

Investigating the genetic diversity of native Iranian *Gladiolus* with ISSR and IRAP molecular markers

Mohammad Nazarbeigi¹, Zeynab Roein², Atefeh Sabouri^{*3}

1. M.Sc. Graduate, Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran. Email: m.nazarbigy@ilam.ac.ir
2. Associate Prof., Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran. Email: z.roein@ilam.ac.ir
3. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: a.sabouri@guilan.ac.ir

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 04.23.2023

Revised: 05.15.2023

Accepted: 06.03.2023

Keywords:

Cluster analysis,
Heterosis,
Ornamental plant,
Structure analysis

ABSTRACT

Background and Objectives: *Gladiolus* (*Gladiolus* spp.) is used as a cut flower, garden ornamental plant and potted plant. Iran is one of the distribution centers of this ornamental plant. In breeding and release of new cultivars, access to diverse germplasm is a vital and essential resource for the production of new genotypes with desirable characteristics, that fortunately, the favorable distribution of *Gladiolus* in Iran has provided the basis for its breeding. Considering that sufficient knowledge about the amount and pattern of genetic diversity of Iran *Gladiolus* is necessary to understand the genetic differentiation of diverse populations, in the present research, ISSR and IRAP markers were used to evaluate genetic diversity and determine the degree of relatedness among native *Gladiolus* samples of Iran.

Materials and Methods: In order to conduct the research, 76 samples of *Gladiolus* belonging to 14 populations were collected from the provinces of Ilam, Kermanshah, Hamedan and Kurdistan in the spring of 2019. The collected samples were related to two species, *G. atroviolaceus* and *G. segetum*. In order to evaluate the genetic diversity of the samples, five ISSR primers and three IRAP primers were used. After recording the genetic data, genetic diversity statistics, molecular variance analysis, cluster analysis and structure analysis were performed.

Results: Based on the results, the average of polymorphic information content (PIC), it was estimated to be 0.38 and 0.34 for ISSR and IRAP markers, respectively, and in the comparison between the used primers, ISSR5 and IRAP3 were able to show a higher potential in diversity. For the investigated populations, the Nei's gene diversity index and Shannon's information index were 0.166 and 0.25, respectively, which showed that the populations have relatively high genetic diversity. The results of the analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the diversity within the populations (81%) is more than the diversity between the *Gladiolus* populations (19%). Cluster analysis based on NJ (Nearest Neighbor) method and Jaccard similarity matrix assigned 76 *Gladiolus* samples into five separate groups. Also, based on structure analysis, *Gladiolus* samples were divided into two subpopulations.

Conclusion: The present study showed that the used markers despite were not able to separate two species from each other and there was no perfect

match between genetic diversity and geographic diversity, had a significant potential in genetic differentiation of the samples. Among the primers, ISSR5 and IRAP3 showed higher efficiency based on all genetic diversity indices and are recommended for use in study and differentiating different *Gladiolus* samples. Also, due to the existence of significant genetic diversity within the populations, selection from within the populations is more desirable to perform crosses and achieve heterosis and is recommended for use in breeding programs.

Cite this article: Nazarbeigi, Mohammad, Roein, Zeynab, Sabouri, Atefeh. 2024. Investigating the genetic diversity of native Iranian *Gladiolus* with ISSR and IRAP molecular markers. *Journal of Plant Production Research*, 31 (1), 89-110.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/JOPP.2023.21288.3038

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی تنوع ژنتیکی گلائیول‌های بومی ایران با نشانگرهای مولکولی IRAP و ISSR

محمد نظریگی^۱، زینب روئین^۲، عاطفه صبوری^{۳*}

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران. رایانامه: m.nazarbigy@ilam.ac.ir
۲. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران. رایانامه: z.roein@ilam.ac.ir
۳. نویسنده مسئول، دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: a.sabouri@guilan.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی - پژوهشی	سابقه و هدف: گلائیول (<i>Gladiolus spp.</i>)، به‌عنوان گل بریدنی، گیاه زینتی باغچه‌ای و گیاه گلدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ایران یکی از مراکز پراکنش این گیاه زینتی است. در به‌نژادی و معرفی ارقام جدید دسترسی به ژرم‌پلاسم متنوع، یک منبع حیاتی و ضروری برای تولید ژنوتیپ‌های جدید با صفات مطلوب است که خوشبختانه پراکنش مطلوب گلائیول در ایران زمینه را برای کار به‌نژادی آن فراهم آورده است. با توجه به این‌که دانش کافی در مورد میزان و الگوی تنوع ژنتیکی گلائیول‌های ایران، برای درک میزان تمایز ژنتیکی جمعیت‌های مختلف ضروری است در پژوهش حاضر از نشانگرهای IRAP و ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان خویشاوندی بین نمونه‌های گلائیول بومی ایران استفاده شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۳ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۳	مواد و روش‌ها: جهت انجام پژوهش تعداد ۷۶ نمونه گلائیول متعلق به ۱۴ جمعیت از استان‌های ایلام، کرمانشاه، همدان و کردستان در بهار سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده مربوط به دو گونه <i>G. segetum</i> و <i>G. atroviolaceus</i> بودند. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌ها، از تعداد پنج آغازگرهای ISSR و تعداد سه آغازگر IRAP استفاده شد. پس از ثبت داده‌های ژنتیکی، آماره‌های تنوع ژنتیکی، تجزیه واریانس مولکولی، تجزیه خوشه‌ای و تجزیه ساختار انجام شد.
واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تجزیه ساختار، گیاهان زینتی، هنروزیس	یافته‌ها: بر اساس نتایج میانگین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)، برای دو نشانگر ISSR و IRAP به ترتیب ۰/۳۸ و ۰/۳۴ برآورد شد و در مقایسه بین آغازگرهای مورد استفاده ISSR5 و IRAP3 توانستند پتانسیل بالاتری در ایجاد تمایز بین نمونه‌ها نشان دهند. برای جمعیت‌های مورد بررسی، شاخص تنوع ژنی نی، و شاخص اطلاعات شانون، به ترتیب ۰/۱۶۶ و ۰/۲۵،

به دست آمد که بیانگر این مطلب است که جمعیت‌ها از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی برخوردارند. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که تنوع داخل جمعیت‌ها (۸۱ درصد) بیش‌تر از تنوع (۱۹ درصد) بین جمعیت‌های گلاپول است. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش NJ (نزدیک‌ترین همسایگی) و ماتریس تشابه جاکارد ۷۶ نمونه گلاپول را به پنج گروه جداگانه تفکیک نمود. هم‌چنین، بر اساس تجزیه ساختار، نمونه‌های گلاپول در دو زیر جمعیت قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان داد نشانگرهای استفاده شده پتانسیل قابل‌توجهی در تمایز ژنتیکی نمونه‌ها دارند؛ اگرچه قادر به تفکیک اختصاصی دو گونه از هم نبودند و بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی تطابق کاملی مشاهده نشد. در بین آغازگرها، IRAP3 و ISSR5 در مجموع شاخص‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی، کارایی بالاتری را نشان دادند و بنابراین استفاده از آن‌ها در بررسی و تمایز نمونه‌های مختلف گلاپول توصیه می‌شود. هم‌چنین با توجه به وجود تنوع ژنتیکی قابل‌توجه در درون جمعیت‌ها، انتخاب از درون آن‌ها برای انجام تلاقی‌ها به منظور رسیدن به هتروزیس، مطلوب‌تر است و برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی پیشنهاد می‌شود.

استناد: نظریگی، محمد، روئین، زینب، صبوری، عاطفه (۱۴۰۳). بررسی تنوع ژنتیکی گلاپول‌های بومی ایران با نشانگرهای مولکولی IRAP و ISSR. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۳۱ (۱)، ۸۹-۱۱۰.

DOI: 10.22069/JOPP.2023.21288.3038



© نویسنده‌گان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

گلابول (*Gladiolus spp.*)، متعلق به تیره Iridaceae (زنبقیان) است که حدود ۲۶۵ گونه از آن در جهان شناسایی شده است. این گیاه چند ساله و پیازی بومی آفریقای جنوبی است و عمدتاً در مناطق گرمسیری آفریقا، ماداگاسکار، شبه جزیره عربستان، حوضه مدیترانه، اروپا و آسیا توزیع می‌شود (۱). جنس گلابول در ایران پنج گونه خودرو (*G. halophilus*, *G. persicus*, *G. segetum*, *G. Kotschyanus* و *G. atroviolaceus*) دارد (۲ و ۳).

ژئوفیت‌ها گیاهان علفی چندساله هستند که اندام هوایی خود را در شرایط نامطلوب محیطی همانند خشکی و سرما از دست می‌دهند و مجدداً با مساعد شدن شرایط محیطی در فصل بعد از روی اندام زیرزمینی رشد می‌کنند (۴ و ۵). گلابول (*Gladiolus spp.*)، یک ژئوفیت پدازه‌دار با گل‌آذین سنبله است که به‌عنوان گل بریدنی، گیاه زینتی باغچه‌ای و گیاه گلدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشورهای تولیدکننده اصلی گلابول ایالات متحده آمریکا (فلوریدا و کالیفرنیا)، هلند و ایتالیا هستند (۶). ایران یکی از مراکز پراکنش این گیاه زینتی ارزشمند است (۲).

با توجه به این‌که افزایش تنوع در رنگ، بافت و شکل گل، ماندگاری و بهبود تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی از مهم‌ترین اهداف پژوهش‌گران حوزه اصلاح گیاهان زینتی است، بنابراین به‌نژادی و معرفی ارقام جدید گلابول و تجاری‌سازی آن‌ها نیز دارای اهمیت فراوانی است (۷). از آن‌جایی‌که اولین قدم در اصلاح و بهبود خصوصیات گیاهی، شناخت خصوصیات ژنتیکی ژرم‌پلاسما بومی است (۸)، دسترسی به ژرم‌پلاسما متنوع، یک منبع حیاتی و ضروری برای تولید گیاهان جدید با صفات مطلوب

است که خوشبختانه پراکنش مطلوب این گیاه در ایران، مقدمات برای آغاز کار به‌نژادی آن را فراهم نموده است.

آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی فقط به استفاده از آن‌ها در برنامه اصلاحی محدود نمی‌شود. به‌طوری‌که عدم اطلاع از میزان تنوع موجود می‌تواند باعث از دست رفتن تنوع ژنتیکی و در نتیجه کاهش توانایی جمعیت‌های گیاهی در سازگاری با تغییرات محیطی و بقای گیاه شود (۹ و ۱۰). بنابراین تنوع ژنتیکی برای سازگاری با تغییرات محیطی و اقلیمی و بقای یک گونه گیاهی بسیار حیاتی است. شناخت و دسترسی به ژرم‌پلاسما متنوع امکان حفاظت از ذخایر ژنتیکی به روش‌های مختلف را فراهم می‌کند. راهکارهای متعددی برای حفاظت گیاهی توسط پژوهش‌گران پیشنهاد می‌شود که چهار استراتژی اصلی برای حفاظت گیاهی عبارت‌اند از محافظت در محل یا روی‌شگاه^۱، محافظت خارج از محل طبیعی^۲، کاربری پایدار^۳ و اعمال سیستم‌های قانونی^۴. بنابراین شناخت تنوع جمعیت‌های گیاهی به‌منظور سیاست‌گذاری در مدیریت و حفظ گونه‌های گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۱).

به‌نژادگران معمولاً از ویژگی‌های ریخت‌شناسی به‌عنوان نخستین نشانگرها برای توصیف و طبقه‌بندی اولیه ژرم‌پلاسما در راستای انتخاب منابع ژنتیکی با ارزش برای برنامه اصلاحی (۱۲) یا حفاظتی خود استفاده می‌کنند. ارزیابی این صفات معمولاً کم هزینه و آسان است، به‌طوری‌که بدون نیاز به تکنیک‌های پیشرفته بیوشیمیایی و مولکولی بررسی می‌شود (۱۳). اما محدودیت‌های نشانگرهای ژنتیکی مبتنی بر فنوتیپ مانند تأثیرپذیری از محیط رشد، کارایی آن‌ها را کاهش می‌دهد. بنابراین تلاش برای دستیابی به

- 2- In situ
- 3- Ex situ
- 4- Sustainable uses
- 5- Legal system establishment

- 1- Corm

با وجود این که کشور ایران دارای پتانسیل عظیمی از گونه‌های وحشی و منابع ژنتیکی گسترده‌ای از گیاهان به‌ویژه ژنوفیت‌های زیتنی است، ولی در اکثر موارد برای تأمین بخش زیادی از گیاهان زیتنی به واردات وابسته است. از آنجایی که گیاهان بومی ژرم‌پلاسما مناسبی برای برنامه‌های اصلاحی می‌باشند، بنابراین با دستیابی به تکنیک‌های اصلاحی جدید، به‌نژادگران می‌تواند ارقام جدید و ارزشمندی از این گیاهان را به جهان عرضه نمایند. شناسایی تنوع گلائیول به‌عنوان یک گیاه بومی در سطوح مختلف فنوتیپی و مولکولی به‌عنوان گامی مهم در جهت برنامه‌های به‌نژادی و حفاظتی آن محسوب می‌شود. بررسی منابع مختلف نشان داد که تاکنون تنها تنوع ریخت‌شناسی گونه‌های گلائیول در مناطق محدودی از ایران انجام شده و سطح بالایی از تنوع فنوتیپی برای این جمعیت‌ها گزارش شد (۷ و ۱۹) و گزارشی مبنی بر ارزیابی تنوع در سطح مولکولی وجود ندارد.

با توجه به سطح بالای تنوع ریخت‌شناسی در ژرم‌پلاسما گلائیول، کومار و همکاران (۲۰۱۶)، استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR را در بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بسیار کارآمد گزارش کردند. آن‌ها تنوع ژنتیکی بین ۱۵ ژنوتیپ گلائیول را با استفاده از نه آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار دادند. این آغازگرها در مجموع ۷۵ نوار چند شکل با ۱۰۰ درصد چندشکلی ایجاد کردند و قادر به تمایز تمامی ژنوتیپ‌ها از هم بودند (۲۰).

کوتلونینا و همکاران (۲۰۱۷) از نشانگرهای ایزوزایم و AFLP برای بررسی ویژگی‌های تکثیری از جمله عقیمی و هم‌چنین بررسی فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف گلائیول از جمله *G. tenuis* و *G. imbricatus* L استفاده کردند (۲۱). هم‌چنین سینگ و همکاران (۲۰۱۷)، توانستند آغازگر اختصاصی از نشانگر SCAR معرفی کنند که قادر به

نشانگرهای دقیق‌تر که بتواند به‌خوبی پراکندگی و تنوع ژنتیکی را تشخیص دهد منجر به ایجاد نشانگرهای مستقیم و عمومی‌تر بر اساس DNA شد که به‌عنوان نشانگرهای مولکولی شناخته می‌شوند. یک نشانگر مولکولی به‌عنوان یک بخش خاص از DNA تعریف می‌شود که نشان‌دهنده تفاوت‌ها در سطح ژنوم است. نشانگرهای مولکولی مزایای بی‌شماری نسبت به ویژگی‌های فنوتیپی دارند، زیرا در همه بافت‌ها بدون توجه به مرحله رشد، تمایز و توسعه سلول، پایدار و قابل ردیابی هستند (۱۴). نشانگر مولکولی ISSR یا بین ریزماهوره‌ای^۱، از جمله نشانگرهای وابسته به PCR است که با استفاده از توالی‌های مرکزی ریزماهوره به‌عنوان آغازگر، همراه با چند نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳ یا ۵ یا به‌عنوان لنگرهای داخلی مناطق غیرتکراری مجاور تکثیر می‌شوند (۱۵). نشانگرهای ISSR در گروه نشانگرهایی هستند که به‌طور تصادفی قسمت‌هایی از ژنوم را تکثیر می‌نمایند و نیازی به اطلاعات اولیه از ژنوم نیست (۱۶ و ۱۷).

از طرف دیگر، قطعاتی از ژنوم موجود زنده که قادرند در ژنوم میزبان جابه‌جا شوند به‌عنوان عناصر ژنتیکی متحرک شناخته می‌شوند. گروهی از عناصر ژنتیکی متحرک که به‌واسطه یک رونوشت RNA و تبدیل آن به cDNA جابه‌جا شده و نسخه اصلی در مکان اولیه در ژنوم باقی می‌مانند را رتروترانسپوزون^۲ گویند (۱۸). نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون‌هایی مانند یا چندشکلی تکثیرشده بین رتروترانسپوزونی^۳ (IRAP) به دلیل فراوانی زیاد، تکرارپذیری مطلوب و حضور در همه جای ژنوم، از پتانسیل بالایی جهت بررسی روابط و تنوع ژنتیکی گیاهان برخوردار هستند (۱۴).

- 1- Inter Simple Sequence Repeat
- 2- Retrotransposon
- 3- Inter retrotransposon amplified polymorphism

بدیهی است دانش جامع در مورد میزان و الگوی تنوع ژنتیکی گلابول‌های ایران، برای درک مکانیسم تمایز ژنتیکی جمعیت‌های مختلف ضروری است. هم‌چنین این اطلاعات به ارزیابی استراتژی‌های حفاظت از گلابول‌های موجود در ایران کمک خواهد کرد.

به‌طورکلی، چنین اطلاعاتی می‌تواند به عنوان راهنمایی برای حفظ منابع ژنتیکی گونه‌های در معرض خطر و پیشنهاد یک استراتژی نمونه‌برداری مؤثر برای حفاظت و مدیریت آن‌ها باشد (۲۶). به‌همین دلیل در پژوهش حاضر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان خویشاوندی بین نمونه‌های گلابول بومی ایران از نشانگرهای ISSR و IRAP استفاده شد تا علاوه بر ارزیابی روابط ژنتیکی بین گونه‌های مختلف در ایران، اطلاعات بیشتری در مورد بهره‌برداری کارآمد از نمونه‌ها ارائه شود تا امکان طراحی برنامه‌های اصلاحی و حفاظتی برای گلابول در آینده فراهم شود.

مواد و روش‌ها

جهت انجام پژوهش و بررسی تنوع ژنتیکی گل گلابول تعداد ۷۶ نمونه گلابول متعلق به ۱۴ جمعیت از استان‌های ایلام، کرمانشاه، همدان و کردستان جمع‌آوری شد. جمع‌آوری نمونه‌ها در بهار سال ۱۳۹۸ انجام گرفت. مشخصات ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. از نمونه‌های گیاهی در هر منطقه، نمونه برگ از برگ‌های جوان جدا و در سطح یخ نگهداری شد و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس در آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان استخراج DNA (که مدت زمان طولانی نبود) در این دما نگهداری شد.

تمایز رقم خاص Amethyst از ۶۲ رقم دیگر مورد بررسی بود. آن‌ها نشانگرهای مولکولی را ابراز قدرتمندی در احراز هویت ژرم پلاسما گلابول معرفی کردند (۲۲).

در پژوهشی به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت در ۵۳ ژنوتیپ بومی هند و نمونه‌های خارجی گلابول (*Gladiolus hybridus* Hort.) از نشانگر ISSR استفاده شد. تجزیه و تحلیل نشانگرهای مولکولی نشان داد که دامنه درصد چندشکلی از ۰/۴۲ (ISSR 861) تا ۰/۹۹ (ISSR 855, ISSR 856 و ISSR 889) با میانگین ۰/۸۱۲، شاخص نشانگر^۱ از ۰/۹۹ (ISSR 889) تا ۹/۲۶ (ISSR 851) با میانگین ۴/۶۶ بود. هم‌چنین با رسم نمودار درختی، UPGMA ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند. تنوع ژنی نی از ۰/۹۲۹ تا ۱/۷۱۷، تعداد مؤثر آلل‌ها (Ne) از ۱/۲۶۲ تا ۱/۳۶۹، شاخص اطلاعات شانون (I) از ۰/۲۵۱ تا ۰/۳۵۳ و تنوع ژنی (He) در محدوده ۰/۱۶۷ تا ۰/۲۲۹ متغیر بود (۲۳). در پژوهش رازنا و همکاران (۲۰۲۲) تعداد نه هیبرید گلابول (*Gladiolus × gandavensis* Van Houtte) بر اساس نه نشانگر مبتنی بر miRNA مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع ۲۹۱ مکان ژنی مورد تکثیر قرار گرفت و نشانگر miR408 بالاترین فراوانی (۲۵ درصد) را در بین نشانگرها به خود اختصاص داد. هم‌چنین نشانگر miR141 توانست ارقام Athos و Dandy را از همدیگر و هم‌چنین از سایر ارقام متمایز کند (۲۴).

کارتیکا نیر (۲۰۲۲) از نشانگر ISSR و نشانگرهای موفولوژیکی برای بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ رقم گلابول استفاده کرد. آغازگرهای ISSR، ۹۴/۵۶ درصد چندشکلی نشان دادند و تعداد نوارهای چندشکل بین ۳ تا ۱۴ نوار بود (۲۵).

جدول ۱- مشخصات مناطق جمع‌آوری نمونه‌های گلابول.

Table 1. The information on the collection location of *Gladiolus* samples.

گونه Species	طول جغرافیایی Longitude (E)	عرض جغرافیایی Latitude (N)	تعداد نمونه Number of samples	استان Province	محل جمع‌آوری Location site	نام اختصاری جمعیت Population abbreviation	ردیف No
<i>G. atroviolaceus</i>	46.415457	33.469194	6	ایلام Ilam	سد ایلام - چمگردلان Cham Gardelan Dam	Ilam1	1
<i>G. atroviolaceus</i>	48.078266	34.720920	6	همدان Hamedan	جاده کرمانشاه - همدان Hamedan-Kermanshah highway	Hmdn2	2
<i>G. segetum</i>	45.859885	34.248129	5	کرمانشاه Kermanshah	گیلان غرب جوبباغان علیا Gilan-e-Gharb, Jub Baghan-e Olya	Krmnsh3	3
<i>G. segetum</i>	45.938587	36.023083	6	کردستان Kurdistan	جاده بانه، سقزو سبدلو Baneh-Saqez road, Sabadlu	Krdstn4	4
<i>G. atroviolaceus</i>	46.492337	34.066568	5	کرمانشاه Kermanshah	اسلام‌آباد غرب Eslamabad-e Gharb	Krmnsh5	5
<i>G. atroviolaceus</i>	46.411724	33.603802	5	ایلام Ilam	چغاسبز Chagha Sabz	Ilam6	6
<i>G. atroviolaceus</i>	47.409358	34.145989	5	کرمانشاه Kermanshah	هرسین، چم شاهی Harsin, Cham Shahi	Krmnsh7	7
<i>G. atroviolaceus</i>	47.869728	34.426065	5	همدان Hamedan	کنگاور Kangavar	Hmdn8	8
<i>G. atroviolaceus</i>	46.497315	33.527452	5	ایلام Ilam	دو راهی ملکشاهی، چشمه‌داوری Crossroads of Malekshahi, Cheshmeh Davi	Ilam9	9
<i>G. atroviolaceus</i>	46.404616	33.610227	5	ایلام Ilam	کوه شلم Shalam mountain	Ilam10	10
<i>G. atroviolaceus</i>	46.587326	33.482880	5	ایلام Ilam	پاکل گراب Pakal-e Garab	Ilam11	11
<i>G. segetum</i>	47.322425	33.093426	6	ایلام Ilam	دره شهر-آبدانان Darreh Shahr-Abdanan	Ilam12	12
<i>G. atroviolaceus</i>	46.567179	33.520020	6	ایلام Ilam	میشکخاص Mishkhas	Ilam13	13
<i>G. atroviolaceus</i>	46.585950	33.398759	6	ایلام Ilam	دلگشا Delgosha	Ilam14	14

حذف شد (۲۸). آغازگرهای IRAP و ISSR مورد استفاده در این پژوهش محصول شرکت metabion international AG بودند که توسط شرکت راستین ژن تهیه شدند. توالی آغازگرها در جدول ۲ ارائه شده است.

برای استخراج DNA ژنومی از روش CTAB (۲۷) با اعمال پاره‌ای تغییرات در مراحل مختلف استخراج استفاده شد. علت تغییرات، بالا بودن غلظت موسیلاژ در اطراف DNA استخراج شده گلابول بود که با استفاده از غلظت بالای نمک از اطراف DNA

جدول ۲- دمای اتصال و توالی آغازگرهای ISSR و IRAP مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی نمونه های گلابول.

Table 2. Annealing temperature and sequence of ISSR and IRAP primers used in *Gladiolus* samples genetic diversity evaluation.

دمای اتصال (سلسیوس) Annealing temperature (°C)	توالی آغازگر Primer sequence	آغازگر Primer
52	5'-TCTCTCTCTCTCTCC- 3'	ISSR1
52	5'-ACACACACACACACACG- 3'	ISSR2
61	5'-ACCACCACCACCACCACC- 3'	ISSR3
55	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTYG- 3'	ISSR4
52	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC- 3'	ISSR5
58	5'-CCGACCTTCATTCTGGCATA- 3'	IRAP1
66	5'-AGCACTTGTGTTTGCCTCAATCACC-3'	IRAP2
69	5'-CGGGTGGGTCGGGGTGTAC-3'	IRAP3

نظر گرفته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Labnet-Multi Gene Optimax, USA) با شیب دمایی اجرا شد. به این صورت که دمای اتصال آغازگر ۵ درجه سلسیوس پایین‌تر از دمای اختصاصی آغازگر در نظر گرفته شد و به ازای هر سیکل ۰/۴ درجه سلسیوس افزایش یافت (جدول ۳).

دمای اتصال مناسب برای هر آغازگر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در شیب حرارتی تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به حجم ۱۰ میکرولیتر برای هر آغازگر ISSR و IRAP تهیه شد. غلظت نهایی برای مواد موردنیاز این واکنش برای هر دو نوع آغازگر به ترتیب ۰/۸ μM برای آغازگر، ۰/۴ mM برای dNTP، ۱X برای بافر PCR، ۲mM برای MgCl₂ و ۵U/μl برای آنزیم Taq پلیمرز DNA در

جدول ۳- مشخصات چرخه‌های PCR در نمونه‌های گلابول.

Table 3. Cycling profile for the PCR in *Gladiolus* samples.

مرحله	واکنش	تعداد چرخه	دما (درجه سلسیوس)	زمان
Step	Reaction	Number of cycles	Temperature (°C)	Time
مرحله ۱	واسرشت‌سازی اولیه DNA	1	94	4 Min.
Step 1	Initial denaturation DNA			
مرحله ۲	واسرشت‌سازی DNA الگو	10	94	45 Sec.
	اتصال آغازگر به DNA		**Specific	1 Min.
	بسط آغازگر		72	1 Min.
Step 2	Annealing primer to DNA			
مرحله ۳	واسرشت‌سازی DNA الگو	30	94	45 Sec.
	اتصال آغازگر به DNA		Specific	1 Min.
	بسط آغازگر		72	1 Min.
Step 3	Annealing primer to DNA			
مرحله ۴	بسط نهایی	1	72	10 Min.
Step 4	Final extension			
مرحله ۵	نگهداری کوتاه مدت	1	4	Finish
Step 5	Short-term storage			

** این دما ۰/۴ درجه سلسیوس پایین‌تر از دمای اختصاصی آغازگر است که به ازای هر سیکل ۰/۴ درجه سلسیوس افزایش می‌یابد

** This temperature is 0.4 °C lower than the specific temperature of the primer, which increases by 0.4 °C per cycle

در این رابطه، PIC_i میزان اطلاعات چندشکلی نشانگر 'i' است. fi فراوانی وجود نوار که به صورت (۱) و ۱-fi فراوانی عدم وجود نوار که به صورت (۰) استفاده شد (۳۰). برای محاسبه سایر آماره‌های تنوع ژنتیکی و تجزیه به مختصات اصلی، تجزیه خوشه‌ای و تجزیه ساختار به ترتیب از نرم‌افزار (۳۱) GenAlEx6.5، (۳۲) GGT2.0 و (۳۳) STRUCTURE 2.3.4 استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی آماره‌های تنوع ژنتیکی آغازگرهای ISSR و IRAP: تنوع ژنتیکی ۷۶ نمونه گلابول وحشی مربوط به ۱۴ جمعیت با استفاده از پنج آغازگر ISSR و سه آغازگر IRAP بررسی شد. از مجموع پنج نشانگر ISSR تعداد ۹۳ ردیف باندهای قابل امتیازدهی

محصولات حاصل از آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک شدند و در نهایت امتیازدهی نوارهای روی ژل براساس صفر و یک انجام شد. امتیازدهی نوارها به صورت مشاهده‌ای و با استفاده از نرم‌افزار (۲۹) PyElph 1.4 صورت گرفت. به این ترتیب که در هر ژل در صورت حضور یک نوار واحد و قابل تشخیص، امتیاز یک و در صورت عدم حضور آن، امتیاز صفر داده شد. در نهایت ماتریس حاصل از اعداد صفر و یک در برنامه Excel ثبت شد. برای محاسبه میزان اطلاعات چندشکلی^۱ (PIC) از رابطه ۱ استفاده شد.

$$PIC_i = 2fi(1-fi) \quad (1)$$

1- Polymorphic Information Content

آن‌ها، که شاخص نشانگری را ۴/۶۶ گزارش کردند در پژوهش حاضر شاخص نشانگری بالاتر و ۶/۵۳ بود. درصد چندشکلی بالا (۹۴/۵۶ درصد) با استفاده از نشانگرهای ISSR در پژوهش دیگری توسط کارتیکا نیر (۲۰۲۲) بر روی ۱۵ رقم گلابول نیز نشان داده شد که بیانگر کارآمدی این نشانگر در تمایز ژنوتیپ‌های گلابول است (۲۵).

مقایسه نتایج سینگ و همکاران (۲۰۱۸a) که روی ۶۲ ژنوتیپ گلابول از ۲۱ نشانگر ISSR استفاده کرده بودند (۳۴)، مشخص نمود که مقادیر شاخص‌هایی چون میزان اطلاعات چندشکلی (۰/۲۸)، نسبت چندگانه مؤثر (۱۱/۰۲) و شاخص نشانگری (۳/۶۴) کم‌تر از یافته‌های ما روی گلابول‌های وحشی در غرب ایران بود. این مقایسه می‌تواند بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین نمونه‌های گلابول وحشی غرب ایران باشد که نویدبخش بستر مناسب برای آغاز کار به‌نژادی و زمینه‌سازی برای برنامه‌های به‌نژادی با هدف تولید ژنوتیپ‌های جدید است.

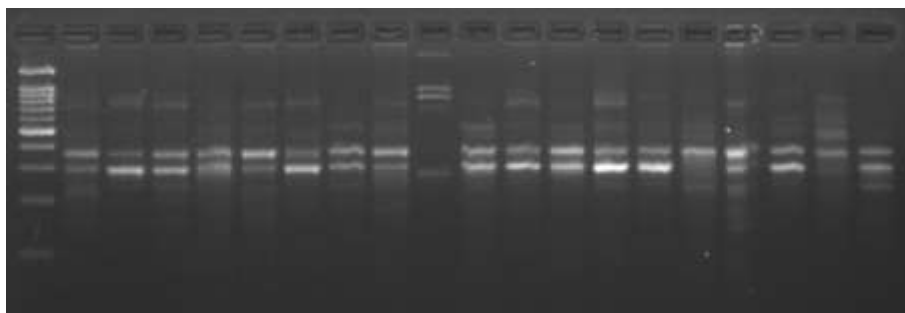
بررسی نتایج مربوط به سه نشانگر IRAP نشان داد که از مجموع ۵۹ ردیف بانندی شناسایی شده برای این نشانگرها، ۵۷ ردیف بانندی چند شکل ثبت شد. میانگین تعداد باند چند شکل به ازای هر آغازگر IRAP، ۱۹ درصد بود. بیش‌ترین تعداد باند چند شکل برای نشانگر IRAP3 با ۲۵ باند و کم‌ترین تعداد باند به نشانگر IRAP2 با ۱۵ باند اختصاص داشت. به‌طوری‌که میانگین درصد چند شکلی در این نشانگر ۹۶/۱ درصد بود. در بین نشانگرهای IRAP، آغازگر IRAP3 با ۱۰۰ درصد چندشکلی و آغازگر IRAP2 با ۹۳/۸ درصد به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین درصد چندشکلی را به خود اختصاص دادند. از نظر محتوای اطلاعات چندشکل، میانگین ۰/۳۴ ثبت شد که بیش‌ترین آن برای آغازگر IRAP1 با مقدار ۰/۳۶ و کم‌ترین آن به آغازگر IRAP2 با مقدار ۰/۳۲ مربوط بود. میزان شاخص نشانگر به عنوان یکی از

شناسایی شد که ۸۹ ردیف بانندی از آن‌ها چند شکل بودند (جدول ۴). میانگین تعداد باند چند شکل به‌ازای هر آغازگر ISSR، ۱۷/۸ درصد بود. بیش‌ترین تعداد باند چند شکل در آغازگر ISSR5 با ۲۶ باند و کم‌ترین تعداد باند در آغازگر ISSR3 با هشت باند مشاهده شد. به‌طور میانگین ۹۶/۳ درصد از باندها چند شکل بودند. از پنج آغازگر استفاده شده دو آغازگر ISSR3 و ISSR4 چند شکلی ۱۰۰ درصدی را نشان دادند. در حالی‌که آغازگر ISSR1 با ۸۹/۵ درصد کم‌ترین درصد چندشکلی را به خود اختصاص داد. میانگین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)، ۰/۳۸ به‌دست آمد که بیش‌ترین آن برای آغازگر ISSR1 با مقدار ۰/۴۶ و کم‌ترین محتوای اطلاعات چند شکل به آغازگر ISSR2 با مقدار ۰/۳۳ مربوط بود. دامنه شاخص شانون از ۰/۳۳ تا ۰/۳۷ متغیر و میانگین آن ۰/۳۴ بود. بیش‌ترین مقدار برای این شاخص در آغازگر ISSR1 با ۰/۳۷ مشاهده شد. براساس نتایج میانگین نسبت چندگانه مؤثر^۱ (EMR) برای نشانگرهای ISSR، ۱۷/۰۶ بود که بیش‌ترین مقدار از این شاخص با مقدار ۲۵/۰۴ به آغازگر ISSR5 اختصاص داشت. میزان شاخص نشانگر (MI) به‌طور میانگین ۶/۵۳ بود که در آغازگر ISSR5 دارای بیش‌ترین مقدار (۱۰/۲۴) بود. این موضوع نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگر نسبت به سایر آغازگرهاست. بنابراین می‌توان استفاده از این آغازگر را به عنوان آغازگر کاندید برای بررسی تنوع ژنتیکی و تمایز دقیق‌تر نمونه‌های مختلف و ناشناخته پیشنهاد کرد.

در مقایسه با سایر پژوهش‌های مشابه، نتایج چادهاری و همکاران (۲۰۱۸) از بررسی ۱۷ آغازگر ISSR روی ۵۳ نمونه گلابول (۲۳) نشان داد که درصد چند شکلی ۹۹ درصد بود که مشابه پژوهش حاضر مقدار بالایی به‌دست آمد اما بر خلاف نتایج

که میانگین نسبت چندگانه مؤثر (EMR) برای آغازگرهای IRAP، ۱۸/۳۷ بود که بیش‌ترین مقدار (۲۵) برای آغازگر IRAP3 ثبت شد. شکل ۱، الگوی نواری تکثیر شده توسط آغازگر IRAP2 در برخی جمعیت‌های گلابول را به عنوان نمونه نشان می‌دهد.

شاخص‌های تنوع به طور میانگین ۶/۳۶ بود که در آغازگر IRAP3 دارای بیش‌ترین مقدار (۸/۸۰) بود. میانگین شاخص شانون برای آغازگرهای IRAP استفاده شده در این پژوهش ۰/۳۳ بود که کم‌ترین مقدار در آغازگر IRAP2 با ۰/۳۲ مشاهده شد. لازم به ذکر است



شکل ۱- الگوی نواری DNA تکثیر شده با آغازگر IRAP2 در برخی نمونه‌های گلابول.

Fig. 1. DNA band profiles in some *Gladiolus* samples amplified by IRAP2 primer.

علی‌رغم تفاوت در برخی از شاخص‌های تنوع، نتایج حاضر نشان می‌دهد که می‌توان از هر یک از این نشانگرها برای تخمین سطوح چندشکلی در جمعیت‌های گلابول استفاده کرد.

تمام هشت نشانگر ISSR و IRAP استفاده شده در این پژوهش دارای PIC بین ۰/۳۲ تا ۰/۴۶ بودند که بر اساس منابع نشان می‌دهد این نشانگرها حاوی اطلاعات سودمندی هستند و برای مطالعه تنوع ژنتیکی گلابول مناسب و کارا بودند (۳۵). در مجموع

جدول ۴- شاخص‌های تنوع مربوط به پنج آغازگر ISSR و سه آغازگر IRAP

Table 4. Genetic diversity statistics of five ISSR primers and three IRAP primers.

شاخص	نسبت چندگانه مؤثر (EMR)	شاخص اطلاعاتی شانون (I)	میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)	درصد چندشکلی	نوار چندشکل	تعداد نوار	آغازگر
Marker index	Effective Multiple Ratio	Shannon Information Index	Polymorphic Information Content	Polymorphic percent	Polymorph bands	Number of bands	Primer
7.05	15.21	0.37	0.46	89.5	17	19	ISSR1
7.03	21.04	0.33	0.33	95.7	22	23	ISSR2
2.77	8.00	0.33	0.35	100.0	8	8	ISSR3
5.57	16.00	0.34	0.35	100.0	16	16	ISSR4
10.24	25.04	0.36	0.41	96.3	26	27	ISSR5
					89	93	کل Total
6.53	17.06	0.34	0.38	96.3	17.8	18.6	میانگین Mean
5.82	16.06	0.34	0.36	94.4	17	18	IRAP1
4.45	14.06	0.32	0.32	93.8	15	16	IRAP2
8.80	25.00	0.34	0.35	100.0	25	25	IRAP3
					57	59	کل Total
6.36	18.37	0.33	0.34	96.1	19	19.6	میانگین Mean

این شاخص‌ها (۰/۱۵۸ و ۰/۱۰۳) برای جمعیت Hmdn8 ثبت شد. با توجه به نتایج به دست آمده از شاخص‌های تنوع، جمعیت Hmdn8 دارای کم‌ترین تنوع پذیری در بین ۱۴ جمعیت گلائیول مورد بررسی بود. در حالی که جمعیت‌های Ilam13 و Ilam14 به ترتیب بیش‌ترین تنوع و پراکندگی را دارا بودند. در واقع بالا بودن مقادیر این شاخص‌ها نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بیش‌تر این دو جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌هاست. هرچه میزان تنوع بیش‌تر باشد، احتمال بیش‌تری وجود دارد که بعضی از اعضای جمعیت، تعدادی از آللهایی که باعث دوام در محیط می‌شوند را به دست بیاورند. از این روی احتمال آن که اعضای بیش‌تری از جمعیت حفظ شوند و از آن‌ها نتایج حاصل شود که حامل آن آلله‌ها باشند، بیش‌تر است (۳۶).

نتایج بررسی چادهاری و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی تنوع شش جمعیت گلائیول (۲۳)، با استفاده از شاخص اطلاعاتی شانون (۰/۲۵)، و شاخص تنوع ژنی نی (۰/۱۵) تقریباً اطلاعات مشابهی را گزارش کردند.

شاخص‌های تنوع در جمعیت‌های مورد ارزیابی: براساس نتایج ارائه شده در جدول ۵، بیش‌ترین تعداد باند تکثیر شده (۱۰۱ باند) در جمعیت Ilam13 و بعد از آن در Ilam11 و Ilam14 با تعداد ۱۰۰ باند ثبت شد. از طرف دیگر کم‌ترین تعداد باند (۶۰ باند) به جمعیت Hmdn8 اختصاص داشت. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده در تمام جمعیت‌ها ۸۹/۵۷ باند بود که جمعیت Hmdn8 فاصله زیادی از میانگین کل داشت. بیش‌ترین درصد چندشکلی (۶۳/۸۲) برای جمعیت Ilam14 و کم‌ترین درصد چندشکلی (۳۲/۲۴) برای جمعیت Hmdn8 بود.

بر اساس نتایج، در مجموع سه باند اختصاصی بین جمعیت‌ها مشاهده شد که متعلق به جمعیت Ilam1 (با دو باند اختصاصی) و جمعیت Ilam12 (با یک باند اختصاصی) بودند. در بقیه جمعیت‌ها باند اختصاصی ثبت نشد. با بررسی شاخص‌های تنوع شانون و نی مشخص شد که بیش‌ترین شاخص تنوع اطلاعاتی شانون (۰/۲۹۲) و نی (۰/۱۸۹) به جمعیت Ilam13 اختصاص دارد. در حالی که کم‌ترین مقادیر

جدول ۵- آماره‌های تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گلائیول.

Table 5. Genetic diversity statistics of *Gladiolus* populations.

شاخص تنوع ژنی نی (He)	شاخص اطلاعاتی شانون (I)	درصد چندشکلی	تعداد نوار اختصاصی	تعداد نوار	جمعیت
Nei's gene diversity Index	Shannon Information Index	Polymorphic percent	Number of specific bands	Number of bands	Population
0.165	0.260	57.89	2	94	Ilam1
0.171	0.264	55.92	0	94	Hmdn2
0.170	0.260	52.63	0	93	Krmnsh3
0.164	0.261	52.87	0	93	Krdstn4
0.164	0.253	52.63	0	89	Krmnsh5
0.165	0.256	53.95	0	88	Ilam6
0.174	0.269	55.92	0	88	Krmnsh7
0.103	0.158	32.24	0	60	Hmdn8
0.140	0.217	45.39	0	76	Ilam9
0.147	0.229	48.03	0	87	Ilam10
0.184	0.287	60.53	0	100	Ilam11
0.162	0.251	52.63	1	91	Ilam12
0.189	0.292	61.18	0	101	Ilam13
0.183	0.288	63.82	0	100	Ilam14
0.163	0.253	53.76	0.21	89.57	میانگین Mean

میان جمعیت‌هایی است که از لحاظ جغرافیایی کاملاً از هم دور و مجزا هستند. جریان ژنی پایین به دلیل فاصله جغرافیایی زیاد بین جمعیت‌ها ناشی می‌شود که پراکندگی اسپورها، گامت‌ها یا پیازهای رویشی را بین جمعیت‌های مورد مطالعه محدود می‌نماید (۳۷). برای رسیدن به هتروزیس بهتر، انتخاب از درون جمعیت‌ها مطلوب‌تر است. در هر برنامه اصلاحی، وجود تنوع به منظور انتخاب والدین مناسب، ضروری است. چون هر چقدر والدین از نظر ژنتیکی فاصله بیشتری از هم داشته باشند به تعداد کم‌تری تلاقی برای دستیابی به بهترین جمعیت با حداکثر تنوع، نیاز است و هتروزیس قوی‌تری در نتاج ظاهر خواهد شد (۳۸). از طرف دیگر با توجه به اهمیت حفظ تنوع موجود در گلابول، اجرای برنامه‌های حفاظت در محل و خارج از محل برای جلوگیری از فرسایش ژنتیکی و تضعیف تنوع منابع ژنتیکی توصیه می‌شود. در ارزیابی ماتریس فاصله و شباهت جمعیت‌های بررسی شده گلابول، براساس شاخص فاصله ژنتیکی نی، بیش‌ترین تفاوت و فاصله ژنتیکی با مقدار ۰/۱۵۷ بین Krmnsh3 و Ilam10 بود (جدول ۷). بنابراین انتظار می‌رود تلاقی بین این جمعیت‌ها با توجه به بیش‌ترین فاصله ژنتیکی، هتروزیس بیش‌تری را بروز دهد.

تجزیه واریانس مولکولی و بررسی میزان تفاوت و شباهت بین جمعیت‌ها: نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی برای جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای ISSR و IRAP نشان داد که درصد واریانس مربوط به درون جمعیت‌ها ۸۱ درصد و تنوع بین جمعیت‌ها ۱۹ درصد بود (جدول ۶). این نتایج، واریانس ژنتیکی بسیار معنی‌دار ($P < 0/001$) مربوط به تفاوت افراد درون جمعیت‌ها را بیان می‌کند. نتایج حاصل بیانگر سطح بالای تنوع بین افراد هر جمعیت است، به طوری که افراد درون جمعیت از تنوع بالایی برخوردار بودند. این تنوع می‌تواند بیانگر وجود نمونه‌هایی با فاصله ژنتیکی زیاد در گروه‌های بررسی شده باشد. بر اساس نتایج، تنوع بین جمعیت‌ها کمتر از تنوع درون جمعیت‌ها بود. از طرف دیگر، توزیع فراوانی ارزش جایگشت PhiPT تصادفی در مقابل ارزش PhiPT مشاهده شده نیز نتیجه واریانس بین جمعیت‌ها، که از طریق تجزیه واریانس مولکولی ۱۹ درصد به دست آمد، را تأیید کرد. مقدار آماره PhiPT (۰/۱۸۸) - که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌هاست - همانند تجزیه خوشه‌ای تا حدودی از نظر جغرافیایی از یکدیگر تفکیک شده‌اند. با این حال میزان واریانس بین جمعیت‌ها هم قابل توجه است. این موضوع نشان‌دهنده عدم امکان برقراری جریان ژنی

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های مختلف گلابول.

Table 6. Analysis of molecular variance of different populations of Gladiolus.

P-Value	آماره PhiPT PhiPT statistic	درصد واریانس Variance percent	میانگین مربعات MS	مجموع مربعات SS	درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of Variations
0.001	0.188	19	43.779	569.123	13	بین جمعیت Between populations
-	-	81	19.382	1201.667	62	درون جمعیت Within population
		100	-	1770.789	75	کل Total

جدول ۷- ضرایب تشابه (بالای قطر) و ضرایب فاصله (پائین قطر) بین ۱۴ جمعیت گلائیول بر اساس شاخص ژنتیکی Nei.

Table 7. Coefficients of similarity (upper diameter) and distance coefficients (lower diameter) between 14 populations of *Gladiolus* based on Nei's genetic index.

Ilam14	Ilam13	Ilam12	Ilam11	Ilam10	Ilam9	Hmdn8	Krmnsh7	Ilam6	Krmnsh5	Krdstn4	Krmnsh3	Hmdn2	Ilam1	شماره جمعیت
0.952	0.943	0.937	0.945	0.903	0.935	0.93	0.961	0.959	0.936	0.956	0.906	0.953	**	Ilam1
0.924	0.921	0.906	0.921	0.867	0.894	0.888	0.936	0.941	0.906	0.934	0.912	**	0.048	Hmdn2
0.906	0.917	0.903	0.902	0.854	0.867	0.898	0.89	0.909	0.886	0.898	**	0.092	0.099	Krmnsh3
0.955	0.934	0.923	0.947	0.914	0.935	0.92	0.964	0.954	0.93	**	0.108	0.068	0.045	Krdstn4
0.942	0.935	0.929	0.918	0.885	0.914	0.915	0.929	0.967	**	0.072	0.121	0.099	0.066	Krmnsh5
0.96	0.947	0.942	0.95	0.899	0.938	0.941	0.957	**	0.034	0.047	0.095	0.061	0.041	Ilam6
0.955	0.934	0.923	0.946	0.907	0.937	0.926	**	0.044	0.074	0.037	0.117	0.067	0.04	Krmnsh7
0.935	0.92	0.914	0.943	0.904	0.938	**	0.077	0.061	0.089	0.083	0.108	0.118	0.073	Hmdn8
0.951	0.914	0.914	0.937	0.932	**	0.064	0.065	0.064	0.09	0.068	0.142	0.112	0.067	Ilam9
0.914	0.897	0.885	0.935	**	0.07	0.101	0.098	0.106	0.122	0.09	0.157	0.142	0.102	Ilam10
0.945	0.935	0.924	**	0.067	0.065	0.059	0.056	0.051	0.086	0.055	0.103	0.083	0.056	Ilam11
0.951	0.959	**	0.08	0.122	0.09	0.09	0.08	0.06	0.074	0.08	0.102	0.099	0.066	Ilam12
0.958	**	0.042	0.067	0.109	0.09	0.083	0.069	0.054	0.067	0.069	0.086	0.082	0.059	Ilam13
**	0.043	0.05	0.056	0.09	0.05	0.067	0.046	0.041	0.06	0.046	0.099	0.079	0.049	Ilam14

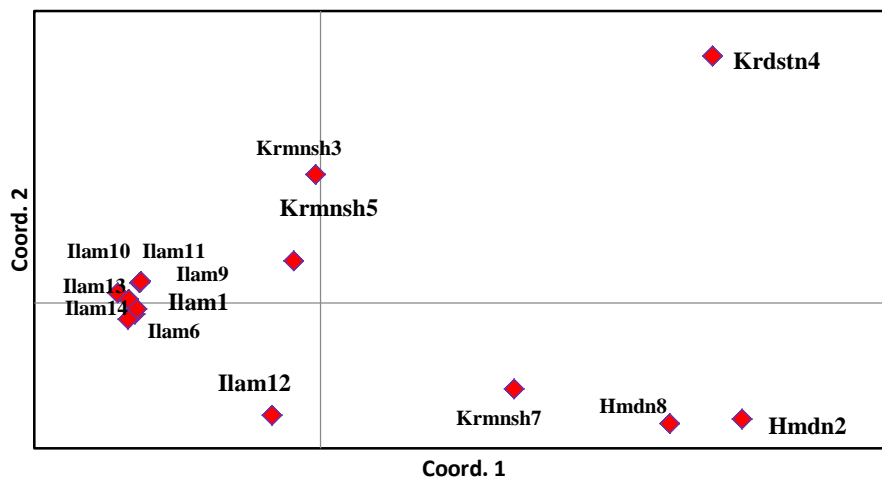
آغازگرها را نیز مورد توجه قرار داد و خاطر نشان نمود تفسیر فوق برای زمانی که تغییرات تعداد بسیار زیادی از نشانگرها به تعداد اندکی مؤلفه توجیه می‌شود صادق می‌باشد. در پژوهش حاضر با توجه به این که در مجموع هشت آغازگر در ۷۶ نمونه مورد بررسی قرار گرفته است بنابراین نتیجه حاصل خیلی دور از انتظار نیست و توجیه ۷۰/۱۵ درصد از کل تغییرات توسط دو مؤلفه از ۹ مؤلفه، نمی‌تواند قطعاً بیانگر عدم پوشش ژنومی تصادفی آغازگرها باشد. همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در نمودار دو وجهی تجزیه به مختصات اصلی، جمعیت‌ها به طور مناسبی بر اساس موقعیت جغرافیایی تفکیک شدند. بر اساس نتایج حاصل از این تجزیه و نمودار دو وجهی حاصل از دو مؤلفه اول جمعیت *Krdstn4* در موقعیت متفاوت و دور از سایر جمعیت‌ها قرار گرفت که می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی (بر اساس اطلاعات دو مؤلفه اصلی اول) این جمعیت با سایرین باشد و کاندیدای مناسبی برای مطالعات بیش‌تر است.

تجزیه به مختصات اصلی^۱ (PCoA): نتایج تجزیه به مختصات اصلی ۷۶ نمونه گلائیول با استفاده از ترکیب داده‌های دو نشانگر ISSR و IRAP بررسی شد. بر اساس نتایج، محورهای اول و دوم به ترتیب ۴۱/۸۷ و ۲۸/۲۸ درصد از کل واریانس را توجیه نمودند. در مجموع دو محور اصلی اول ۷۰/۱۵ درصد از کل واریانس را تبیین نمودند (جدول ۸). توجیه بخش زیادی از تغییرات توسط چند مؤلفه اول دلیل بر توزیع نامناسب آغازگرهای بررسی شده روی ژنوم است که نشان می‌دهد آغازگرها در سطح ژنوم پراکنده نیستند و بیش‌تر روی قسمت‌های از ژنوم متمرکز شده‌اند (۳۹). بر اساس یک تخمین کلی، اگر در داده‌های مولکولی حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد و یا به عبارتی کم‌تر از ۲۵ درصد از تغییرات مربوط به نشانگرها توسط دو یا سه مؤلفه اول توجیه شود نشان‌دهنده نمونه‌برداری مطلوب نشانگرها از کل ژنوم می‌باشد (۴۰ و ۴۱). البته نکته مهم این‌که باید تعداد

1- Principal Coordinates Analysis (PCoA)

تجزیه‌های چندمتغیره باید از نتایج مجموع آن‌ها یعنی نتایج تجزیه به مؤلفه‌ها به همراه تجزیه خوشه‌ای و بررسی ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده کرد (۴۰).

هر کدام از جمعیت‌های ایلام و جمعیت‌های همدان موقعیت تقریباً نزدیک به هم داشتند و می‌توان تفکیک خوبی را از لحاظ جغرافیایی مشاهده نمود. باید خاطر نشان کرد به‌منظور استفاده کاربردی از نتایج



شکل ۲- نمودار دوبعدی بر اساس تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) در ۱۴ جمعیت گلابول.

Fig. 2. Bi-plot based on principal coordinate analysis (PCoA) in 14 *Gladiolus* populations.

جدول ۸- درصد تنوع محاسبه شده برای نشانگرهای ISSR و IRAP به‌وسیله سه مؤلفه اصلی PCoA.

Table 8. Percentage of variation calculated for ISSR and IRAP markers by the three components of PCoA.

3	2	1	
9.20	28.28	41.87	درصد تنوع Variation percent
79.35	70.15	41.87	درصد تجمعی تنوع Cumulative Percent Variance

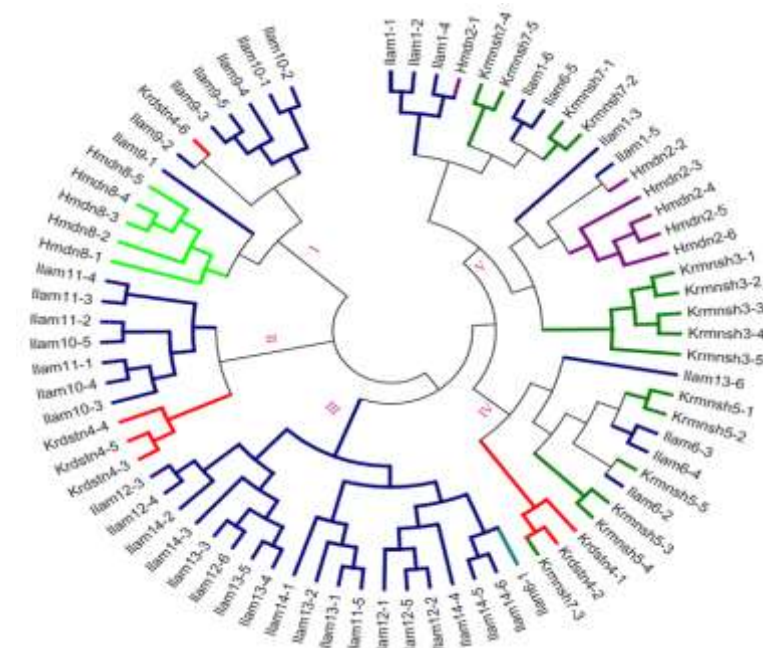
این موضوع نشان‌دهنده خصوصیات ژنتیکی و خویشاوندی این جمعیت‌هاست. گروه اول با ۱۳ نمونه از چهار جمعیت Hmdn8 (۵ نمونه)، Ilam9 (۵ نمونه) Krdstn4 (۱ نمونه) و Ilam10 (۲ نمونه) تشکیل شد. گروه دوم شامل ۱۰ نمونه از سه جمعیت Krdstn4 (۳ نمونه)، Ilam10 (۳ نمونه) و Ilam11 (۴ نمونه) بود. گروه سوم ۱۹ نمونه از پنج جمعیت را در خود جای داد که همه جمعیت‌ها به ایلام تعلق داشتند. جمعیت‌ها به تفکیک شامل Ilam6 (۱ نمونه)، Ilam11 (۱ نمونه)، Ilam12 (۶ نمونه)، Ilam13

تجزیه خوشه‌ای: در این پژوهش با هدف درک بهتر تنوع ژنتیکی از ترکیب داده‌های دو نشانگر استفاده شد. بدین‌منظور از داده‌های حاصل از هشت آغازگر موجود با هم ترکیب شدند و نمودار درختی حاصل از آن‌ها ترسیم شد. تجزیه خوشه‌ای توأم جمعیت‌های مختلف گلابول براساس نشانگرهای IRAP و ISSR با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد و روش NJ نشان داد که جمعیت‌ها براساس موقعیت‌های جغرافیایی محل جمع‌آوری نزدیک به هم به پنج گروه تفکیک شده‌اند و در خوشه‌های نزدیک به هم قرار گرفتند.

بنابراین نشانگرهای ISSR و IRAP نتوانستند افراد را براساس نوع گونه تفکیک نمایند. در این مطالعه نحوه گروه‌بندی PCoA با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای تا حدود زیادی مطابقت داشت. به طوری که در تجزیه به مختصات اصلی جمعیت‌های ایلام موقعیت نزدیک به هم داشتند و در گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای نیز غالباً در کنار هم قرار گرفتند که با توجه به موقعیت جغرافیایی آن‌ها دور از انتظار نیست. البته باید خاطر نشان نمود در تجزیه خوشه‌ای چون تجزیه براساس نمونه‌های جمعیت‌ها انجام شد، مطابق آنچه در شکل ۳ مشاهده می‌شود، برخی نمونه‌های یک جمعیت در گروه‌های مختلف پراکنده بودند که علاوه بر وجود تنوع درون جمعیتی، می‌تواند بیانگر این مطلب باشد برای تفکیک دقیق‌تر نمونه‌ها بر اساس اطلاعات مولکولی باید از تعداد آغازگرهای بیش‌تری استفاده کرد تا بتوان آغازگرهای اختصاصی‌تر، پوشش ژنومی مطلوب‌تر و به دنبال آن ایجاد تمایز دقیق‌تری را انتظار داشت.

(۵ نمونه) و Ilam14 (۵ نمونه) بود. در گروه چهارم ۱۲ نمونه قرار گرفت که متعلق به پنج جمعیت Ilam13 (۱ نمونه)، Krmnsh5 (۵ نمونه)، Ilam6 (۳ نمونه)، Krdstn4 (۲ نمونه) و Krmnsh7 (۱ نمونه) بود. بیش‌ترین تعداد افراد (۲۲ نمونه) در گروه پنجم قرار گرفتند. پنج جمعیت Ilam1 (۶ نمونه)، Hmdn2 (۶ نمونه)، Krmnsh3 (۵ نمونه)، Krmnsh7 (۴ نمونه) و Ilam6 (۱ نمونه) مربوط به گروه پنجم بودند (شکل ۳).

قرار گرفتن افراد در یک گروه نشان از نزدیکی ژنتیکی بین آن‌هاست. تعداد بیش‌تر زیرگروه‌ها در خوشه پنجم بیانگر تنوع بالای بین افراد در این گروه است. براساس بررسی نتایج، نمونه‌های Krdstn4 و Ilam6 به علت تنوع زیاد در بین خوشه‌ها پخش بودند که نشان‌دهنده تنوع بالای درون این مناطق است. با توجه به نتایج بالا مشخص می‌شود که بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی تطابق کاملی وجود ندارد. افزون بر این دو گونه *G. atroviolaceus* و *G. segetum* در گروه‌های مجزا گروه‌بندی نشدند.

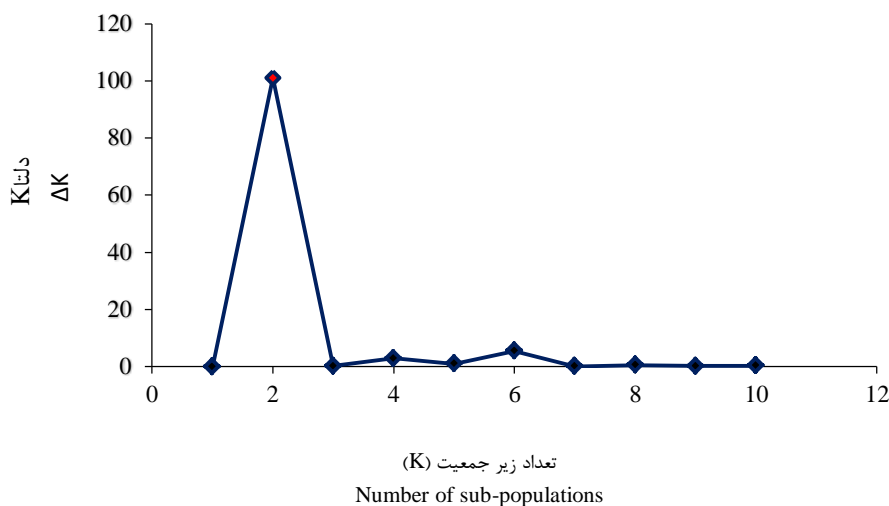


شکل ۳- گروه‌بندی جمعیت‌های مختلف گلابول بر اساس نشانگرهای ISSR و IRAP، ماتریس تشابه جاکارد و روش NJ.

Fig. 3. Grouping of different glycol samples based on ISSR and IRAP markers, Jaccard similarity matrix and NJ method.

که نقطه اوج منحنی را نشان می‌دهد. بنابراین ۷۶ نمونه گلاپول در دو زیر جمعیت قرار گرفتند. جدول ۸، درصد عضویت ۷۶ ژنوتیپ گلاپول را در گروه‌های یک و دو نشان می‌دهد.

تجزیه ساختار جمعیت: با استفاده از نرم‌افزار STRACUTRE ساختار جمعیت و میزان اختلاط افراد در جمعیت‌های مختلف گلاپول مشخص شد. بر اساس شکل ۴ بهترین K یا (بهترین تعداد زیر جمعیت) برای ترسیم ساختار جمعیت $K=2$ بود



شکل ۴- مقادیر دلتا K در هر کدام از مدل‌ها برای تعیین بهترین تعداد K (زیر جمعیت). تعداد $K=2$ بهترین تعداد زیر جمعیت است.

Fig. 4. The value of ΔK in each model to determine of the best K (sub-populations). The $K=2$ is the best number of sub-populations.

به هیچ‌کدام از گروه‌های یک و دو منتسب نشدند. تفکیک افراد در گروه‌های مختلف در شکل ۵ نشان داده شده است. در تجزیه ساختار جمعیتی که برای ۵۳ ژنوتیپ گلاپول در هند توسط چادهاری و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد، ژنوتیپ‌ها به سه زیر جمعیت تقسیم شدند که برخلاف پژوهش حاضر ۳۲ ژنوتیپ از آن‌ها مختلط بودند (۲۳).

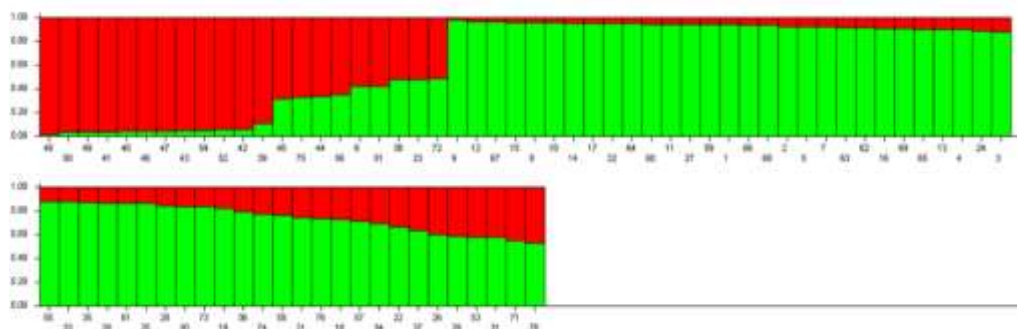
بر اساس نتایج، ۱۲ ژنوتیپ در گروه اول، ۴۷ ژنوتیپ در گروه دوم و ۱۷ ژنوتیپ به صورت مختلط قرار گرفتند (جدول ۹).

ژنوتیپ‌هایی که درصد عضویت آن‌ها در هیچ کدام از دو گروه فوق به ۷۰ درصد و بالاتر نرسید به‌عنوان ژنوتیپ‌های مخلوط انتخاب شدند. در پژوهش حاضر ۱۷ ژنوتیپ مخلوط شناسایی شدند که

جدول ۹- درصد عضویت نمونه‌های گلائیول بر اساس نتایج حاصل از نرم‌افزار STRACUTRE. تعلق به هر گروه با زیرخط و مخلوط بودن بدون خط نشان داده شده است.

Table 9. Membership proportion of *Gladiolus* samples based on the results of STRACUTRE software. Belonging to each group is indicated by underline and mixedness is indicated without line.

میزان عضویت			میزان عضویت			میزان عضویت		
Membership proportion			Membership proportion			Membership proportion		
گروه ۲	گروه ۱	نمونه	گروه ۲	گروه ۱	نمونه	گروه ۲	گروه ۱	نمونه
Group 2	Group 1	Sample	Group 2	Group 1	Sample	Group 2	Group 1	Sample
0.061	<u>0.939</u>	Ilam10-4	<u>0.948</u>	0.052	Krmnsh5-4	<u>0.943</u>	0.057	Ilam1-1
0.582	0.418	Ilam10-5	<u>0.846</u>	0.154	Krmnsh5-5	<u>0.924</u>	0.076	Ilam1-2
0.056	<u>0.944</u>	Ilam11-1	0.588	0.412	Ilam6-1	<u>0.883</u>	0.117	Ilam1-3
<u>0.882</u>	0.118	Ilam11-2	<u>0.840</u>	0.160	Ilam6-2	<u>0.900</u>	0.100	Ilam1-4
0.355	0.645	Ilam11-3	0.580	0.420	Ilam6-3	<u>0.924</u>	0.076	Ilam1-5
<u>0.718</u>	0.282	Ilam11-4	<u>0.950</u>	0.050	Ilam6-4	0.423	0.577	Ilam1-6
<u>0.769</u>	0.231	Ilam11-5	<u>0.879</u>	0.121	Ilam6-5	<u>0.924</u>	0.076	Hmdn2-1
<u>0.944</u>	0.056	Ilam12-1	<u>0.697</u>	0.303	Krmnsh7-1	<u>0.962</u>	0.038	Hmdn2-2
<u>0.949</u>	0.051	Ilam12-2	<u>0.877</u>	0.123	Krmnsh7-2	<u>0.981</u>	0.019	Hmdn2-3
<u>0.871</u>	0.129	Ilam12-3	<u>0.796</u>	0.204	Krmnsh7-3	<u>0.962</u>	0.038	Hmdn2-4
<u>0.919</u>	0.081	Ilam12-4	0.639	0.361	Krmnsh7-4	<u>0.948</u>	0.052	Hmdn2-5
<u>0.920</u>	0.080	Ilam12-5	0.479	0.521	Krmnsh7-5	<u>0.967</u>	0.033	Hmdn2-6
<u>0.950</u>	0.050	Ilam12-6	0.114	<u>0.886</u>	Hmdn8-1	<u>0.901</u>	0.099	Krmnsh3-1
<u>0.906</u>	0.094	Ilam13-1	0.043	<u>0.957</u>	Hmdn8-2	<u>0.954</u>	0.046	Krmnsh3-2
<u>0.939</u>	0.061	Ilam13-2	0.041	<u>0.959</u>	Hmdn8-3	<u>0.963</u>	0.037	Krmnsh3-3
<u>0.966</u>	0.034	Ilam13-3	0.064	<u>0.936</u>	Hmdn8-4	<u>0.911</u>	0.089	Krmnsh3-4
<u>0.938</u>	0.062	Ilam13-4	0.054	<u>0.946</u>	Hmdn8-5	<u>0.951</u>	0.049	Krmnsh3-5
<u>0.911</u>	0.089	Ilam13-5	0.336	0.664	Ilam9-1	<u>0.734</u>	0.266	Krdstn4-1
0.534	0.466	Ilam13-6	0.319	0.681	Ilam9-2	<u>0.823</u>	0.177	Krdstn4-2
0.555	0.445	Ilam14-1	0.045	<u>0.955</u>	Ilam9-3	<u>0.871</u>	0.129	Krdstn4-3
0.492	0.508	Ilam14-2	0.048	<u>0.952</u>	Ilam9-4	<u>0.746</u>	0.254	Krdstn4-4
<u>0.840</u>	0.160	Ilam14-3	0.021	<u>0.979</u>	Ilam9-5	0.665	0.335	Krdstn4-5
0.777	0.223	Ilam14-4	0.037	<u>0.963</u>	Ilam10-1	0.483	0.517	Krdstn4-6
0.331	0.669	Ilam14-5	0.036	<u>0.964</u>	Ilam10-2	<u>0.890</u>	0.110	Krmnsh5-1
<u>0.741</u>	0.259	Ilam14-6	0.426	0.574	Ilam10-3	<u>0.869</u>	0.131	Krmnsh5-2
						0.607	0.393	Krmnsh5-3



شکل ۵- گروه‌بندی ۷۶ ژنوتیپ گلائیول در دو گروه بر اساس نواحی ژنومی تکثیر شده دو نشانگر ISSR و IRAP. در این بار پلات محور Y نشان‌دهنده درصد عضویت افراد به گروه مربوطه و محور X بیانگر شماره نمونه‌هاست.

Fig. 5. Grouping of 76 genotypes of *Gladiolus* in two groups based on the amplified genomic regions of ISSR and IRAP markers. In the bar plot, the Y-axis indicates membership proportion, and the X-axis indicates the number of samples.

نتیجه‌گیری کلی

نشان دادند و بنابراین استفاده از آن‌ها در تمایز نمونه‌های مختلف گلابول توصیه می‌شود و می‌توانند کاندیدهای مناسبی در پژوهش‌های بعدی در این زمینه باشند. براساس شاخص فاصله ژنتیکی نی، بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین Krmnsh3 و Ilam10 برآورد شد و بنابراین انتظار می‌رود تلاقی بین این جمعیت‌ها با توجه به بیش‌ترین فاصله ژنتیکی، هتروزیس بیش‌تری را بروز دهد و در برنامه‌های به‌نژادی مدنظر قرار گیرد.

پژوهش حاضر تنوع ژنتیکی ۷۶ نمونه گلابول وحشی جمع‌آوری شده از غرب ایران، با استفاده از نشانگرهای ISSR و IRAP مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج اگرچه آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش نتوانستند افراد را بر اساس نوع گونه متفاوت گلابول از هم تفکیک نمایند، اما پتانسیل قابل‌توجهی را در تمایز ژنتیکی نمونه‌ها نشان دادند و به‌ویژه آغازگرهای ISSR5 و IRAP3 در مجموع شاخص‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی، کارایی بالاتری را

منابع

- Singh, N., Pal, A. K., Roy, R. K., Tewari, S. K., Tamta, S. & Rana, T. S. (2018). Characterization of gladiolus germplasm using morphological, physiological, and molecular markers. *Biochemical Genetics*, 56, 128-148.
- Majd, R., Chamanabad, H. R. M., Zand, E., Mohebodini, M., Khiavi, H. K., Alebrahim, M. T. & Tseng, T. M. (2019). Evaluation of herbicide treatments for control of wild gladiolus (*Gladiolus segetum*) in wheat. *Applied Ecology & Environmental Research*, 17(3).
- Wendelbo, P. (1977). Tulips and Irises of Iran and their relatives. Ariamehr Botanical Garden Publishment, 83p.
- Raunkiaer, C. (1934). The life forms of plants and statistical plant geography. Clarendon Press, Oxford.
- Kamenetsky, R. & Okubo, H. (Eds.). 2012. Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production. CRC press.
- Wahocho, N. A., Miano, T. F., & Leghari, M. H. (2016). Propagation of Gladiolus corms and cormels: A review. *African Journal of Biotechnology*, 15(32), 1699-1710.
- Fakhraei Lahiji, M., Rahimi Midani, A. & Safaei Chaeikar, S. (2012). Effect of irrigation intervals and different mulches on some traits of *Gladiolus* cv. rose supreme. *Seed and Plant Production*, 28(2), 239-248. [In Persian]
- Taheri, S., Zabet, M. P., Izanlo, A. P. & Izadi Darbandi, A. (2015). Assessment of genetic diversity of fennel ecotypes using RAPD and ISSR markers. *Agriculture. Biotechnology Journal*, 7(4), 113-128. [In Persian]
- Hogbin, P. M. & Peakall, R. (1999). Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata*. *Conservation Biology*, 13(3), 514-522.
- Yamagishi, M., Nishioka, M. & Kondo, T. (2010). Phenetic diversity in the *Fritillaria camschatcensis* population grown on the Sapporo campus of Hokkaido University. *Landscape and Ecological Engineering*, 6, 75-79.
- Hamrick, J. L. & Godt, M. J. W. (1996). Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise, J. C. & Hamrick, J. L. (Eds), *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York, USA, Pp 281-304.
- Krichen, L., Audergon, J. M. & Trifi-Farah, N. (2012). Relative efficiency of morphological characters and molecular markers in the establishment of an apricot core collection. *Hereditas*, 149(5), 163-172.
- Shao, Q. S., Guo, Q. S., Deng, Y. M. & Guo, H. P. (2010). A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers.

- Biochemical Systematics and Ecology*, 38(6), 1160-1169.
14. Agarwal, M., Shrivastava, N. & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27, 617-631.
 15. Li, T. H., Li, Y. X., Li, Z. C., Zhang, H. L., Qi, Y. W. & Wang, T. (2008). Simple sequence repeat analysis of genetic diversity in primary core collection of peach (*Prunus persica*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(1), 102-110.
 16. Pradeep Reddy, M., Sarla, N. & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17.
 17. Kunjupillai, V. (2005). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in mulberry genome analysis. *International Journal of Industrial Entomology*, 10(2), 79-86.
 18. SanMiguel, P. J. L. & Bennetzen, J. L. (1998). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany*, 82, 37-44.
 19. Pirzadi, L. (2018). Evaluation of genetic diversity of some native Iranian *Gladiolus* species based on morphological traits. MSc Thesis Ilam University. [In Persian]
 20. Kumar, P., Kumar, M., Naresh, R. K., Kumar, N., Chaudhary, P. & Sharma, S. (2016). Evaluation of genetic diversity among gladiolus (*Gladiolus hybridus hort.*) Germplasm using ISSR markers. *International Journal of Agricultural Sciences*, 12(1), 277-283.
 21. Kutlunina, N., Permyakova, M. & Belyaev, A. (2017). Genetic diversity and reproductive traits in triploid and tetraploid populations of *Gladiolus tenuis* (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 303, 1-10.
 22. Singh, N., Pal, A. K., Meena, B., Roy, R. K., Tamta, S. & Rana, T. S. (2017). Development of ISSR-and RAPD-derived SCAR markers for identification of *Gladiolus* germplasm. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92(6), 577-582.
 23. Chaudhary, V., Kumar, M., Sharma, S., Kumar, N., Kumar, V., Yadav, H. K., Sharma, S. & Sirohi, U. (2018). Assessment of genetic diversity and population structure in gladiolus (*Gladiolus hybridus Hort.*) by ISSR markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24, 493-501.
 24. Ražná, K., Kučka, M., Harenčár, E. & Majtán, M. (2022). Genetic Diversity of Selected *Gladiolus* (*Gladiolus* × *Gandavensis Van Houtte*) Cultivars Assesed by Microrna-Based Markers. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, 6(1).
 25. Karthika Nair, A. S. 2022. Genetic diversity analysis of gladiolus genotypes (*Gladiolus grandiflorus* L.) using molecular markers (Doctoral dissertation, Department of Plant Biotechnology, College of Agriculture, Vellayani, Kerala, India).
 26. Xiang, L., Li, X. L., Wang, X. S., Yang, J., Lv, K., Xiong, Z. Q., Chen, F. Q. & Huang, C. M. (2020). Genetic diversity and population structure of *Distylium chinense* revealed by ISSR and SRAP analysis in the Three Gorges Reservoir Region of the Yangtze River, China. *Global Ecology and Conservation*, 21, e00805.
 27. Saghai-Marooif, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. & Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(24), 8014-8018.
 28. Ramos, S. N., Salazar, M. M., Pereira, G. A. & Efraim, P. (2014). Plant and metagenomic DNA extraction of mucilaginous seeds. *MethodsX*, 1, 225-228.
 29. Pavel, A. B. & Vasile, C. I. (2012). PyElph-a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC bioinformatics*, 13(1), 1-6.

30. Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A. & De Loose, M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6, 125-134.
31. Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research- an update. *Bioinformatics.*, 28, 2537-9.
32. Van Berloo, R. (2008). GGT 2.0: versatile software for visualization and analysis of genetic data. *Journal of Heredity*, 99(2), 232-236.
33. Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
34. Singh, N., Mahar, K. S., Verma, S., Meena, B., Roy, R. K., Tewari, S. K. & Rana, T. S. (2018a). Molecular analysis of genetic variability and relationship among *Gladiolus* cultivars. *Indian Journal of Biotechnology*, 17, 118-127.
35. Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314-331.
36. Romesburg, C. 2004. Cluster Analysis for Researchers. Lulu. com.
37. Koohgard, M., Shiran, B. & Mirakhorli, N. (2013). Study of genetic diversity between and within populations of *Fritillaria imperialis* in Zagrose regions using RAPD marker. *Modern Genetics Journal*, 7(4), 353-362. [In Persian]
38. Amiri, P., Ismaili, A. & Hadian, J. (2017). Evaluation of genetic diversity of styrian pumpkin (*Cucurbita pepo* var. styriaca) populations, using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Resource*, 4(2), 17-28. [In Persian]
39. Roein, Z., Hassanpour Asil, M., Sabouri, A. & Dadras, A. R. (2014). Genetic structure of Chrysanthemum genotypes from Iran assessed by AFLP markers and phenotypic traits. *Plant Systematics and Evolution*, 300, 493-503.
40. Mohammadi, S. A. & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43(4), 1235-1248.
41. Siahshar, B., AllahDoo, M. & Hasani, H. S. (2010). Evaluation of genetic diversity of tritipyrum, triticale and wheat lines through RAPD and ISJ markers. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 41(3), 555-568. [In Persian]