

کارایی نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تمایز دو گونه *Lolium multiflorum* و *Lolium perenne*

محسن فرشادفر^{۱*}، هومن شیروانی^۲، مصطفی امجدیان^۳ و آنتیتا یاقوتی پور^۴

۱- مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، پست الکترونیکی: farshadfarmohsen@yahoo.com

۲- مدرس گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور

۳- مربی، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور

۴- دکترای اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۹

چکیده

چشم یکی از گیاهان مهم علوفه‌ای در مناطق سردسیری جهان می‌باشد و در شرایط مختلف آب و هوایی رشد می‌کند. تنوع ژنتیکی دو گونه بین نه ژنوتیپ از *Lolium perenne* و نه ژنوتیپ از *Lolium multiflorum* با استفاده از ۱۵ نشانگر مولکولی SCoT بررسی شد. آغازگرهای ScoT در مجموع ۸۶ باند تولید کردند که از این تعداد ۱۲ باند یک‌شکل مشاهده شد و سایر باندها چندشکل بودند. آغازگرهای SC35، SC36 و SC26 به ترتیب با ۹ و ۸ باند بیشترین تعداد باند و آغازگرهای SC10 و SC44 با ۲ و ۳ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند. بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای SC5، SC40، SC35، SC63، SC13، SC44، SC26، SC21 و SC10 بود. به طوری که بیشترین میزان شاخص قدرت تفکیک (RP)، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) را آغازگرهای SC35 و SC26 داشتند. تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از ۰/۳۵ تا ۰/۹۱ متغیر بود و میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/۶۴ بود. بر اساس تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در ۲ گروه قرار گرفتند، به طوری که گونه‌ها به صورت صد در صد از یکدیگر تفکیک شدند. این نتایج با نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) تأیید شد. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس گونه‌های یکساله و چند ساله نشان داد که تنوع در درون گونه‌ها برابر ۵۱٪ و در بین گونه‌ها برابر ۴۹٪ بود. بر اساس شاخص‌های هتروژنتیکی مورد انتظار (He) و شاخص شانون (I) بیشترین تنوع درون گونه‌ای و تنوع ژنی مربوط به گونه *L. Multiflorum* بود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، چشم، نشانگر مولکولی

مقدمه

گراس‌ها از مهمترین گیاهان مرتعی هستند که به لحاظ تولید علوفه، احداث چراگاه‌ها، حفاظت و جلوگیری از فرسایش خاک اهمیت زیادی دارند (Moradi & Jafari, 2006). جنس *Lolium* با نام فارسی چشم و نام انگلیسی

Ryegrass یکی از مهمترین گراس‌های مناطق معتدل است که از نواحی مدیترانه‌ای منشأ گرفته و به طور گسترده‌ای در اروپا، آسیای جنوب غربی، آسیای میانه و شمال آفریقا گسترش یافته است (Tsvelev, 1989). از لحاظ تقسیم بندی گیاه‌شناسی جنس لولیوم هشت گونه دارد که در

مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده است (Williams et al., 1990; Sicard et al., 2005). روش‌های مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به دلیل سهولت، هزینه پایین، سرعت و عدم نیاز به کاوشگرهای رادیواکتیو امروزه به‌طور گسترده‌ای در بررسی تنوع و فاصله ژنتیکی در بین ارقام مختلف گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. باید توجه داشت که نشانگر-های DNA می‌توانند تشابهات ژنتیکی را در سطح قسمت‌های ژنومی بدون رمز (هتروکروماتینی) نیز نشان دهند. بنابراین، ممکن است جمعیت‌های دو گونه از لحاظ خصوصیات ظاهری متفاوت باشند ولی از لحاظ کل ژنوم با هم شباهت زیادی داشته باشند (Buckler & Thornsberry, 2002).

نشانگر مولکولی SCoT بر اساس توالی‌های آغاز (ATG) پرایمرها طراحی می‌شوند و نواحی بین کدون‌های آغاز طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر و تفاوت‌ها آشکار می‌شود (Kalendar, 2007). سیستم این نشانگر غالب بودن است. دو پرایمر تک رشته‌ای در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به رشته‌های مخالف DNA الگو، در جهت عکس هم متصل می‌شوند و فاصله بین آنها توسط آنزیم پلیمرز به صورت نمایی در واکنش PCR تکثیر می‌شود. اگر جهش‌های حذف یا اضافه در محل اتصال پرایمر رخ دهد شاهد عدم اتصال پرایمر و عدم سنتز قطعه DNA خواهیم بود (Davis et al., 1995). نشانگرهای SCoT به‌طور کلی در مقایسه با ISSR و RAPD از تکرارپذیری بیشتری برخوردارند و عقیده بر این است که طول و دمای اتصال آغازگرها تنها عواملی نیستند که در تکرارپذیری الگوی نواربندی آنها نقش دارند (Collard & Mackill, 2009). از مزایای این نشانگر می‌توان به آسان بودن و کم‌هزینه بودن به‌کارگیری آن، چندشکلی بالا، آشکارسازی اطلاعات ژنتیکی وسیع و فراگیر بودن آغازگرهای آن در ژنوم گیاهان اشاره کرد.

میان آنها چچم دائمی (*Lolium perenne*) و چچم ایتالیایی (Ryegrass) یا یکساله (*Lolium multiflorum*) از جنبه تولید علوفه در شرایط محیط‌های معتدله در سراسر جهان ارزش اقتصادی دارند (Heydari Sharif & Dari, 2003). در ایران، این گونه به‌عنوان یک علوفه مرتعی خوشخوراک با رغبت مورد چرای دام قرار می‌گیرد. مهمترین اهداف اصلاحی گراس‌های یکساله و چند ساله، علاوه بر افزایش عملکرد علوفه، صفات دیگری از قبیل سرعت رشد در اوایل بهار و پاییز، دیرزیستی (طول دوره زنده‌مانی)، توسعه فصل چرا، بهبود کیفیت علوفه و مقاومت به چرای دام می‌باشد. موفقیت در اصلاح و گزینش ارقام جدید بستگی به تنوع یا ایجاد نوترکیبی ژنتیکی و هتروزیس دارد (Humphreys, Peters & Martinelli, 1989, 1991). یکی از روش‌های اصلاح گیاهان علوفه‌ای، گزینش همراه با آزمایش نسل است. موفقیت در گزینش، بستگی به تنوع با ایجاد نوترکیبی ژنتیکی و هتروزیس دارد. گزارش‌های متعددی وجود دارد که با افزایش فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گونه‌های گراس‌ها، احتمال هتروزیس در برنامه‌های تلاقی افزایش می‌یابد (Humphreys, Peters & Martinelli, 1989, 1991). آگاهی دقیق از تنوع ژنتیکی موجود در ژرم پلاسما گیاهی ضمن حفظ ذخائر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آنها را در برنامه‌های اصلاحی تعیین می‌کند. همچنین کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی نسبی بین افراد و جمعیت‌ها و روابط خویشاوندی بین آنها، امکان سازماندهی ژرم پلاسما و تهیه جمعیت‌های مناسب را برای ترسیم نقشه ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها فراهم می‌سازد (Williams et al., 1990). ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر توارثی، حیاتی بوده و اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی در گونه گیاهی برای انتخاب والدین برای رسیدن به هیبرید مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است (Singh, 2003). در سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR به‌عنوان ابزاری قدرتمند برای شناسایی چندشکلی،

والدین اهمیت زیادی دارد، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی براساس خصوصیات مولکولی ۹ ژنوتیپ از گونه *Lolium perenne* و ۹ ژنوتیپ از گونه *Lolium multiflorum* از تیره گرامینه با توجه به بذره‌های موجود در بانک ژن منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد. مشخصات مواد ژنتیکی مورد مطالعه، با ذکر اسم، کد بانک ژن، منشأ و کد ژنوتیپ در جدول ۱ نشان داده شده است.

افزون بر این، در طراحی آغازگرهای این نشانگر به اطلاع از توالی نوکلئوتیدی ژنوم نیاز نیست (Collard & Mackill, 2009). در بررسی Polok و همکاران (۲۰۰۶) شباهت ژنتیکی بین گونه‌های جنس *Lolium* با استفاده از نشانگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت و بیان کردند که دو گونه *L. perenne* و *L. multiflorum* شباهت ژنتیکی بسیار بالایی با هم داشتند. هدف از این تحقیق ارزیابی کارایی نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی دو گونه از جنس *Lolium* و بررسی میزان فاصله ژنوتیپ‌های مورد مطالعه برای برنامه‌های اصلاحی با توجه به اینکه این اطلاعات در انتخاب تلاقی‌های بین

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های مورد استفاده در تحقیق

گونه	ژنوتیپ	منشأ	کد بانک ژن	گونه	ژنوتیپ	منشأ	کد بانک ژن
<i>Lolium perenne</i>	G1	هلند	۱۳۰۹	<i>Lolium multiflorum</i>	G10	ایتالیا	۳۷۴
	G2	ایرلند جنوبی	۱۳۰۷		G11	هلند	۱۷۶۶
	G3	ایرلند جنوبی	۱۳۰۸		G12	روسیه	vi
	G4	هلند	۱۳۰۵		G13	هلند	۱۶۲۴
	G5	ایرلند	۱۳۱۳		G14	هلند	۱۷۵۵
	G6	ایرلند شمالی	۱۳۰۱		G15	ایتالیا	۳۹۳
	G7	هلند	۱۳۰۹		G16	روسیه	۱۵۵۱
	G8	ایرلند جنوبی	۱۳۰۷		G17	فرانسه	۱۲۶۸
	G9	دانمارک	۱۳۱۱		G18	آمریکا	USA

آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر انجام شد.

استخراج DNA ژنومی

این تحقیقات در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام شد. استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته تشریح شده توسط Doyle و Doyle (۱۹۸۷) برای هر ژنوتیپ انجام گردید. بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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 ۱x) انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد 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 سانتی-گراد، 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 سانتی-گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد استفاده شد. به منظور تزیق نمونه در ژل، ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه گذاری به DNA های تکثیر شده اضافه و بعد میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک های ایجاد شده در ژل آگارز بارگذاری و با ولتاژ ۱۰۰ و مدت ۲/۵ ساعت حرکت انجام شد و بعد ژل را برای رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم برمایید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه قرار داده و از Gel Document برای نمایان شدن نوارها استفاده شد.

نتایج

بررسی چندشکلی نشانگر SCoT

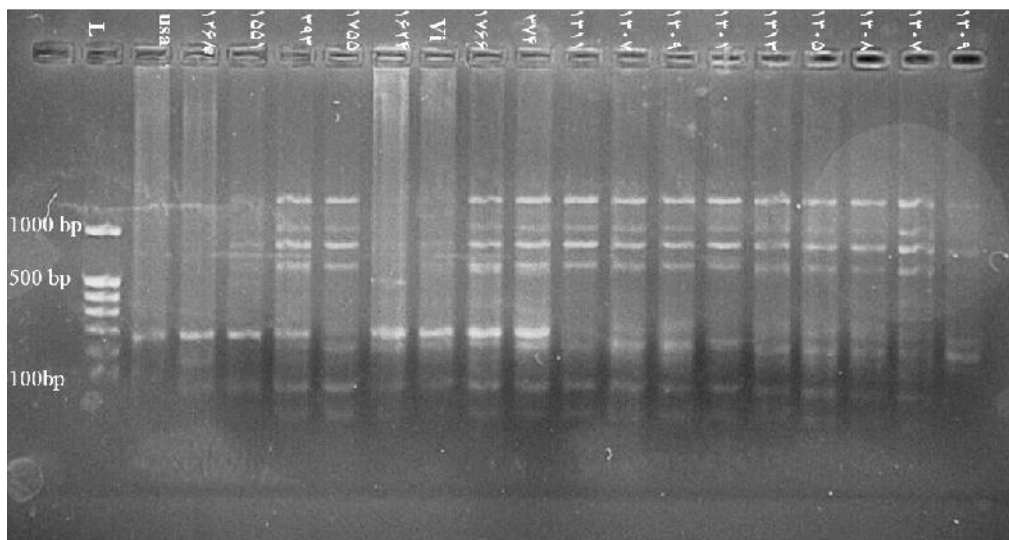
تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های مورد مطالعه با استفاده از ۱۵ آغازگر SCoT مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرهای SCoT در مجموع ۸۶ باند تولید کردند که از این تعداد، ۱۲ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چندشکل بودند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۸ ژنوتیپ برابر ۴/۷۷ بود. همچنین آغازگرهای SCoT در مجموع تعداد ۸۲۱ مکان را تکثیر کردند که میانگین تعداد مکان تکثیر شده برای ۱۵ آغازگر برابر ۵۴/۷۳ بود. آغازگرهای SC35، SC36 و SC26 به ترتیب با ۹ و ۸ باند بیشترین تعداد باند و آغازگرهای SC10 و SC44 با ۲ و ۳ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند. ژنوتیپ ۱۱ بیشترین باند (۵۸ باند) و ژنوتیپ ۱۸ کمترین باند (۳۶ باند) را در بین ژنوتیپ های مورد بررسی داشتند. شکل ۱ الگوی باندی ۱۸ ژنوتیپ مورد بررسی را با استفاده از آغازگر SC26 نشان می دهد.

تجزیه و تحلیل داده ها

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC^1) از طریق فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ محاسبه شد. در این رابطه p برابر با مجموع نوارهای هر مقر ژنی برای کلیه ژنوتیپ هاست (Hou et al., 2005). همچنین شاخص نشانگری (MI^2) از رابطه $MI = PIC \times N \times B$ به دست آمد که N تعداد کل باندها و نسبت چندشکلی برای هر آغازگر بود (Powell et al., 1996). شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR^3) از رابطه $EMR = NPB \times$ که از درصد چندشکلی () ضرب در تعداد نوارهای چندشکل

4- Number of polymorphic bands
5- Resolving power

1- Polymorphic information content
2- Marker Index
3- Effective multiplex ratio



شکل ۱- الگوی باندهای ۱۸ ژنوتیپ با استفاده از آغازگر SC26

میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) توانایی خوبی در جداسازی ژنوتیپ‌ها نداشت. میانگین شاخص قدرت تفکیک (RP) برابر ۴/۶۸ بود که آغازگرهای SC35 و SC26 بیشترین میزان و آغازگر SC44، SC10، SC59، SC5 و کمترین میزان این شاخص را داشتند. همچنین میانگین شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) به ترتیب برابر ۱/۷۵ و ۴/۳۹ بود. به طوری که بیشترین میزان شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) را آغازگرهای SC35 و SC26 و کمترین میزان را آغازگرهای SC44، SC10 و SC59 داشتند.

نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ ارائه شده است. میانگین درصد چندشکل در بین آغازگرهای مورد بررسی برابر ۸۸/۱۷ درصد بود که کمترین درصد چندشکلی را آغازگرهای SC36 (۵۰٪)، SC20 (۷۱/۴۳٪)، SC21 (۷۱/۴۳٪) و SC59 (۷۵٪) داشتند. بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای SC5، SC40، SC35، SC63، SC13، SC26، SC44، SC21 و SC10 بود که بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) توانستند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص کنند. آغازگر SC36 با کمترین

جدول ۲- درصد چندشکلی، تعداد کل باند، محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص نشانگری، نسبت چندگانه مؤثر و شاخص قدرت تفکیک در آغازگرهای مورد بررسی

کد آغازگر	توالی آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چندشکل	درصد چندشکلی	PIC	MI	EMR	RP
SC36	5'-GCAACAATGGCTACCAC-3'	۸	۴	%۵۰	۰/۲۳	۰/۴۷	۲	۳/۲۲
SC35	5'-CATGGCTACCACCGGCC-3'	۹	۹	%۱۰۰	۰/۴۴	۳/۹۹	۹	۸/۴۴
SC40	5'-CAATGGCTACCACTACAG-3'	۵	۵	%۱۰۰	۰/۴۵	۲/۲۳	۵	۳/۷۸
SC59	5'-ACAATGGCTACCACCATC-3'	۴	۳	%۷۵	۰/۳۵	۰/۷۸	۲/۲۵	۲/۴۴
SC44	5'-CAATGGCTACCATTAGCC-3'	۳	۳	%۱۰۰	۰/۴۲	۰/۸۵	۳	۲/۷۵
SC63	5'-ACCATGGCTACCACGGG-3'	۵	۵	%۱۰۰	۰/۴۴	۲/۲۲	۵	۴/۷۰
SC28	5'-CCATGGCTACCACCGCC-3'	۶	۵	%۸۳/۳۳	۰/۴۰	۱/۶۵	۴/۱۷	۵/۵۶
SC26	5'-CACCATGGCTACCACCAT-3'	۸	۸	%۱۰۰	۰/۴۱	۳/۲۵	۸	۹/۸۹
SC20	5'-ACCATGGCTACCACCGC-3'	۷	۵	%۷۱/۴۳	۰/۳۲	۱/۱۶	۳/۵۷	۴/۳۳
SC15	5'-CCATGGCTACCACCGGC-3'	۷	۶	%۸۵/۷۱	۰/۳۹	۲/۰۳	۵/۱۴	۵/۲۲
SC11	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	۷	۶	%۸۵/۷۱	۰/۳۹	۲/۰۱	۵/۱۴	۵/۸۷
SC5	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	۳	۳	%۱۰۰	۰/۴۵	۱/۳۶	۳	۲/۱۱
SC13	5'-ACGACATGGCGACCATC-3'	۵	۵	%۱۰۰	۰/۴۳	۲/۱۷	۵	۴/۳۳
SC21	5'-AACCATGGCTACCACCG-3'	۷	۵	%۷۱/۴۳	۰/۳۴	۱/۲۱	۳/۵۷	۵/۸۹
SC10	5'-CAACAATGGCTACCAGC-3'	۲	۲	%۱۰۰	۰/۴۱	۰/۸۲	۲	۱/۶۷
میانگین		۵/۷۳	۴/۹۳	%۸۸/۱۷	۰/۳۹	۱/۷۵	۴/۳۹	۴/۶۸

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR) و شاخص قدرت تفکیک (RP)

جدول ۳- ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های گونه‌های *L. multiflorum* و *L. perenne*

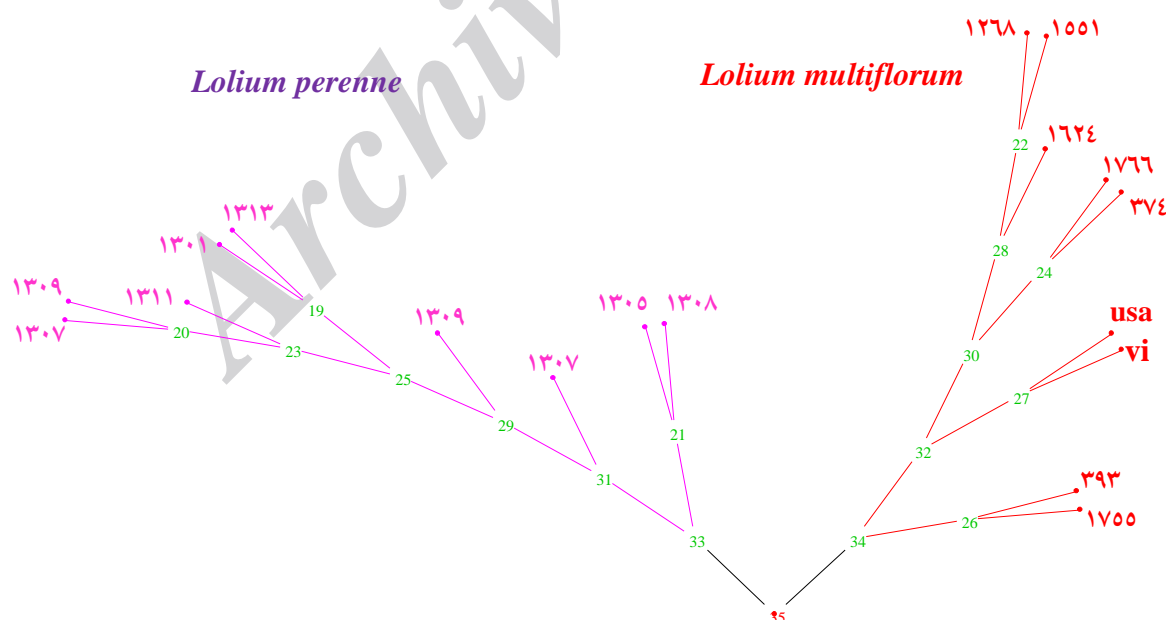
	<i>Lolium perenne</i>							<i>Lolium multiflorum</i>										
	۱۳۰۹	۱۳۰۷	۱۳۰۸	۱۳۰۵	۱۳۱۳	۱۳۰۱	۱۳۰۹	۱۳۰۷	۱۳۱۱	۳۷۴	۱۷۶۶	vi	۱۶۲۴	۱۷۵۵	۳۹۳	۱۵۵۱	۱۲۶۸	USA
۱۳۰۹	۱																	
۱۳۰۷	۰/۷۰	۱																
۱۳۰۸	۰/۶۹	۰/۶۳	۱															
۱۳۰۵	۰/۷۸	۰/۶۸	۰/۸۷	۱														
۱۳۱۳	۰/۷۳	۰/۷۵	۰/۷۹	۰/۸۴	۱													
۱۳۰۱	۰/۷۳	۰/۷۴	۰/۷۸	۰/۸۴	۰/۹۱	۱												
۱۳۰۹	۰/۷۸	۰/۷۲	۰/۷۱	۰/۷۶	۰/۸۶	۰/۸۵	۱											
۱۳۰۷	۰/۸۴	۰/۷۸	۰/۷۶	۰/۸۴	۰/۸۶	۰/۸۸	۰/۹۰	۱										
۱۳۱۱	۰/۷۲	۰/۷۶	۰/۷۲	۰/۷۳	۰/۷۶	۰/۸۰	۰/۸۷	۰/۸۳	۱									
۳۷۴	۰/۴۷	۰/۴۹	۰/۵۹	۰/۵۸	۰/۶۰	۰/۶۴	۰/۵۸	۰/۵۸	۰/۵۸	۱								
۱۷۶۶	۰/۵۳	۰/۵۵	۰/۵۰	۰/۵۴	۰/۶۱	۰/۵۶	۰/۵۹	۰/۵۷	۰/۵۹	۰/۸۱	۱							
vi	۰/۴۵	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۷	۰/۴۵	۰/۴۹	۰/۴۱	۰/۴۳	۰/۴۲	۰/۷۵	۰/۷۶	۱						
۱۶۲۴	۰/۴۶	۰/۵۱	۰/۵۱	۰/۵۳	۰/۵۱	۰/۴۹	۰/۵۳	۰/۵۱	۰/۵۳	۰/۷۵	۰/۷۸	۰/۷۱	۱					
۱۷۵۵	۰/۶۲	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۶۰	۰/۶۷	۰/۶۴	۰/۶۹	۰/۶۴	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۷۹	۰/۵۹	۰/۷۱	۱				
۳۹۳	۰/۵۴	۰/۶۱	۰/۵۳	۰/۵۲	۰/۶۲	۰/۵۴	۰/۶۴	۰/۶۲	۰/۶۷	۰/۷۱	۰/۸۰	۰/۶۲	۰/۶۷	۰/۷۸	۱			
۱۵۵۱	۰/۴۸	۰/۵۳	۰/۵۳	۰/۵۴	۰/۵۷	۰/۵۱	۰/۵۱	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۷۵	۰/۷۷	۰/۶۴	۰/۷۹	۱		
۱۲۶۸	۰/۵۰	۰/۵۲	۰/۴۹	۰/۵۱	۰/۴۷	۰/۴۸	۰/۴۸	۰/۵۴	۰/۵۵	۰/۷۲	۰/۷۳	۰/۷۶	۰/۷۹	۰/۶۵	۰/۷۴	۰/۸۶	۱	
USA	۰/۴۶	۰/۵۲	۰/۴۱	۰/۴۱	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۳۶	۰/۴۰	۰/۴۲	۰/۶۱	۰/۶۸	۰/۷۷	۰/۷۴	۰/۶۷	۰/۶۶	۰/۷۱	۰/۷۹	۱

ماتریس تشابه

تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از ۰/۳۵ تا ۰/۹۱ متغیر بود، میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/۶۴ بود که نشان‌دهنده وجود تنوع قابل قبول در بین ژنوتیپ‌های لولیوم بر اساس آغازگر-های مورد بررسی بود (جدول ۳). بیشترین تشابه را در گونه *L. perenne* ژنوتیپ ۷ با ۸ و کمترین تشابه را ژنوتیپ ۲ با ۳ داشت. بیشترین تشابه را در گونه *L. multiflorum* ژنوتیپ ۱۶ با ۱۷ و کمترین تشابه را ژنوتیپ‌های ۱۸ با ۱۰ داشت. همچنین در بین گونه‌ها نیز بیشترین تشابه را ژنوتیپ ۷ از گونه *L. perenne* با ژنوتیپ ۱۴ از گونه *L. multiflorum* و کمترین تشابه را ژنوتیپ ۷ از گونه *L. perenne* با ژنوتیپ ۱۸ از گونه *L. multiflorum* داشت که می‌توان از ژنوتیپ‌هایی که در بین گونه‌ها بیشترین تشابه را داشتند برای تلاقی و جریان ژنی استفاده کرد.

تجزیه خوشه‌ای

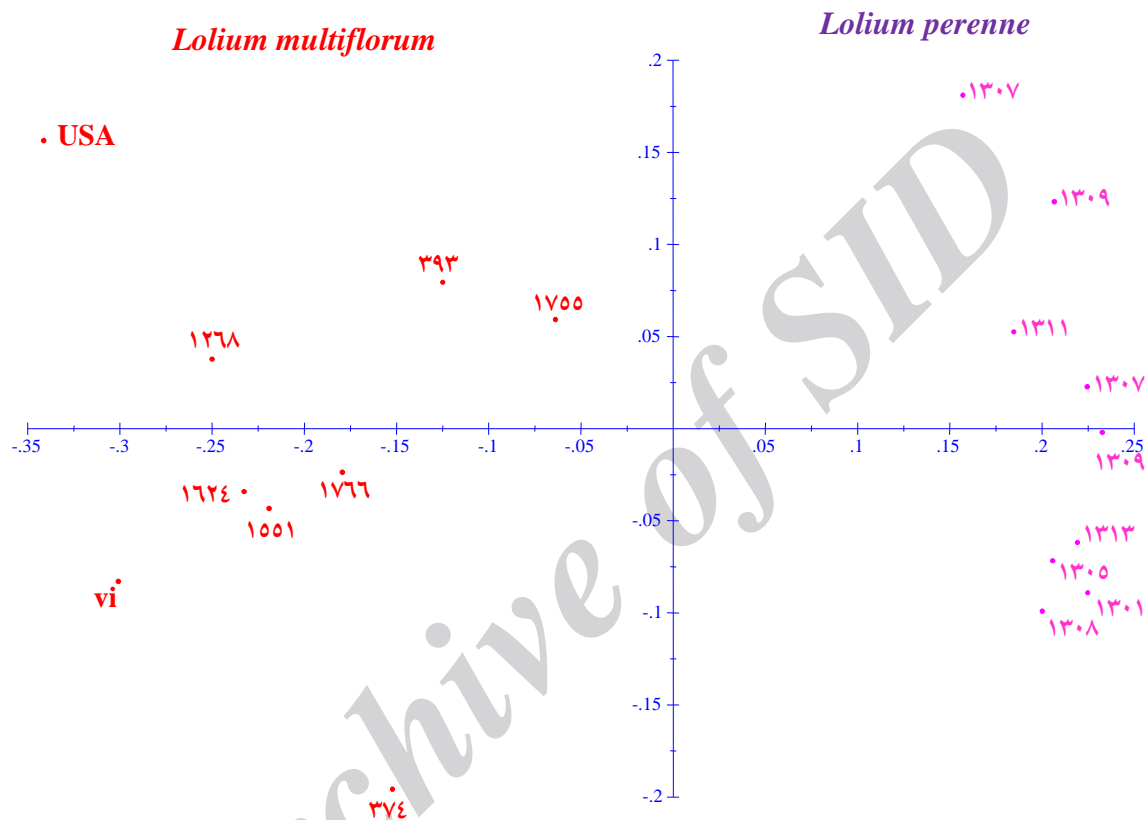
نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار DARwin 6 برای ژنوتیپ‌ها در شکل ۲ ارائه شده است. از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده شد، چون این ضریب نسبت به ضریب‌های تطابق ساده و دایس ضریب کوفتیک (۹۳٪) بالاتری داشت. همانطور که ملاحظه می‌شود ژنوتیپ‌ها در ۲ گروه قرار گرفتند، به طوری که گونه‌ها به صورت صد در صد از یکدیگر تفکیک شدند که نشان‌دهنده کارایی بالای نشانگر مورد استفاده می‌باشد. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های گونه *L. perenne* ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ بود؛ متوسط ضریب تشابه برای ژنوتیپ‌های این گونه ۰/۷۸ بود. در گروه دوم ژنوتیپ‌های گونه *L. multiflorum* ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸ قرار گرفتند که متوسط ضریب تشابه برای ژنوتیپ‌های این گونه ۰/۷۳ بود.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر SCoT برای ژنوتیپ‌های *Lolium* مورد مطالعه با استفاده از روش UPGMA

دادند و در مجموع ۴۱/۴۶ درصد از واریانس با این دو محور بیان شد. بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی ژنوتیپ‌ها رسم شد (شکل ۳) که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت و ژنوتیپ‌ها به دو گروه تقسیم شدند.

تجزیه به مختصات اصلی (PCo) بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد بررسی تجزیه به مختصات اصلی برای ژنوتیپ‌ها انجام شد، به نحوی که نتایج نشان داد محور مختصات اول و دوم به ترتیب ۲۱/۲۵ و ۲۰/۲۱ درصد از واریانس موجود را توضیح



شکل ۳- بای پلات ژنوتیپ‌ها برای نشانگر SCoT بر اساس محور مختصات اصلی اول و دوم

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گونه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر SCoT

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس برآورد شده	درصد از واریانس	PhiPT
بین گونه‌ها	۱	۹۰/۲۲۲	۹۰/۲۲۲	۸/۹۷۲	٪۴۹	۰/۴۸۶*
درون گونه‌ها	۱۶	۱۵۱/۵۵۶	۹/۴۷۲	۹/۴۷۲	٪۵۱	
کل	۱۷	۲۴۱/۷۷۸		۱۸/۴۴۴	٪۱۰۰	

*: اختلاف در سطح ۵٪ معنی‌دار

(Nm) و ضریب تمایز ژنتیکی میان گونه‌ها (G_{ST}) محاسبه شد (جدول ۵) که با توجه به نتایج به‌دست آمده بیشترین تنوع درون جمعیتی و تنوع ژنی مربوط گونه *L. Multiflorum* بود. همچنین بیشترین میزان پلی‌مورفیسم نیز در بین ژنوتیپ‌های این گونه بود. ضریب تمایز ژنتیکی (G_{ST}) برآورد شده میان گونه‌ها ۰/۳۳۹ بود که این موضوع نشان‌دهنده تقویت یکنواختی ژنتیکی و یکسان شدن فراوانی‌های آلی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشد. فراوانی جریان ژنی (Nm) میان گونه‌ها در هر نسل ۰/۹۷۳ فرد برآورد شد که با پایین بودن تمایز ژنتیکی میان گونه‌ها همخوانی دارد. به‌طور معمول گونه‌های دگرگش از تنوع ژنتیکی بالا و تمایز ژنتیکی بین جمعیتی پایینی برخوردار هستند.

جدول ۵- میزان تنوع درون گونه‌ای برای دو گونه مورد بررسی

گونه	تعداد ژنوتیپ	PPB%	UHe(st)	He	I	Nm	G_{ST}
<i>L. perenne</i>	۹	۵۴/۹۳	۰/۲۳۲	۰/۲۱۹	۰/۳۲۰		
<i>L. multiflorum</i>	۹	۶۳/۳۸	۰/۲۴۷	۰/۲۳۳	۰/۳۴۷		
		۵۹/۱۵	۰/۲۳۹	۰/۲۲۶	۰/۳۳۳	۰/۹۷۳	۰/۳۳۹

تشکیل شده تعداد ۳۷ باند متفاوت بودند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در نشانگرهای غالب از صفر تا نیم متغیر بود. البته هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۰/۳۹ بود. در مجموع پیشنهاد می‌شود با توجه به این شاخص از آغازگرهای SC5، SC40، SC35، SC63، SC13، SC44، SC26، SC21 و SC10 که میزان بالایی از این شاخص را نشان دادند، برای تجزیه و تحلیل مجموعه ژرم پلاسما دیگر ژنوتیپ‌های جنس لولیم در تحقیقات بعدی استفاده شود. بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد باند و

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

بر اساس آماره PhiPT در بین گونه‌ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که در درون گونه‌ها تنوع بیشتر از بین گونه‌ها می‌باشد (جدول ۴). بر این اساس تنوع در درون گونه‌ها برابر ۵۱٪ و در بین گونه‌ها برابر ۴۹٪ مشاهده شد (شکل ۴).

محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای

با توجه به نتایج حاصل از بررسی مولکولی گونه‌های مورد بررسی با نشانگر SCoT، برای هر گونه شاخص‌های درصد چندشکلی (P%)، هتروژنتیکی مورد انتظار ناریب (Uhe)، هتروژنتیکی مورد انتظار (He)، شاخص شانون (I)، جریان ژنی

بحث

با استفاده از نشانگر SCoT همانطور که مشاهده شد تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین ژنوتیپ‌های هر دو گونه *Lolium* وجود داشت و چندشکلی مطلوبی بر اساس این نشانگر مشاهده شد. در بررسی Abbaszade و همکاران (۲۰۱۳) تنوع ژنتیکی شش جمعیت تتراپلوئید چچم یکساله *Lolium multiflorum* با استفاده از نشانگر ISSR بررسی شد. تعداد ۵۰ باند برای جمعیت‌ها مشاهده شد که ۴۳ باند چندشکل و ۷ باند یک‌شکل به‌دست آمد. تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی مناسب بود. در بررسی تفاوت ژنتیکی چچم یکساله و چچم چندساله Pivoriene و Pasakinskiene (۲۰۰۷) با استفاده از نشانگر ISSR نشان دادند که بین چچم یکساله و چند ساله از تعداد ۵۷ باند

ISSR روش کارآمدی برای تعیین تنوع ژنتیکی ارقام لولیوم بوده است. همچنین Majidi و Mirlohi (۲۰۱۰) به بررسی تشابه ژنتیکی ۴۲ جمعیت از ۸ گونه ایرانی *Agropyron* و *Bromus Lolium Festuca* نشانگرهای AFLP پرداختند و بیان کردند که ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد میان جمعیت‌ها متغیر بود که نشان‌دهنده سطوح بالای تنوع ژنتیکی بین و داخل گونه‌ایست. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در ۲ گروه قرار گرفتند؛ به طوری که گونه‌ها به صورت صد در صد از یکدیگر تفکیک شدند که نشان‌دهنده کارایی بالای نشانگر مورد استفاده می‌باشد. این نتایج با نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مطابقت داشت. در مطالعه Bolaric و همکاران (۲۰۰۵) به ارزیابی خصوصیت مولکولی از طریق تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های لهستانی از گونه *Lolium perenne* و مقایسه رابطه این گروه و اکوتیپ‌های آلمانی و واریته‌های اروپایی پرداختند. در یک تجزیه و تحلیل مشترک با ۱۹ اکوتیپ لهستانی، ۲۲ اکوتیپ آلمانی و ۲۲ واریته اروپایی ۱۷۲ نشانگر پلی‌مورفیک RAPD دیده شد و فاصله ژنتیکی میان اکوتیپ‌های لهستانی متغیر بود. همچنین Elazreg و همکاران (۲۰۱۱) تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از گونه *Lolium perenne* را با استفاده از نشانگرهای AFLP ارزیابی کردند و بیان کردند که عامل پراکنش جغرافیایی در تنوع ژنتیکی نقش داشته و بر همین اساس می‌توان از تنوع ژنتیکی متأثر از عامل پراکنش جغرافیایی در برنامه‌های حفاظت ذخایر ژنتیکی و همچنین بهبود عملکرد علوفه‌ای گونه مورد مطالعه در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد. از کاربردهای تجزیه واریانس مولکولی می‌توان در تعیین تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها و تعیین حد مطلوب خوشه در تجزیه خوشه‌ای اشاره کرد. تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گونه‌های یکساله و چند ساله با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx 6.2 انجام شد که اساس تنوع در درون گونه‌ها برابر ۵۱٪ و در بین گونه‌ها تنوع برابر ۴۹٪ مشاهده شد. در مطالعه Vieira و همکاران (۲۰۰۴) به بررسی تعیین خصوصیت تنوع ژنتیکی و ساختار

هم تعداد آلل تأثیرپذیری دارد. میانگین شاخص قدرت تفکیک (RP) برابر ۴/۶۸ بود. در حالت کلی با توجه به کلیه شاخص‌ها آغازگرهای SC35 و SC26 به‌عنوان بهترین آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی جنس لولیوم معرفی می‌شوند. در مطالعه‌ای Abbaszade و همکاران (۲۰۱۳a) به ارزیابی تنوع ژنتیکی هفت جمعیت دیپلوئید چچم یکساله *Lolium multiflorum* با استفاده از نشانگر ISSR پرداختند. تعداد ۵۳ باند برای جمعیت‌ها مشاهده شد که ۴۶ باند چندشکل و ۷ باند یک‌شکل به‌دست آمد. با توجه به چندشکلی به‌دست آمده تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی مناسب بود. همچنین Farshadfar و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌های رازیانه با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناختی و مولکولی SCoT بر اساس شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، قدرت تفکیک (RP)، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندانگانه مؤثر (EMR) اقدام به معرفی بهترین نشانگرها کردند. میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/۶۴ بود که نشان‌دهنده وجود تنوع قابل قبول در بین ژنوتیپ‌های لولیوم بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. در این تحقیق پیشنهاد می‌شود از ژنوتیپ‌هایی که حداکثر فاصله ژنتیکی را در درون گونه خود دارند بر اساس نشانگرهای مورد استفاده، در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. همچنین می‌توان از ژنوتیپ‌هایی که در بین گونه‌ها بیشترین تشابه را داشتند برای تلاقی و جریان ژنی استفاده کرد. در بررسی Ghariani و همکاران (۲۰۰۳) تنوع ژنتیکی ۱۸ اکسشن از *Lolium perenne* تونس با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. این نشانگر برای تخمین فاصله ژنتیکی میان ارقام در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل میزان بالای تنوع ژنتیکی را در *Lolium perenne* نشان داد. همچنین Pivoriene و همکاران (۲۰۰۸) تعداد ۱۶ رقم چچم چندساله را با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار دادند و تنوع معنی‌دار را در بین ارقام با استفاده از نشانگر ISSR گزارش کردند، همچنین بیان کردند که انگشت‌نگاری

- markers. Theoretical and Applied Genetics 91: 582-8
- 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.
- Elazreg, H., Chtourou-Ghorbel, N., Ghariani, S., Chakroun, M. and Trifi-Farah, N., 2011. Studying genetic diversity of the Tunisian *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea* with AFLP markers. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9 (1): 409-415.
- Farshadfar, M., Moradzade, N., Farshadfar, E. and Shirvani, H., 2017. Genetic diversity among fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions using morphological and SCoT markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Researc.* 25(2): 212-231. (In Farsi with English abstract).
- Ghariani, S., Trifi-Farah, N., Chakroun, M., Marghali, S. and Marrakchi, M., 2003. Genetic diversity in Tunisian Perennial ryegrass revealed by ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(8): 809-815.
- Heydari Sharif Abad, H. and Dari, M.A., 2003. Fodder plants (grass) Volume II. Forestry and Rangeland Research Institute. Tehran.
- Hou, Y., Yan, Z. and Wei, Y., 2005. Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis Barely. *Genetics Newsletter*, 35:9-22.
- Humphreys, M.O., 1991. A genetic approach to the multivariate differentiation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. *Heredity*, 66: 437-443.
- Kalendar, R., 2007. FastPCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. Available at www.biocenter.helsinki.fi/programs/fastpcr.htm; 2007.
- Kumar, M., Mishra, G.P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P.K. and Singh S.B., 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of Trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3): 225-236.
- Majidi, M.M. and Mirolohi, A., 2010. Genetic similarities among Iranian populations of *Festuca*, *Lolium*, *Bromus* and *Agropyron* using amplified fragments length polymorphism (AFLP) markers. *Iranian Journal of Biotechnology*, 8(1): 16-23.
- 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
- ۴ جمعیت *Lolium multiflorum* با استفاده از نشانگر RAPD پرداختند. مقدار شاخص تنوع ژنتیکی کلی به دست آمده بالا بود که نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی وسیع در ۴ جمعیت بود. تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی نشان داد که تنوع داخل جمعیتی بیشتر از تنوع بین جمعیتی بود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام شده و کلیه حقوق مادی و معنوی آن متعلق به آن دانشگاه می باشد؛ از این رو از مدیران محترم دانشگاه قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

- Abbaszade, S., Jafari, AA. and Safari, H., 2013a. Evaluation of genetic diversity of the seven *Lolium Multiflorum* diploid population using the ISSR marker, The 8th Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran and the 4th National Bioethics Conference, Iran.
- Abbaszade, S., Jafari, A.A. and Safari, H., 2013b. Evaluation of Genetic Diversity of the Seven *Lolium Multiflorum* Tetraploid Population Using the ISSR Marker, The 8th Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran and the 4th National Bioethics Conference.
- Altıntas, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A. and Zkan, H. O., 2008. Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 127: 9-14.
- Bolaric, S., Barth, S., Melchinger, A.E. and Posselt, U.K., 2005. Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivar investigated with RAPD markers. *Plant Boching*, 124: 161-166.
- Buckler, E.S., and Thornsherry, J.M., 2002. Plant molecular diversity and application to genomics. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 107-111.
- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J., 2009. Start Codon Targeted (SCoT) polymorphism: a simple novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27: 86-93.
- Davis, T.M., Haigis, Y.U.H. and McGowan, P.J., 1995. Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD

- Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
- Rohlf, F. and Taxonomy, N.P.N., 1998. *Multivariate Analysis System*, Version 2.02. New York: Exeter Software, Applied Biostatistics Inc.
- Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D. and Papa, R., 2005. Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding*, 124 (5): 464–472.
- Singh, S.K., 2003. Cluster analysis for heterosis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Genetics*. 63(3):249-250.
- Tsvelev, N.N., 1989. The system of grasses and their evolution. *Botanical Review* ,55: 141-204.
- Vieira, E.A., Castro, C.M., Oliveira, A.Cd., Irajá, F., Carvalho, Fd., Zimmer, P.D. and Martins, L.F., 2004. Genetic structure of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by RAPD. *Sci. Agric.*, 61(4): 407-413.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalskiand, J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18: 6531-6535.
- Wright, S., 1949. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.
- provienc. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 14: 175-180 (In Farsi with English abstract).
- Peakall, R. and Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6:288-295.
- Perrier, X. and Jacquemoud-Collet, J.P., (2006). DARwin soft ware, <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Peters, J.P. and Martinelli, J.A., 1989. Hierarchical cluster analysis as a tool manages variation in germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 78: 42-48.
- Pivoriene, O. and Pasakinskiene, I., 2007. Genetic differences between annual and *perennial ryegrass* revealed by ISSR markers and their Sequence characteristics. *Zemdirbyste / Agriculture*, 94: 197–204
- Pivoriene, O., Pašakinskiene, I., Brazauskas, G., Lideikyte, L., Jensen, L.B., and Lübberstedt, T., 2008. Inter-simple sequence repeats (ISSR) loci mapping in the genome of *perennial ryegrass*. *Biologija*. vol. 54. Nr. 1.P. 17–21
- Polok, K., Ciaglo, S. and Carbrita, L., 2006. AFLP analysis of genetic similarity between the species of the genus *Lolium*. *Biodiv. Res. Conserv.* 3-4: 232-234
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M.,

Application of SCoT marker to discriminate *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum* species

M. Farshadfar^{1*}, H. Shirvani², M. Amjadian³, A. Yaghotipoor⁴

1- Corresponding author, Assoc. Prof., Department of Agriculture, Payame Noor University, I.R. Iran
Email: farshadfarmohsen@yahoo.com

2-Instructor, Department of Agriculture, Payame Noor University, I.R. Iran

3- Department of Agriculture, Payame Noor University, I.R. Iran

4-Ph.D in Plant breeding, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Science and Agriculture Engineering, Razi University, Kermanshah, I.R. Iran

Received: 26.08.2017

Accepted: 20.11.2017

Abstract

Lolium is an important cool season grass species growing in different climates. To identify variation among nine *Lolium multiflorum* and nine *Lolium perenne* genotypes, this experiment was carried out based on 15 SCoT molecular markers. All of the SCoT primers showed 86 visible bands. Seventy four out of 86 bands were polymorphs. Primers SC35, SC36 and SC26 (with 9 and 8 bands respectively) showed the highest number of bands and SC10 and SC44 (with 2 and 3 bands) showed the lowest number of bands. The greatest number of band for polymorphic information content (PIC) belonged to SC5 SC40 SC35 SC63 SC13, C44 SC26 SC21 and SC10. The greatest Resolving Power (RP), Marker Index (MI), Effective Multiplex Ratio (EMR) belonged to SC35 and SC26 primers. Genetic similarity based on Jaccard coefficient ranged from 0.35 to 0.91. Mean similarity between the genotypes was 0.64. Cluster analysis grouped genotypes into two groups. The results of clustering was confirmed by principal coordinate (PCo) analysis. Analysis of molecular variance of annual and perennial species revealed that variation within species was 51% and variation between species was 49%. Based on heterogeneity (He) and Shannon indices (I), the highest intraspecific variability and gene variation belonged to *L. Multiflorum*.

Key words: Genetic variability, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, molecular marker, SCoT