطالعه جمعیتهای مختلف یونجه چند شکلی بالای نشانگر مولکولی ISSR را گزارش نمودند (۳).



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورزی اکوتیپهای *Dactylis* مورد بررسی برای آغازگر IS11

جدول ۲- درصد چند شکلی، تعداد کل باند و محتوای اطلاعات چند شکلی در آغازگرهای ISSR

آغازگر	توالی آغازگر ('3- '5)	تعداد مکانهای تکثیر شده	تعداد مکانهای چند شکل	درصد چند شکلی	PIC
IS6	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	7	5	71.42	0.32
IS7	ACACACACACACACACYA	5	4	80	0.31
IS10	GAGAGAGAGAGAGAGARc	5	5	100	0.39
IS11	ACACACACACACACACC	8	4	50	0.29
IS12	TGTGTGTGTGTGTGTGG	5	4	80	0.32
IS13	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	7	5	71.42	0.36
IS14	GACAGACAGACAGACA	9	7	77.77	0.36
IS15	GGATGGATGGATGGAT	5	3	60	0.22
IS2	ACACACACACACACACC	10	7	70	0.36
IS5	AGAGAGAGAGAGAGAGC	12	9	75	0.33
IS9	CTCTCTCTCTCTCTCTG	10	7	70	0.39
IS16	DBDACACACACACACACA	7	7	100	0.35
میانگین		7.50	5.58	75.47	0.33

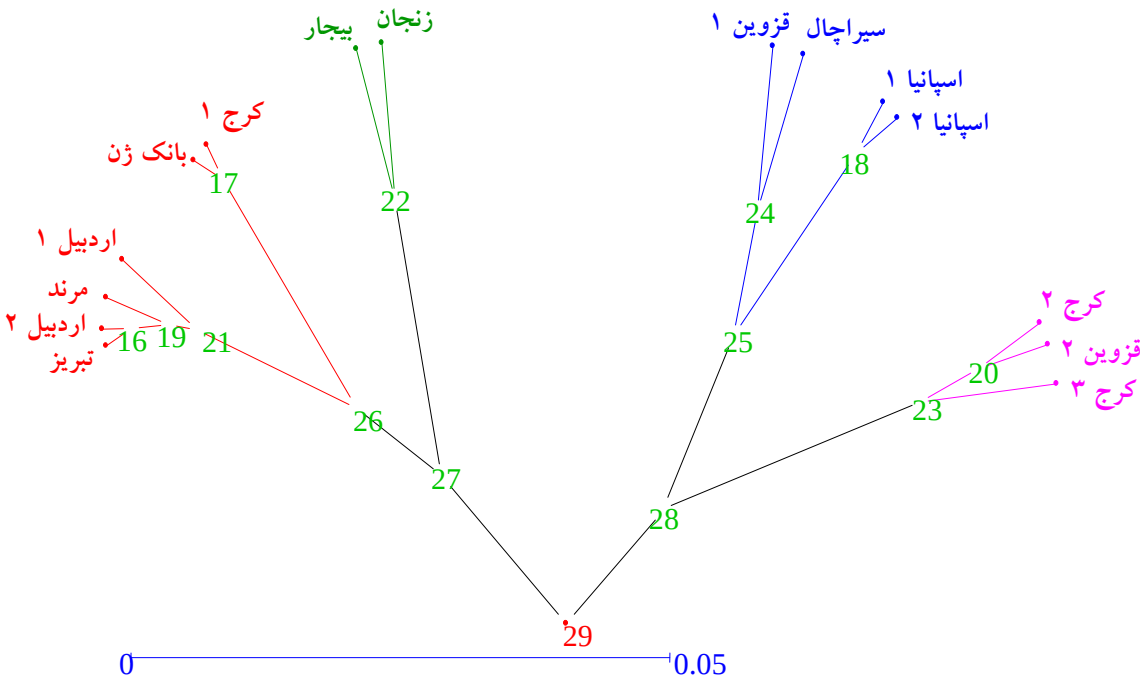
Y=(C,T), V=(A,C,G), D=(A,G,T), B=(C,G,T)

ماتریس تشابه: تشابه ژنتیکی اکوتیپهای مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس از ۰/۱ تا ۰/۹۷ متغیر بود، میانگین تشابه بین اکوتیپها برابر ۰/۵۵ بود که بالا بودن تشابه ژنتیکی یاد شده نشان دهنده تنوع متوسط اکوتیپهای *Dactylis* می‌باشد. مجیری و همکاران (۱۳۹۳) بیان نمودند که نشانگرهای نیمه تصادفی کارآیی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی دارند (۴). بیشترین تشابه را اکوتیپهای اردبیل ۲ و تبریز (۰/۹۷) و کمترین تشابه را اکوتیپ اردبیل ۱ و کرج ۳ (۰/۱) داشتند (جدول ۳). Tuna و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از نشانگرهای مولکولی تنوع ژنتیکی میان جمعیتهای مختلف علف باغ (*Dactylis glumerata*) را بررسی و بر اساس ماتریس تشابه سطح بالایی از تنوع را میان جمعیتها گزارش نمودند (۲۰).

جدول ۳- ماتریس تشابه اکوتیپها برای پرایمرهای ISSR استفاده شده بر اساس ضریب دایس

	کرج۱	بانک ژن	مرند	قزوین۱	اردبیل۱	اردبیل۲	تبریز	زنجان	سیراچال	بیجار	قزوین۲	کرج۲	اسپانیا۱	اسپانیا۲	کرج۳
کرج۱	1.00														
بانک ژن	0.95	1.00													
مرند	0.77	0.69	1.00												
قزوین۱	0.40	0.51	0.50	1.00											
اردبیل۱	0.46	0.47	0.75	0.57	1.00										
اردبیل۲	0.69	0.80	0.96	0.71	0.86	1.00									
تبریز	0.62	0.73	0.80	0.44	0.79	0.97	1.00								
زنجان	0.73	0.34	0.73	0.13	0.51	0.46	0.57	1.00							
سیراچال	0.41	0.52	0.51	0.62	0.69	0.53	0.55	0.56	1.00						
بیجار	0.17	0.27	0.58	0.27	0.67	0.51	0.62	0.64	0.38	1.00					
قزوین۲	0.73	0.75	0.63	0.65	0.51	0.65	0.67	0.69	0.56	0.42	1.00				
کرج۲	0.55	0.67	0.44	0.45	0.62	0.57	0.58	0.49	0.46	0.66	0.82	1.00			
اسپانیا۱	0.31	0.52	0.31	0.62	0.48	0.53	0.44	0.45	0.64	0.50	0.67	0.69	1.00		
اسپانیا۱	0.56	0.67	0.65	0.47	0.34	0.58	0.59	0.51	0.48	0.56	0.71	0.62	0.90	1.00	
کرج۳	0.38	0.50	0.15	0.27	0.10	0.20	0.31	0.19	0.19	0.22	0.66	0.68	0.39	0.46	1.00

تجزیه خوشه‌ای: در این تحقیق برای مشخص کردن بهترین شاخص تشابه و تشخیص بهترین الگوریتم برای ترسیم مناسب‌ترین دندروگرام برای گزارش نتایج، شاخصهای تشابه شامل دایس و جاکارد با روشهای اتصال میانگین (UPGMA) و اتصال مجاور (NJ) محاسبه و بر اساس ضرایب کوفنتیک حاصل از آزمون مانتل مقایسه شدند. با توجه به نتایج به دست آمده الگوریتم UPGMA و شاخص دایس در آزمون مانتل ضریب کوفنتیک بالاتری نشان داد (۸۸ درصد). دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای در شکل (۲) آمده است که بر اساس آن اکوتیپها در ۴ گروه قرار گرفتند، که با توجه به نتایج نشانگر ISSR توانست تا حدودی بر اساس توزیع جغرافیایی و تشابهات اقلیمی برخی از اکوتیپها را از هم تفکیک کند. گروه اول شامل اکوتیپهای (کرج ۱، بانک ژن، مرند، اردبیل ۱، اردبیل ۲ و تبریز) می‌باشد. در گروه دوم اکوتیپهای (زنجان و بیجار) قرار گرفتند. گروه سوم شامل اکوتیپهای (قزوین ۱، سیراچال، اسپانیا ۱ و اسپانیا ۲) می‌باشد. گروه چهارم شامل اکوتیپهای (قزوین ۲، کرج ۲ و کرج ۳) بود.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر ISSR برای اکوتیپهای مورد مطالعه

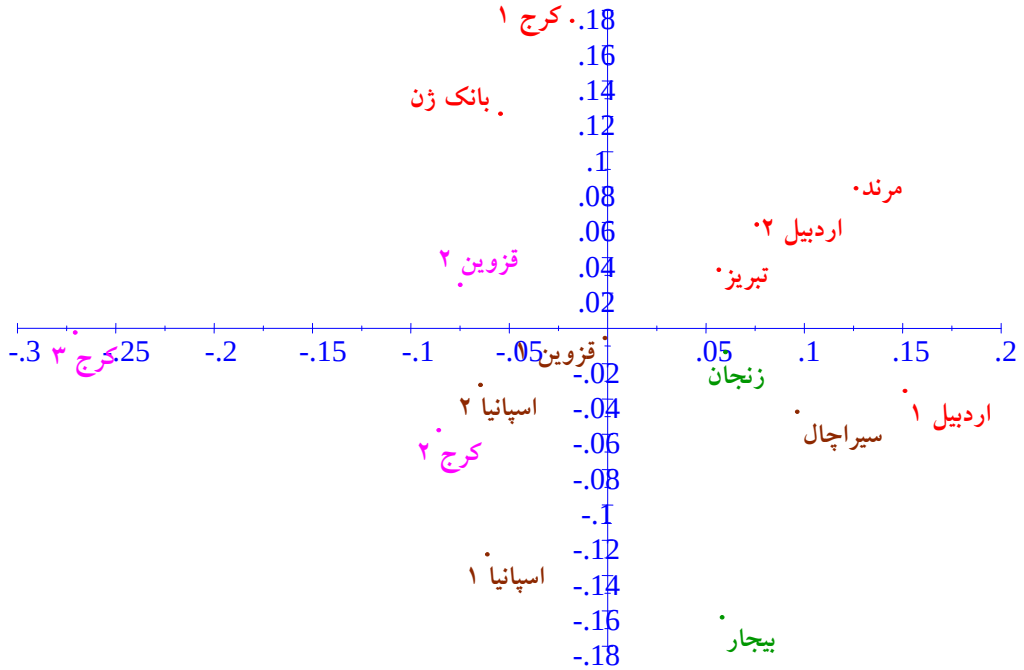
جهانی و همکاران (۱۳۸۹) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR تنوع ژنتیکی جمعیتهای علف باغ (*Dactylis glumerata*) را بررسی گزارش نمودند که با استفاده از نشانگر ISSR تنوع بالایی در میان جمعیتها وجود دارد و در پایان جمعیتها را در ۳ گروه قرار دادند، نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی همبستگی نداشت (۲).

تجزیه به مختصات اصلی (PCo): تجزیه به مختصات اصلی (PCo) به همراه تجزیه خوشه‌ای یکی دیگر از تکنیکهای چند متغیره است که کاربرد زیادی در تجزیه ژنتیکی دارد. این تکنیک را می‌توان برای نمایش دو بعدی پراکنش افراد به کار برد. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات نشان دهنده تشابه ژنتیکی افراد است. که با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه به مختصات و بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی اکوتیپها رسم گردید، که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای تا حدودی مطابقت داشت و اکوتیپها به چهار گروه تقسیم شدند (شکل ۳). اصغری و همکاران (۱۳۸۹) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD تنوع ژنتیکی جمعیتهای علف باغ را بررسی و بر اساس تجزیه خوشه‌ای، ۲۵ اکوتیپ علف باغ (*Dactylis glumerata*) در ۸ گروه مجزا قرار گرفتند. گروه‌بندی بر اساس داده‌های مولکولی انطباقی با گروه‌بندی جغرافیایی اکوتیپها نداشت (۱).

نتیجه‌گیری

برای موفقیت برنامه‌های اصلاحی دانستن میزان قرابت ژنتیکی والدین اهمیت بسیار زیادی دارد. با توجه به مطالعات مولکولی تنوع متوسطی بین اکوتیپهای مورد بررسی وجود داشت که این موضوع تأیید کننده مطالعات قبلی می‌باشد که در بین اکوتیپهای *Dactylis glumerata* از نظر DNA نیز تنوع متوسطی وجود دارد. طبق بررسیهای انجام شده، تنوع ژنتیکی متوسطی بین اکوتیپهای *Dactylis* مورد مطالعه وجود داشت و از آنجا که این اکوتیپها نماینده توده‌های *Dactylis* موجود در بانک ژن می‌باشند لذا در بین کل اکوتیپهای موجود در بانک ژن نیز تنوع وجود دارد. بنابراین این مطلب را که در اکثر مطالعات مربوط به

ارزشیابی تنوع درون گونه‌ای، تنوعی اندک بین اکوتیپها یافته‌اند و یا گاهی هیچ گونه تنوعی وجود نداشته است، نمی‌توان به عنوان یک پیش فرض برای هرگونه در نظر گرفت. بنابراین پیشنهاد می‌شود روی بررسی ژرم پلاسم و تنوع ژنتیکی این گونه مطالعات گسترده‌ای صورت گیرد تا بتوان در جهت شناسایی و انتقال ژنهای مفید به گیاهان هم خانواده دید بالاتری داشت.



شکل ۳- بای پلات اکوتیپها برای نشانگر ISSR بر اساس محور مختصات اصلی اول و دوم

قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام گرفته و کلیه حقوق مادی و معنوی آن متعلق به دانشگاه پیام نور می‌باشد.

منابع

۱- اصغری، ع.، پناهی، ا.، شکرپور، م.، محمددوست‌چمن‌آباد، ح. ر.، ایمانی، ع. ا. و سفالیان، ا.، ۱۳۸۹. بررسی تنوع‌ژنتیکی در اکوتیپهای علف باغ (*Dactylis glomerata* L.) با استفاده از نشانگرهای RAPD. دو فصلنامه- علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۸(۲): ۲۱۴-۲۲۶.

۲- جهانی، ح.، فرشادفر، م.، صفری، ه. و شیروانی، ه.، ۱۳۹۲. ارزیابی تنوع‌ژنتیکی ژنوتیپهای *Dactylis glomerata* با استفاده از نشانگر ISSR. هشتمین همایش ملی بیوتکنولوژی.

۳- عبدالهی مندوکانی، ب.، عزیزی، ح.، ۱۳۹۳. شناسایی نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات مورفولوژیک در جمعیتهای یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۷ (۲): ۲۶۰-۲۶۸.

۴- مجیری، ف.، اسماعیلی، ا.، نظریان فیروزآبادی، ف.، مومنی، ر.، ۱۳۹۳. مقایسه نشانگرهای اینترونی و اگزونی در ارزیابی تنوع ژنتیکی آویشن کرک آلود (*Thymus pubescens*). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۷ (۳): ۲۶۲-۲۷۲.

۵- یزدی صمدی، ب.، و س. عبد میشانی. ۱۳۷۵. اصلاح نباتات زراعی. مرکز نشر دانشگاه تهران.

6- Alam, A., Naik, PK. and Mishra Gyan, P. (2009). Congruence of RAPD and ISSR Markers for Evaluation of Genomic Relationship Among 28 Populations of Podophyllum Hexandrum from Himachal Pradesh. Turkish journal of botany, 33: 1-12

7- Chawla, H S. (2000). Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers Inc. USA

8- Doyle, J.J., and Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochem Bull, 19:11–15.

9- Gupta, S., Srivastava, M., Mishra Gyan, P., Naik, PK., Chauhan, RS., Tiwari, SK., Kumar, M. and Singh, R. (2008). Analogy of ISSR and RAPD Markers for Comparative Analysis of Genetic Diversity Among Different Jatropha Curcas Genotypes. African journal of biotechnology, 23: 4230-4243.

10- Hou, Y., Yan, Z. and Wei, Y. (2005). Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR nalysis. Barely Genetics Newsletter, 35:9-22

11- Moradi, P. and Jafari, A. A., (2006). Comparative study of forage quality in 26 Dactylis glomerata genotypes in order to produce synthetic varieties in Zanjan provienc. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14: 175-180.

12- Perrier, X. and Jacquemoud-Collet, JP. (2006). DARwin soft ware, http://darwin.cirad.fr/darwin

13- Rajaram, S. (2010). International Wheat Breeding. The Proceeding of 11th Iranian Crop Science Congress: Crop Production, Pp 225-238.

14- Rastegar, M. E. (2007). Cultivation of forage crops, Nopardazan Publications, Tehran.

15- Rohlf, F. and Taxonomy, N. P.N. (1998). Multivariate Analysis System, Version 2.02. New York: Exeter Software, Applied Biostatistics Inc.

16- Sanderson, MA., Skinner, RH. and Elwinger, GF. (2002). Seedling development and field performance of prairiegrass, grazing bromegrass, and orchardgrass. Crop Science, 42(1): 224-230.

17- Slageren, M. and Van, W. (1994). Wild wheats: a monograph AegilopsL. and Amblypyrum (Jaub. and spach.) of eig (poaceae). Wagenin Gen. Agr., univ.ICARDA.

18- Terzopoulos, PJ. and Bebeli, PJ. (2008). Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (Vicia faba L.) with ISSR markers. Field Crops Research, 108:39-44.

19- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, GS. (2008). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Sciatica Horticulture, 118: 1-7.

20- Tuna, M., Khadka, D.K., Shrestha, M., Arumuganathan, K. and Golan- Goldhirsh, A. (2004). Characterization of natural orchardgrass (Dactulis glomerata L.) population of the Thrace Region of Turkey based on ploidy and DNA. Euphytica, 135: 39- 46.

21- Zeng, B., Zhang, Yu., Huang, L., Jiang, X., Luo, D., Yin, Guohua. (2014). Genetic diversity of orchardgrass (Dactylis glomerata L.) germplasms with resistance to rust diseases revealed by Start Codon Targeted (SCoT) markers. Biochemical Systematics and Ecology, 54:96-102.

22- Zeng, B., Zhang, X.Q. and Lan, Y. (2008). Assessment of genetic diversity among Dactylis glomerata L. asdetermined by RAPD and SRAP. Acta Horticulturae, 783: 407-418.

23- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics, 20: 176-183

The study of genetic diversity *Dactylis glumerata* ecotype using ISSR molecular marker

Rahmati H. and Shirvani H.

Agriculture Dept., Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Cocksfoot (*Dactylis glomerata*) is a perennial grass that is used for pastures and hay production.Genetic variation for 15 ecotype were surveyed using the number of 20 ISSR primers, that the number of 12 primers can be scored. The ISSR primers can be produced the number of 90 bands, which the polymorphism was showed for the number of 67 bands. The primer of IS5 showed the highest number of band (12 bands) and IS7, IS12, IS10 and IS15 showed the lowest number of band (5 bands). The average of polymorphism percentage and polymorphism information content (PIC) between populations was 75.45% and 0.33 respectively. The highest polymorphism information content (PIC) was belonged to IS9 and IS10. Classification of cluster analysis showed that the ecotype were divided into 4 groups and the genetic diversity of the ecotype not matching with the geographical diversity, also the results of grouping by using analysis of coordinate analysis (PCo) were confirmed.

Key words: *Genetic variation, Molecular marker, Ecotype, Dactylis glomerata.*