Razi University

Cereal Biotechnology and Biochemistry

Online ISSN: 2783-5170

Cereal Biotechnology and Biochemistry

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

Evaluating the effectiveness of ISSR and leaf soluble proteins markers in investigating the conformity of the genetic diversity of *Agropyron elongatum* genotypes with their geographical distribution

Hooshmand Safari [1]✉ Elnaz Miri [2], Alireza Etminan [3], Hooman Shirvani [4] & Lida Fereidooni [5]

[1]✉ Assistant Professor, Forests and Rangelands Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran. E-mail: hooshmand.safari@gmail.com

[2] Ms. C. Graduated from Islamic Azad University, Kermanshah Branch, Kermanshah, Iran. E-mail: elnazmiri333@gmail.com

[3] Associate Professor, Department of Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. E-mail: alietminan55@yahoo.com

[4] Teacher, Department of Agriculture, Payam Noor University. E-mail: hooman.sh1366@yahoo.com

[5] Ph. D. Student of PlantBreeding, Ilam University, Ilam, Iran. E-mail: l.feridooni@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Genetic erosion increases the vulnerability of plants to environmental and biological stresses. The wild relatives of cultivated plants are undeniably very useful for the modern agricultural breeders in the richness of their vast gene pool, which, according to this genetic diversity, forms the basis of breeding programs and makes it possible to improve plants with desirable traits and characteristics.

Materials and methods: The effectiveness of ISSR and leaf soluble proteins markers in examining the genetic diversity of 12 Agropyron elongatum genotypes collected from different regions of Kermanshah province in the Biotechnology Laboratory of the Research and Education Center of Agriculture and Natural Resources of Kermanshah Province were investigated in 2019.

Results: Based on leaf soluble proteins, 14 bands were observed for genotypes, the highest number of bands were related to genotypes 2G, 5G and 7G with 13 bands and the lowest number of bands were related to 4G with 9 bands. Soluble proteins did not show a high genetic diversity among the studied genotypes and a total 36% of bands were polymorphic. Grouping of genotypes based on soluble proteins showed that genotypes 1G, 5G, 12G and 10G were in the first group, 4G, 3G and 9G were in the second group and 6G, 7G, 8G, 2G and 11G were in the third group. The grouping obtained from the genotypes did not correspond to their geographical distribution and due to the high similarity of the genotypes, no favorable polymorphism was observed with regard to leaf soluble proteins. In total, the soluble proteins did not have the ability to suitable separation within the species for the species of Tall wheatgrass. Based on ISSR primers, a total of 73 bands were observed, of which 70 bands were polymorphic among genotypes. The average percentage of polymorphism among genotypes was 96.25%. The lowest number of bands was related to IS3 primer (3 bands) and the highest number of bands was related to IS5 primer (10 bands). Primers IS3, IS10, IS11, IS13, and IS14 were introduced as suitable primers for investigating the populations of Tall wheatgrass species. The grouping of genotypes based on ISSR data was highly consistent with the geographical distribution of genotypes. The first group included 8G, 9G and 10G, and the genotypes of this group belonged to two cities of Javanrood and Ravansar. The second group included 5G, 6G and 7G. The genotypes of this group belonged to Eslamabad-e Gharb region. The third group was 11G and 12G. This group was also from Harsin region. The fourth group included 1G, 2G, 3G and 4G. The genotypes of this group belonged to Kermanshah. Genotypes from Javanroud and Ravansar had the highest genetic distance with other genotypes, and the genotypes from Harsin had the least genetic distance similarity with the genotypes from Kermanshah.

Conclusion: The ISSR marker was more efficient than the soluble proteins in determining the intraspecies genetic diversity of the studied genotypes, and the genotypes of Javanrud and Ravansar (8G, 9G, and 10G) had the greatest genetic distance with the genotypes of Kermanshah (1G, 2G, 3G, and 4G).

Keywords: *Agropyron elongatum*, Geographical distribution, Soluble proteins, ISSR marker.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 03/04/2022, **Revised:** 09/05/2022, **Accepted:** 16/05/2022, **Published online:** 26/06/2022

Cite this article: Safari, H., Miri, E., Etminan, A., Shirvani, H. & Fereidooni, L. (2022). Evaluating the effectiveness of ISSR and leaf soluble proteins markers in investigating the conformity of the genetic diversity of Agropyron elongatum genotypes with their geographical distribution. Cereal Biotechnology and Biochemistry. 1 (4). 463-480. DOI:10.22126/cbb.2023.8664.1031

© The Author(s).

Publisher: Razi University

10.22126/cbb.2023.8664.1031

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات
شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳
Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

ارزیابی کارایی نشانگرهای ISSR و پروتئین‌های محلول برگ در بررسی تطابق تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *Agropyron elongatum* با پراکنش جغرافیایی آن‌ها

هوشمند صفری [۱] ✉، الناز میری [۲]، علیرضا اطمینان [۳]، هومن شیروانی [۴] و لیدا فریدونی [۵]

[۱] ✉ استادیار، بخش تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: hooshmand.safari@gmail.com

[۲] دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. رایانامه: elnazmiri333@gmail.com

[۳] دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: alietminan55@yahoo.com

[۴] مدرس، گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور. رایانامه: hooman.sh1366@yahoo.com

[۵] دانشجوی دکترای ژنتیک و به نژادی گیاهی دانشگاه ایلام، ایلام، ایران. رایانامه: l.feridooni@gmail.com

چکیده

مقدمه: فرسایش ژنتیکی آسیب‌پذیری گیاهان را به تنش‌های محیطی و زیستی افزایش می‌دهد. خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی به‌صورت انکار ناپذیری در افزایش غنای خزانه ژنی برای به‌نژادگران مفید هستند به‌طوری‌که با توجه به این تنوع ژنتیکی، پایه و اساس برنامه‌های به‌نژادی شکل می‌گیرد و اصلاح گیاهان با خصوصیات مطلوب فراهم می‌گردد.

مواد و روش‌ها: کارایی نشانگرهای ISSR و پروتئین‌های محلول برگ در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲ ژنوتیپ از گونه *Agropyron elongatum* جمع آوری شده از مناطق مختلف استان کرمانشاه در آزمایشگاه زیست فناوری مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه در سال ۱۳۹۹ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس پروتئین‌های محلول برگ تعداد ۱۴ نوار برای ژنوتیپ‌ها مشاهده شد، که بیشترین تعداد نوار مربوط به ژنوتیپ‌های G۲، G۵ و G۷ با ۱۳ نوار و کمترین تعداد نوار مربوط به G۴ با ۹ نوار بود. پروتئین‌های محلول تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان ندادند و در مجموع ۳۶ درصد از نوارهای حاصل چندشکل بودند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس پروتئین‌های محلول نشان داد که ژنوتیپ‌های G۱، G۵، G۱۲ و G۱۰ در گروه اول، G۴، G۳ و G۹ در گروه دوم و G۶، G۷، G۸، G۲ و G۱۱ در گروه سوم قرار گرفتند. گروه‌بندی بدست آمده از ژنوتیپ‌ها با پراکنش جغرافیایی آنها مطابقت نداشت و با توجه به شباهت بالای ژنوتیپ‌ها، چندشکلی مطلوبی در پروتئین‌های محلول برگ مشاهده نشد. در مجموع پروتئین‌های محلول توانایی تفکیک درون گونه‌ای مناسبی برای گونه‌ی علف گندمی پابلند نداشتند. بر اساس آغازگرهای ISSR در مجموع تعداد ۷۳ نوار مشاهده شد، که ۷۰ نوار در بین ژنوتیپ‌ها چندشکل بودند. متوسط درصد چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها ۹۶/۲۵٪ بود. کمترین تعداد نوار مربوط به آغازگر IS_3 (۳ نوار) و بیشترین تعداد نوار مربوط به آغازگر IS_5 (۱۰ نوار) بود. آغازگرهای IS_3، IS_{10}، IS_{11}، IS_{13} و IS_{14} به‌عنوان آغازگرهای مناسب برای بررسی جمعیت‌های گونه‌ی علف گندمی پابلند معرفی شدند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های ISSR تا حد بالایی با پراکنش جغرافیایی ژنوتیپ‌ها تطابق داشت. گروه اول شامل G۸، G۹ و G۱۰ بودند که ژنوتیپ‌های این گروه متعلق به دو شهرستان جوانرود و روانسر بودند. گروه دوم شامل G۵، G۶ و G۷ بودند. ژنوتیپ‌های این گروه متعلق به منطقه‌ی اسلام آباد غرب بودند. گروه سوم G۱۱ و G۱۲ بودند. این گروه نیز از شهرستان هرسین بودند. گروه چهارم شامل G۱، G۲، G۳ و G۴ بودند ژنوتیپ‌های این گروه متعلق به شهرستان کرمانشاه بودند. ژنوتیپ‌های شهرستان‌های جوانرود و روانسر بیشترین فاصله‌ی ژنتیکی با دیگر ژنوتیپ‌ها داشتند و ژنوتیپ‌های شهرستان هرسین کمترین فاصله‌ی ژنتیکی را با ژنوتیپ‌های شهرستان کرمانشاه داشتند.

نتیجه‌گیری: نشانگر ISSR کارایی بهتری نسبت به پروتئین‌های محلول در تعیین تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای ژنوتیپ‌های مورد بررسی داشت و ژنوتیپ‌های شهرستان‌های جوانرود و روانسر (G۸، G۹ و G۱۰) بیشترین فاصله‌ی ژنتیکی را با ژنوتیپ‌های شهرستان کرمانشاه (G۱، G۲، G۳ و G۴) داشتند.

واژه‌های کلیدی: *Agropyron elongatum*، پراکنش جغرافیایی، پروتئین‌های محلول، نشانگر ISSR.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۲ **اصلاح:** ۱۴۰۱/۰۹/۱۸ **پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۹/۲۵، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۱/۱۰/۰۵

استناد: صفری، ه.، میری، ا.، اطمینان، ع. ر.، شیروانی، ه. و فریدونی، ل. (۱۴۰۱). ارزیابی کارایی نشانگرهای ISSR و پروتئین‌های محلول برگ در بررسی تطابق تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *Agropyron elongatum* با پراکنش جغرافیایی آن‌ها. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات. ۱ (۴). ۴۸۰-۴۶۳.

DOI: 10.22126/cbb.2023.8664.1031

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

مقدمه

گراس‌ها علاوه بر اینکه مورد چرا قرار می‌گیرند، ممکن است برداشت شده و جهت تغذیه دام به صورت خشک شده یا سیلو شده مورد استفاده قرار گیرند. (Sanadgol, 1996). جنس آگروپیرون از گیاهان مهم مرتعی ایران است و متعلق به طایفه Triticeae می‌باشد که موضوع تحقیقات وسیعی در زمینه ژنتیکی، سیتوژنتیکی و بیوسیستماتیک بوده است. علاوه بر اهمیت علوفه‌ای گراس‌ها که در احیای مراتع بسیار مورد توجه است، در سال‌های اخیر افزایش گرایش در استفاده از این خویشاوندان وحشی برای اصلاح گندم به‌طور قابل ملاحظه‌ای اصلاح گران را به جمع آوری چنین موادی ترغیب کرده است. چرا که برخی از این گیاهان دارای صفات با ارزشی برای اصلاح گندم می‌باشند که از میان آنها می‌توان تحمل خشکی، شوری، سرما، بیماری‌های گیاهی و غیره را نام برد. جنس آگروپیرون تقریباً در کلیه مراتع ایران وجود دارد. این گیاه علفی و دایمی است و حدود ۱۸ گونه از آن به‌خصوص در مناطق غربی، مرکزی و شمال غرب ایران گزارش شده است. این گیاه از نظر دامپروری و تغذیه دام نیز گیاه ارزشمندی است (Safari *et al*., 2016).

در بین گونه‌های جنس آگروپایرون، علف گندمی بلند[1] (*Agropyron elongatum*) با توجه به مقاومت به کم آبی، نیاز غذایی کم، آفات و امراض کمتر، چند ساله بودن و تولید ماده خشک بالا، معادل ذرت علوفه‌ای و به‌عنوان یک جایگزین برای آن معرفی شده است (Dickeduisberg *et al*., 2017). این گونه بومی مرغزارهای شور و سواحل دریا در جنوب غرب اروپا و خاورمیانه است (Heidari Sharif abad & Dorri, 2003)، همچنین گیاهی است مقاوم به سرما و یخبندان که عمدتاً برای چراگاه‌های دست کاشت و تولید علوفه استفاده می‌شود. تولید بذر آن زیاد، استقرار آن آسان، دیررس بودن، دوره رشد طولانی، سبز بودن در طی تابستان و گاهی در پاییز از مزایای دیگر این گیاه است. برگ‌های گیاه دارای سیلیس است که موجب کاهش میل و رغبت دام به آن می‌شود. بنابراین خوش‌خوراکی آن نسبت به سایر گونه‌های این جنس پائین‌تراست (Jouri & Mahdavi, 2010).

جایگزینی ارقام متنوع بومی با تعداد محدودی از ارقام اصلاح شده پرمحصول که غالبا دارای ساختار ژنتیکی یکنواخت و تا حدودی مشابه هستند، به همراه گسترش سیستم‌های پیشرفته زراعی موجب کاهش تنوع ژنتیکی لازم برای بسیاری از صفات مهم محصولات مختلف زراعی شده است. فرسایش ژنتیکی آسیب پذیری گیاهان را به تنش های محیطی و زیستی افزایش می‌دهد. خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی به‌صورت انکارناپذیری در غنای خزانه ژنی برای به نژادگران کشاورزی مدرن مفید هستند (Aghaei Sabarze, 2010)، بر همین اساس تنوع ژنتیکی پایه و اساس برنامه‌های به‌نژادی محسوب شده و اصلاح گیاهان با صفات و

[1] - Tall wheat grass

خصوصیات مطلوب را ممکن می‌سازد (Shirzad *et al*., 2021).

تجزیه و تحلیل چندشکلی را می‌توان با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی، سیتولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام داد. در ابتدا، نشانگرهای مورفولوژیکی برای تجزیه و تحلیل چندشکلی استفاده شد و همچنان نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.. پس از آن، تفاوت‌های سیتولوژیکی و بیوشیمیایی که در ژنوتیپ‌های یک گونه رخ می‌دهد، در ارزیابی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت (Safari *et al*., 2022) و در ادامه ظهور ابزارهای ژنومی، نشانگرهای مولکولی به روش انتخابی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی تبدیل شدند (Bhandari *et al*., 2017). هر یک از این نشانگرها دارای نقاط ضعف و قوتی است، که باید به موقع و مناسب از آنها استفاده شود (Farshadfar & Farshadfar, 2004).

نشانگرهای ISSR توالی‌های تکثیر شده نواحی از DNA هستند که بین توالی‌های دو ریزماهواره قرار دارند. در این روش از قطعات تکراری SSR همراه با بازهای انتخابی در انتهای آن‌ها به عنوان آغازگر استفاده می‌شود. بنابراین آغازگرهای ISSR از روی توالی‌های ریزماهواره‌ای موجود در ژنوم برای هر گونه یا نژاد طراحی می‌شوند. از آنجائیکه ریزماهواره‌ها در طول ژنوم پراکنده شده‌اند، آغازگرهای ISSR تمام سطح ژنوم را تحت پوشش قرار می‌دهند. روش ISSR دارای این امتیاز است که محصولات PCR حاصل از این نشانگر را علاوه بر ژل اکریل آمید می‌توان بر روی ژل آگارز هم تفکیک کرد. از آنجا که ریزماهواره‌ها در نقاط مختلف ژنوم واقع شده‌اند، بنابراین نوارهای مختلفی با اندازه‌های متفاوت بر روی ژل حاصل می‌شود (Borem & Fritch-neto, 2014). تکنیک ISSR یک راه سریع، ساده و ارزان برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، شناسایی ارقام تقریباً خویشاوند و مطالعه فرآیندهای تکاملی نظیر سیستم های تولید مثلی و جریان ژن می‌باشد (Gonzalez *et al*., 2005). نتایج تحقیقات نشان داده است که در گونه‌های مختلف جنس علف گندمی و سایر جنس‌ها نشانگر ISSR توانایی بالایی در بررسی‌های تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای داشته است (Shirvani *et al*., 2014; Moradi *et al*., 2015; Zarafshani *et al*., 2020; Farshadfar *et al*., 2018; Safari *et al*., 2022; Rostami-Ahmadvandi *et al*., 2013, 2016; Zebarjadi *et al*., 2016).

پروتئین‌های گیاهی شامل دو گروه پروتئین‌های غیر ساختاری یا آنزیم‌ها و پروتئین‌های ذخیره‌ای می‌باشد که با استفاده از روش‌های الکتروفورتیک می‌توانند در بررسی تفاوت‌ها و شباهت‌های درون و بین گونه‌ای کاربرد داشته باشند (Safari *et al*., 2017). یکی از مزایای نشانگرهای پروتئینی نسبت به نشانگرهای مورفولوژیک، عدم تاثیرپذیری آنها از شرایط محیطی است (Farshadfar & Farshadfar, 2004). بر همین اساس توانایی نشانگرهای پروتئینی در بررسی تنوع ژنتیکی گراس‌های مرتعی مختلف گزارش شده است (Afkar *et al*., 2010; Safari *et al*., 2017, 2022). با توجه به مطالب بیان شده هدف از تحقیق حاضر

بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲ جمعیت از گونه *Agropyron elongatum* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و پروتئین‌های ذخیره‌ای برگ بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد آزمایش

تنوع ژنتیکی ۱۲ جمعیت از گونه *Agropyron elongatum* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان کرمانشاه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و پروتئین‌های محلول برگ مورد بررسی قرار گرفت. مشخصات مواد ژنتیکی مورد مطالعه، با ذکر کد و محل جمع‌آوری در جدول ۱ ارائه شده است. لازم به ذکر است تحقیقات آزمایشگاهی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه انجام شد.

جدول ۱- لیست ژنوتیپ‌های *Agropyron elongatum* مورد مطالعه.

Table 1. List of studied *Agropyron elongatum* genotypes

ناحیه	شهرستان	کد
فیروزآباد	کرمانشاه	G1
ماهیدشت	کرمانشاه	G2
مرکزی	کرمانشاه	G3
کوزران	کرمانشاه	G4
شیان	اسلام آباد غرب	G5
حسن آباد	اسلام آباد غرب	G6
حمیل	اسلام آباد غرب	G7
مرکزی	جوانرود	G8
مرکزی	روانسر	G9
حومه	روانسر	G10
مرکزی	هرسین	G11
حومه	هرسین	G12

بررسی پروتئین‌های محلول برگ:

برای 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. در مرحله بعد، مخلوط به دست آمده در

لوله‌های آزمایش ریخته و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. عصاره حاصل، به منظور صاف کردن با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول صاف شده رویی جدا شده و با محلول بافر نمونه به نسبت ۱ به ۱ مخلوط گردید. سرانجام محلول مخلوط شده به میکروتیوپ منتقل و در دستگاه بن‌ماری در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه گرم شد. نمونه‌ها تا زمان مصرف در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Laemmli,1970). الکتروفورز به روش ژل پلی اکریل امید به صورت ژل پایینی (۱۲ درصد) و ژل بالایی یا متراکم کننده (چهار درصد) انجام شد. میزان ۷۰ میکرولیتر پروتئین نمونه به داخل چاهک تزریق شد و سیستم الکتروفورز به منبع تغذیه وصل گردید. هنگامی که نمونه در داخل ژل فوقانی قرار داشت، از ولتاژ ثابت ۱۱۰ و بعد از ورود نمونه به داخل ژل جداکننده، از ولتاژ ۱۳۰ به مدت پنج ساعت استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز، به منظور مشاهده نوارهای پروتئینی، رنگ آمیزی با استفاده از کوماسی بلو[۲] به مدت یک ساعت انجام شد. در پایان،جهت آشکار شدن نوارهای پروتئینی، از محلول رنگ بر در چند مرحله به مدت یک ساعت استفاده شد (Safari *et al.*, 2017).

بررسی DNA با نشانگر ISSR:

از روش CTAB تغییر یافته (Doyle & Doyle, 1987) به‌منظور استخراج DNA برای ژنوتیپ‌ها استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش اسپکتروفتومتری مشخص شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الگو، دو میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۰۵ میلی مولار از هر dNTP، ۰/۲ میکرو مول آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerese و بافر واکنش به غلظت ۱x) انجام شد. فهرست آغازگرهای ISSR مورد استفاده در جدول ۲ آمده است. چرخه حرارتی شامل مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت پنج دقیقه و ۴۰ چرخه تکثیر 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 پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ژل آگارز دو درصد با بافر TBE (۱x) استفاده شد. در ادامه، میزان پنج میکرولیتر بافر نمونه گذاری به DNAهای تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز بارگذاری و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت (Safari *et al.*, 2017). رنگ آمیزی ژل با استفاده از Safe view انجام شد

۲- Coomassie blue

و از دستگاه Gel Document جهت مشاهده و عکس برداری نوارها استفاده شد. در جدول شماره ۲، توالی آغازگرهای مورد استفاده به همراه کد آغازگر و شماره آن‌ها ارائه شده است. لازم به توضیح است که آغازگرهای مذکور در مطالعات قبلی انجام شده روی گونه‌های جنس آگروپایرون نتایج مطلوبی داشته‌اند (Shirvani *et al*., 2014; Farshadfar *et al*., 2018; safari *et al*., 2022).

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گونه علف گندمی پابلند

Table 2. ISSR primers used for analysis of genetic diversity in *Agropyron elongatum* genotypes

شماره آغازگر Primer number	کد آغازگر Primer code	توالی آغازگر Primer sequence
P_1	IS_3	5' GAGAGAGAGAGAGAGAYC 3'
P_2	IS_5	5' AGAGAGAGAGAGAGAGC 3'
P_3	IS_6	5' GAGAGAGAGAGAGAGA C 3'
P_4	IS_7	5' GTGTGTGTGTGTGTGTC 3'
P_5	IS_9	5' CTCTCTCTCTCTCTCTG 3'
P_6	IS_{10}	5' GAGAGAGAGAGAGAGARC 3'
P_7	IS_{11}	5' ACACACACACACACACC 3'
P_8	IS_{12}	5' TGTGTGTGTGTGTGTGG 3'
P_9	IS_{13}	5' AGAGAGAGAGAGAGAGYT 3'
P_{10}	IS_{14}	5' GACAGACAGACAGACA 3'
P_{11}	IS_{15}	5' GGATGGATGGATGGAT 3'
P_{12}	IS_{16}	5'DBDACACACACACACACA3'

به منظور استفاده از اطلاعات الکتروفورزی در تجزیه‌های آماری، نتایج حاصل برای پروتئین و آغازگرهای ISSR مورد استفاده، بر اساس داشتن نوار (کد یک) یا نداشتن نوار (کد صفر)، کدبندی شدند. پارامترهای نشانگری برای آغازگرهای مورد استفاده با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (Kumar *et al*., 2009; Altıntas *et al*., 2008; Mohammadi & Prasanna, 2003).

درصد چندشکلی = (تعداد کل مکان‌ها/تعداد مکان‌های چندشکل)×۱۰۰

محتوای اطلاعات چندشکلی = $1-\sum pi2$ (p = مجموع نوارهای هر مکان برای کلیه ژنوتیپ‌ها)

نسبت چندگانه موثر = تعداد مکان‌های چندشکل×درصد چندشکلی

شاخص نشانگر = تعداد مکان‌های چندشکل×محتوای اطلاعات جندشکلی

قدرت تفکیک $RP=\sum IB$; $IB=1-[2\times(0.5-Pi)]$ (Pi=نسبت افراد دارای نوار)

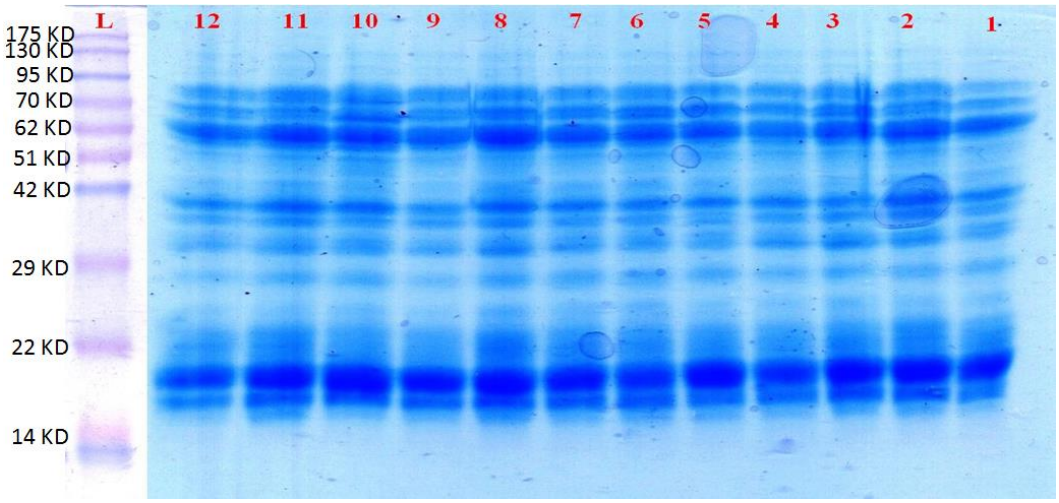
تجزیه خوشه‌ای و ماتریس تشابه بر مبنای ضریب جاکارد با استفاده از نرم افزار Darwin و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم افزار GenAlEx 6.2 و بر اساس ضرایب دایس انجام گرفت (Powell *et al*., 1996).

نتایج

نتایج بررسی پروتئین‌های محلول برگ

در شکل ۱ نوارهای حاصل از الکتروفورز ژل پروتئین‌های استخراج شده از برگ ژنوتیپ‌های مورد بررسی ارائه شده و بر همین اساس وجود یا عدم وجود نوار برای هر ژنوتیپ بر اساس کد بندی صفر و یک نشان داد که، اگر چه نوارهای پروتئینی مشترک زیادی در داخل ژنوتیپ‌های مورد بررسی وجود داشت، اما در بعضی موارد نیز ژنوتیپ‌ها فاقد بعضی از نوارها بودند. در مجموع تعداد ۱۴ نوار برای ۱۲ ژنوتیپ مورد بررسی مشاهده شد، که بیشترین تعداد نوار مربوط به ژنوتیپ‌های G۲، G۵ و G۷ با ۱۳ نوار و کمترین تعداد نوار مربوط به ژنوتیپ G۴ با ۹ نوار بود. بنابراین به خوبی مشخص است که تنوع بالایی برای نوارهای پروتئینی در بین ژنوتیپ‌ها وجود نداشت.

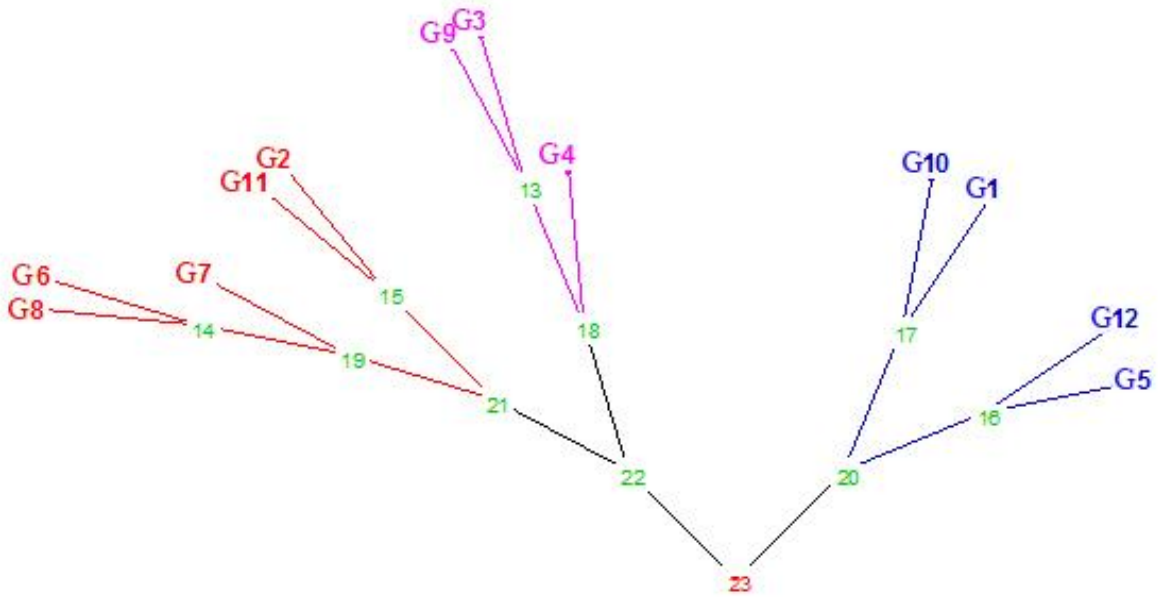
همچنین از ۱۴ نوار حاصل تعداد ۵ نوار چند شکل بود و در ۹ نوار نیز چند شکلی مشاهده نشد. علاوه بر این نوارهای پروتئینی نه تنها از نظر محل قرار گرفتن روی ژل و وزن مولکولی، بلکه از لحاظ تراکم و شدت نیز با یکدیگر اختلاف نشان دادند.



شکل ۱- تصویر الکتروفورز پروتئین‌های محلول برگ ژنوتیپ‌های گونه علف گندمی پابلند مورد مطالعه.

Figure 1. Electrophoresis image of leaf soluble proteins for studied genotypes of *Agropyron elongatum*

تجزیه خوشه‌ای برای ژنوتیپ‌ها به‌منظور گروه‌بندی آنها بر اساس تنوع نوارهای پروتئینی بر اساس ضریب جاکارد و با روش UPGMA صورت گرفت (شکل ۲) که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به ۳ دسته تقسیم شدند بطوری که گروه اول شامل ژنوتیپ‌های G۱، G۵، G۱۲ و G۱۰ بود. ژنوتیپ‌های G۴، G۳ و G۹ در گروه دوم قرار داشتند و ژنوتیپ‌های G۶، G۷، G۸، G۲ و G۱۱ در گروه سوم قرار داشتند. همچنانکه ملاحظه می‌گردد، گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس نوارهای پروتئینی تا حدودی توانست ژنوتیپ‌ها را در سه گروه متمایز قرار دهد و آنها را از هم تفکیک نماید بنابراین تنوع‌ژنتیکی بر اساس پروتئین‌های ذخیره‌ای برگ در ژنوتیپ‌های مورد بررسی وجود داشت. هرچند به نظر می‌رسد احتمالاً به‌دلیل تعداد کم ژنوتیپ‌ها تنوع ژنتیکی قابل توجه‌ی مشاهده نگردید.



شکل ۲- نمودار حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گونه علف گندمی پابلند بر اساس پروتئین‌های محلول در آب با روش UPGMA و با استفاده ازضریب فاصله جاکارد.

Figure 2. The graph obtained from the cluster analysis of *Agropyron elongatum* genotypes based on water-soluble proteins using UPGMA method and Jaccard's distance coefficient

ماتریس تشابه بر مبنای ضریب جاکارد برای نوارهای حاصل از الکتروفورز پروتئین برگ ژنوتیپ‌ها محاسبه شد و در جدول ۳ ارائه شده است. میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/۸۹ بود که بالا بودن تشابه بیانگر شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها برای پروتئین‌های ذخیره‌ای برگ بود و ضریب تشابه از ۱/۰۰۰ تا ۰/۷۸ متغیر بود. بیشترین تشابه بین ژنوتیپ‌های G۳ و G۹ و همچنین بین دو ژنوتیپ G۶ و G۸ مشاهده گردید، با ضریب تشابه ۱ و کمترین تشابه بین ژنوتیپ‌های G۷ و G۱ با ضریب تشابه ۰/۷۸ بود.

با توجه به نتایج بدست آمده ملاحظه شد که شباهت ژنوتیپ‌ها بر اساس پروتئین‌های برگ بالا بود و بنابراین می‌توان بیان داشت که تنوع‌ژنتیکی بالایی بر اساس پروتئین‌های برگ در بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نمی‌گردد. اما در هر حال گروه‌بندی بر اساس پروتئین‌های برگ تا حدودی دسته‌های متمایزی از ژنوتیپ‌ها را نشان داد که با توجه به این مسئله می‌توان بیان داشت استفاده از بررسی پروتئین‌های برگ در بررسی تنوع درون گونه‌ای تا حدودی موثر است.

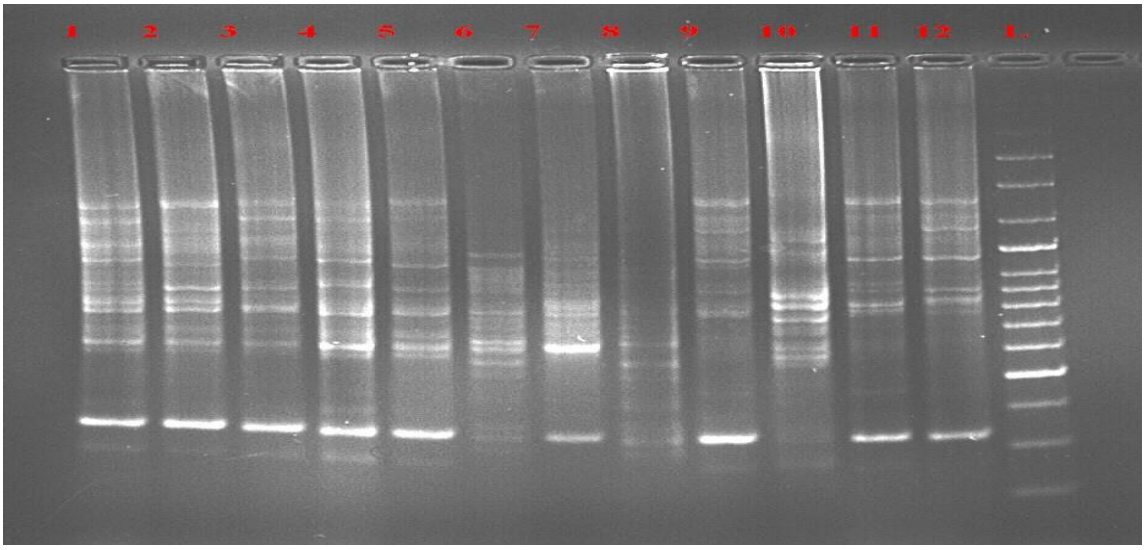
جدول ۳- ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های گونه علف گندمی پابلند بر اساس پروتئین‌های برگ با روش جاکارد.

Table 3. Similarity matrix between *Agropyron elongatum* genotypes based on leaf proteins using Jaccard's method

ژنوتیپ Genotype	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
G1	1.00											
G2	0.87	1.00										
G3	0.90	0.87	1.00									
G4	0.95	0.82	0.95	1.00								
G5	0.87	0.92	0.87	0.82	1.00							
G6	0.86	0.92	0.95	0.90	0.92	1.00						
G7	0.78	0.92	0.87	0.82	0.92	0.92	1.00					
G8	0.86	0.92	0.95	0.90	0.92	1.00	0.92	1.00				
G9	0.90	0.87	1.00	0.95	0.87	0.95	0.87	0.95	1.00			
G10	0.95	0.83	0.86	0.90	0.92	0.82	0.83	0.82	0.86	1.00		
G11	0.91	0.96	0.91	0.86	0.88	0.87	0.88	0.87	0.91	0.87	1.00	
G12	0.91	0.88	0.82	0.86	0.96	0.87	0.88	0.87	0.82	0.96	0.83	1.00

نتایج حاصل از بررسی‌های DNA

آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۷۳ نوار تولید کنند که از این تعداد، ۳ نوار یک شکل مشاهده شد و سایر نوارها چند شکل بودند. میانگین تعداد نوار تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۲ ژنوتیپ برابر ۶/۰۸ بود. آغازگرهای IS5، IS13 و IS11 به ترتیب با ۱۰ و ۹ نوار بیشترین تعداد و آغازگر IS3 با ۳ نوار کمترین تعداد نوار را نشان دادند. ژنوتیپ G۱۲ بیشترین نوار (۵۷ نوار) و ژنوتیپ G۵ کمترین نوار (۳۶ نوار) را در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی داشتند شکل ۱ الگوی نواری ۱۲ ژنوتیپ مورد بررسی با استفاده از آغازگرهای IS13 را نشان می‌دهد.



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورزی ژنوتیپ‌های مورد بررسی گونه علف گندمی پابلند برای آغازگر IS_{14}.

Figure 3. Gel electrophoresis image of genotypes studied of *Agropyron elongatum* using IS_{14} primer

نتایج به‌دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۴ ارائه شده است. میانگین درصد چند شکلی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر ۹۶/۲۵ بود که کمترین درصد چند شکلی را آغازگرهای IS6 (۷۵٪) و IS7 (۸۰٪) و برای سایر آغازگرها میزان چند شکلی برابر ۱۰۰٪ بود. میانگین PIC در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۰/۴۱ بود که بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگر IS3 بود که این آغازگر بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص PIC توانست فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص کنند. آغازگر IS6 با کمترین میزان PIC توانایی خوبی در جداسازی ژنوتیپ‌ها نداشتند. در مجموع پیشنهاد می‌گردد از آغازگرهای IS3، IS10، IS11، IS13 و IS14 که شاخص PIC درصد چند چندشکلی بالایی را نشان دادند، برای آنالیز مجموعه ژرم‌پلاسم دیگر ژنوتیپ‌های آگروپیرون در تحقیقات بعدی استفاده کرد.

آغازگرهای IS6 و IS15 با کمترین میزان PIC در جداسازی ژنوتیپ‌ها نداشتند.

بهترین شاخص برای انتخاب پرایمر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد دارای نوار و هم تعداد آلل تاثیرپذیری دارد. میانگین شاخص RP برابر ۶/۰۱ بود که پرایمرهای IS5، IS11 و IS13 بیشترین میزان و پرایمر IS3 دارای کمترین میزان بودند. همچنین میانگین شاخص‌های MI و EMR به‌ترتیب برابر ۲/۴۶ و ۵/۸۵ بود. بیشترین میزان MI و EMR را پرایمرهای IS5، IS11 و IS13 و کمترین میزان را پرایمر های IS3 و IS6 داشتند.در حالت کلی با توجه به کلیه شاخص‌ها پرایمرهای IS11 و IS13 به عنوان بهترین آغازگرها جهت بررسی تنوع ژنتیکی علف گندمی پابلند در این تحقیق معرفی می‌شوند.

جدول ۴- پارامترهای نشانگری برای آغازگرهای ISSR مورد استفاده در ژنوتیپ‌های گونه علف گندمی پابلند

Table 4. Marker parameters of ISSR primers used for diversity analysis of *Agropyron elongatum* genotypes

کد آغازگر Primer code	تعداد مکان‌های تکثیر شده Number of amplified loci	تعداد مکان‌های چندشکل Number of polymorphism loci	درصد چندشکلی polymorphism percentage	محتوای اطلاعات چندشکلی polymorphism information content	شاخص نشانگر Marker index	نسبت چندگانه موثر Effective Multiplex Ratio	قدرت تفکیک Resolving Power
IS3	3	3	100	0.49	1.46	3.00	2.83
is5	10	10	100	0.36	3.61	10.00	11.33
is6	4	3	75	0.32	0.96	2.25	3.67
is7	4	3	80	0.36	1.81	4.00	4.00
is9	6	6	100	0.37	2.24	6.00	5.17
is10	6	6	100	0.44	2.64	6.00	5.67
is11	9	8	88.88	0.42	4.18	7.11	8.17
is12	5	5	100	0.40	2.01	5.00	6.50
is13	9	9	100	0.44	3.96	9.00	7.50
is14	5	5	100	0.46	2.29	5.00	5.83
is15	4	4	100	0.35	1.39	4.00	5.00
is16	7	7	100	0.43	3.01	7.00	5.50
میانگین Average	6	5.83	96.25	0.41	2.46	5.85	6.01

تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از ۰/۳۰۲ تا ۰/۸۲۹ متغیر بود (جدول ۵)، میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/۵۶۷ بود که پایین بودن تشابه ژنتیکی یاد شده نشان دهنده تنوع ژنتیکی خوب و قابل قبولی در بین ژنوتیپ‌های علف گندمی پابلند بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. بیشترین تشابه را ژنوتیپ‌های G۱ با G۲ و کمترین تشابه را ژنوتیپ G۴ با G۸ داشتند.

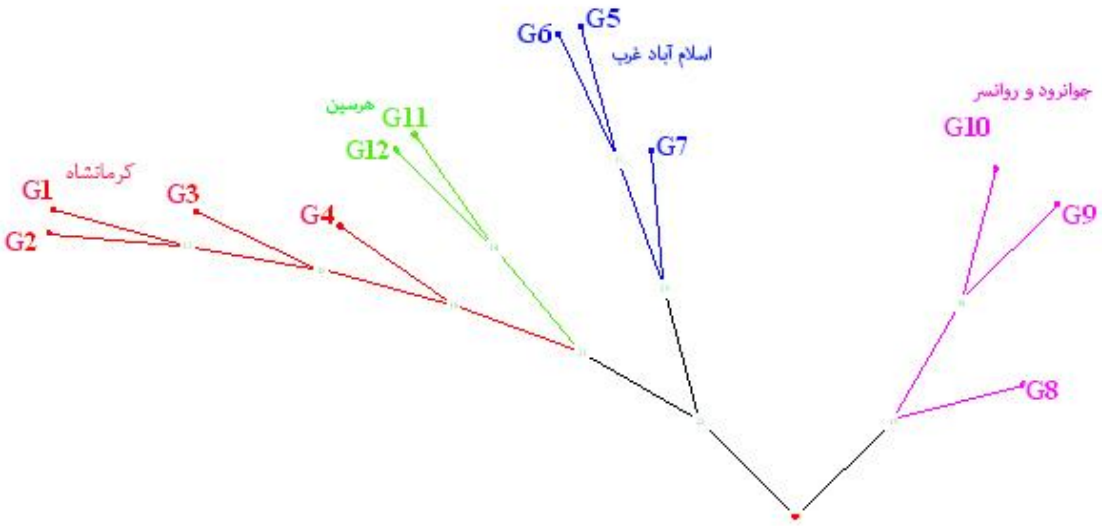
جدول ۵- ماتریس تشابه ژنوتیپ‌های گونه علف گندمی پابلند برای پرایمرهای ISSR استفاده شده بر اساس ضریب جاکارد.

Table 5. Similarity matrix of *Agropyron elongatum* genotypes for ISSR primers based on Jaccard's coefficient

ژنوتیپ Genotype	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
G1	1.00											
G2	0.83	1.00										
G3	0.80	0.73	1.00									
G4	0.67	0.70	0.73	1.00								
G5	0.55	0.51	0.69	0.67	1.00							
G6	0.48	0.55	0.57	0.56	0.66	1.00						
G7	0.59	0.53	0.70	0.49	0.57	0.58	1.00					
G8	0.47	0.48	0.40	0.30	0.35	0.59	0.57	1.00				
G9	0.57	0.56	0.58	0.42	0.47	0.56	0.52	0.58	1.00			
G10	0.59	0.54	0.51	0.37	0.39	0.53	0.57	0.61	0.65	1.00		
G11	0.58	0.53	0.64	0.64	0.62	0.49	0.56	0.42	0.61	0.51	1.00	
G12	0.62	0.59	0.63	0.65	0.55	0.49	0.52	0.42	0.69	0.58	0.82	1.00

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای ژنوتیپ‌ها در شکل ۴ ارا ئه شده است. چنانکه ملاحظه می‌گردد ژنوت یپ ها در ۴ گروه قرار گرفتند. که این گروهبندی تا حد بالایی با پراکنش جغرافیایی ژنوتیپ‌ها تطابق داشت. گروه اول شامل ژنوت یپ- های G۸، G۹ و G۱۰ بود، متو سط ضریب ت شابه برای ژنوتیپ‌های این گروه ۰/۶۱ بود. ژنوتیپ‌های این گروه متعلق به دو شهرستان جوانرود و روانسر بودند که از ن ظر فا صله‌ی جغرافیایی همجوار همدیگر هستند. ژنوتیپ‌های این گروه با سه گروه دیگر فاصله‌ی بالایی داشتند و از لحاظ اقلیمی ن یز این دو منطقه تفاوت بالایی با سه منطقه‌ی دیگر دارند. گروه دوم شامل ژنوت یپ های G۵، G۶ و G۷ بود، که متو سط ضریب ت شابه برای ا ین سه ژنوت یپ ۰/۶۰ به‌د ست آ مد. ژنوتیپ‌های گروه سوم همگی متعلق به منطقه‌ی اسلام آ باد

غرب بودند. گروه سوم شامل ۲ ژنوتیپ G۱۱ و G۱۲ بود. برای این گروه ضریب تشابه ۰/۸۲ به دست آمد. این گروه نیز شامل دو ژنوتیپ از شهرستان هرسین بود که با ژنوتیپ‌های گروه چهارم شباهت بیشتری داشتند. گروه چهارم شامل ۴ ژنوتیپ G۱، G۲، G۳ و G۴ بود با متوسط ضریب تشابه ۰/۷۴ بود. ژنوتیپ‌های این گروه نیز متعلق به شهرستان کرمانشاه بودند و با ژنوتیپ‌های شهرستان هرسین فاصله‌ی ژنتیکی کمتری نشان دادند. از لحاظ تنوع درون گروهی نیز ژنوتیپ های گروه سوم دارای بیشترین و ژنوتیپ‌های گروه دوم دارای کمترین تشابه بودند. بنابراین چندشکلی مطلوبی بر اساس مارکر ISSR در بین ژنوتیپ ها مشاهده شد.



شکل ۴- نمودار خوشه‌ای حاصل از داده های نشانگر ISSR برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه‌ی علف گندمی پابلند.

Figure 4. Cluster diagram obtained from ISSR marker data for studied genotypes of *Agropyron elongatum*

تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای انجام شد (جدول ۶)، که ژنوتیپ‌ها در داخل ۴ گروه قرار گرفتند بر اساس آماره PhiPT در بین جمعیت‌ها در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت به عبارت دیگر گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در چهار گروه را تایید نمود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که در میان کلاسترها تنوع بیشتر از بین گروه‌ها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون کلاسترها برابر ۶۸٪ و در بین کلاسترها تنوع برابر ۳۲٪ بود.

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر ISSR.

Table 6. Molecular variance Analysis based on the ISSR markers.

منابع تغییرات Sources of Variation	درجه آزادی Degrees of freedom	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean of squares	واریانس برآورد شده Estimatred variance	درصد از واریانس Percentage of variance	PhiPT
بین گروه Between group	3	57.91	19.30	5.22	32%	0.393**
درون گروه Within group	8	121.33	15.16	12.38	68%	
کل Total	11	179.25		17.60	100%	

* اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد.

بحث

بررسی پروتئین‌های محلول تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان نداد و در مجموع ۳۶ درصد از نوارهای حاصل چندشکل بودند. بر همین اساس چندشکلی مطلوبی در بین ژنوتیپ‌ها با توجه به پروتئین‌های محلول برگ مشاهده نشد و برای گونه‌ی علف گندمی پابلند بررسی پروتئین‌های محلول قابل توصیه نمی‌باشد، اگرچه در بعضی موارد نوارهای اختصاصی برای ژنوتیپ‌های مورد بررسی وجود داشت. به‌نظر می‌رسد الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌های محلول بتواند بهتر ساختار تنوع ژنتیکی را نشان دهد. در هر حال در دیگر گزارشات نتایج مشابه با این تحقیق بیان شده است (Safari *et al*., 2022; Safari *et al*., 2017). از طرفی دیده شد که تنوع پروتئینی مشاهده شده با پراکنش جغرافیایی ژنوتیپ‌ها نیز مطابقت نداشت، که در گزارشی مشابه با این نتیجه‌گیری بیان شد که بین پراکنش جغرافیایی و پروتئین‌های محلول ۱۱ جمعیت *Dactylis glomerata* تطابق وجود ندارد (Jafari *et al*., 2013). در مجموع مشاهده شد که براساس پروتئین‌های محلول ژنوتیپ‌ها به سه دسته تقسیم شدند و ژنوتیپ‌های ۲، ۶، ۷، ۸ و ۱۱ بیشترین فاصله را با ژنوتیپ‌های ۱، ۵، ۱۰ و ۱۲ داشتند.

نشانگر ISSR تنوع مطلوبی در بین ژنوتیپ‌ها آشکار کرد. خصوصاً اینکه گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های این نشانگر با پراکنش جغرافیایی آنها کاملا مطابقت نشان داد و این مسئله به خوبی کارایی مناسب این نشانگر را در بررسی تنوع درون گونه‌ای در گونه‌ی علف گندمی پابلند را نشان می‌دهد. دیگر تحقیقات انجام شده در خصوص تنوع درون گونه‌ای برای ژنوتیپ‌های جنس علف گندمی نیز این نتیجه‌گیری را تایید کرد (Safari *et al*., 2022; Zarafshani *et al*., 2020). در هر حال علاوه بر سیستم گرده‌افشانی و تولید مثل که بر ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها تاثیر دارد، عوامل محیطی متعدد دیگری از جمله شرایط اکولوژیکی و تنش‌های غیرزیستی نیز بر روی ساختار ژنتیکی جوامع گیاهی تاثیر دارد (Nosrati *et al*., 2011) و

این مسئله سبب می‌شود گیاهانی که در شرایط متفاوت اکولوژیکی رشد می‌کنند بر اثر انتخاب طبیعی خصوصیات ژنتیکی متفاوت داشته باشند و بر همین اساس نشانگر ISSR نیز به‌دلیل آشکار کردن اثر انتخاب طبیعی بر روی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها مناسب است (Volis *et al.*, 2001). در تحقیق حاضر نیز می‌توان نتیجه‌گیری کرد که شرایط اکولوژیکی متفاوت و انتخاب طبیعی سبب ایجاد تفاوت در ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌ها شده است. مشابه این نتیجه گیری در بررسی جمعیت‌های مختلف اسپرس زراعی با استفاده از نشانگر RAPD گزارش شده است (Nosrati *et al.*, 2011). به عبارت دیگر مشاهده شد که ژنوتیپ‌های دو منطقه‌ی جوانرود و روانسر فاصله‌ی ژنتیکی بیشتری با سایر مناطق داشتند و به‌نظر می‌رسد شرایط اقلیمی متفاوت این دو منطقه توانسته از طریق انتخاب طبیعی بر روی ساختار ژنتیکی این گونه تاثیر گذاشته باشد و باعث سازگاری اکولوژیکی گونه در این دو منطقه شود، شاید از مهمترین عوامل اقلیمی موثر میزان بارش بیشتر و عامل ارتفاع بالاتر بوده باشد. عامل ارتفاع بالا و اقلیم سرد به عنوان فاکتورهای تاثیر گذار بر تفاوت ژنتیکی جمعیت‌های اسپرس با نشانگر RAPD گزارش شده است (Nosrati *et al.*, 2011). در هر حال نتایج به‌دست آمده با مطالعاتی که در زمینه‌ی تاثیر شرایط اکولوژیکی بر روی میزان فاصله‌ی ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گونه‌های گیاهی گزارش شده است مطابقت نشان می‌دهد (Nianxi *et al.*, 2006; Nevo *et al.*, 1998). دو منطقه‌ی کرمانشاه و هرسین نسبت به اسلام آباد غرب بیشتر باهم شباهت داشتند. به‌نظر می‌رسد عامل شباهت این دو منطقه به همدیگر فاصله‌ی جغرافیایی باشد. در تطابق با این نتیجه‌گیری وجود شباهت ژنتیکی با استفاده از نشانگر SSR در ذرت و مطابقت آن با فاصله‌ی جغرافیایی گزارش شده است (Liu *et al.*, 2005). بنابراین در مجموع می‌توان هم عامل شرایط متفاوت اقلیمی و هم فاصله‌ی جغرافیایی را به‌عنوان عوامل موثر بر تنوع ژنتیکی جمعیت‌های علف گندمی پابلند بیان نمود.

آغازگرهای IS_3، IS_{10}، IS_{11}، IS_{13} و IS_{14} به‌عنوان آغازگرهای مناسب برای بررسی جمعیت‌های گونه‌ی علف گندمی پابلند معرفی شدند. نتایج مطالعات قبلی نیز نشان داده است که این آغازگرها در بررسی تنوع درون گونه‌ای جنس علف گندمی آغازگرهای مناسبی هستند (Farshadfar *et al.*, 2018; Safari *et al.*, 2022)، همچنین گزارش شده است که کارایی نشانگرها درون جمعیت‌های گونه‌های مختلف جنس آگروپایرون متفاوت است. به‌نظر می‌رسد با توجه به توالی آغازگرها، بیشتر آغازگرهایی که توالی AG، GA و AC دارند، در گونه‌های جنس آگروپایرون کارایی بیشتری نشان داده‌اند و آغازگرهای دارای تولی‌های GT، TG، CT و GGAT کمترین موفقیت را در آشکارسازی چندشکلی در این جنس داشتند (Safari *et al.*, 2022)، که با نتایج این گزارش مطابقت داشت.

References

Afkar, S., Karimzadeh, G., & Jafari, A. A. 2010. Genetic variation in tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) populations based on seed storage protein polymorphism. Journal of New Seeds, 11, 390-398. http://dx.doi.org/10.1080/1522886X.2010.525733

Aghaei Sabarze, M. 2010. The importance of enriching the gene pool of crops by using wild species: Limitations and ways to overcome obstacles .Iranian Journal of Crop Sciences, 12(1): 1-58. [In Persian].

Altıntas, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A., & 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.

Bhandari, H. R., Nishant Bhanu, A., Srivastava, K., Singh, M. N., Shreya, & Hemantaranjan, A. 2017. Assessment of genetic diversity in crop plants - an overview. Advances in Plants & Agriculture Research, 7 (3), 279-286. DOI: 10.15406/apar.2017.07.00255.

Borem, A., & Fritch-neto, R. 2014. Biotechnologye and plant breeding. Academic Press is an imprint of Elsevier, Pp19-45.

Dickeduisberg, M., Laser, H., Tonn, B., & Isselstein, J. 2017. Tall wheatgrass (*Agropyron elongatum*) for biogas production: Crop management more important for biomass and methane yield than grass provenance. Industrial Crops and Products, 97, 563-663. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.055.

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. 1987. A rapd DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19, 11-15.

Farshadfar, M., & Farshadfar, E. 2004. Genetic Variation Among Different Agropyron Species Based on Morphological and Chemical Indices. Journal of Water and Soil Science, 8(2): 243-251. [In Persian].

Farshadfar, M., Nowrozi, R., Safari, H., Shirvani, H., & Amjadian, M. 2018. Assessment of genetic diversity in *Agropyron desertorum* accessions using ISSR molecular marker. Future of Food: Journal on Food, Agriculture and Society, 6 (1), 20-29.

Gonzalez, A., Wong, A., Delgado-Salinas, A., Papa, R., & Gepts, P., 2005. Assessment of Inter Simple Sequence Repeat Markers to Differentiate Sympatric Wildand Domesticated Populations of Common Bean. Crop Science 45(2): 606-615.

Heidari Sharif abad, H., & Dorri, M. A. 2003. The forage plants (Grasses). Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran, IRAN, 312 P.

Jafari, A. A., Salehi Shanjani, P., Kouhi, L., & Bakhshi Khaneki, GH. R. 2013. Genetic diversity and geographic relationship among 11 dactyis glomerata populations using total protein electrophoresis. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 26 (3), 278-288. [In Persian].

Jouri, M. H., & Mahdavi, M. 2010. Applied identification of rangeland plants, Aij Press, Iran, 418 pages. [In Persian].

Kumar, M., Mishra, G. P., Singh, R., Kumar, J., Naik P. K., & 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.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

Liu, X. H., Liu, W. X., Zhang, Y. R., Liu, Z. X., Zhang, S. K. & Dai, J. R. 2005. Genetic relationship among several maize inbreds revealed by SSR markers. Molecular Plant Breeding, 3: 179-187.

Mohammadi, S. A., & Prasanna.,B. M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43:1235-1248.

Moradi, M., Farshadfar, E., & Safari, H. 2015. Evaluation of genetic diversity in *Agropyron cristatum* using ISSR molecular marker. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 6 (5), 425-432.

Nevo, E., Baum, B., Beiles, A., & Johnson, D. A. 1998. Ecological correlates of RAPD DNA diversity of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent. Genetic Resources and Crop Evolution, 45: 151-159.

Nianxi, Z., Yubao, G., Jinlong, W., Anzhi, R., & Hua, X. 2006. RAPD diversity of *Stipa grandis* populations and its relationship with some ecological factors. Acta Ecological Sinaica, 26: 1312-1319.

Nosrati, H., Hosseinpour Feizi, M. A., Seyed Tarrah, S., & Razban Haghighi, A. 2011. A study of the relationship between eco-geographical factors and genetic similarity in different populations of Onobrychis viciifolia using RAPDs. Journal of Plant Biology, 3(7): 85-96. [In Persian].

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.

Rostami-Ahmadvandi, H., Cheghamirza, K., Kahrizi, D., & Bahraminejad, S. 2013. Comparison of morpho-agronomic traits versus RAPD and ISSR markers in order to evaluate genetic diversity among Cuminum cyminum L. accessions. Australian Journal of Crop Science, *7*(3): 361-367.

Rostami-Ahmadvandi, H., Kahrizi, D., Cheghamirza, K., Nosratti, I., & Zargooshi, J. 2016. Molecular and agro-morphological genetic diversity assessment of Chickpea mutants induced via ethyl methane sulfonate. Cellular and Molecular Biology, 62(11): 8-12.

Rostami-Ahmadvandi, H., Kahrizi, D., Zebarjadi, A. R., Mostafaie, A., Sohrabi-Babahadi, F., & Kiani, S., 2011. Study of Peganum harmala genetic diversity based on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis. Journal of Agricultural Science and Technology, A(1): 1300-1302.

Safari, H., Afzali, P., Etminan, A., Shirvani, H., & Fereidooni, L., 2022. The study of genetic diversity in *Agropyron intermedium* genotypes using ISSR and leaf soluble proteins markers. Cereal Biotechnology and Biochemistry, 1 (3), 358-374. DOI: 10.22126/cbb.2022.8391.1022. [In Persian].

Safari, H., Shirvani, H., & Etminan, A. R. 2016. Assessment of genetic variation in *Agropyron intermedium* accessions using cytogenetical and morphological traits. Modern Genetics, 11 (4), 623-627. [In Persian].

Safari, H., Shirvani, H., & Fereidoni, L. 2017. The study of genetic variation for *Lolium perenne* using molecular and biochemical markers. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 30 (4), 361-374. [In Persian].

Sanadgol, A. A. 1996. An Introduction to forage plants breeding. Research Institute of Forests and Rangelands Press, Tehran. Iran. 128 pages. [In Persian].

Shirvani, H., Etminan, A., Safari, H. 2014. Genetic variation of *Agropyron trichophorum* accessions using ISSR molecular marker. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 5 (4), 23-30.

Shirzad, H., Ahmadi, J., Aghaei, M. J., & Sorkhi, B., 2021. Morphological Genetic Variation of Native Species of *Aegilops triuncialis* L. Collected from the northern half of Iran. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 34 (3): 682-693. [In Persian].

Volis, S., Yakubov, B., Shulgina, I., Ward, D., Zur, V., & Nedlinge, S. 2001. Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. Biological Journal of Linnaean Society. 74: 289-303.

Zarafshani, F., Safari, H., & Etminan, A. R. 2020. Genetic diversity assessment of *Agropyron cristatum* accessions using ISSR marker. Modern Genetics, 15 (1), 69-73. [In Persian].

Zebarjadi, A., Rostami Ahmadvandi, H., Kahrizi, D., & Cheghamirza, K. 2016. Assessment of Genetic Diversity by Application of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Primers on Iranian Harmal (*Peganum harmala* L.) Germplasm as an Important Medicinal Plant. Journal of Applied Biotechnology Reports, *3*(3): 441-445