



## Determining the genetic diversity of the selected genotypes of smooth brome grass (*Bromus inermis* Leyss.) using ISSR molecular markers for synthetic variety development

Yousef Nami<sup>1</sup>, Saleh Amiri<sup>2</sup>, Reza Mohammadi<sup>3\*</sup>

1Assist. Prof., Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran

2 Researcher, Branch for Northwest & West Region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.

3\*Corresponding author, Assoc. Prof., Branch for Northwest & West Region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran. Email: [m\\_riza51@gmail.com](mailto:m_riza51@gmail.com)

Received: 10/08/2025

Revised: 27/08/2025

Accepted: 19/09/2025

### Abstract

**Background and Objectives:** Knowledge of genetic diversity in forage plants is crucial for breeding and developing synthetic varieties with optimal adaptability and performance. Smooth brome grass (*Bromus inermis* Leyss.), due to its relatively high resistance to drought and unfavorable climatic conditions, holds particular importance in the semi-steppe rangelands of Iran. Assessing the level of genetic diversity in forage grasses is essential for parent selection in breeding programs, and the use of molecular markers reduces both the time and cost of these projects. This study aimed to investigate the genetic diversity and determine the degree of similarity among 20 selected genotypes of smooth brome grass using ISSR molecular markers, to identify suitable genotypes for breeding improved varieties.

**Materials and Methods:** Twenty genotypes of smooth brome grass, previously selected from domestic and foreign germplasm resources, were evaluated using 34 ISSR primers. DNA was extracted from leaf tissue, and its quality and quantity were assessed using a NanoDrop device. Polymerase chain reaction (PCR) was performed under optimized conditions, and the resulting products were electrophoresed on agarose gel. Presence or absence of bands was recorded as a binary matrix. Marker efficiency was determined by calculating polymorphism information content (PIC), including percentage of polymorphic loci, effective number of alleles ( $N_e$ ), Shannon's index (I), and expected heterozygosity ( $H_e$ ). Genetic structure was analyzed using UPGMA clustering based on Jaccard's coefficient and principal component analysis (PCA). All computations were conducted using MEGA, POPGENE software, and R packages.

**Results:** A total of 400 alleles were identified, of which 355 were polymorphic, indicating high genetic diversity among the genotypes. Diversity indices revealed moderate to high genetic variation, with an average effective number of alleles of 1.533, Shannon's index of 0.447, and expected heterozygosity of 0.315. Cluster analysis grouped the genotypes into four clusters, with the fourth



cluster exhibiting the highest diversity and identified as a potential source for introducing new traits through targeted crosses. The results of PCA also confirmed these groupings, highlighting considerable genetic divergence among genotypes. ISSR markers were recognized as a highly efficient, cost-effective, and reproducible tool for genetic analysis this plant species.

**Conclusion:** ISSR24, ISSR07, ISSR06, ISSR13, ISSR14, and ISSR35 markers produced the highest number of clear, repeatable, and polymorphic bands, making them suitable, cost-effective tools for investigating genetic diversity in smooth bromegrass and applicable in breeding programs aimed at improving forage yield. Eight to twelve superior genotypes-including B.in06, B.in14, B.in19, B.in17, B.in12, B.in16, B.in08, and B.in15-were identified across three clusters with appropriate genetic distances, providing a foundation for creating improved synthetic varieties.

**Keywords:** *Bromus inermis* Leyss., genetic diversity, ISSR primers, synthetic varieties.

## بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های منتخب علف پشمکی (*Bromus inermis* Leyss.) با استفاده از آغازگرهای مولکولی ISSR به منظور تولید ارقام سنتتیک

یوسف نامی<sup>۱</sup>، صالح امیری<sup>۲</sup> و رضا محمدی<sup>۳\*</sup>

۱- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

۲- محقق، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

۳- نویسنده مسئول، دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران.

پست الکترونیک: [m\\_riza51@gmail.com](mailto:m_riza51@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۹ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۰۶/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۸

### چکیده

سابقه و هدف: درک تنوع ژنتیکی در گیاهان علوفه‌ای نقش کلیدی در به‌نژادی و تولید ارقام سنتتیک با سازگاری و عملکرد بهینه دارد. گونه علف پشمکی (*Bromus inermis* Leyss.) به دلیل مقاومت نسبتاً بالا به خشکی و شرایط نامساعد اقلیمی، از اهمیت ویژه‌ای در مراتع نیمه استپی ایران برخوردار است. اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی در گراس‌های علوفه‌ای برای انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی، سبب کاهش مدت زمان اصلاح و هزینه‌های پروژه‌های اصلاحی می‌شود. هدف این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان خویشاوندی میان ۲۰ ژنوتیپ منتخب از این گونه با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و شناسایی ژنوتیپ‌های مناسب برای برنامه‌های اصلاحی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۲۰ ژنوتیپ منتخب از گونه علف پشمکی که در تحقیقات قبلی از بین منابع ژرم پلاسم داخلی و خارجی انتخاب شده بودند، با استفاده از ۳۴ آغازگر ISSR مورد ارزیابی مولکولی قرار گرفتند. ابتدا DNA از بافت برگ‌ها استخراج شد و بعد کمیت و کیفیت آن با دستگاه نانودراپ بررسی گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از معرف‌های استاندارد و شرایط بهینه دمایی انجام شد و محصولات حاصل روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. داده‌های حاصل از حضور یا عدم حضور باندها به‌صورت ماتریس دودویی (Binary Matrix) ثبت گردیدند. به‌منظور تعیین کارایی نشانگرها، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، شامل درصد چندشکلی، تعداد مؤثر آلل (Ne)، شاخص شانون (I) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) محاسبه شد. برای تحلیل ساختار ژنتیکی، از روش گروه‌بندی UPGMA براساس ضریب جاکارد و تحلیل مؤلفه‌های هم‌انگ اصلی (PCA) استفاده شد. کلیه محاسبات با نرم‌افزارهای MEGA و POPGENE و بسته R انجام گردید.

نتایج: در مجموع، تعداد ۴۰۰ آلل شناسایی شد که از این میان ۳۵۵ آلل چندشکل بودند که نشان‌دهند تنوع ژنتیکی بالا میان ژنوتیپ‌هاست. شاخص‌های تنوع نشان دادند که تنوع ژنتیکی در حد متوسط تا بالا قرار دارد؛ به‌طوری‌که میانگین تعداد مؤثر آلل ۱/۵۳۳، شاخص شانون ۰/۴۴۷ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۳۱۵ گزارش شد. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه طبقه‌بندی نمود که خوشه چهارم بیشترین میزان تنوع را داشت. این گروه به‌عنوان منبع بالقوه برای وارد کردن صفات جدید از طریق تلاقی‌های هدفمند معرفی شد. نتایج تحلیل مؤلفه‌های هم‌انگ اصلی نیز این گروه‌بندی را تأیید کرده و بر واگرایی ژنتیکی قابل توجه بین ژنوتیپ‌ها دلالت داشت. نشانگرهای ISSR به‌عنوان ابزار قدرتمندی در شناسایی ژنوتیپ‌های متمایز و تحلیل ساختار ژنتیکی شناخته شدند و کارایی بالای آنها برای مطالعات تنوع ژنتیکی تأیید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش نشان داد که نشانگرهای ISSR24، ISSR07، ISSR06، ISSR13، ISSR14، ISSR35 بیشترین تعداد باندهای

چند شکل، واضح و تکرارپذیر را ایجاد کردند که به عنوان نشانگر مولکولی ارزان و ساده، ابزار مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های علف‌پشمکی هستند و می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی، به‌ویژه برای بهبود عملکرد علوفه، به‌کار روند. همچنین امکان انتخاب ۸ تا ۱۲ ژنوتیپ برتر علف‌پشمکی شامل ژنوتیپ‌های B.in06, B.in14, B.in19, B.in17, B.in12, B.in16, B.in08, و B.in15 که در سه خوشه متفاوت گروه‌بندی شدند با فاصله ژنتیکی مناسب برای ایجاد رقم سنتتیک میسر شد.

واژه‌های کلیدی: علف‌پشمکی، تنوع ژنتیکی، آغازگرهای ISSR، ارقام سنتتیک

## مقدمه

بروموس اینرمیس (*Bromus inermis* Leyss.) که با نام علف‌پشمکی (Smooth brome) شناخته می‌شود، یکی از گونه‌های برجسته سرده *Bromus* است که به دلیل مقاومت بالا به خشکی و سازگاری با شرایط اقلیمی مختلف، به‌ویژه در مناطق سردسیر و نیمه‌خشک، اهمیت زیادی دارد (Palit and DeKeyser, 2022). این گیاه چندساله با ریشه‌های عمیق، به‌طور خاص در برابر خشکی مقاوم بوده و در مراتع، چراگاه‌های ترکیبی و پروژه‌های احیای مراتع مخروطیه در مناطق نیمه‌خشک که گیاهان دیگر در آنها عملکرد مناسبی ندارند، کاربرد دارد (Bam et al, 2022; Ünal and Mutlu, 2015). علف‌پشمکی توسط بذر و ریزوم تکثیر می‌شود و چمن متراکمی را تشکیل می‌دهد و در طیف وسیعی از خاک‌ها به خوبی رشد می‌کند و نقش مهمی در کنترل فرسایش خاک دارد. همچنین در برابر سرمای زمستان مقاوم است و با طیف وسیعی از شرایط آب و هوایی سازگار شده است (Molnar, 1988). علف‌پشمکی در میان گونه‌های مختلف سرده بروموس (*Bromus*) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. این گونه با ویژگی‌های برجسته‌ای مانند توانایی سازگاری بالا با مناطق کم‌باران و دمای معتدل تابستان، به‌ویژه در نواحی نیمه‌خشک و سردسیر، اهمیت بیشتری پیدا کرده است (Mohammadi et al, 2022). پژوهش‌های زیادی به بررسی مقاومت این گیاه به خشکی و سازگاری آن با محیط‌های خشک و نیمه‌خشک پرداخته‌اند، اما مطالعات کمی در زمینه آثار بلندمدت کشت و گسترش این گیاه در زیست‌بوم‌های بومی انجام شده است.

گونه *B. inermis* یک گونه پلی‌پلوئید ( $2n=8x=56$ ) و دگربارور می‌باشد که درصد خودگشنی در آن پایین است. بنابراین شناسایی و انتخاب تک‌بوته‌های برتر برای تولید بذر پلی‌کراس و سنتتیک ضروری می‌باشد (Molnar, 1988). این گیاه در ایران عمدتاً به‌عنوان گیاه وارداتی در مراکز تحقیقاتی مانند ایستگاه همدان آب‌سرد و مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان کاشته شده است. انتخاب این گیاه به دلیل ویژگی‌هایی مانند مقاومت بالا به خشکی و سازگاری با شرایط اقلیمی کشور انجام شده است که از عملکرد و کیفیت علوفه مناسبی برخوردار است. همچنین، برخی از ژنوتیپ‌های استفاده شده در این تحقیق از مجارستان بوده که این انتخاب برای استفاده از تنوع ژنتیکی بیشتر در برنامه‌های به‌نژادی می‌باشد. چون موفقیت هر برنامه اصلاحی مبتنی بر بهره‌گیری از تنوع ژنتیکی گسترده است. در سال‌های اخیر، نشانگرهای مولکولی به‌ویژه نشانگرهای ISSR، به‌عنوان ابزارهای مولکولی ساده، ارزان و کارآمد برای تحلیل تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی مطرح شده‌اند. استفاده از این نشانگرها برای شناسایی تنوع ژنتیکی در گونه *B. inermis* می‌تواند به ما در انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب برای برنامه‌های اصلاحی کمک کند. نشانگرهای ISSR به دلیل قابلیت بالا در شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌های مختلف و قدرت تشخیص تنوع ژنتیکی در مقیاس وسیع، ابزار مناسبی برای این‌گونه مطالعات به‌شمار می‌روند. پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که استفاده از این نشانگرها می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد روابط خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مختلف این گیاه فراهم کند (Mohammadi et al, 2022). این تحقیق به‌ویژه بر

دوساله از میان مجموعه‌های بزرگ از اکوتیپ‌های طبیعی علف‌پشمکی انتخاب شدند (Maleki et al., 2021). انتخاب ژنوتیپ‌ها بر پایه داده‌های مربوط به عملکرد علوفه، تاریخ گرده‌افشانی و مقاومت به بیماری زنگ انجام شده بود. نمونه‌های بومی اولیه از بانک ژن مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تهیه شدند (<https://esfahan.areeo.ac.ir>). فرایند جمع‌آوری نمونه‌ها براساس دستورالعمل‌ها و مقررات ملی مربوطه انجام شد. همچنین شش ژنوتیپ خارجی از کشور مجارستان و توسط بانک ژن مؤسسه Agrobotany مجارستان (HIFA) در منطقه Tapioszele تهیه شدند. با توجه به ماهیت دگرگشتی این گونه، ژنوتیپ‌هایی با کد مشابه اما شماره‌های متفاوت می‌توانند ویژگی‌های ژنتیکی متمایزی داشته باشند.

استفاده از نشانگرهای ISSR برای تحلیل تنوع ژنتیکی و تعیین فواصل ژنتیکی ژنوتیپ‌های منتخب علف‌پشمکی تمرکز دارد. نتایج این تحقیق می‌تواند به توسعه ارقام مقاوم و بهبود عملکرد علوفه‌ای در این گونه کمک کند و راهکارهای پایداری برای مدیریت این گیاه در سیستم‌های کشاورزی و زیست‌بوم‌های طبیعی ارائه دهد. هدف این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان خویشاوندی میان ۲۰ ژنوتیپ منتخب از این گونه با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و شناسایی ژنوتیپ‌های مناسب برای برنامه‌های اصلاحی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

بیست ژنوتیپ برتر (تک بوته) براساس نتایج ارزیابی‌های

جدول ۱- فهرست ژنوتیپ‌های منتخب علف‌پشمکی و محل جمع‌آوری آنها

**Table 1. List of selected genotypes of *B. inermis* and their collection areas**

Row	Genotype	Population Number	Primary Seed Code	Province	County/ Location
1	B.in01	B.i-u1	2000/40	Isfahan (IR)	Semirom
2	B.in02	B.i-03	43/2000	Isfahan (IR)	Seed Bank of Fozveh
3	B.in03	B.i-04	18/2000	Isfahan (IR)	Seed Bank of Fozveh
4	B.in04	B.i-11	RCAT040601	Hungary*	Kotelek
5	B.in05	B.i-13	18/2000	Isfahan (IR)	Seed Bank of Fozveh
6	B.in06	B.i-15	18/2000	Isfahan (IR)	Seed Bank of Fozveh
7	B.in07	B.i-18	RCAT041016	Hungary*	Babolna
8	B.in08	B.i-19	RCAT064835	Hungary*	Uzsa
9	B.in09	B.i-23	RCAT041861	Hungary*	Kerekegyhaza
10	B.in10	B.i-25	25/2000	Isfahan (IR)	Seed Bank of Fozveh
11	B.in11	B.i-16	25/2000	Isfahan (IR)	Seed Bank of Fozveh
12	B.in12	B.i-08	48/2000	Isfahan (IR)	Fereydunshahr
13	B.in13	B.i-06	RCAT041016	Hungary*	Babolna
14	B.in14	B.i-15	18/2000	Isfahan (IR)	Seed Bank of Fozveh
15	B.in15	B.i-19	RCAT064835	Hungary*	Uzsa
16	B.in16	B.i-01	40/2000	Isfahan (IR)	Semirom
17	B.in17	B.i-08	48/2000	Isfahan (IR)	Fereydunshahr
18	B.in18	B.i-16	25/2000	Isfahan (IR)	Seed Bank of Fozveh
19	B.in19	B.i-09	9T/2000	Hamedan	Hamedan
20	B.in20	B.i-13	18/2000	Isfahan (IR)	Seed Bank of Fozveh

\* ژنوتیپ‌های مجاری از مؤسسه Agrobotany مجارستان (HIFA) در منطقه Tapioszele دریافت شده‌اند.

\* The Hungarian genotypes were obtained from Hungarian Institute of Agrobotany (HIFA), Tapioszele, Hungary

## استخراج DNA

جدول ۲ آمده است. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل Tris-HCl (pH 9.0) ده میلی مولار، KCl پنجاه میلی مولار، ۰/۲۴ dNTP (Biomatik, France) ۲/۵ میلی مولار، Taq میلی مولار، پنج میکرومول آغازگر، نیم واحد آنزیم پلی‌مراز (Fermentas) و ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی بود. چرخه PCR در دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems, USA) Verity با برنامه دمایی شامل: دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سلسیوس برای سه ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۹ درجه سلسیوس (مطابق جدول ۲) برای ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۴ درصد الکتروفورز شد و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. نوارهای ISSR به صورت مارتیس دودویی (Binary Matrix) امتیازدهی شدند، به طوری که حضور نوار با عدد ۱ و عدم حضور با عدد ۰ ثبت شد.

## تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی

مارتیس حاصل از امتیازدهی نوارها برای تحلیل تنوع ژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA مورد بررسی قرار گرفت (Tamura et al., 2011). همچنین، پارامترهای دیگری مانند درصد چندشکلی، فراوانی آلل، تنوع ژنی و شاخص اطلاعاتی شانون با استفاده از نرم افزار POPGENE نسخه ۱/۳۲ محاسبه شد (Yüzer et al., 2023).

## تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)

به منظور تجسم روابط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها، تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی حاصل از داده‌های ISSR انجام شد. این تحلیل با استفاده از بسته آماری Adegnet در نرم افزار R انجام گردید (Jombart et al., 2018). دو مؤلفه اصلی اول (PC1) و (PC2) که بیشترین

استخراج DNA از بافت برگ گیاهان به صورت انفرادی و با استفاده از بافر CTAB اصلاح شده انجام شد. ابتدا، دو گرم از بافت تازه برگ با ترازوی حساس وزن‌کشی و در هاون چینی استریل با نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سلسیوس) به خوبی ساییده شد. آنگاه پودر حاصل به لوله‌های دو میکرولیتر منتقل و به هر لوله ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج CTAB افزوده شد. نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه روی شیکر قرار گرفتند و بعد به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۶۵ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از آن، سانتریفوژ با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد تا بخش‌های مختلف جدا شود. بخش فوقانی حاوی DNA و RNA با دقت به تیوب‌های جدید منتقل شد. در زیر هود، ۸۰۰ میکرولیتر از مخلوط کلروفرم: ایزوآمیل الکل (نسبت ۱:۲۴) به آن افزوده و دوباره سانتریفوژ گردید. بخش آبی خالص به تیوب‌های جدید منتقل شده و با افزودن ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد، رسوب DNA ایجاد شد. نمونه‌ها یک شب در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری و روز بعد سانتریفوژ شدند. رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شسته شد و پس از حذف الکل، لوله‌ها به مدت یک ساعت وارونه روی دستمال آزمایشگاهی قرار گرفتند تا بوی الکل کاملاً از بین برود. در پایان، ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE به تیوب‌ها افزوده شد و به مدت سه ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا DNA کاملاً حل شده و برای آنالیزهای مولکولی آماده شود.

## واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آگارهای ISSR

برای ارزیابی مولکولی، برگ‌های جوان از هر ژنوتیپ جمع‌آوری و در نیتروژن مایع فریز شدند. برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ استفاده شد. در این مطالعه از ۴۲ آغازگر شرکت Bioneer که در مطالعات قبلی نیز به دلیل چندشکلی بالا مؤثر بوده‌اند، استفاده گردید (Mohammadi et al., 2022) که نام و توالی آغازگرها در

جذب در ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. تمامی نمونه‌ها از نظر کمیت و کیفیت شرایط مطلوبی را نشان دادند و DNA استخراج شده یکنواخت و قابل استفاده بود.

#### ویژگی‌های آغازگرهای ISSR

در این پژوهش از ۴۲ آغازگر ISSR استفاده شد که ۳۴ مورد از آنها باندهای واضح و چندشکل تولید کردند. در مجموع، ۴۰۰ آلل شناسایی شد که ۳۵۵ آلل از آنها چندشکل بودند. تعداد آلل در هر نشانگر از ۶ تا ۱۹ متغیر بود و میانگین آن ۱۱/۷۶ گزارش شد. اندازه باندها در محدوده ۳۰۰ تا ۸۵۰ جفت باز قرار داشت. آغازگرهای ISSR24، ISSR07، ISSR06، ISSR13، ISSR14، ISSR35 بیشترین تعداد باندهای تکرارپذیر را ایجاد کردند (شکل ۱).

#### تنوع ژنتیکی

شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای ژنوتیپ‌های مورد بررسی محاسبه شد. تعداد مؤثر آلل (Ne) در میان نشانگرها از ۱/۲۸۵ تا ۱/۷۲۷ متغیر بود و میانگین آن برابر با ۱/۵۳۳ به دست آمد. شاخص شانون (I) در بازه ۰/۳۱۳ تا ۰/۵۹۱ قرار داشت و میانگین آن ۰/۴۴۷ محاسبه شد. همچنین، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) از ۰/۱۹۳ تا ۰/۴۰۷ تغییر داشت و میانگین آن ۰/۳۱۵ بود.

واریانس را در داده‌ها پوشش دادند، استخراج شد و درصد واریانس توضیح داده‌شده توسط هر مؤلفه نیز محاسبه گردید. نتایج به صورت نمودار دو بعدی پراکنش نمایش داده شدند تا الگوی توزیع ژنوتیپ‌ها بهتر درک گردد. ماتریس شباهت ژنتیکی براساس ضریب جاکارد برای تعیین میزان قرابت ژنتیکی میان ۲۰ ژنوتیپ *B. inermis* محاسبه شد. شباهت‌های زوجی بر پایه ماتریس دودویی (Binary Matrix) حاصل از نشانگرهای ISSR محاسبه گردید. این ماتریس در تفسیر نتایج گروه‌بندی و تحلیل ساختار ژنتیکی نقش مؤثری ایفا کرد و به شناسایی ژنوتیپ‌های با شباهت نزدیک یا دارای تنوع بالا کمک نمود.

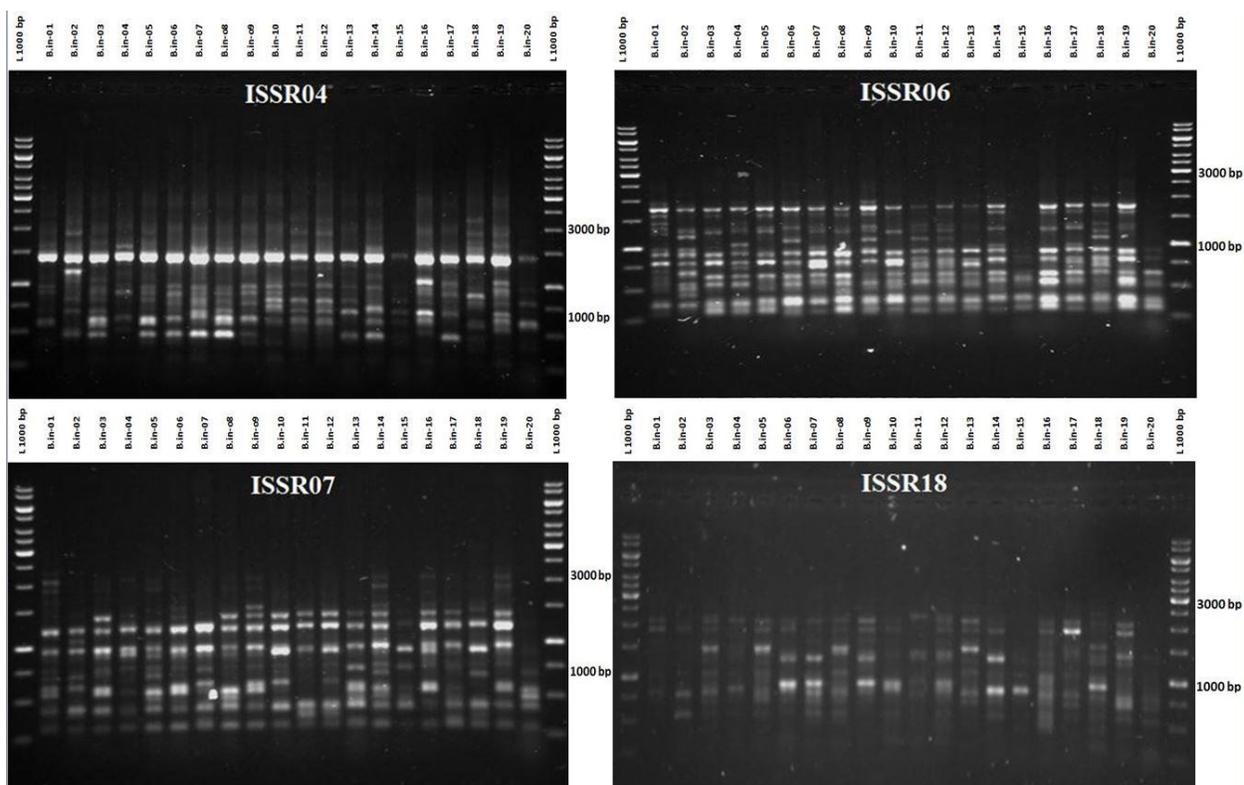
#### تحلیل تجزیه خوشه‌ای

شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب جاکارد محاسبه و درخت فیلوژنی با استفاده از روش UPGMA ترسیم شد.

#### نتایج

##### کیفیت DNA استخراج شده

DNA از گیاهان علف پشمکی استخراج شد و کمیت و کیفیت آن با استفاده از نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت ۲۸۰/۲۶۰ در نمونه‌ها بین ۱/۷ تا ۱/۹ گزارش شد. غلظت DNA نیز براساس



شکل ۱- الگوی نواری بندی ۲۰ ژنوتیپ برتر علف پشمکی با استفاده از چهار آغازگر ISSR مختلف (نشانه تعیین انداز ۱۰۰۰ جفت باز)  
**Figure 1. Banding pattern of the top 20 genotypes of *B. inermis* using four different ISSR markers (DNA Ladder: L1000bp)**

جدول ۲- نام، توالی، دمای اتصال (TM)، تعداد کل باندها، تعداد باند چندشکلی، درصد چندشکلی، تعداد مؤثر آلل، شاخص شانون و هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای برآورد تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های علف پشمکی

Table 2. Name, sequence, annealing temperature (Tm), total number band, Number of polymorphic bands, polymorphism (%), Number of Effective Alleles(Ne), Shannon's Index (I) and Expected Heterozygosity (He) for estimation of genetic variation in genotypes of *Bromus inermis*

Marker Name	Marker Sequence	Melting Point (°C)	N	PPB	PPB%	He	Ne	I
ISSR01	*(CA) <sub>8</sub> RG	52	7	5	71	0.273	1.494	0.390
ISSR02	***(GA) <sub>8</sub> YT	52	11	10	91	0.321	1.575	0.480
ISSR03	(GA) <sub>8</sub> YG	52	15	9	60	0.238	1.427	0.348
ISSR04	(AG) <sub>8</sub> YT	52	14	11	78	0.363	1.683	0.514
ISSR05	(AG) <sub>8</sub> T	52	11	10	91	0.259	1.431	0.398
ISSR06	(GA) <sub>8</sub> T	52	17	15	88	0.275	1.450	0.421
ISSR07	(GA) <sub>8</sub> A	52	18	16	89	0.315	1.522	0.473
ISSR09	(CA) <sub>8</sub> A	52	9	9	100	0.193	1.285	0.320
ISSR11	(TC) <sub>8</sub> C	52	11	10	91	0.323	1.597	0.467
ISSR12	(AG) <sub>8</sub> GCC	52	16	16	100	0.235	1.364	0.380
ISSR13	(AG) <sub>8</sub> YA	52	17	17	100	0.358	1.628	0.531
ISSR14	(GT) <sub>8</sub> YA	52	17	17	100	0.305	1.508	0.463
ISSR15	(AC) <sub>8</sub> YT	52	12	10	83	0.369	1.671	0.539
ISSR16	(AC) <sub>8</sub> YA	52	8	5	63	0.248	1.424	0.365
ISSR17	(AC) <sub>8</sub> YG	52	10	8	80	0.321	1.543	0.457
ISSR18	(GACA) <sub>4</sub>	52	10	10	100	0.358	1.602	0.536
ISSR19	(GGAGA) <sub>3</sub>	52	11	9	82	0.357	1.643	0.519
ISSR20	(GA) <sub>8</sub> YA	52	6	4	67	0.254	1.431	0.376
ISSR21	(GA) <sub>8</sub> RC	52	7	6	86	0.326	1.578	0.481
ISSR22	(GGGGT) <sub>3</sub>	52	7	6	86	0.364	1.650	0.527
ISSR23	(AC) <sub>8</sub> GCT	52	13	13	100	0.312	1.536	0.471
ISSR24	(AC) <sub>8</sub> TG	52	19	19	100	0.407	1.727	0.591
ISSR25	(TCC) <sub>5</sub> TG	52	14	14	100	0.343	1.560	0.520
ISSR26	(AC) <sub>8</sub> GT	52	9	9	100	0.340	1.563	0.514
ISSR27	(AG) <sub>8</sub> TC	52	8	7	88	0.382	1.701	0.548
ISSR28	(GA) <sub>8</sub> GCC	52	14	13	93	0.304	1.524	0.457
ISSR31	CGT AGT CGT (CA) <sub>7</sub>	52	9	8	89	0.355	1.635	0.518
ISSR32	AGT CGT AGT (AC) <sub>7</sub>	52	14	13	93	0.389	1.708	0.562
ISSR34	(CT) <sub>9</sub> G	52	11	9	82	0.244	1.382	0.383
ISSR35	(CA) <sub>10</sub> G	52	17	17	100	0.304	1.493	0.468
ISSR37	(GTG) <sub>7</sub> C	52	9	7	78	0.256	1.428	0.389
ISSR39	(CA) <sub>8</sub> RG	54	8	6	75	0.200	1.321	0.313
ISSR41	(GA) <sub>8</sub> YT	56	8	5	63	0.289	1.539	0.409
ISSR42	(AG) <sub>8</sub> YT	54	13	12	92	0.295	1.493	0.447
Overall average			11.76	10.44	88.75	0.315	1.532	0.447

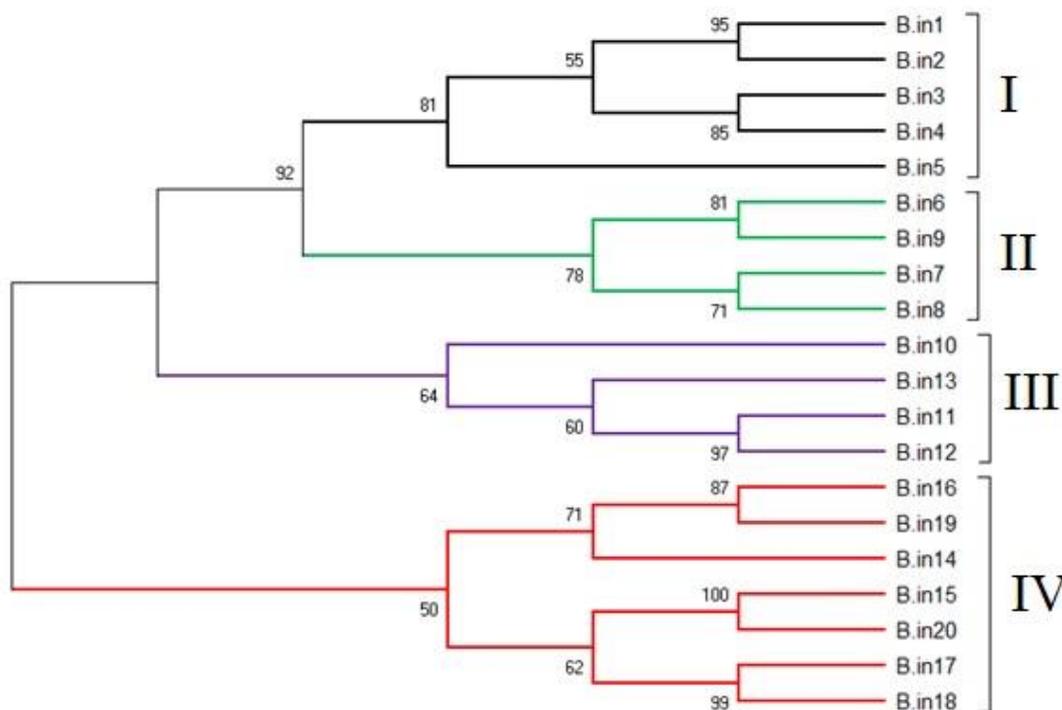
\*R: A+G; \*\*Y: C+T;

N	Number of Bands	تعداد باندها
PPB	Number of Polymorphic Bands	تعداد باندهای چندشکلی
PPB%	Polymorphism Percentage	درصد چندشکلی
Ne	Number of Effective Alleles	تعداد مؤثر آلل
I	Shannon's Index	شاخص شانون
He	Expected Heterozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار

## تحلیل خوشه‌ای

براساس داده‌های حاصل از آغازگرهای ISSR و با استفاده از روش UPGMA، درخت فیلوژنی برای ۲۰ ژنوتیپ علف-پشمکی رسم شد. این ژنوتیپ‌ها در چهار خوشه (I تا IV)

طبقه‌بندی شدند (شکل ۲). خوشه I شامل ژنوتیپ‌های ۱ تا ۵، خوشه II شامل ژنوتیپ‌های ۶ تا ۹، خوشه III شامل ژنوتیپ‌های ۱۰ تا ۱۳ و خوشه IV شامل ژنوتیپ‌های ۱۴ تا ۲۰ بود.



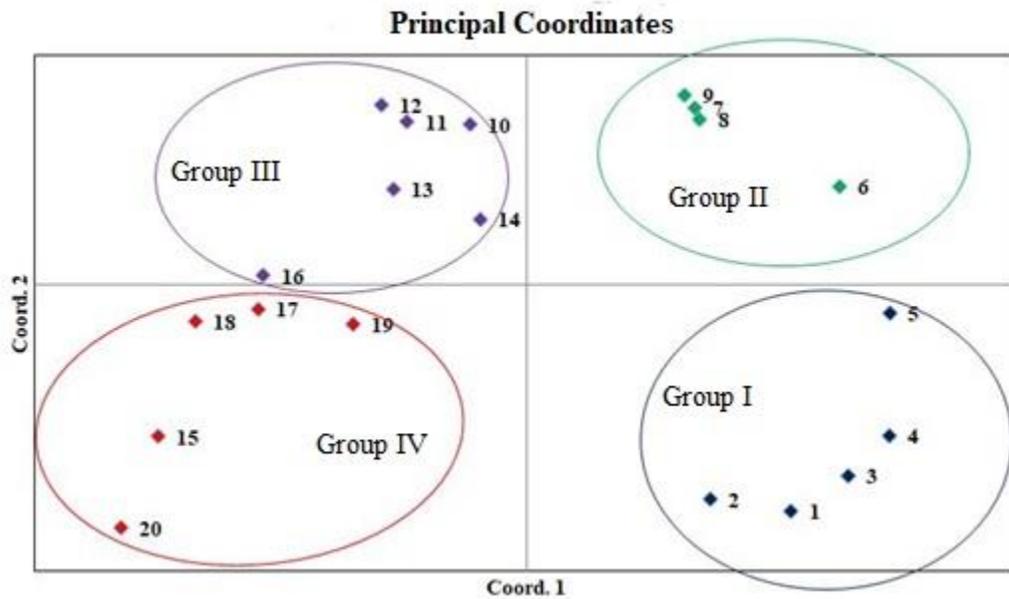
شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۰ ژنوتیپ علف‌پشمکی به روش UPGMA با استفاده از ۳۴ نشانگر ISSR براساس ضرایب تشابه ژاکارد

Figure 2. Dendrogram generated by UPGMA cluster analysis among 20 *Bromus inermis* genotypes using 34 ISSR markers based on Jaccard similarity coefficient.

## تحلیل مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (PCA)

نمودار پراکنش ۲۰ ژنوتیپ علف‌پشمکی براساس دو مؤلفه اصلی اول در تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی با استفاده از داده‌های ISSR به دست آمد (شکل ۳). ژنوتیپ‌ها در چهار

خوشه مشابه با تحلیل خوشه‌ای قرار گرفتند. خوشه IV بیشترین پراکندگی را در نمودار دو بعدی مؤلفه‌ها نشان داد. موقعیت قرارگیری ژنوتیپ‌ها در فضا بیانگر درجات مختلفی از تمایز ژنتیکی بود.



شکل ۳- نمودار پراکنش ۲۰ ژنوتیپ علف پشمکی براساس دو مؤلفه اصلی اول در تجزیه به مؤلفه‌های هم‌هنگ اصلی با استفاده از ۳۴ آغازگر ISSR

Figure 3. Biplot of 20 *Bromus inermis* genotypes based on the first two principal coordinate components using 34 ISSR markers.

#### تحلیل شباهت ژنتیکی

قرار گرفتند. علاوه بر این، فراوانی ژنی و آللی در این تحلیل‌ها نیز بررسی شد. ژنوتیپ‌هایی که شباهت ژنتیکی کمتری داشتند، معمولاً تفاوت‌های بیشتری در فراوانی آلل‌ها نشان دادند که این عامل می‌تواند تأثیر زیادی در تفکیک آنها در خوشه‌ها داشته باشد. این نتایج نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی قابل توجه در جمعیت مورد مطالعه است.

ضریب شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها بین ۰/۳۷ تا ۰/۷۸ متغیر بود (جدول ۳). بالاترین شباهت بین ژنوتیپ‌های B.in11 و B.in12 برابر با ۰/۷۸ و پایین‌ترین شباهت بین B.in01 و B.in20 برابر با ۰/۳۷ بود. همان‌طور که مشاهده می‌شود ژنوتیپ‌هایی که شباهت کمتری داشتند، در خوشه‌های متفاوتی

جدول ۳- ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های علف‌پشمکی با استفاده از آغازگرهای ISSR براساس ضریب تشابه ژاکارد

**Table 3. Similarity matrix between genotypes of *B. inermis* using ISSR markers based on Jaccard similarity coefficient.**

Genotype	B.in1	B.in2	B.in3	B.in4	B.in5	B.in6	B.in7	B.in8	B.in9	B.in10	B.in11	B.in12	B.in13	B.in14	B.in15	B.in16	B.in17	B.in18	B.in19	B.in20
<i>B.in1</i> #	1.00																			
<i>B.in2</i>	0.63	1.00																		
<i>B.in3</i>	0.63	0.63	1.00																	
<i>B.in4</i>	0.60	0.59	0.71	1.00																
<i>B.in5</i>	0.64	0.59	0.70	0.71	1.00															
<i>B.in6</i>	0.56	0.56	0.65	0.66	0.75	1.00														
<i>B.in7</i>	0.53	0.55	0.58	0.59	0.67	0.72	1.00													
<i>B.in8</i>	0.56	0.53	0.61	0.60	0.71	0.68	0.74	1.00												
<i>B.in9</i>	0.59	0.52	0.61	0.62	0.67	0.74	0.72	0.74	1.00											
<i>B.in10</i>	0.55	0.54	0.57	0.55	0.60	0.62	0.67	0.69	0.68	1.00										
<i>B.in11</i>	0.50	0.53	0.54	0.53	0.59	0.62	0.61	0.62	0.65	0.69	1.00									
<i>B.in12</i>	0.50	0.55	0.53	0.51	0.57	0.60	0.60	0.61	0.62	0.70	<b>0.78</b>	1.00								
<i>B.in13</i>	0.48	0.53	0.54	0.54	0.56	0.57	0.61	0.60	0.58	0.65	0.63	0.70	1.00							
<i>B.in14</i>	0.59	0.51	0.61	0.54	0.62	0.60	0.60	0.63	0.68	0.65	0.58	0.61	0.59	1.00						
<i>B.in15</i>	<b>0.39</b>	<b>0.39</b>	0.43	<b>0.41</b>	<b>0.42</b>	0.44	0.44	0.45	0.46	0.50	0.47	0.43	0.47	0.50	1.00					
<i>B.in16</i>	0.50	0.50	0.56	0.53	0.55	0.57	0.57	0.59	0.61	0.61	0.58	0.59	0.57	0.66	0.51	1.00				
<i>B.in17</i>	0.52	0.51	0.54	0.53	0.58	0.58	0.58	0.58	0.63	0.59	0.57	0.58	0.60	0.64	0.50	0.72	1.00			
<i>B.in18</i>	0.48	0.48	0.51	0.50	0.52	0.51	0.52	0.56	0.54	0.57	0.63	0.62	0.53	0.54	0.44	0.63	0.68	1.00		
<i>B.in19</i>	0.54	0.53	0.57	0.54	0.59	0.59	0.58	0.57	0.61	0.57	0.58	0.59	0.55	0.62	0.44	0.70	0.69	0.66	1.00	
<i>B.in20</i>	<b>0.37</b>	<b>0.37</b>	<b>0.41</b>	<b>0.38</b>	<b>0.40</b>	<b>0.39</b>	<b>0.41</b>	<b>0.41</b>	<b>0.39</b>	0.45	0.43	<b>0.41</b>	<b>0.41</b>	<b>0.39</b>	0.51	0.45	0.46	0.47	0.48	1.00

# The names and information of the genotypes is presented in Table 2

نام و مشخصات ژنوتیپ‌ها در جدول ۲ آمده است

## بحث

نتایج این مطالعه تنوع ژنتیکی قابل توجهی را در میان ژنوتیپ‌های علف‌پشمکی (*B. inermis*) نشان داد که با استفاده از ۳۴ آغازگر ISSR آشکارسازی شد. این آغازگرها با کارایی بالا توانستند الگوهای چندشکلی را شناسایی کنند و به‌ویژه در خوشه IV، بیشترین تنوع ژنتیکی مشاهده شد. این موضوع نشان‌دهنده تأثیر عوامل محیطی، فشارهای انتخابی و احتمالاً نوترکیبی ژنتیکی در شکل‌گیری تفاوت‌های ژنوتیپی است (Antonova and Röder, 2022; Safari et al, 2019). تنوع مشاهده شده در شاخص‌های Ne، شاخص شانون (I) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، مؤید سازگاری گسترده این گونه با شرایط اکولوژیکی مختلف و ساختار دگرگشن آنهاست (Farsani et al, 2011; Szenejko et al, 2016; Al-Soqeer et al, 2020; Karimi and Saedi, 2016).

تحلیل خوشه‌ای و PCA، هردو ساختار ژنتیکی منسجم و چهار خوشه مجزا را نشان دادند که نشانگر ثبات و صحت داده‌های مولکولی مورد استفاده بود (Hand et al, 2012; Keshavarzi and Tabaripour, 2021). خوشه IV با بیشترین پراکندگی ژنتیکی، منابع ارزشمندی برای به‌نژادی صفات مهمی مانند مقاومت به خشکی و بیماری فراهم می‌کند. این ارزیابی‌ها براساس عملکرد علوفه و مقاومت به بیماری زنگ انجام شده‌اند، اما برای ارزیابی دقیق‌تر مقاومت به خشکی و بیماری‌ها، پیشنهاد می‌شود که این ویژگی‌ها در مطالعات آینده به‌طور تجربی بررسی شوند. در مقایسه نتایج تحلیل خوشه‌ای (UPGMA) و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)، در بیشتر موارد الگوی گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها همخوانی بالایی نشان داد؛ با این حال، مواردی از عدم انطباق نیز مشاهده شد. به‌طور خاص، ژنوتیپ‌های B.in14 و B.in16 که در تحلیل خوشه‌ای براساس ضریب ژاکارد در خوشه IV قرار گرفته بودند، در نمودار پراکنش حاصل از PCA در محدوده خوشه III مشاهده شدند. این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت‌های بنیادی در روش‌های آماری دو تحلیل باشد:

تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA براساس ماتریس شباهت کلی و روابط سلسله‌مراتبی بین ژنوتیپ‌ها عمل می‌کند و ساختار درختی را بر مبنای بیشینه شباهت ایجاد می‌نماید، اما PCA داده‌ها را به مؤلفه‌های خطی اصلی تجزیه می‌کند که بیشترین واریانس را توضیح می‌دهند و موقعیت ژنوتیپ‌ها در فضا ممکن است تحت تأثیر مؤلفه‌های ترکیبی از چندین شاخص ژنتیکی قرار گیرد (Mohammadi et al, 2022). در نتیجه، جابه‌جایی این دو ژنوتیپ در PCA می‌تواند بیانگر وجود ویژگی‌های ژنتیکی مشترک آنها با اعضای خوشه III باشد که در ساختار درختی کمتر مشهود است. این موضوع می‌تواند به پیچیدگی روابط ژنتیکی یا اثر متقابل منشأ جغرافیایی و صفات خاص این ژنوتیپ‌ها مرتبط باشد و نیاز به بررسی دقیق‌تر با نشانگرهای تکمیلی مانند SNP یا آنالیزهای چندمتغیره پیشرفته‌تر دارد (Jombart and Collins, 2015).

ماتریس شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها (دامنه ۰/۳۷ تا ۰/۷۸) تأییدکننده تفکیک مناسب ژنوتیپ‌ها در تحلیل‌های خوشه‌ای و PCA بود (Safari et al, 2019; Hand et al, 2012). برای نمونه، ژنوتیپ‌هایی که دارای کمترین شباهت بودند، مانند B.in01 و B.in20 را می‌توان به‌عنوان والدین مناسب برای تلاقی‌های هدفمند با هدف بروز هتروزیس استفاده نمود. شواهد موجود از سایر تحقیقات نیز توانمندی بالای آغازگرهای ISSR را در مطالعات تنوع ژنتیکی گونه‌های *Bromus* نشان می‌دهند (Bidyananda et al, 2024; Shahabzadeh et al, 2020). همچنین استفاده از آغازگرهای تک‌نوکلئوتیدی (SNP) و توالی‌یابی نسل جدید (NGS) در کنار ISSR می‌تواند شناخت عمیق‌تری از ساختار ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها فراهم کند (Yi et al, 2021; Zhao et al, 2017). این مطالعه نیز همانند بررسی (Sun et al, 2021) بر روی گونه *Bromus catharticus*، نشان‌دهنده تأثیر منشأ جغرافیایی بر ساختار ژنتیکی بود. در این تحقیق نیز سه ژنوتیپ B.in07، B.in08 و B.in08 با منشأ مجارستان در گروه دوم در کنار هم

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا و ظرفیت قابل توجه برای به‌کارگیری ژنوتیپ‌های مختلف *B. inermis* در برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی است. همچنین آغازگرهای ISSR14, ISSR13, ISSR06, ISSR07, ISSR24 و ISSR35 بیشترین تعداد باند‌های تکرارپذیر را ایجاد کردند که برای مطالعات مولکولی در علف‌پشمکی پیشنهاد می‌شوند. تحلیل‌های مولکولی با استفاده از نشانگرهای ISSR نشان داد که ژنوتیپ‌هایی با تفاوت ژنتیکی بالا می‌توانند از طریق ایجاد هتروزیس، پایه‌گذار تولید ارقام سنتتیک پایدار باشند و باعث افزایش سازگاری ارقام جدید در شرایط متفاوت محیطی شوند.

### سیاسگزاری

از کلیه همکاران پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی تبریز و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند، قدردانی می‌شود.

قرار گرفتند ولی ژنوتیپ‌های B.in04, B.in13 و B.in15 که منشأ مجارستانی داشتند در گروه‌های جدا قرار گرفتند که حکایت از قرابت آنها با ژنوتیپ‌های داخلی داشت. ژنوتیپ‌هایی با پراکنش وسیع‌تر، عمدتاً از زیستگاه‌های متمایز بوده و با فشارهای اکولوژیکی متفاوت سازگار شده‌اند. در نهایت، این تحقیق با ارائه اطلاعات دقیق از ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌های *B. inermis*، مبنای مناسبی برای اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی، حفظ منابع ژنتیکی و افزایش بهره‌وری و سازگاری گونه در برابر تنش‌های محیطی آینده فراهم می‌کند. البته ترکیب روش‌های مولکولی مانند ISSR با ابزارهای نوین مانند GWAS، مسیر مؤثری برای شناسایی ژنوتیپ‌های برتر در گونه‌های مرتعی مانند *B. inermis* خواهد بود.

در مطالعه ملکی و همکاران جمعیت‌های B.in9, B.in15, B.in8, B.in1 و B.in19 از نظر عملکرد علوفه و بذر به عنوان جمعیت‌های برتر معرفی شده بودند (Maleki et al, 2021). ژنوتیپ‌های B.in06, B.in14, B.in19, B.in17, B.in12, B.in16, B.in08 و B.in15 بررسی شده در این تحقیق متعلق به همین جمعیت‌ها بودند (جدول ۱) که در سه خوشه متفاوت گروه‌بندی شدند که می‌توان از آنها در تولید ارقام سنتتیک استفاده نمود.

### References

- Al-Hadeithi, Z. S., & Jasim, S. A. 2021. Study of plant genetic variation through molecular markers: An overview. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(45B), 464-473.
- Al-Soqeer, A., Al-Otayk, S. M., & Motawei, M. I. 2020. Molecular characterization of new Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*) genotypes. *Plant Omics*, 13(2), 104-107.
- Antonova, E. V., & Röder, M. S. 2022. Evaluation of the genetic structure of *Bromus inermis* populations from chemically and radioactively polluted areas using microsatellite markers from closely related species. *International Journal of Radiation Biology*, 98(7), 1289-1300.
- Bam, S., Ott, J. P., Butler, J. L., & Xu, L. 2022. Belowground mechanism reveals climate change impacts on invasive clonal plant establishment. *Scientific Reports*, 12(1), 2860.
- Bidyananda, N., Jamir, I., Nowakowska, K., Varte, V., Vendrame, W. A., Devi, R. S., & Nongdam, P. 2024. Plant Genetic Diversity Studies: Insights from DNA Marker Analyses. *International Journal of Plant Biology*, 15(3), 607-640.
- Farsani, T. M., Etemadi, N., Sayed-Tabatabaei, B. E., & Talebi, M. 2011. Assessment of genetic diversity of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) using ISSR markers. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 383-392.

- Hand, M. L., Cogan, N. O. & Forster, J. W. 2012. Molecular characterisation and interpretation of genetic diversity within globally distributed germplasm collections of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and meadow fescue (*F. pratensis* Huds.). *Theoretical and Applied Genetics*, 124(6), 1127-1137.
- Jombart, T., Kamvar, Z. N., Collins, C., Lustrik, R., Beugin, M.-P., Knaus, B. J., & Jombart, M. T. 2018. Package 'adegenet'. Github repository: <https://github.com/thibautjombart/adeogenet>.
- Jombart, T., & Collins, C. 2015. A tutorial for discriminant analysis of principal components (DAPC) using adegenet 2.0.0.
- Karimi, A., & Saeidi, H. 2016. Genetic diversity of *Sorghum halepense* (L.) Pers. in Iran as revealed by IRAP markers. *Plant Genetic Resources*, 14(2), 132-141.
- Keshavarzi, M., & Tabaripour, R. 2021. Genetic diversity of *Lolium persicum* (Poaceae) in Southern region of coastal Caspian sea using ISSR markers. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 45(6), 1861-1868. (In Persian).
- Maleki, Z., Nouraein, M., & Mohammadi, R. 2021. Investigation variation of the forage yield and related agro-morphological traits of *Bromus inermis* Leyss. populations. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 29(1), 108-124. (In Persian).
- Mohammadi, R., Amiri, S., & Montakhabi Kalajahi, V. 2022. ISSR markers efficiency to assess cool-season grass species genetic diversity and phylogenetic relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 92(3), 691-699.
- Molnar, S.J. 1988. Smooth Bromegrass (*Bromus inermis* Leyss). In: Bajaj, Y.P.S. (eds) Crops II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 6. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-73520-2\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-642-73520-2_22)
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the national academy of sciences*, 70(12), 3321-3323.
- Palit, R., & DeKeyser, E. S. 2022. Impacts and drivers of smooth brome (*Bromus inermis* Leyss.) invasion in native ecosystems. *Plants*, 11(10), 1340.
- Safari, H., Zebarjadi, A., Kahrizi, D., & Jafari, A. A. 2019. The study of inter-specific relationships of *Bromus* genus based on SCoT and ISSR molecular markers. *Molecular Biology Reports*, 46(5), 5209-5223 .
- Shahabzadeh, Z., Mohammadi, R., Darvishzadeh, R., & Jaffari, M. 2020. Genetic structure and diversity analysis of tall fescue populations by EST-SSR and ISSR markers. *Molecular Biology Reports*, 47, 655-669 .
- Sun, M., Dong, Z., Yang, J., Wu, W., Zhang, C., Zhang, J., Ma, X. 2021. Transcriptomic resources for prairie grass (*Bromus catharticus*): expressed transcripts, tissue-specific genes, and identification and validation of EST-SSR markers. *BMC plant biology*, 21(1), 264 .
- Szenejko, M., Śmietana, P., & Stepień, E. 2016. Genetic diversity of *Poa pratensis* L. depending on geographical origin and compared with genetic markers. *PeerJ*, 4, e2489 .
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739 .
- Ünal, S., & Mutlu, Z. 2015. A Study in smooth bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) in the semi-arid of Turkey. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24(1), 47-55 .
- Yi, L., Dong, Z., Lei, Y., Zhao, J., Xiong, Y., Yang, J., Ma, X. 2021. Genetic diversity and molecular characterization of worldwide prairie grass (*Bromus catharticus* Vahl) accessions using SRAP markers. *Agronomy*, 11(10), 2054 .
- Yüzer, Ö., Doğaç, E., Tonguç, A., & Güneç, E. 2023. ISSR-based population genetic structure of some Turkish honeybee (*Apis mellifera* L., 1758) populations. *Turkish Journal of Bioscience and Collections*, 7(2), 83-90 .
- Zhao, Y., Yu, F., Liu, R., & Dou, Q. 2017. Isolation and characterization of chromosomal markers in *Poa pratensis*. *Molecular Cytogenetics*, 10, 1-9.