دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌های *Festuca arundinacea* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

هوشنگ رحمتی[۱]، محسن فرشادفر[۲] و هومن شیروانی[۳]

۱- مربی، گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، (نویسنده مسوول: hoshang.rahmati@yahoo.com)
۲ و ۳- دانشیار و مدرس، گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱

چکیده

جنس فستوکا یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که در اقلیم‌های مختلف رشد می‌کند. به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی تعداد ۱۸ نمونه از گیاه *Festuka arundinacea* در دانشگاه پیام نور کرمانشاه مورد آزمایش قرار گرفت. تعداد ۱۲ آغازگر ISSR برای بررسی میزان تنوع استفاده شد. تنوع ژنتیکی مطلوبی بر اساس نشانگر ISSR در بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد. در کل ۸۷ باند تشکیل شد و ۷۷ باند دارای چند شکلی بودند. میانگین درصد چند شکلی در بین اکسشن‌های مطالعه شده برابر ۸۹/۰۵ محاسبه گردید. بیشترین درصد چند شکلی به آغازگرهای IS6، IS9، IS11، IS12 و IS16 (۱۰۰ درصد) اختصاص داشت. میانگین PIC و میانگین MIدر آغازگرهای بررسی شده به ترتیب ۰/۳۳ و ۲/۲ بود. بیشترین میزان MI مربوط به آغازگرهای IS10، IS2، IS6 و IS12 بود. در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده بر اساس شاخص‌های محاسبه شده آغازگرهای IS10 و IS_6 بیشترین چندشکلی را در بین ژنوتیپ‌ها نشان دادند. بیشترین و کمترین تشابه به ترتیب مربوط به اکسشن‌های ۱۶ (کامیاران) و ۱۷ (ایرلند) و اکسشن‌های یک (بانه) و ۱۲ (بروجن) بود. با توجه به نتایج حاصل از رسم دندروگرام اکسشن‌ها در چهار گروه قرار گرفتند که با نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مطابقت داشت که بیشترین فاصله ژنتیکی بین گروه‌های یک و سه محاسبه گردید. در ضمن این گروه‌بندی بر اساس تجزیه واریانس مولکولی نیز تایید شد.

واژه‌های کلیدی: فستوکا، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR

مقدمه

فستوکا (*Festuca*) یکی از گیاهان مهم مرتعی برای ایجاد چراگاه و تولید علوفه است و گیاهی کاملا خوش‌خوراک می‌باشد. ارزش غذایی این گیاه به‌صورت سبز و تر یا خشک نسبتا خوب است، به‌طوری‌که اکثر دام‌ها با رغبت آن را چرا می‌نمایند. فستوکا جزء گیاهان کوتاه قد است و اخیرا انواع اصلاح شده آن در مراتع مختلف استفاده می‌شود (۱۴). بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین جمعیت‌های گیاهی یکی از موضوعات مورد علاقه دانشمندان می‌باشد. در روش‌های متداول اصلاحی، ژنوتیپ‌های مطلوب از داخل یک توده دارای تنوع ژنتیکی انتخاب و با ایجاد تغییراتی در بعضی از صفات مهم آنها، یک واریته تجاری تولید می‌گردد. تنوع گونه‌های گیاهی در یک محیط موجب پایداری و افزایش قابلیت تولید آن اکوسیستم می‌گردد. نکته حائز اهمیت این است که تنوع داخل گونه‌ها می‌تواند نقش مهمی را در میزان تولید یک اکوسیستم ایفا کند (۱۱). غالبا از تنوع ژنتیکی به عنوان معیاری برای انتخاب والدین استفاده می‌شود. مکانیزم‌های مختلفی مانند جهش، نوترکیبی جنسی، مهاجرت، رانده شدن ژنتیکی و انتخاب والدین می‌تواند در ایجاد تنوع ژنتیکی در یک جمعیت گیاهی نقش داشته باشند (۲). الگوهای تنوع بر سه نوع محیطی، ژنتیکی و تکاملی می‌باشند. شناسایی این الگوها تصویر ساده‌ای از ماهیت تنوع داخل جمعیت را به ما نشان می‌دهد، در حقیقت با شناسایی این الگوها می‌توانیم به‌علت تنوع موجود در یک جمعیت پی ببریم (۲). شناسایی تنوع ژنتیکی، به‌نژادگران را در امر شناسایی والدین یک تلاقی یاری می‌دهد. به‌عنوان مثال، تجزیه مولکولی می‌تواند افرادی که در یک مجموعه دورترین فاصله ژنتیکی را دارا هستند، شناسایی نماید، آنگاه بالاترین سطح پلی‌مورفیسم و بیشترین مقدار بنیه هیبرید و در نتیجه هتروزیس حاصل می‌گردد (۶). گاهی اوقات هدف به‌نژادگران انتقال یک صفت کیفی (که توسط یک لوکوس و یا تعداد کمی لوکوس کنترل می‌شود) از گیاهی به گیاه دیگری است، به‌طوری‌که صفات کمی مطلوب گیاه دومی تغییر نکند در این حالت، بهترین والد برای آمیزش با این فرد، نزدیک‌ترین خویشاوند به آن فرد می‌باشد، که دارای صفت کمی مطلوب می‌باشد (۵). نشانگرهای DNA گروه بزرگ از نشانگرهای مولکولی هستند که به‌دلیل دارا بودن کاربردهای فراوان در انواع مطالعات مولکولی، امروزه در سطح گسترده‌ای توسط پژوهشگران شاخه‌های مختلف علوم زیستی استفاده می‌شوند. گرچه این گروه از نشانگرها از حدود ۳۰ سال گذشته به صورت عملی وارد عرصه تحقیقات مولکولی شده‌اند اما در همین مدت کوتاه تاثیر شگرفی بر پیشرفت مطالعات مولکولی داشته‌اند. با استفاده از نشانگرهای DNA امکان بررسی تنوع ژنتیکی بین افراد جوامع مختلف گیاهی با سرعت و دقت بیشتری فراهم شده است. همچنین با کمک این نشانگرها می‌توان با کاوش در ژنوم یک گونه یا نژاد خاص، از وجود یا عدم وجود ژن‌های مورد نظر در آن آگاه شد (۱۷). ISSR[۱] ها (توالی‌های بین ریز ماهواره) نشانگرهای مولکولی نیمه تصادفی هستند (۱). این نشانگر اولین بار توسط تیکویچ و همکاران ۱۹۹۴ ابداع شد. تکثیر در این نشانگر در حضور یک آغازگر مکمل با توالی‌های SSR[۲] یا ریز ماهواره هدف انجام می شود (۱۸). سوفارمین و گوپالکریشنا (۱۷) در مقایسه بین نشانگرهای ISSR وRAPD عنوان کردند که نشانگرهای ISSR نسبت به RAPD کارایی بیشتری دارند. فصیح و

1- Inter Simple Sequence Repeat
2- Polymorphic information content

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-14]
[DOI: 10.29252/jcb.9.24.87]

همکاران (۳) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR روابط ژنتیکی میان جمعیت‌های *Festuca* را بررسی و گزارش کردند که بین جمعیت‌های بررسی شده تنوع بالایی وجود دارد. شریفی تهرانی و همکاران (۱۶) بر اساس مارکرهای مولکولی EST-SSR SSR ژنومی در بین جمعیت‌های فستوکای پابلند ایرانی تنوع معنی‌داری را گزارش کردند. هدف از تحقیق حاضر بررسی تنوع ژنتیکی ۱۸ ژنوتیپ از گونه *Festuca arundinacea* با استفاده از نشانگر ISSR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۱۸ اکسشن از گونه *Festuca arundinacea* تهیه شده از بانک ژن سازمان جنگل‌ها و مراتع ایران (جدول ۱) در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه ارزیابی شدند. پس از کشت بذور هر اکسشن، استخراج DNA به‌روش CTAB (۳) و برای هر اکسشن در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام شد. بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک‌مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت‌سازی به‌ترتیب 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 تحقیق از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE ۱ درصد استفاده شد. به‌منظور بارگذاری نمونه در ژل، ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNAهای تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز با ولتاژ ۱۲۰ و میزان ۲ ساعت بارگذاری شد. از محلول اتیدیوم برماید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۴۵–۳۰ دقیقه برای رنگ‌آمیزی ژل و از دستگاه Gel Document جهت مشاهده باندها استفاده شد. محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC)[1] از طریق فرمول زیر محاسبه شد (۷).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} PI^{2}$$

همچنین شاخص نشانگری (MI)[2] از رابطه MI= PIC × E بدست آمد (۱۴). در پایان نیز با استفاده از نرم‌افزارهای DARwin 6 و GenAlEx 6.2 داده‌های حاصل آنالیز و بررسی شدند.

جدول ۱– کد بانک ژن و منشأ اکسشن‌های فستوکا مورد بررسی

Table 1. Gene bank code and origin of *Festuca* accessions

کد بانک ژن	منشا	کد بانک ژن	منشا
۱	بانه	۱۰	بروجن
۲	بانک ژن	۱۱	بروجن
۳	ایرلند	۱۲	بروجن
۴	استرالیا	۱۳	کامیاران
۵	گناباد	۱۴	کامیاران
۶	اصفهان	۱۵	کامیاران
۷	اصفهان	۱۶	کامیاران
۸	سمیرم	۱۷	ایرلند
۹	بروجن	۱۸	اردبیل

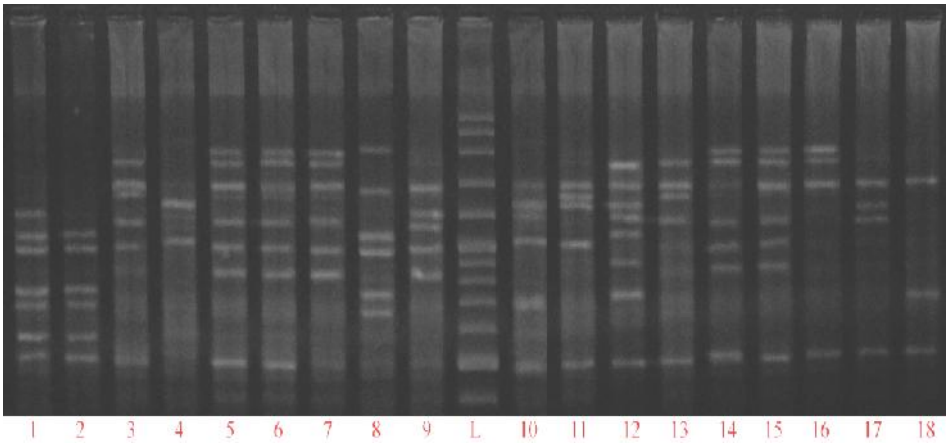
نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مطالعه شده با استفاده از ۱۵ آغازگر ISSR بررسی شد که از این تعداد، ۱۲ آغازگر دارای باندهای قابل امتیازدهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۸۷ مکان ژنی را شناسایی کنند که از این تعداد، ۱۰ باند یک‌شکل و سایر باندها چند شکل بودند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۸ اکسشن برابر ۶/۵ بود. آغازگر IS_2 بیشترین تعداد باند (تعداد ۱۳ باند) و آغازگرهای IS_{12} و IS_6 کمترین تعداد باند (تعداد ۴ باند) را نشان دادند. اکسشن ۸ (سمیرم) بیشترین باند (۴۸ باند) و اکسشن ۱۶ (کامیاران) کمترین باند (۳۲ باند) را در بین اکسشن‌های بررسی شده دارا بودند. شکل ۱ الگوی باندی اکسشن‌های بررسی شده با استفاده از آغازگر IS_2 را نشان می‌دهد. خیام نکویی و همکاران (۸) تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف فستوکای بلند را با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP[3] ارزیابی کردند و با استفاده از ۱۰ ترکیب آغازگری تعداد ۲۰۹ باند چندشکل را به دست آوردند. شریفی تهرانی و همکاران (۱۶) بر اساس مارکرهای مولکولی SSR[4] و EST-SSR ژنومی در بین جمعیت‌های فستوکای پابلند ایرانی تنوع معنی‌داری را گزارش کردند و نتیجه گرفتند که نشانگرهای استفاده شده کارایی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های بررسی شده داشته اند. در ضمن نشانگر EST-SSR بهتر توانست تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌ها را آشکار سازد.

1- Simple Sequence Repeat
2- Marker Index
3- Amplified fragment length polymorphism
4- Simple Sequence Repea

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-14]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.87]



شکل ۱- الگوی باندی ۱۸ اکسشن فستوکا با استفاده از آغازگر IS_{11}
Figure1. The band pattern for 18 *Festuca* accessions using IS_{11} primer

نتایج بدست آمده برای آغازگرهای بررسی شده در جدول ۲ ارائه شده است. میانگین درصد چند شکلی در بین اکسشن های مطالعه شده برابر ۸۹/۰۵ بود که کمترین درصد چند شکلی را آغازگر IS_5 (۵۷/۱۴٪) و بیشترین درصد چند شکلی به‌آغازگرهای IS_6، IS_9، IS_{11}، IS_{12} و IS_{16} (۱۰۰٪) اختصاص داشت. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از صفر تا نیم در نشانگرهای غالب متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چند شکلی برای آن جایگاه در اکسشن‌های بررسی شده می‌باشد. میانگین PIC در آغازگرهای بررسی شده در این تحقیق برابر ۰/۳۳ بود. بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگرهای IS_{10}، IS_3، IS_6 و IS_{16} بود که این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص PIC توانستند فاصله ژنتیکی اکسشن‌ها را مشخص کنند. آغازگر IS_1 و IS_4 با کمترین میزان PIC توانایی خوبی در جداسازی اکسشن‌ها نداشتند. میانگین شاخص نشانگر (MI) در آغازگرهای این تحقیق برابر ۲/۲ بود. بیشترین میزان MI مربوط به آغازگرهای IS_{10}، IS_2، IS_6 و IS_{12} بود. بنابراین این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرها توانستند فاصله ژنتیکی اکسشن‌ها را بر اساس شاخص MI مشخص کنند و کمترین میزان MI مربوط به آغازگرهای IS_5 و IS_{13} بود. لذا پیشنهاد می‌گردد از آغازگرهای IS_{10} و IS_6 که بر اساس هر دو شاخص PIC و MI بیشترین چندشکلی را نشان دادند، برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسم دیگر اکسشن‌های فستوکا در تحقیقات بعدی استفاده گردد. آغازگرهای IS_1، IS_4، IS_{13} و IS_5 با کمترین میزان PIC و MI توانایی خوبی در جداسازی اکسشن‌ها نداشتند. دیگر آغازگرها دارای حد متوسطی از PIC و MI نسبت به دو گروه حداقل و حداکثر بودند. مهدی‌خانی و همکاران (۱۰) در مطالعه خود روی ۱۶ توده بابونه ایرانی با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی متوسط تعداد نوار برای هر آغازگر نیمه تصادفی را ۱۳/۹۳ نوار گزارش نمودند. در پایان نتیجه گرفتند که آغازگرهای نیمه‌تصادفی کارآیی بالایی در ایجاد چندشکلی دارند و می‌توانند برای بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بابونه استفاده شوند.

جدول ۲- درصد چند شکلی، تعداد کل باند، محتوای اطلاعات چند شکلی، شاخص نشانگری در آغازگرهای مورد بررسی
Table 2. Percentage of polymorphism bands, Number of scored bands, polymorphism information content, Marker Index in primer this study

کد آغازگر	توالی آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC	MI
IS_1	5'- AC AC AC AC AC AC AC ACYA-3'	۹	۶	۶۶/۶۶	۰/۲۴۷	۱/۴۸
IS_2	5'-ACACACACACACACACC-3'	۱۰	۹	۹۰	۰/۳۶۲	۳/۲۶
IS_3	5'- GA GA GA GA GA GA GA GAYC-3'	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۸۹	۲/۳۳
IS_5	5'- AG AG AG AG AG AG AG AGC-3'	۷	۴	۵۷/۱۴	۰/۲۲۵	۰/۹۰
IS_6	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۸۸	۲/۷۲
IS_9	5'- CT CT CT CT CT CT CT CT CTG-3'	۷	۷	۱۰۰	۰/۲۶۱	۱/۸۳
IS_{10}	5'–GAGAGAGAGAGAGAGARC–3'	۱۳	۱۲	۹۲/۳	۰/۳۹۰	۴/۶۸
IS_{11}	5'-ACACACACACACACACC-3'	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۶۵	۲/۱۹
IS_{12}	5'– TGTGTGTGTGTGTGTGG–3'	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۶۷	۲/۵۷
IS_{13}	5'- AG AG AG AG AG AG AG AGYT-3'	۴	۳	۷۵	۰/۲۹۳	۰/۸۸
IS_{14}	5'- GACA GACA GACA GACA -3'	۸	۷	۸۷/۵	۰/۲۸۹	۲/۰۳
IS_{16}	5'-DBDACACACACACACACA-3'	۴	۴	۱۰۰	۰/۳۸۶	۱/۵۴
	میانگین	۷/۳۳	۶/۵	۸۹/۰۵	۰/۳۳	۲/۲۰

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-14]
[DOI: 10.29252/jcb.9.24.87]

ماتریس تشابه

تشابه ژنتیکی اکسشن‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس از ۰/۴۷ تا ۰/۸۵ متغیر بود (جدول ۳)، میانگین تشابه بین اکسشن‌ها برابر ۰/۶۳ بود که بالا بودن تشابه ژنتیکی یاد شده نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی پایین در بین اکسشن‌های فستوکا بر اساس آغازگرهای بررسی شده می‌باشد. اما با توجه به‌اینکه دامنه تشابه بالا می‌باشد می‌توان این‌گونه بیان‌کرد این نشانگرها بخوبی توانسته‌اند تنوع ژنتیکی میان اکسشن‌ها را آشکار سازند. بیشترین تشابه را اکسشن‌های ۱۶ (کامیاران) و ۱۷ (ایرلند) و کمترین تشابه را اکسشن ۱ (بانه) با اکسشن ۱۲ (بروجن) داشتند. روفوماین و همکاران (۱۴) تنوع ژنتیکی ۱۶ جمعیت فستوکا را با نشانگر AFLP بررسی کردند و با توجه به وجود تنوع ژنتیکی بالا بیان داشتند که اکسشن‌های بررسی شده منبع ژنتیکی مناسبی جهت برنامه‌های اصلاحی فستوکا می‌باشند همچنین بر اساس ماتریس تشابه جمعیت‌های مورد بررسی را ارزیابی کردند.

جدول ۳- ماتریس تشابه با استفاده ضریب تشابه دایس برای اکسشن‌های مورد بررسی فستوکا

Table 3. Similarity matrix for studying *Festuca* accessions based on Dice's coefficient

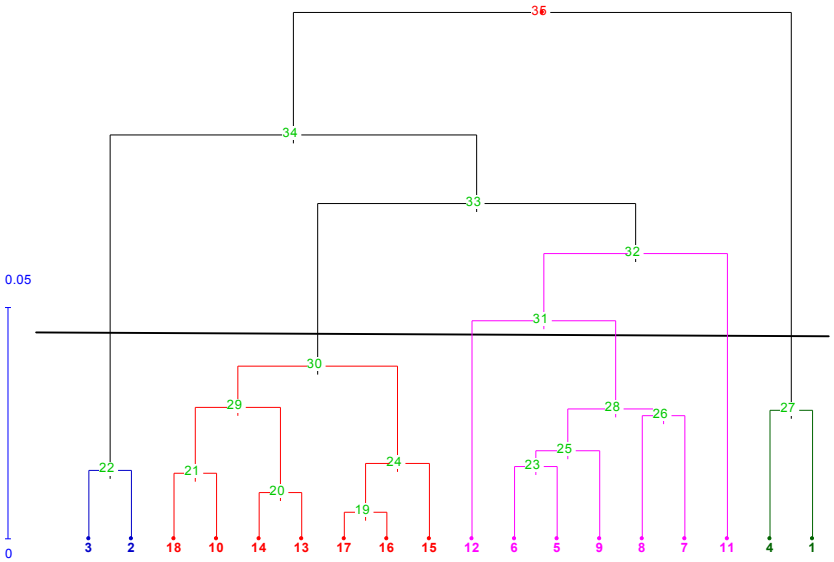
اکسشن	بانک ژن	ایرلند	استرالیا	گناباد	اصفهان	اصفهان	سمیرم	بروجن	بروجن	بروجن	بروجن	کامیاران	کامیاران	کامیاران	کامیاران	بانک ژن	اردبیل
بانک ژن	۰/۶۰																
ایرلند	۰/۵۳	۰/۷۶															
استرالیا	۰/۶۷	۰/۴۷	۰/۵۴														
گناباد	۰/۵۳	۰/۴۷	۰/۶۷	۰/۵۴													
اصفهان	۰/۵۷	۰/۶۱	۰/۷۳	۰/۵۳	۰/۷۵												
اصفهان	۰/۵۱	۰/۵۷	۰/۶۴	۰/۴۷	۰/۶۹	۰/۷۰											
سمیرم	۰/۵۹	۰/۵۴	۰/۵۷	۰/۵۶	۰/۷۰	۰/۷۱	۰/۶۷										
بروجن	۰/۵۷	۰/۵۶	۰/۶۱	۰/۵۱	۰/۷۳	۰/۷۳	۰/۶۷	۰/۶۷									
بروجن	۰/۶۰	۰/۶۰	۰/۶۳	۰/۶۲	۰/۶۰	۰/۷۰	۰/۶۹	۰/۶۸	۰/۷۰								
بروجن	۰/۴۸	۰/۴۹	۰/۵۳	۰/۴۹	۰/۴۸	۰/۶۱	۰/۶۷	۰/۶۱	۰/۴۹	۰/۵۸							
بروجن	۰/۴۷	۰/۵۴	۰/۵۵	۰/۴۷	۰/۵۸	۰/۶۳	۰/۶۰	۰/۵۷	۰/۷۲	۰/۶۲	۰/۵۵						
کامیاران	۰/۵۵	۰/۵۳	۰/۶۹	۰/۵۶	۰/۶۷	۰/۷۲	۰/۶۱	۰/۶۳	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۵۷	۰/۵۵					
کامیاران	۰/۵۷	۰/۶۲	۰/۷۰	۰/۵۳	۰/۶۰	۰/۷۳	۰/۶۲	۰/۵۹	۰/۷۳	۰/۷۰	۰/۶۲	۰/۵۷	۰/۸				
کامیاران	۰/۵۳	۰/۵۴	۰/۶۸	۰/۵۹	۰/۵۹	۰/۶۸	۰/۶۲	۰/۶۱	۰/۶۶	۰/۶۵	۰/۶۳	۰/۵۷	۰/۷۲	۰/۷۳			
کامیاران	۰/۴۸	۰/۵۸	۰/۶۴	۰/۵۱	۰/۶۴	۰/۶۵	۰/۶۸	۰/۶۳	۰/۷۰	۰/۶۹	۰/۵۸	۰/۶۳	۰/۶۶	۰/۷۳	۰/۷۵		
ایرلند	۰/۵۵	۰/۵۳	۰/۵۹	۰/۵۶	۰/۶۵	۰/۶۸	۰/۶۴	۰/۶۸	۰/۷۳	۰/۷۳	۰/۵۹	۰/۵۹	۰/۶۹	۰/۷۴	۰/۷۸	۰/۸۵	
اردبیل	۰/۵۲	۰/۵۹	۰/۶۴	۰/۵۸	۰/۶۷	۰/۷۲	۰/۶۸	۰/۶۳	۰/۷۴	۰/۷۶	۰/۵۲	۰/۶۶	۰/۷۶	۰/۷۵	۰/۶۹	۰/۷۴	۰/۷۷

تجزیه خوشه‌ای

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس در شکل ۲ ارائه شده‌است. با توجه به نتایج ضریب کوفنتیک برای ضرایب و روش‌های گروه‌بندی مختلف، ضریب دایس و روش UPGMA دارای بالاترین ضریب کوفنتیک بود و بر این اساس اکسشن‌ها گروه‌بندی شدند. محجوب و همکاران (۹) در بررسی روابط ژنتیکی بین ۳۶ ژنوتیپ از گونه‌های کلزا با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR گزراش کردند که ضریب جاکارد و روش UPGMA دارای ضریب همبستگی کوفنتیک بالاتری نسبت به سایر روش‌ها بوده و با استفاده از همین روش ژنوتیپ‌ها را گروه‌بندی کردند. خط برش دندروگرام از محل فاصله ژنتیکی ۰/۵۰ اکسشن‌ها را به ۴ گروه تقسیم کرد که این خط بر اساس نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه واریانس مولکولی گروه‌بندی را تایید نمود. بر اساس خط برش، گروه اول شامل اکسشن‌های ۱ (بانه) و ۴ (استرالیا) می‌باشد در گروه دوم اکسشن‌های ۵ (گناباد)، ۶ (اصفهان)، ۷ (اصفهان)، ۸ (سمیرم)، ۹ (بروجن)، ۱۱ (بروجن) و۱۲ (بروجن) قرار گرفتند. میانگین تشابه این گروه ۰/۶۴ بدست آمد. در این گروه اکسشن‌های ۵ (گناباد) و ۱۱ (بروجن) کمترین تشابه و اکسشن‌های ۶ (اصفهان) و ۵ (گناباد) بیشترین تشابه را با یکدیگر داشتند. گروه سوم شامل اکسشن‌های ۱۰ (بروجن)، ۱۴ (کامیاران)، ۱۳ (کامیاران)، ۱۵ (کامیاران)، ۱۶ (کامیاران)، ۱۷ (ایرلند) و ۱۸ (اردبیل) می‌باشد. میانگین تشابه در این گروه ۰/۷۳ بود که در بین اکسشن‌های این گروه اکسشن‌های ۱۴ (کامیاران) و ۱۳ (کامیاران) دارای بیشترین تشابه و اکسشن‌های ۱۵ (کامیاران) و ۱۰ (بروجن) دارای کمترین تشابه می‌باشند. گروه چهار نیز شامل اکسشن‌های ۲ (بانک ژن) و ۳ (ایرلند) بود، میانگین تشابه در این گروه برابر ۰/۷۶ محاسبه شد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-14]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.87]



شکل ۲- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر ISSR برای اکسشن‌های فستوکا مورد مطالعه با استفاده از روش UPGMA

Figure 2. Dendrogram of cluster analysis for *Festuca* accessions using ISSR marker based jaccard coefficient by UPGMA

ماتریس تشابه برای گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای (جدول ۴) نشان داد که بیشترین تشابه در بین اکسشن‌های گروه ۳ و ۴ و کمترین تشابه در بین اکسشن‌های گروه ۳ و ۱ وجود دارد. با توجه به نتایج فوق در صورتی‌که هدف از برنامه‌های اصلاحی استفاده از اکسش‌هایی با حداکثر فاصله ژنتیکی برای تلاقی باشد می‌توان از اکسش‌های گروه ۱ و ۳ استفاده کرد.

جدول ۴- تشابه گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای

Table 4. Similar groups from the cluster analysis

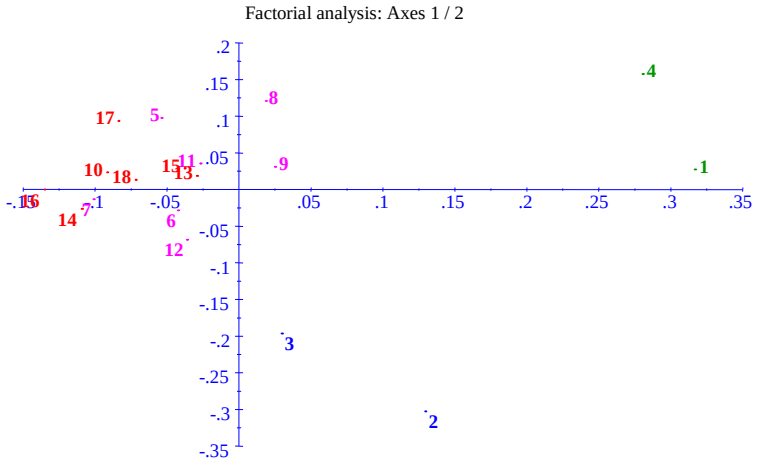
گروه	C1	C 2	C 3	C 4
C 1	۱			
C 2	۰/۸۲۷	۱		
C 3	۰/۸۰۶	۰/۸۴۲	۱	
C 4	۰/۸۰۴	۰/۸۴۹	۰/۹۳۴	۱

تجزیه به مختصات

از تجزیه به مختصات اصلی به‌عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی می‌شود. بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای بررسی شده تجزیه به مختصات اصلی برای اکسشن‌ها انجام شد. نتایج نشان داد محور مختصات اول و دوم به ترتیب ۲۶/۶۹ و ۱۷/۷۹ درصد از واریانس موجود را تبیین می‌کنند و در مجموع مؤلفه اول و دوم ۴۴/۴۸ درصد از واریانس موجود را توجیه کردند. در ضمن دیاگرام پراکنش اکسشن‌ها بر اساس مختصات اول و دوم رسم شد (شکل ۳). این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای تا حدودی مطابقت داشت و اکسشن‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-14]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.87]



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

Figure 3. Scatter plot for accessions for ISSR primer based on two first axes from principal coordinate analysis.

تجزیه واریانس مولکولی

از کاربردهای تجزیه واریانس مولکولی می‌توان در تعیین تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها و تعیین حد مطلوب خوشه در تجزیه خوشه‌ای اشاره کرد، به‌این صورت که در هر گروه نقطه برش دندروگرام به‌عنوان یک جمعیت و ژنوتیپ‌های درون آن به‌عنوان افراد جمعیت در نظر گرفته می‌شود و برای هر نقطه برش یک تجزیه واریانس صورت می‌گیرد. نقطه‌ای که در آن بیشترین تمایز بین گروه‌ها به‌وجود آید، به‌عنوان نقطه مناسب برش دندروگرام انتخاب خواهد شد. در این تحقیق تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای انجام شد (جداول ۵) و ژنوتیپ‌ها به ۴ گروه تقسیم شدند و بر اساس آماره P میان جمعیت‌ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری وجود داشت یعنی گروه‌بندی به‌صورت صحیح انجام گرفته است. نتایج بدست آمده نشان داد که در میان کلاسترها تنوع بیشتر از بین گروه‌ها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون کلاسترها برابر ۷۹٪ و در بین کلاسترها تنوع برابر ۲۱٪ مشاهده گردید. پیتراشمید و همکاران (۱۲) تنوع ژنتیکی دو گونه *Festuca pratensis* و *Lolium multiflorum* را به ترتیب با استفاده از ۲۴ و۲۲ نشانگر SSR بررسی کردند و نتیجه تجزیه واریانس مولکولی بیان‌گر عدم وجود تنوع معنی‌دار در بین تیپ‌های مرتعی هر دو گونه بود. آنها همچنین گزارش کردند که تنوع ژنتیکی گونه *F. pratensis* با هتروژنتیکی مورد انتظار همبستگی منفی دارد اما این مسئله برای *L. multiflorum* گزارش نگردید.

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی اکسشن‌ها با استفاده از نشانگر ISSR

Table 5. Molecular variance analysis based on cluster using ISSR marker

منابع تغییرات	Df	SS	MS	Var.Est	%Var	STAT	P
بین گروه	۳	۸۰/۷۴۶	۲۶/۹۱۵	۳/۴۸۹	٪۲۱	PhiPT	۰/۰۱۰*
درون گروه	۱۴	۱۷۹/۶۴۳	۱۲/۸۳۲	۱۲/۸۳۲	٪۷۹		
کل	۱۷	۲۶۰/۳۸۹		۱۶/۳۲۰	٪۱۰۰		

Est/ Var واریانس محاسبه شده برای داخل و بین اکسشن‌ها %Var درصد واریانس هر منبع تغییر به واریانس کل

با استفاده از آغازگرهای ISSR همان‌طور که مشاهده گردید تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین اکسشن‌های فستوکا وجود داشت و چند شکلی مطلوبی بر اساس نشانگر ISSR در بین اکسشن‌ها مشاهده شد. در حالت‌کلی و بر اساس شاخص‌های محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی‌های گونه فستوکا، آغازگرهای IS_{10} و IS_6 تعیین شد و پیشنهاد می‌گردد برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسم دیگر اکسشن‌های فستوکا در تحقیقات بعدی استفاده گردند. میانگین تشابه بین اکسشن‌ها برابر ۰/۶۳ بود که پایین بودن تشابه ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع‌ژنتیکی بالا در بین اکسشن‌های فستوکا بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. که پیشنهاد می‌گردد از این اکسشن‌ها که حداکثر فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مورد استفاده را داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. بر اساس تجزیه خوشه‌ای اکسشن‌ها در چهار گروه قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای با دیاگرام حاصل از پراکنش اکسشن‌ها بر اساس مقدار مختصات اول و دوم حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مطابقت نشان داد. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای مشاهده شد که واریانس بین گروه‌ها در سطح پنج درصد معنی‌دار بود، اما بر اساس واریانس برآورد شده سهم واریانس بین گروه‌ها تنها ۲۹ درصد از تنوع کل بود.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-14]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.87]

منابع

1. Brantestam, A.K., R.V. Bothmer, C. Dayteg I. Rashal, S. Tuvesson and J. Weibull. 2004. Inter-simple sequence repeats analysis of genetic diversity and relationship in cultivated barleyof Nordic and Baltic origin. Heredity, 141: 186-192.
2. Briggs, D.S. and M. Walters. 1997. Plant variation and evolution. Cambridge University Press, UK, 512 p.
3. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull*, 19: 11-15.
4. Fasih, Z., M. Farshadfar and H. Safari. 2013. Genetic diversity evaluation of within and between populations for Festuca arundinacea by ISSR markers. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 5: 135-139.
5. Fortune, J.A. 1989. Forage Plant Breeding. Analysis variation in sainfoin (*Onobrychis*. *Viciofolia*). School of Agriculture Science Group, 305-306.
6. Henrry, R.I. 1997. Practical applications of plant molecular biology. Chapman and Hall, London. 258p.
7. Hou, Y., Z. Yan and Y. Wei. 2005. Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis Barely. Genetics Newsletter, 35: 9-22.
8. Khayam Nekoie, M., R. Jahantighi, M. Soloki, R. Muhamadi and A.B. Iman Jome. 2010. Study of genetic variation in different Festuca arundinacea Schreb Using molecular marker AFLP. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 1: 351-361.
9. Mahjoob, B., H. Najafi-Zarini and S.HR. Hashemi. 2014. Assessment of Genetic Relationships among 36 Brassica Genotypes using ISSR Molecular Markers. Journal of Crop Breeding, 6: 96-106.
10. Mehdikhani, H., S. Mahmood and H. Zeinali. 2013. Study of Genetic Diversity in Chamomile Landraces (*Matricaria aurea* (Loefl.) Sch. Bip.) Using Random and Semi-Random Primers. Journal of Crop Breeding, 5: 69-82.
11. Michaud. R., G. Tremblay, F. Belanger and G. Michaud. 1990. J. Agriculture and Agri-Food Canada, Soils and Crops Research and Development Center, 2560 Hochelaga blvd, Sainte-Foy, Quebec, Canada, 213 pp.
12. Peter-schmid, M., R. Kolliker and B. Boller. 2010. Genetic Diversity of *Festuca* Pratensis Huds and *Lolium Multiflorum* Lam Ecotype Populations in Relation to Species Diversity and Grassland Type. In: Runas, J. and Dahlgren, Grassland Biodiversity-Habitat Types, Ecological.Nova Science Publishers, Portland, USA, pp: 333-345.
13. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
14. Rouf Mian, M.A., A.A. Hopkins and J.C. Zwonitzer. 2002. Determination of Genetic Diversity in Tall Fescue with AFLP Markers. Crop Science, 42: 944-950.
15. Saedi, H., M. Shama and K. Nikpour Tehrani. 2001. Tehran University, 337 pp.
16. Sharifi-Tehrani, M., M. Mardi, J. Sahebi, P. Catalán and A. Díaz-Pérez. 2009. Genetic diversity and structure among Iranian tall fescue populations based on genomic-SSR and EST-SSR marker analysis. Plant Systematics and Evolution, 282: 57-70.
17. Souframanien, J. and T. Gopalkrishna. 2004. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics, 109: 87-93.
18. Surve-Iyer, R.S., G.C. Adams, A.F. Lezzon and A.L. Jones. 1995. Isozyme detection and variation in Ieucostoma species from prunus and malus. *Mycologia*, 87: 471- 482.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-14]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.87]

Study of Genetic Diversity of *Festuca Arundinacea* Based on ISSR Molecular Markers

Hoshang Rahmati[1], Mohsen Farshadfar[2] and Hooman Shirvani[3]

1- Educator, Department of Agriculture Payame Noor University,
(Corresponding Author: Hoshang.rahmati@yahoo.com)
2 and 3- Associate Professor and Teacher, Department of Agriculture, Payame Noor University
Received: June 18, 2016 Accepted: February 19, 2017

Abstract

Fescue is an important forage species growing in wide climates. Genetic variation was estimated for 18 accessions of *Festuca arundinacea* using 12 ISSR primers in payame Noor university of Kermanshah. In total 87 bands (loci) were obtained.77 bands out of 87 were polymorph in accessions. The mean polymorphism percentage was 89.05 among Fescue accessions.The greatest polymorphism percentage were belonged to IS6, IS9, IS11, IS12 and IS16. Polymorphic information content (PIC) average and Marker index (MI) mean were 0.33 and 2.2 respectively. The highest MI belonged to IS10, IS2, IS6 and IS12. The IS10 and IS6 had the most polymorphism. The greatest similarity belonged to accession 16 (kamiaran)-17 (Irland) and the least similarity belonged to accession1 (Bane)-12(Brojen). Cluster analysis and principal coordinate analysis classified these genotyped to four groups; the accessions of the first group had the highest genetic distance with the accessions of the group 3, based on ISSR markers. These results confirmed by molecular variance analysis as well.

Keywords: Cluster analysis, Festuca arundinacea, ISSR, Genetic variation

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-14]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.87]