

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های چچم دائمی (*Lolium perenne*) با استفاده از

نشانگرهای مولکولی و بیوشیمیایی

هوشمند صفری^{۱*}، هومن شیروانی^۲ و لیدا فریدونی^۳

^۱ کرمانشاه، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، بخش تحقیقات جنگلها و مراتع

^۲ تهران، دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی

^۳ ایلام، دانشگاه ایلام، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۷



چکیده

تنوع ژنتیکی ۱۲ ژنوتیپ از گونه مرتعی *Lolium perenne* با استفاده از نشانگرهای مولکولی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. برای هر ژنوتیپ پروتئینهای محلول برگ به روش Laemmli استخراج، و با ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۲ باند برای ۱۲ ژنوتیپ مورد بررسی مشاهده شد، که از ۱۲ باند حاصل تعداد ۶ باند چندشکل بود و در ۶ باند نیز چند شکلی مشاهده نشد. بیشترین تعداد باند مربوط به ژنوتیپ Tyrone با ۱۲ باند و کمترین تعداد باند مربوط به ژنوتیپ Green Gold با ۶ باند بود. نتایج تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در سه دسته قرار داد. با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها مورد بررسی قرار گرفت که از این ۱۲ آغازگر ۱۰ عدد دارای باندهای قابل امتیاز دهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۶۲ باند تولید کنند که از این تعداد، ۱۵ باند یک شکل، سایر باندها چند شکل بودند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۲ ژنوتیپ برابر ۶/۲ بود. آغازگر IS₉ بیشترین تعداد باند (تعداد ۱۱ باند) و آغازگر IS₁₅ کمترین تعداد باند (تعداد ۳ باند) را نشان دادند. بر اساس مارکر ISSR چندشکلی مطلوبی در بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد و آغازگرهای IS₉، IS₁₀، IS₁₃ و IS₁₆ به عنوان آغازگرهای مناسب برای بررسی‌های گونه چچم دائمی، تعیین شدند. بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس مارکر ISSR برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تطابق متوسطی با نتایج مطالعات بیوشیمیایی داشت.

واژه‌های کلیدی: چچم دائمی، تنوع ژنتیکی، پروتئینهای محلول، مارکر ISSR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۳۰۵۸۲۳، پست الکترونیکی: Hooshmandp@yahoo.com

مقدمه

دامپروری تأمین می‌شود و محدود بودن منابع آب، زمین، دام و مرتع، محدودیت مواد غذایی را در پی دارد، تولیدات به دست آمده از این منابع پاسخگوی نیازهای ژنوتیپ روز افزون نخواهد بود. مرتع یکی از منابع مهمی است که در تولید این فرآورده‌ها نقش ارزنده‌ای دارد. نقش گیاهان علوفه‌ای در تغذیه دام، از اهمیت غیرقابل انکاری برخوردار است، از این رو، بذل توجه به کشت محصولات علوفه‌ای با

بشر از روزگاران گذشته برای دستیابی به غذا کوششی پی-گیر را آغاز کرده است. آنچه مسلم است این است که انسان، هزارها و سده‌های بسیاری را با خوردن گیاهان خودرو گذرانده است. در حال حاضر تأمین غذا برای ژنوتیپ ۷ میلیارد نفری جهان کاری بس مشکل است. روند افزایش ژنوتیپ در جهان این مشکل را بیشتر نمایان می‌سازد. از آنجا که غذای انسان عمدتاً از کشاورزی و

ماهواره‌ها نشانگرهای مولکولی نیمه تصادفی هستند (۷). تکثیر در این نشانگر در حضور یک آغازگر مکمل با توالیهای SSR یا ریز ماهواره هدف انجام می‌پذیرد (۳۱). در مطالعات متعددی با استفاده از مارکرهای مولکولی تنوع ژنتیکی گونه‌های چچم مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شده که استفاده از نشانگرهای مولکولی روش کارآمدی جهت تعیین تنوع ژنتیکی ارقام چچم بوده است (۱۳، ۲۷ و ۲۸). پروتئینهای گیاهی به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند: ۱- پروتئینهای غیر ساختاری یا آنزیمها و ۲- پروتئینهای ساختاری و پروتئینهای ذخیره‌ای بذر که از هر دو گروه این پروتئینها، برای مطالعات تنوع ژنتیکی و تغییرات درون ژنوتیپها استفاده می‌شود (۱۶). تکنیک الکتروفوریتیک پروتئینها نشان دهنده بسیاری از شباهتها و اختلافات ژنتیکی میان گیاهان مورد مقایسه هستند بخصوص در مورد گیاهان زراعی که رقمهای آنها برای آنالیز با ارزش هستند (۱۷). در بسیاری از مطالعات جهت بررسی تنوع ژنتیکی از پروتئینهای محلول در برگ استفاده گردید و گزارش شده که الگوی بانندی پروتئین روش کارآمدی جهت بررسی تنوع ژنتیکی و تفکیک گونه‌ها می‌باشد (۱۱ و ۲۴). هدف از تحقیق حاضر بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای گونه چچم دائمی با استفاده از مارکر مولکولی ISSR و پروتئینهای محلول در برگ می‌باشد.

مواد و روشها

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی براساس خصوصیات بیوشیمیایی و مولکولی تعداد ۱۲ ژنوتیپ از سرده *Lolium perenne* از تیره گرامینه با توجه به کلیه بذره‌های موجود در بانک ژن منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور تهیه گردید. مشخصات مواد ژنتیکی مورد مطالعه، با ذکر اسم، کد بانک ژن، منشأ و کد ژنوتیپ در جدول ۱ نشان داده شده است. لازم به ذکر است تحقیقات آزمایشگاهی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه انجام شد.

شیوه علمی، اهمیت خاصی می‌یابد (۳۰). گراسها از مهم ترین گیاهان مرتعی هستند که به لحاظ تولید علوفه، احداث چراگاهها، حفاظت و جلوگیری از فرسایش خاک اهمیت زیادی دارند (۲۳). جنس چچم (*Lolium*) شامل گونه‌هایی است که از منطقه مدیترانه منشأ گرفته‌اند (۳۲) و بومی اروپا، مناطق معتدل آسیا و شمال آفریقا هستند، اما تقریباً از سرتاسر جهان معرفی شده است (۱۹ و ۲۵). به دلیل کیفیت بالای این گیاه عمده استفاده مهم از آن برای تغذیه گاوهای شیری و همچنین برای تمامی دامهایی که نیازهای غذایی بالایی دارند مناسب است. در هر حال *Lolium perenne* از نظر اقتصادی، از گونه‌های علوفه‌ای بسیار مهم در ایران هستند (۲۱). تولید ارقام گیاهان علوفه‌ای که علاوه بر عملکرد خوب دارای مواد غذایی مناسب برای انواع متفاوت دامها هستند یکی از اهداف مهم به‌نژادگران و تولید کنندگان محصولات علوفه‌ای می‌باشد (۱۵). بررسی و تحلیل تنوع ژنتیکی در ذخائر توارثی موجود از مهم ترین مراحل پروژه‌های به‌نژادی است که امکان گروه‌بندی و توصیف دقیق نمونه‌ها را فراهم آورده و به‌نژادگرها را در تشخیص زیر مجموعه‌ها و نمونه‌هایی که امکان استفاده مؤثر آنها در برنامه‌های اصلاحی آبی وجود دارد یاری می‌کند (۲۲). ارزیابی و تعیین میزان تنوع ژنتیکی یکی از شاخصهای مهم برای انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی است. 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. با افزایش فاصله ژنتیکی بین گونه‌های گراسها احتمال هتروزیس در برنامه‌های تلافی افزایش می‌یابد (۱۴ و ۲۶). نشانگرهای مولکولی ابزارهای بسیار مفید و قوی در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیک، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف می‌باشد. نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA تحت تأثیر شرایط محیط قرار نمی‌گیرند و تعداد زیادی از بین نشانگرها را می‌توان به راحتی در کل ژنوم جستجو نمود (۸). توالیهای بین ریز

جدول ۱- لیست ژنوتیپ‌های چچم چند ساله تهیه شده از بانک ژن‌منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور به همراه کد بانک ژن و

منشاء		منشاء		منشاء		منشاء	
کد بانک ژن	اسم ژنوتیپ	کد ژنوتیپ	منشاء	کد بانک ژن	اسم ژنوتیپ	کد ژنوتیپ	منشاء
۱۳۰۳	Grenisle	G۷	ایرلند جنوبی	۱۳۰۹	Aubisque	G۱	هلند
۱۳۱۲	Tyrone	G۸	ایرلند شمالی	۱۳۰۷	Green Gold	G۲	ایرلند جنوبی
۱۳۱۱	Napoleon	G۹	دانمارک	۱۳۰۸	Magician	G۳	ایرلند جنوبی
۱۳۱۰	Fontoon	G۱۰	ایرلند جنوبی	۱۳۰۵	Carat	G۴	هلند
۱۳۰۲	Yatsyn	G۱۱	نیو زیلند	۱۳۱۳	Gilford	G۵	ایرلند
۱۳۰۶	Spelga	G۱۲	ایرلند شمالی	۱۳۰۱	Moy	G۶	ایرلند شمالی

مدت ۳۰-۴۵ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document جهت مشاهده باندها استفاده شد.

نجزیه بیوشیمیایی: جهت عصاره‌گیری ۰/۵ گرم از برگ هر ژنوتیپ را که در داخل گلدان کشت شده بودند، بریده و پس از توزین با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری (تریس، ۵/۶ گرم و گلیسین، ۲/۹۶ گرم، pH=۸/۳) در داخل هاون چینی مخلوط و کاملاً ساییده شد (۱۸). پس از ۱۰ دقیقه سایش عصاره حاصل را در لوله‌های آزمایش ریخته و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت نگهداری گردید. سپس عصاره‌ها جهت صاف کردن با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول صاف شده رویی توسط میکروپیپت جدا شده و با محلول بافر نمونه به نسبت ۱ : ۱ مخلوط گردید. سرانجام محلول مخلوط شده به میکروتیوپهای درب‌دار اپندروف منتقل و در دستگاه بن ماری در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه گرم شد. نمونه‌ها تا زمان مصرف در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۸). الکتروفورز به روش ژل پلی‌اکریل امید به صورت ژل پایینی (۱۲ درصد) و ژل بالایی یا متراکم کننده (۴ درصد) انجام شد (۱۸). پس از بررسی کمیت و کیفیت پروتئینها میزان ۷۰ میکرولیتر پروتئین نمونه به داخل چاهک تزریق و سیستم الکتروفورز به منبع تغذیه وصل گردید. هنگامی که نمونه در داخل ژل فوقانی قرار داشت از ولتاژ ثابت ۱۱۰ و بعد

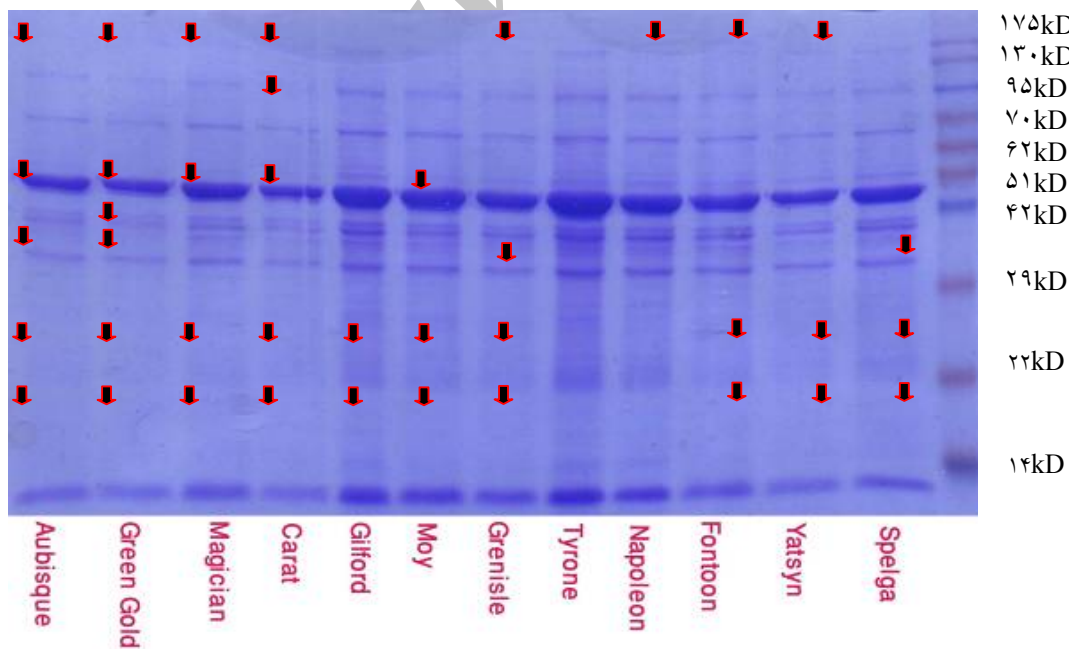
تجزیه مولکولی: استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته (۱۰) برای ژنوتیپ‌ها انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش اسپکتروفتومتری مشخص شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مولار MgCl₂، ۰/۰۵ میلی مولار از هر dNTP، ۰/۲ میکرومول آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر واکنش به غلظت ۱x) انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۴۵ 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 ۱x TBE استفاده گردید. به منظور بررسی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه گذاری به DNA های تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرو لیتر از هر نمونه به درون چاهکهای ایجاد شده در ژل آگارز بارگذاری و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت و سپس ژل را جهت رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم برمایید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به

نتایج حاصل از ارزیابی تنوع بر اساس الگوی بانندی پروتئین: در شکل ۱ باندهای حاصل از الکتروفورز ژل پروتئینهای استخراج شده از برگ ژنوتیپهای مورد بررسی ارائه شد. همچنان که ملاحظه می‌گردد، اگر چه باندهای پروتئینی مشترک زیادی در داخل ژنوتیپهای مورد بررسی وجود داشت، اما در بعضی موارد نیز ژنوتیپها فاقد بعضی از باندها بودند که این موضوع می‌تواند مربوط به عدم تولید پروتئین مورد نظر در مرحله استخراج پروتئین باشد. در مجموع تعداد ۱۲ باند برای ۱۲ ژنوتیپ مورد بررسی مشاهده شد که بیشترین تعداد باند مربوط به ژنوتیپ Tyrone (G۸) با ۱۲ باند و کمترین تعداد باند مربوط به ژنوتیپ Green Gold (G۲) با ۶ باند بود. بنابراین به خوبی مشخص است که تنوع بالایی برای باندهای پروتئینی در بین ژنوتیپها وجود نداشت. همچنین از ۱۲ باند حاصل تعداد ۶ باند چند شکل بود و در ۶ باند نیز چند شکلی مشاهده نشد. علاوه بر این باندهای پروتئینی نه تنها از نظر محل قرار گرفتن روی ژل و وزن مولکولی، بلکه از لحاظ تراکم و شدت نیز با یکدیگر اختلاف نشان دادند.

از ورود نمونه به داخل ژل جداکننده ولتاژ را به ۱۳۰ و مدت ۵ ساعت استفاده گردید. پس از انجام الکتروفورز به منظور مشاهده باندهای پروتئینی، رنگ آمیزی با استفاده از کوماسی بلو به مدت ۱ ساعت انجام گرفت. در پایان جهت آشکار شدن باندهای پروتئینی از محلول رنگ بر در چند مرحله به مدت ۱ ساعت استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور استفاده از اطلاعات الکتروفورزی در آنالیزهای آماری براساس داشتن باند (کد یک) یا نداشتن باند (کد صفر) نتایج حاصل برای پروتئین و نشانگر ISSR کدبندی شدند. تجزیه خوشه‌ای، ماتریس تشابه بر مبنای ضریب دایس و تجزیه به مختصات اصلی (PCo) داده‌ها با استفاده از نرم افزار Darwin، و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم افزار GenAlEx 6.2 بر اساس ضرایب دایس انجام گرفت. محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) برای نشانگر ISSR از طریق فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n PI^2$ (۲۹) محاسبه گردید.

نتایج و بحث



شکل ۱- تصویر الکتروفورز پروتئین‌های محلول در برگ ژنوتیپهای چچم چند ساله مورد مطالعه نشان دهنده عدم وجود باند در ژل می‌باشد

همچنین بین سه ژنوتیپ (G۳) Magician، (G۴) Carat و (G۵) Yatsyn (G۱۱) مشاهده گردید، با ضریب تشابه ۱ و کمترین تشابه بین ژنوتیپهای (G۶) Moy و (G۷) Napoleon (G۹) با ضریب تشابه ۰/۷۳۷ و بین ژنوتیپهای Gilford (G۵) و (G۲) Green Gold با ضریب تشابه ۰/۷۰۶ و بین ژنوتیپ (G۸) Tyrone با ژنوتیپهای (G۱) Aubisque، (G۲) Green Gold و (G۷) Grenisle به ترتیب با ضرایب تشابه ۰/۷۳۷، ۰/۶۶۷ و ۰/۷۳۷ بود.

ماتریس تشابه ژنوتیپها بر اساس پروتئین برگ: ماتریس تشابه بر مبنای ضریب جاکارد برای باندهای حاصل از الکتروفورز پروتئینهای محلول در برگ ژنوتیپها محاسبه شد و در جدول ۲ ارائه شده است. میانگین تشابه بین ژنوتیپها برابر ۰/۸۶۳ بود که بالا بودن تشابه بیانگر شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپها برای پروتئینهای محلول در برگ بود و ضریب تشابه از ۱/۰۰۰ تا ۰/۶۶۷ متغیر بود. بیشترین تشابه بین دو ژنوتیپ (G۱) Aubisque و (G۷) Grenisle و

جدول ۲- ماتریس تشابه ژنوتیپهای مورد بررسی برای پروتئینهای برگ بر اساس ضریب جاکارد

ژنوتیپ	Aubisque	Green Gold	Magician	Carat	Gilford	Moy	Grenisle	Tyrone	Napoleon	Fontoon	Yatsyn	Spelga
Aubisque	۱											
Green Gold	۰/۹۲۳	۱										
Magician	۰/۹۳۳	۰/۸۵۷	۱									
Carat	۰/۹۳۳	۰/۸۵۷	۱/۰۰	۱								
Gilford	۰/۷۷۸	۰/۷۰۶	۰/۸۴۲	۰/۸۴۲	۱							
Moy	۰/۸۵۷	۰/۸۰۰	۰/۹۴۱	۰/۹۴۱	۰/۹۰۰	۱						
Grenisle	۱/۰۰	۰/۹۲۳	۰/۹۳۳	۰/۹۳۳	۰/۷۷۸	۰/۸۵۷	۱					
Tyrone	۰/۷۳۷	۰/۶۶۷	۰/۸۰۰	۰/۸۰۰	۰/۹۵۷	۰/۸۵۷	۰/۷۳۷	۱				
Napoleon	۰/۸۲۴	۰/۷۵۰	۰/۷۷۸	۰/۷۷۸	۰/۸۵۷	۰/۷۳۷	۰/۸۲۴	۰/۹۰۹	۱			
Fontoon	۰/۸۵۷	۰/۸۰۰	۰/۹۴۱	۰/۹۴۱	۰/۹۰۰	۰/۸۸۹	۰/۸۵۷	۰/۸۵۷	۰/۸۴۲	۱		
Yatsyn	۰/۹۳۳	۰/۸۵۷	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۸۴۲	۰/۹۴۱	۰/۹۳۳	۰/۸۰۰	۰/۷۷۸	۰/۹۴۱	۱	
Spelga	۰/۸۵۷	۰/۸۰۰	۰/۸۲۴	۰/۸۲۴	۰/۹۰۰	۰/۸۸۹	۰/۸۵۷	۰/۸۵۷	۰/۸۴۲	۰/۸۸۹	۰/۸۲۳	۱

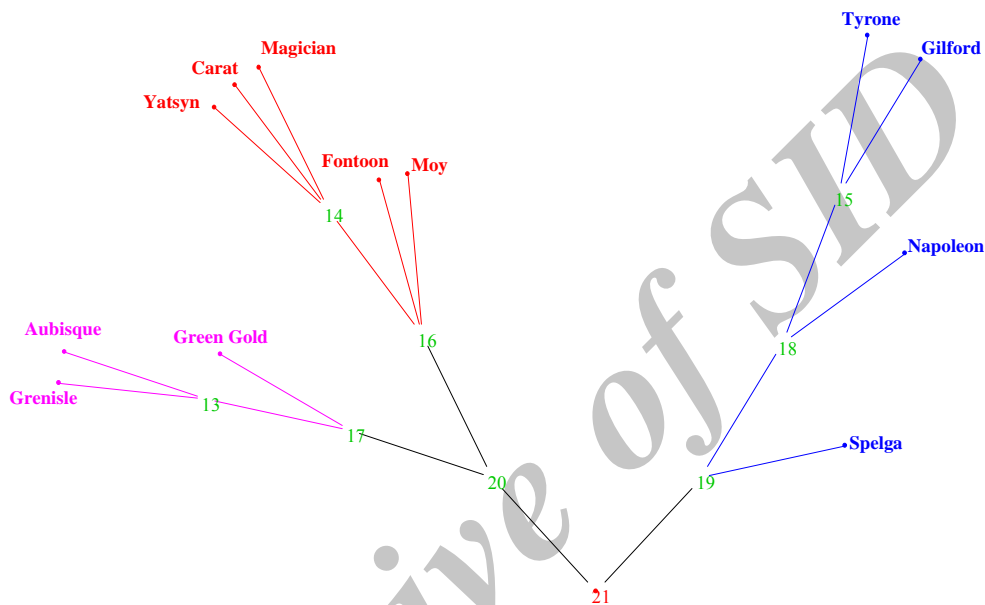
سوم قرار داشتند. همچنان که ملاحظه می‌گردد، گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس باندهای پروتئینی توانست ژنوتیپها را در سه گروه متمایز قرار دهد و آنها را از هم تفکیک نماید.

تجزیه به مختصات اصلی بر اساس پروتئینهای برگ: تجزیه به مختصات اصلی برای ژنوتیپها بر اساس پروتئینهای برگ انجام شد و نمودار پراکنش ژنوتیپها بر اساس دو مختصات اول و دوم در شکل ۳ ارائه شده است، همچنانکه ملاحظه می‌گردد گروه‌بندی حاصل از مختصات اول و دوم با گروه‌بندی ژنوتیپها بر اساس تجزیه خوشه‌ای

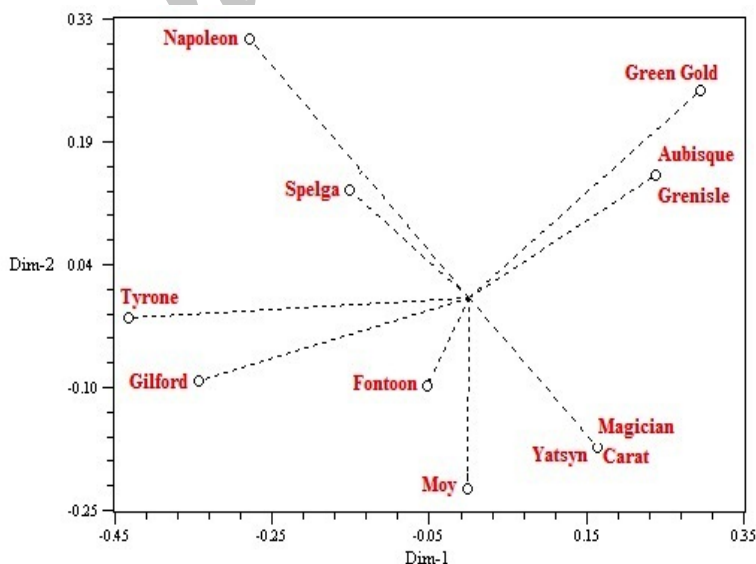
تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپها بر اساس پروتئین برگ: تجزیه خوشه‌ای برای ژنوتیپها به منظور گروه‌بندی آنها بر اساس تنوع باندهای پروتئینی بر اساس ضریب جاکارد و با روش UPGMA صورت گرفت (شکل ۲) که ژنوتیپهای مورد مطالعه به ۳ دسته تقسیم شدند، به طوری که گروه اول شامل ژنوتیپهای (G۲) Green Gold، (G۷) Grenisle و (G۱) Aubisque بود. ژنوتیپهای (G۴) Carat، (G۳) Yatsyn، (G۱۱) Moy، (G۶) Fontoon و (G۱۰) در گروه دوم قرار داشتند و ژنوتیپهای (G۹) Napoleon، (G۱۲) Spelga، (G۸) Tyrone و (G۵) Gilford در گروه

تشابه بر اساس پروتئینهای محلول بودند. از طرف دیگر ژنوتیپهای Green Gold (G۲)، Aubisque (G۱) در یک گروه قرار گرفتند. ژنوتیپهای Carat (G۴)، Magician (G۳)، Yatsyn (G۱۱)، Moy (G۶) و Fontoon (G۱۰) در گروه دوم قرار داشتند و ژنوتیپهای Napoleon (G۹)، Spelga (G۱۲)، Tyrone (G۸) و Gilford (G۵) در گروه سوم قرار داشتند. بنابراین ژنوتیپهای هر گروه دارای بیشترین

ژنوتیپهای Green Gold (G۲) و Fontoon (G۱۰) بیشترین فاصله ژنتیکی بر اساس شکل ۳ داشتند و ژنوتیپهای Carat (G۴)، Yatsyn (G۱۱)، Moy (G۶) و Napoleon (G۹) بیشترین فاصله با ژنوتیپهای Fontoon (G۱۰) داشتند.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از بررسی الکتروفورز پروتئینهای برگ در ژنوتیپهای مطالعه شده



شکل ۳- نمودار پراکنش ژنوتیپهای مورد بررسی براساس دو محور مختصات اصلی اول و دوم

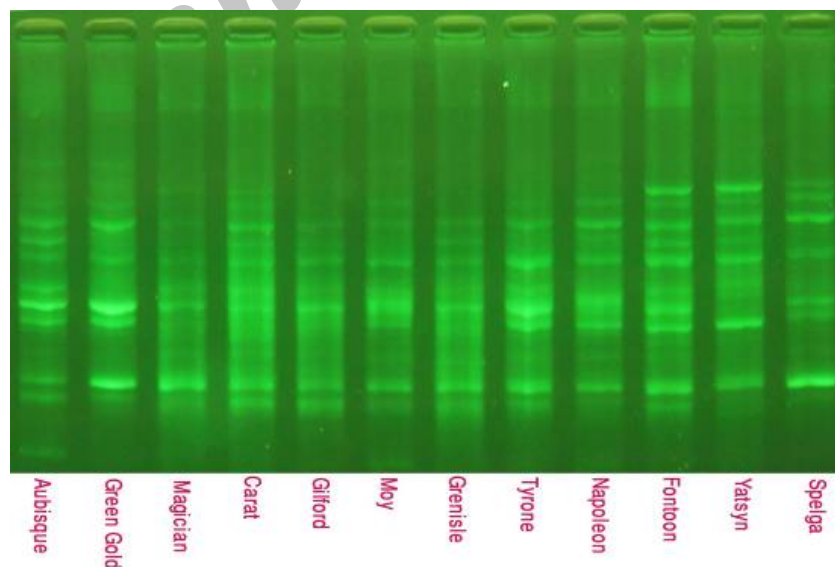
باند) و آغازگر IS₁₅ کمترین تعداد باند (تعداد ۳ باند) را نشان دادند. ژنوتیپ Spelga (G۱۲) بیشترین باند (۴۹ باند) و ژنوتیپ Fontoon (G۱۰) کمترین باند (۳۴ باند) را در بین ژنوتیپهای مورد بررسی داشتند. شکل ۴ الگوی بانندی ۱۲ ژنوتیپ مورد بررسی به ترتیب با استفاده از آغازگرهای IS₅ را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۳ ارائه شده است.

نتایج حاصل از تجزیه ISSR: تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای مورد مطالعه با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت که از این ۱۲ آغازگر ۱۰ عدد دارای باندهای قابل امتیاز دهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۶۲ باند تولید کنند که از این تعداد، ۱۵ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۲ ژنوتیپ برابر ۶/۲ بود. آغازگر IS₉ بیشترین تعداد باند (تعداد ۱۱

جدول ۳- درصد چند شکلی، تعداد کل باند و محتوای اطلاعات چند شکلی در آغازگرهای ISSR

نام آغازگر	توالی آغازگر (3'-5')	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	محتوی اطلاعات چند شکلی
IS ₃	GAGAGAGAGAGAGAYC	۴	۴	۱۰۰	۰/۲۵
IS ₅	AGAGAGAGAGAGAGC'	۱۱	۸	۷۲/۷۳	۰/۳۰
IS ₉	CTCTCTCTCTCTCTG	۴	۴	۱۰۰	۰/۳۶
IS ₁₀	GAGAGAGAGAGAGAGA Rc	۸	۸	۱۰۰	۰/۳۳
IS ₁₁	ACACACACACACACC	۷	۴	۵۷/۱۴	۰/۳۴
IS ₁₂	TGTGTGTGTGTGTGG	۵	۳	۶۰	۰/۴۵
IS ₁₃	AGAGAGAGAGAGAGYGT	۳	۳	۱۰۰	۰/۳۲
IS ₁₄	GACAGACAGACAGACA	۸	۵	۶۲/۵۰	۰/۲۸
IS ₁₅	GGATGGATGGATGGAT	۸	۴	۵۰	۰/۳۳
IS ₁₆	DBDACACACACACACA	۴	۴	۱۰۰	۰/۳۴
میانگین		۶/۲۰	۴/۷۰	۸۰/۲۴	۰/۳۳

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



شکل ۴- تصویر ژل الکتروفورزی ژنوتیپهای چچم چند ساله مورد بررسی برای آغازگر IS₅

استفاده کرد. آغازگرهای IS₅، IS₁₁، IS₁₄ و IS₁₅ با کمترین میزان PIC و درصد چند شکلی توانایی خوبی در جداسازی ژنوتیپها نداشتند. دیگر آغازگرها برای یکی از پارامترهای PIC یا درصد چندشکلی برتری نشان دادند.

ماتریس تشابه: تشابه ژنتیکی ژنوتیپهای مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس از ۰/۷۰۹ تا ۰/۸۷۳ متغیر بود (جدول ۴)، میانگین تشابه بین ژنوتیپها برابر ۰/۷۹۲ بود که بالا بودن تشابه ژنتیکی یاد شده نشان دهنده تنوع ژنتیکی پایین در بین ژنوتیپهای چچم بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. بیشترین تشابه را ژنوتیپهای Aubisque (G1) با Grenisle (GV) و کمترین تشابه را ژنوتیپ Yatsyn (G11) با Grenisle (GV) داشتند.

میانگین درصد چند شکلی در بین ژنوتیپهای مورد بررسی برابر ۸۰/۲۴ درصد بود که کمترین درصد چند شکلی را آغازگر IS₁₅ (۵۰ درصد) و بیشترین درصد چند شکلی به آغازگرهای IS₃، IS₉، IS₁₀، IS₁₃ و IS₁₆ اختصاص داشت، که میزان چند شکلی در این آغازگرها برابر ۱۰۰ درصد بود. میانگین PIC در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۰/۳۳۵ بود که بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگر IS₁₂ بود که این آغازگر بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص PIC توانست فاصله ژنتیکی ژنوتیپها را مشخص کند. آغازگر IS₃ و IS₁₄ با کمترین میزان PIC توانایی خوبی در جداسازی ژنوتیپها نداشتند. در مجموع پیشنهاد می‌گردد از آغازگرهای IS₉، IS₁₀، IS₁₃ و IS₁₆ که شاخص PIC درصد چند چندشکلی بالایی را نشان دادند، برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسما دیگر ژنوتیپهای لولیم در تحقیقات بعدی

جدول ۴- ماتریس تشابه ژنوتیپها برای پرایمرهای ISSR استفاده شده بر اساس ضریب دایس

ژنوتیپ	Aubisque	Green Gold	Magician	Carat	Gilford	Moy	Grenisle	Tyrone	Napoleon	Fontoon	Yatsyn	Spelga
Aubisque	۱											
Green Gold	۰/۸۲۲	۱										
Magician	۰/۷۹۵	۰/۷۸۷	۱									
Carat	۰/۷۱۴	۰/۸۲۵	۰/۷۸۲	۱								
Gilford	۰/۸۷۳	۰/۸۰۵	۰/۸۱۸	۰/۷۸۵	۱							
Moy	۰/۷۷۸	۰/۷۳۲	۰/۸۰۹	۰/۷۷۵	۰/۸۴۰	۱						
Grenisle	۰/۸۳۶	۰/۸۰۰	۰/۷۷۱	۰/۷۶۷	۰/۸۰۰	۰/۷۴۷	۱					
Tyrone	۰/۷۷۶	۰/۸۳۱	۰/۷۳۸	۰/۸۰۰	۰/۸۳۱	۰/۷۵۳	۰/۸۱۷	۱				
Napoleon	۰/۸۲۷	۰/۸۱۴	۰/۸۳۹	۰/۷۸۶	۰/۸۶۰	۰/۸۱۴	۰/۷۹۵	۰/۸۱۵	۱			
Fontoon	۰/۷۸۷	۰/۷۸۹	۰/۷۴۷	۰/۷۴۶	۰/۸۲۹	۰/۷۴۳	۰/۸۵۷	۰/۸۶۲	۰/۸۶۵	۱		
Yatsyn	۰/۷۴۷	۰/۷۳۶	۰/۷۶۶	۰/۸۰۰	۰/۷۶۷	۰/۷۸۲	۰/۷۰۹	۰/۷۵۶	۰/۷۹۱	۰/۷۸۴	۱	
Spelga	۰/۷۴۴	۰/۸۰۰	۰/۸۰۴	۰/۷۵۰	۰/۷۷۸	۰/۷۷۸	۰/۷۸۶	۰/۸۰۰	۰/۸۰۹	۰/۷۶۳	۰/۸۲۱	۱

ژنوتیپها در شکل ۵ ارائه شده است. همچنان که ملاحظه می‌گردد ژنوتیپها در ۳ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل

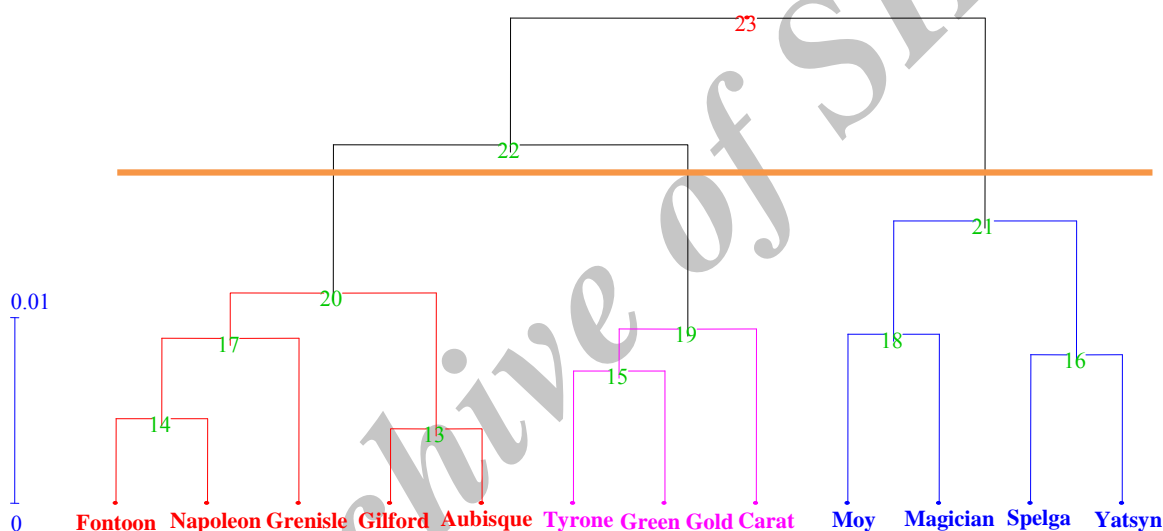
تجزیه خوشه‌ای: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس برای

تشابه بودند. ماتریس تشابه برای گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای (جدول ۵) نشان داد که بیشترین تشابه در بین ژنوتیپ‌های گروه ۲ و ۳ بود. کمترین تشابه در بین ژنوتیپ‌های گروه ۲ و ۱ وجود داشت.

جدول ۵- شباهت گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای

گروه سوم	گروه دوم	گروه اول	گروه
		۱/۰۰۰	گروه اول
	۱/۰۰۰	۰/۷۶۷	گروه دوم
۱/۰۰۰	۰/۷۹۵	۰/۷۷۸	گروه سوم

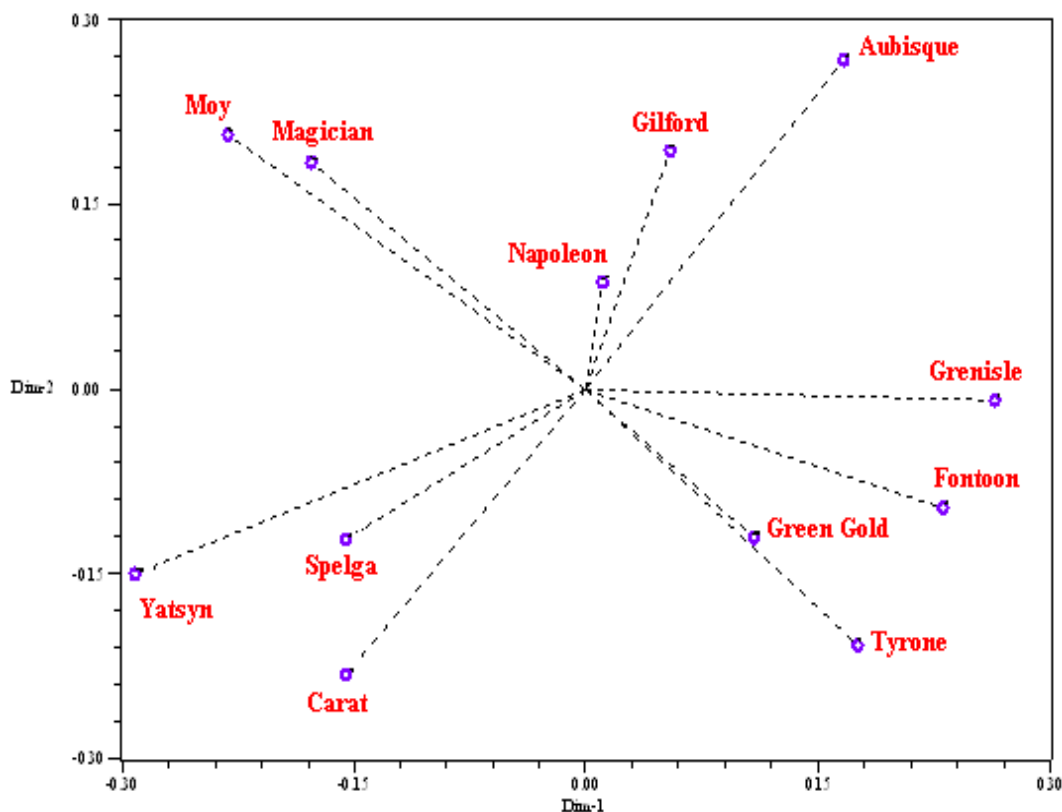
ژنوتیپ‌های Yatsyn (G۱۱)، Spelga (G۱۲)، Magician (G۳) و Moy (G۶) بود، متوسط ضریب تشابه برای ژنوتیپ‌های این گروه ۰/۷۹۳ بود. ژنوتیپ‌های Carat (G۴)، Green Gold (G۲) و Tyrone (G۸) گروه دوم بود، که متوسط ضریب تشابه برای این سه ژنوتیپ ۰/۸۱۹ به دست آمد. گروه سوم شامل پنج ژنوتیپ Aubisque (G۱)، Gilford (G۵)، Grenisle (G۷)، Napoleon (G۹) و Fontoon (G۱۰) بود. برای این گروه متوسط ضریب تشابه این گروه ۰/۸۳۳ بود. بنابراین گروه چهارم دارای بیشترین تشابه بودند و ژنوتیپ‌های گروه اول دارای کمترین



شکل ۵- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر ISSR برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

شدند. با توجه به نمودار ژنوتیپ‌های Magician (G۳) و Moy (G۶) با بیشترین تشابه در یک گروه قرار داشتند و دارای بیشترین فاصله را با ژنوتیپ‌های Green Gold (G۲)، Tyrone (G۸)، Grenisle (G۷) و Fontoon (G۱۰) که در یک گروه قرار داشتند، بودند. همچنین ژنوتیپ‌های G۵، G۱ و G۹ (با تشابه بالا در یک گروه قرار داشتند) با ژنوتیپ‌های Aubisque (G۱)، Gilford (G۵) و Napoleon (G۹) (با تشابه بالا در یک گروه قرار داشتند) بیشترین فاصله ژنتیکی بر اساس بای پلات نشان دادند.

تجزیه به مختصات اصلی (PCo): بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد بررسی تجزیه به مختصات اصلی برای ژنوتیپ‌ها انجام شد، که نتایج نشان داد محور مختصات اول و دوم به ترتیب ۲۴/۵۱ و ۱۹/۲۷ درصد از واریانس موجود را توضیح دادند و در مجموع ۴۳/۷۸ درصد از واریانس با این دو محور بیان گردید. بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی ژنوتیپ‌ها رسم گردید (شکل ۶)، که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای تا حدودی مطابقت داشت و ژنوتیپ‌ها به چهار گروه تقسیم



شکل ۶- بای پلات ژنوتیپها برای نشانگر ISSR بر اساس محور مختصات اصلی اول و دوم

به صورت صحیح انجام گرفته است. نتایج به دست آمده نشان داد که در میان کلاسترها تنوع بیشتر از بین گروهها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون کلاسترها برابر ۸۷ درصد و در بین کلاسترها تنوع برابر ۱۳ درصد مشاهده گردید.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA): تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای انجام شد (جدول ۶)، که ژنوتیپها در داخل ۳ گروه قرار گرفتند بر اساس آماره PhiPT در بین ژنوتیپها در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت به عبارت دیگر گروه‌بندی

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر ISSR

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس برآورد شده	درصد از واریانس	PhiPT
بین گروه	۲	۲۷/۶۳	۱۳/۸۲	۱/۳۲۳	٪۱۳	۰/۱۳۳*
درون گروه	۹	۷۷/۷۰	۸/۶۳	۸/۶۳۳	٪۸۷	
کل	۱۱	۱۰۵/۳۳		۹/۹۵۷	٪۱۰۰	

* اختلاف در سطح ۵٪ معنی‌دار

توان بیان داشت که تنوع ژنتیکی بالایی بر اساس پروتئینهای برگ در بین ژنوتیپها مشاهده نشد. جعفری و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی ارتباط بین تنوع ژنتیکی و توزیع جغرافیایی میان ۱۱ جمعیت وحشی

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده ملاحظه شد که شباهت ژنوتیپها بر اساس پروتئینهای برگ بالا بود و بنابراین می-

بررسی تنوع ژنتیکی ۱۸ جمعیت *Lolium perenne* تونس با استفاده از نشانگر ISSR پرداختند. این نشانگر برای تخمین فاصله ژنتیکی میان ارقام در نظر گرفته شد داده‌های حاصل میزان بالای تنوع ژنتیکی را *Lolium perenne* نشان داد (۱۲). نتایج تنوع ژنتیکی بر اساس مارکر ISSR برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تطابق متوسطی با نتایج مطالعات بیوشیمیایی داشت. بدین شرح که ژنوتیپ‌های Yatsyn (G۱۱)، (G۳) Magician و (G۶) Moy با توجه به تجزیه بیوشیمیایی و تجزیه ISSR در یک گروه قرار داشتند، همچنین ژنوتیپ‌های (G۱) Aubisque و (G۷) Grenisle بر اساس هر دو روش شباهت ژنتیکی داشتند و همچنین ژنوتیپ‌های (G۵) Gilford و (G۹) Napoleon نیز بر اساس هر دو روش در یک گروه بودند. Hu و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی تنوع ژنتیکی *Lolium perenne* با استفاده از نشانگر ISSR برای مقایسه تنوع ژنتیکی مابین واریته‌های تجاری و ژرم پلاس طبیعی که از اروپا، آفریقا، آسیا، و آمریکای شمالی جمع‌آوری شده بودند پرداختند. یک تغییر ژنتیکی نسبتاً بالا در کل مجموعه مشخص شد. نتایج نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی پایین‌تر در واریته‌های تجاری نسبت به ژرم پلاس طبیعی بود. بر اساس ضریب تشابه جاکارد، ۱۲ گروه با یک نقطه برش متمایز شدند (۱۳). بر اساس تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند، که این نتیجه با دیاگرام حاصل از پراکنش ژنوتیپ‌ها بر اساس مقدار مختصات اول و دوم حاصل از تجزیه به مختصات اصلی تا حدودی مطابقت نشان داد، علت اینکه تطابق بالا مشاهده نشد این بود که دو مختصات اول تنها ۴۳/۷۸ درصد از تنوع موجود را توجیه نمود. در مجموع بر اساس آغازگرهای مورد استفاده و با توجه به تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی ژنوتیپ‌های Green (G۲) Gold و (G۸) Tyrone دارای بیشترین فاصله ژنتیکی با ژنوتیپ‌های (G۳) Magician و (G۶) Moy بودند. Pivoriene و همکاران (۲۰۰۸) به بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶ واریته *Lolium perenne* و دو لاین اصلاح شده

Dactylis glomerata توسط پروتئین‌های کل گزارش کردند که همبستگی میان تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی بسیار کم بوده و از لحاظ آماری معنی دار نبوده است (۱). Aiken و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گونه‌های جنس فستوکا و لولیوم را طبقه‌بندی کردند و بیان داشتند که پروفایل باندهای پروتئین با مناطق جمع‌آوری گونه‌ها تطابق نداشت (۴). اما در هر حال گروه‌بندی بر اساس پروتئین‌های برگ تا حدودی دسته‌های متمایزی از ژنوتیپ‌ها را نشان داد که باتوجه به این مسئله می‌توان بیان داشت استفاده از بررسی پروتئین‌های برگ در بررسی تنوع درون گونه‌ای تا حدودی مؤثر است. Lucchese و Dinelli (۱۹۹۹) با استفاده از SDS-PAGE تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای در جنس لولیوم را مورد بررسی قرار دادند و بیان داشتند که استفاده از پروتئین‌ها می‌تواند در جهت ارزیابی تنوع مفید واقع شود (۹). Ahmed (۱۹۹۴) از تکنیک الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌امید برای بررسی ۷ گونه از جنس یونجه استفاده کرد و نتایج حاصل را با استفاده از تجزیه خوشه‌ای تحلیل نمود. او نشان داد که الکتروفورز روشی مؤثر برای ارزیابی روابط فنوتیپی در بین رده‌های انتخاب شده است و این تکنیک به طور وسیعی در مطالعات رده‌بندی جنسها و نیز ارزیابی تنوع بین گونه‌ها و درون گونه‌ها به کار برده می‌شود (۳).

بر اساس مطالعات مولکولی چندشکلی مطلوبی بر اساس مارکر ISSR در بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد. عبدالهی و عزیزی (۱۳۹۳) نیز در مطالعه جمعیت‌های مختلف یونجه چند شکلی بالای نشانگر مولکولی ISSR را گزارش نمودند (۲). مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی‌های گونه چچم دائمی، آغازگرهای IS₉، IS₁₀، IS₁₃ و IS₁₆ بر اساس شاخص PIC تعیین شد، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از صفر تا نیم در نشانگرهای غالب متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد. Ghariani و همکاران (۲۰۰۳) به

واریانس برآورد شده سهم واریانس بین گروهها تنها ۱۳ درصد از تنوع کل بود. Bolaric و همکاران (۲۰۰۵b) به بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم *Lolium perenne* و توصیف رابطه میان ارقام در شرایط اصلاح از راه دور با استفاده از نشانگرهای RAPD پرداختند. تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد تنوع زیادی در درون (۶۶ درصد) و بین ارقام (۳۴ درصد) وجود داشت (۶). Bolaric و همکاران (۲۰۰۵a) به ارزیابی خصوصیت مولکولی از طریق تنوع ژنتیکی در اکوتیپهای لهستانی *Lolium perenne* و مقایسه رابطه این گروه و اکوتیپهای آلمانی و واریته‌های اروپایی پرداختند. در یک آنالیز مشترک با ۱۹ اکوتیپ لهستانی، ۲۲ اکوتیپ آلمانی و ۲۲ واریته اروپایی ۱۷۲ نشانگر پلی‌مورفیک RAPD می‌توان دید. فاصله ژنتیکی میان اکوتیپهای لهستانی متغیر بود. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) تغییرات بیشتری داخل جمعیتها نسبت به بین جمعیتها نشان داد. اکوتیپهای لهستانی شامل بالاترین تغییرات داخل جمعیتی بودند (۵). Vieira و همکاران (۲۰۰۴) به بررسی تعیین خصوصیت تنوع ژنتیکی و ساختار ۴ جمعیت *Lolium multiflorum* با استفاده از نشانگر RAPD پرداختند. مقدار شاخص تنوع ژنتیکی کلی به دست آمده بالا بود، که نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی وسیع در ۴ جمعیت بود. آنالیز ساختار ژنتیکی نشان داد که تنوع داخل جمعیتی بیشتر از تنوع بین جمعیتی بود (۳۳).

Festulolium با استفاده از نشانگر ISSR پرداختند. تشابه ژنتیکی در ماتریس محاسبه شده بین واریته‌های *L. perenne* و *Festulolium* و لاینهای اصلاح شده متغیر بودند. نتایج سطح قابل توجه تنوع ژنتیکی بین واریته‌ها و لاینهای اصلاح شده توسط پلی‌مورفیسم ISSR ناشی از تغییرات نمونه‌های DNA را نشان داد (۲۷). Majidi و Mirlohi (۲۰۱۰) به بررسی تشابه ژنتیکی ۴۲ جمعیت از ۸ گونه ایرانی *Agropyron* و *Bromus Lolium Festuca* با استفاده از نشانگرهای AFLP پرداختند. بیان داشتند که ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد میان جمعیتها متغیر بود که نشان دهنده سطوح بالای تنوع ژنتیکی بین و داخل گونه‌ای است. آنالیز خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی به طور واضح تفاوت میان ذخایر ژنتیکی را نشان داد (۲۰). از کاربردهای تجزیه واریانس مولکولی می‌توان در تعیین تفاوت ژنتیکی بین ژنوتیپها و تعیین حد مطلوب خوشه در تجزیه خوشه‌ای اشاره کرد، به این صورت که در هر گروه در نقطه برش دندروگرام به عنوان یک ژنوتیپ و ژنوتیپهای درون آن به عنوان افراد ژنوتیپ در نظر گرفته می‌شود و برای هر نقطه برش یک تجزیه واریانس انجام می‌گیرد. نقطه‌ای که بیشترین تمایز بین گروهها به وجود می‌آید، به عنوان نقطه مناسب برش دندروگرام انتخاب خواهد شد. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی گروههای حاصل از تجزیه کلاستر مشاهده شد که واریانس بین گروهها در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود، اما بر اساس

منابع

۲- 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 زیست‌شناسی ایران). ۲۷ (۲): ۲۶۰-۲۶۸.

۱- جعفری، ع. ا.، صالحی شانجانی، پ.، کوهی، ل.، بخشی خانیکی، غ. ر.، ۱۳۹۲. بررسی ارتباط بین تنوع ژنتیکی و توزیع جغرافیایی میان ۱۱ جمعیت وحشی *Dactylis glomerata* توسط پروتئینهای کل. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۶ (۳): ۲۷۸-۲۸۸.

3- Ahmed, M F. (1994). A study of the cytotoxicity for conservation of genetic resources of forage legumes (*Medicago species*) in Omayed Biosphere Reserve. Scientific Report, University of Alexandria, Egypt. Blackstock,

W.P., and M.P. Weir, 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular protein. Trends in Biotechnology, 17: 121-127.

4- Aiken, S G., Gardiner, S E., Bassett, CM. H., Wilson, B L., Consau, L. L. (1998). Implications

- from SDS-PAGE analyses of seed proteins in the classification of taxa of *Festuca* and *Lolium* (Poaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 26(5): 511-533.
- 5- Bolaric, S., Barth, S., Melchinger, A E., Posselt, U K. (2005a). Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivar investigated with RAPD markers. *Plant Boching*, 124: 161-166.
 - 6- Bolaric, S., Barth, S., Melchinger, A E., Posselt, U K. (2005b). Molecular characterization of genetic diversity in European germplasm or perennial ryegrass. *Euphytic*, 146: 39-44.
 - 7- Brantestam, A. K, Botheme, R. V, Dayteg, Ch., Rashall, I., Tuveesson, S., Weibull, J. (2004). Inter simple sequence repeat analysis of diversity and relationships in cultivated burly of Nordic and Baltic origin. *Hereditas*, 141: 186-192.
 - 8- Chawla, H S. (2000). *Introduction to Plant Biotechnology*. Science Publishers Inc. USA.
 - 9- Dinelli, G., Lucchese, C. (1999). Comparison between capillary and polyacrylamide gel electrophoresis for identification of *Lolium* species and cultivars. *Electrophoresis*, 20(12): 2524-32.
 - 10- Doyle, j j, Doyle, j l. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull*, 19: 11-15.
 - 11- Fareghi, S. H., Farshadfar, M., Farshadfar, E. (2007). Study of chemical composition and nutrition value of perennial Lucerne (*Medicago sativa* L.) and genetic diversity based on SDS-PAGE markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 15: 196-210. (In Farsi with English abstract).
 - 12- Ghariani, S., Trifi-Farah, N., Chakroun, M., Marghali, S., Marrakchi, M. (2003). Genetic diversity in Tunisian Perennial ryegrass revealed by ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(8): 809-815.
 - 13- Hu, T., Li, H., Li, D., Sun, j., Fu, j. (2011). Assessing genetic diversity of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from four continents by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(83): 19365-19374.
 - 14- Humphreys, M O. (1991). A genetic approach to the multivariate differentiation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. *Heredity*, 66: 437-443.
 - 15- Jung, G A., Kocker, R E., Groos, C F., Berg, C C., Benntt, O L. (1976). Non-structural carbohydrates in the spring herbage of temperate grasses. *Crop Science*, 16: 353-359.
 - 16- Krishnan, H B., Sleper, D A. (1997). Identification of tall fescue cultivars by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of seed protein. *Crop Science*, 37: 215-219.
 - 17- Ladizinsky, G. (1983). Study of evolutionary problems by means of seed protein electrophoresis. "In seed proteins, Biochemistry, Genetics, Nutritive value". (Gottschalk, W., Muller, H. P., eds). P 481-489.
 - 18- Laemmli, U K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
 - 19- Loos, B P. (1993). Morphological variation in *Lolium* (Poaceae) as a measure of species relationships. *Plant Systematic and Evolution*, 188: 87-99.
 - 20- Majidi, M M., Mirlohi, 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. (In Farsi with English abstract).
 - 21- Mirjalili, S A., Bennett, S., Poorazizi, E. (2008). A phenetic analysis on the genus *Lolium* (Poaceae) in Iran. *Plant Systematic and Evolution*, 274: 203-208. (In Farsi with English abstract).
 - 22- Mohammadi, S A., Prasanna, B M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant: Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43: 1235-1248.
 - 23- Moradi, P., 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 (In Farsi with English abstract).
 - 24- Mukhlesur, R. M. D., Hirata, Y. (2004). Genetic diversity in Brassica species using SDS-PAGE analysis. *Journal of Biological Sciences*, 4: 234-238.
 - 25- Parsa, A. (1950). *Flora de l'Iran*. Vol. V. Publication Du Ministere De l'Education. Museum D'Historie Naturele De Tehran.

- 26- Peters, J P., Martinelli, J A. (1989). Hierarchical cluster analysis as a tool manages variation in germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 78: 42-48.
- 27- Pivoriene, O., Pasakinskiene, I. (2008). Genetic diversity assessment in perennial ryegrass and *Festulolium* by ISSR fingerprinting. *Agriculture*, 95(2): 125-133.
- 28- Pivoriene, O., Pašakinskiene, I., Brazauskas, G., Lideikyte, L., Jensen, L. B., Lübberstedt, T. (2008). Inter-simple sequence repeats (ISSR) loci mapping in the genome of *perennial ryegrass*. *Biologija*. 54 (1): 17-21
- 29- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
- 30- Rastegar, M E. (2007). Cultivation of forage crops, Nopardazan Publications, Tehran. (In Farsi with English abstract).
- 31- Surve-Iyer, R S., Adams, G C., Lezzon, A F., Jones, A L. (1995). Isozyme detection and variation in *Ieucostoma* species from *prunus* and *malus*. *Mycologia*, 87: 471-482.
- 32- Tsvelev, N N. (1989). The system of grasses and their evolution. *Botanical Review*, 55(3): 141-204.
- 33- Vieira, E A., Castro, C M., Oliveira, A Cd., Irajá, F., Carvalho, Fd., Zimmer, P D., Martins, L F. (2004). Genetic structure of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by RAPD. *Scientia Agricola*, 61(4): 407-413.

The study of genetic variation for *Lolium perenne* using molecular and biochemical markers

Safari H.¹, Shirvani H.² and Fereidoni L.³

¹ Agriculture and Natural Resources Research Center, Kermanshah, I.R. of Iran

² Agriculture Dept, Payame Noor University, I.R. of Iran

³ Campus of Agriculture and Natural Resources, Ilam University, I.R. of Iran

Abstract

Genetic variations were study for 12 accessions of *Lolium perenne* using molecular and biochemical markers. Soluble proteins were extracted for each population by Laemmli's method and electrophoresis was done using polyacrilamid 12% gel. The numbers of 12 bands were observed for genotypes, which the numbers of 6 bands were polymorph. The highest number of band belonging to Tyrone with 12 bands and the genotype of Green Gold had the lowest number of band (6 bands). The results of cluster analysis and principal coordinate analysis were fall the genotypes in three groups. Genetic variation for accessions were surveyed using the number of 12 ISSR primers, that the number of 10 primers can be scored. The ISSR primers can be produced the number of 62 bands, which the polymorphism was showed for the number of 47 bands. The average of bands was 6.2 for each primer. The primer of IS₉ showed the highest number of band (11 bands) and IS₁₅ showed the lowest number of band (3 bands). A desirable polymorphism between genotype was observed based on ISSR markers, which the primers of IS₉, IS₁₀, IS₁₃ and IS₁₆ were determined for genetic variation study in *Lolium perenne* as desirable primers. Genetic variation based on ISSR marker had a average conformity with the results of protein surveys.

Key words: *Lolium perenne*, Genetic variation, soluble proteins, ISSR marker.