



Investigation of genetic diversity of superior cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) genotypes using agronomic traits and ISSR markers for enhanced breeding strategies

Yousef Nami¹, Saleh Amiri², Reza Mohammadi^{3*}

1 Assis. Prof., Branch for Northwest and 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@yahoo.com

Received: 30/07/2025

Revised: 16/11/2025

Accepted: 20/12/2025

Abstract

Background and Objective: Cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) is a major cool-season perennial forage grass widely distributed in the rangelands of Iran and extensively used for livestock grazing and forage production. In grass breeding programs, knowledge of genetic variation is essential for achieving sustainable biomass production, broad adaptation, and long-term genetic improvement. Genetic diversity is the cornerstone of grass breeding because it enables effective parental selection, facilitates the exploitation of heterosis in polycross and synthetic varieties, and enhances yield stability and tolerance to biotic and abiotic stresses. Therefore, this study was conducted to investigate the genetic diversity of superior cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) genotypes using agronomic traits and ISSR molecular markers.

Materials and Methods: Twenty superior genotypes, previously selected based on forage yield, flowering date, and resistance to rust disease, were evaluated for both agronomic traits and ISSR molecular markers. The field experiment was conducted at the research farm of the Agricultural Biotechnology Research Institute, Tabriz, Iran, in 2020. Fifteen clonal plants from each genotype were established in compost-filled pots. After growth under greenhouse conditions, the seedlings were transplanted to the field. The experiment was arranged in a randomized complete block design with three replications. In each plot, five plants of each genotype were established at a spacing of 60 × 60 cm. No data were collected during the establishment year. Data on heading date, pollination date, plant height, panicle length, tiller number, crown diameter, seed yield, and forage dry matter yield at the first and second harvests were recorded in 2022. The data were subjected to analysis of variance, and mean comparisons were performed using the LSD test at the 5% probability level. Agronomic data were further classified using Ward's cluster analysis. For molecular analysis, 29 ISSR primers were employed. Band presence or absence was scored, and genetic diversity parameters, including the number of effective alleles (N_e), Shannon's information index (I), and

expected heterozygosity (H_e), were estimated. Genetic relationships among genotypes were evaluated using the Neighbor-Joining clustering method and principal component analysis (PCA).

Results: The results of the field experiment revealed significant differences among genotypes for all measured traits. Genotypes Dg1, Dg6, Dg12, Dg13, and Dg18 exhibited superior forage dry matter and seed yields compared with the remaining genotypes. Cluster analysis based on agronomic traits classified the 20 cocksfoot genotypes into four distinct groups, containing 3, 8, 4, and 5 genotypes, respectively. Molecular analysis identified 346 alleles, of which 337 (97.4%) were polymorphic. The number of alleles per primer ranged from 7 to 20, with an average of 11.93 alleles. The mean values of Shannon's information index, expected heterozygosity, and the number of effective alleles were 0.447, 0.315, and 1.533, respectively, indicating substantial genetic diversity among the evaluated genotypes. Cluster analysis based on ISSR markers also grouped the genotypes into four clusters, with cluster IV exhibiting the highest level of genetic divergence and diversity. The PCA results confirmed the clustering pattern obtained from the molecular data. The genetic similarity matrix, with coefficients ranging from 0.41 to 1.00, suggested that genetically distant clones could serve as suitable parental materials for polycross breeding to maximize heterosis. A comparison of the clustering patterns derived from ISSR markers and agronomic traits indicated that the grouping of genotypes was not fully consistent between the two analytical approaches.

Conclusion: Based on band clarity, reproducibility, and discriminatory ability, ISSR03, ISSR25, ISSR06, ISSR32, ISSR17, and ISSR15 were identified as the most informative markers for assessing genetic diversity in cocksfoot. Furthermore, the lowest Jaccard similarity coefficient (higher genetic distances) was observed between genotype Dg13 and genotypes Dg17, Dg18, and Dg19. Accordingly, genotypes Dg1, Dg6, Dg12, Dg13, and Dg18 demonstrated superior agronomic performance while also belonging to distinct groups with relatively greater genetic distances. These genotypes are therefore recommended as promising parental candidates for polycross or synthetic breeding programs aimed at maximizing heterosis and broadening the genetic base of cocksfoot cultivars.

Keywords: Cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.), forage yield, genetic diversity, ISSR markers, cluster analysis

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برتر علف‌باغ (*Dactylis glomerata* L.) با استفاده از صفات زراعی و آغازگرهای ISSR به منظور بهبود راهبردهای اصلاحی

یوسف نامی^۱، صالح امیری^۲ و رضا محمدی^{۳*}

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

۲ محقق، گروه کشت بافت و سلول، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

۳ * نویسنده مسئول، دانشیار، گروه کشت بافت و سلول، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران. پست الکترونیک: m_riza51@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۰۸ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۰۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۹

چکیده

سابقه و هدف: گیاه علف‌باغ (*Dactylis glomerata* L.) یکی از مهمترین گندمیان علوفه‌ای چندساله مناطق سرد است که در مراتع ایران پراکنش دارد و به دلیل تولید زیست‌توده بالا و سازگاری وسیع، نقش کلیدی در تولید علوفه و چرای دام دارد. در برنامه‌های به‌نژادی گراس‌ها، وجود و شناسایی تنوع ژنتیکی شرط اصلی موفقیت در اصلاح آنها بوده و امکان‌پذیرش والدین دور از نظر ژنتیکی، افزایش هتروزیس، بهبود پایداری عملکرد و ارتقای تحمل به تنش‌ها را فراهم می‌کند. از این رو، این پژوهش با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برتر علف‌باغ و معرفی والدین مناسب برای برنامه‌های اصلاحی با استفاده از صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی ISSR انجام شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۰ ژنوتیپ برتر که پیش‌تر براساس عملکرد علوفه، تاریخ گرده‌افشانی و مقاومت به بیماری زنگ انتخاب شده بودند، مورد ارزیابی مولکولی و مورفولوژیکی قرار گرفتند. آزمایش زراعی در مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی تبریز واقع در خسروشهر در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. هریک از ژنوتیپ‌ها در اوایل فصل پاییز ۱۳۹۹ به صورت تقسیم پنجه‌ها، به تعداد ۱۵ بوته کلون گردیدند و در هر کرت تعداد ۵ بوته به فاصله ۶۰ سانتیمتر کشت شدند. در سال ۱۴۰۰ گیاهان کشت شده به‌طور کامل استقرار یافتند. از بهار سال ۱۴۰۱ صفات زراعی شامل تاریخ ظهور خوشه، تاریخ گرده‌افشانی، ارتفاع بوته، طول خوشه، تعداد ساقه، قطر تاج پوشش، وزن خشک علوفه، عملکرد بذر و قطر طوقه اندازه‌گیری گردیدند. داده‌ها تجزیه واریانس شدند و پس از تأیید اختلاف‌های معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها، مقایسه میانگین‌ها با روش LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش (Ward) انجام گردید. در تجزیه مولکولی، از تعداد ۲۹ آغازگر ISSR استفاده شد. داده‌ها به صورت حضور/عدم حضور باندها ثبت و شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل تعداد مؤثر آلل (Ne)، شاخص شانون (I) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) محاسبه گردید. همچنین، روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با روش Neighbor-Joining و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام شد.

نتایج: نتایج تجزیه واریانس آزمایش زراعی نشان داد که تفاوت بین ژنوتیپ‌ها برای کلیه صفات معنی‌دار بود. ژنوتیپ‌های Dg6، Dg1، Dg10، Dg12 و Dg18 بالاترین عملکرد علوفه خشک و عملکرد بذر را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها داشتند. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را به

چهار خوشه اصلی تقسیم کرد که خوشه ۴، بیشترین پراکندگی و تنوع ژنتیکی را داشت. نتایج تجزیه ملکولی نشان داد که در مجموع ۳۴۶ آلل شناسایی شدند که ۳۳۷ آلل (۹۷/۴٪) چندشکل بودند. تعداد آلل در نشانگرها بین ۷ تا ۲۰ متغیر و میانگین آنها ۱۱/۹۳ آلل بود. میانگین شاخص شانون، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و تعداد مؤثر آلل به ترتیب برابر با ۰/۴۴۷، ۰/۳۱۵ و ۱/۵۳۳ بود که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجه بین ژنوتیپ‌هاست. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز این گروه‌بندی را تأیید کرد. تحلیل ماتریس شباهت ژنتیکی (دامنه ۰/۴۱ تا ۱/۱۰) نشان داد که ژنوتیپ‌های با فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند برای بیشینه‌سازی هتروزیس در تلاقی‌های پلی‌کراس استفاده شوند. مقایسه نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس نشانگرهای ISSR و صفات زراعی نشان داد که الگوی گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در این دو رویکرد همخوانی نداشت.

نتیجه‌گیری: براساس کیفیت باندها و توان تفکیک، آغازگرهای ISSR03، ISSR25، ISSR06، ISSR32، ISSR17 و ISSR15 به‌عنوان نشانگرهای کارآمدتر برای غربالگری ژرم‌پلاسم علف‌باغ پیشنهاد شدند. بر پایه ضریب شباهت جاکارد، کمترین شباهت (بیشترین فاصله) مربوط به فاصله ژنوتیپ Dg13 با ژنوتیپ‌های Dg17، Dg18 و Dg19 بود. در تجزیه خوشه‌ای براساس صفات زراعی، ژنوتیپ‌های Dg1، Dg6، Dg12، Dg13 و Dg18 با فاصله ژنتیکی بیشتر در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند و به عنوان کاندیداهای بالقوه به‌عنوان والدین برای برنامه‌های اصلاحی پلی‌کراس و توسعه ارقام مصنوعی با هدف به حداکثر رساندن هتروزیس و گسترش پایه ژنتیکی ارقام علف‌باغ توصیه شدند.

واژه‌های کلیدی: علف‌باغ (*Dactylis glomerata* L.)، عملکرد علوفه، تنوع ژنتیکی، آغازگر ISSR، تجزیه خوشه‌ای

مقدمه

به‌عنوان یکی از گندمیان علوفه‌ای اصلی در مناطق معتدل و سرد، نقش قابل‌توجهی در تأمین خوراک دام ایفا می‌کند و در بسیاری از کشورها به‌صورت کشت خالص یا در مخلوط با لگوم‌ها کشت می‌شود. مهم‌ترین کاربردهای آن شامل تولید علوفه با کیفیت، احیای مراتع و چراگاه‌ها و افزایش پایداری مرتع است و به‌دلیل انعطاف‌پذیری، عملکرد بالای زیست‌توده و سازگاری با شرایط محیطی متنوع مورد توجه قرار گرفته است (Kole, 2011).

علف‌باغ پس از استقرار، در صورت مدیریت مناسب، سال‌ها باقی می‌ماند و برای تولید علوفه خشک، چرای دام و سیلاژ مناسب است. این گیاه می‌تواند به صورت کشت خالص یا در مخلوط با لگوم‌ها کشت شود. علف‌باغ، گونه‌ای دگرگشن و متعلق به گندمیان سردسیری است که از تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی برخوردار بوده و در شرایط اقلیمی گوناگون، از

گراس‌ها از مهمترین گیاهان علوفه‌ای-مرتعی هستند که به لحاظ تولید علوفه، حفاظت خاک و جلوگیری از فرسایش آن اهمیت زیادی دارند. چون نواحی مریستمی در گراس‌ها نزدیک خاک قرار گرفته و توسط برگ‌های غلاف‌دار محافظت می‌شوند، بنابراین سازگاری خوبی در برابر چرای انواع دام دارند (Mohammadi et al, 2006).

گونه علف‌باغ که *Dactylis glomerata* L. شناخته می‌شود، تنها گونه اصلی جنس *Dactylis* بوده و دست‌کم شامل ۱۸ زیرگونه است (Majidi et al, 2015; Chtourou-Ghorbel et al, 2024). این گیاه علوفه‌ای چندساله و علفی، از گونه‌های مهم مرتعی به‌شمار می‌رود و به‌طور گسترده در مراتع نیمه‌استپی ایران پراکنش دارد و برای چرای دام و مدیریت پایدار مراتع مورد استفاده قرار می‌گیرد. از نظر اهمیت اقتصادی، علف‌باغ

پراکنش دارد و عوامل محیطی (شیب، ارتفاع، رطوبت و ویژگی‌های خاک) می‌توانند بر وقوع و فراوانی آن اثرگذار باشند (Sabouriazar et al, 2022). از سوی دیگر، علف‌باغ به‌عنوان یک گراس فصل سرد، از نظر کیفیت علوفه و قابلیت هضم، به‌ویژه در مراحل رویشی، می‌تواند از علوفه با ارزش تغذیه‌ای مناسب برخوردار باشد. کیفیت علوفه در گراس‌ها عموماً با شاخص‌های ترکیبات فیبری مانند ADF، NDF و شاخص‌های هضم‌پذیری ارزیابی می‌شود (Riley et al, 2014; Xie et al, 2014; Ren et al, 2021). بنابراین، هدف از این تحقیق برآورد میزان تنوع ژنتیکی موجود در ۲۰ ژنوتیپ منتخب علف‌باغ براساس نشانگرهای مولکولی ISSR و نیز عملکرد و صفات مورفولوژیکی بود تا ضمن شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی، زمینه انتخاب آگاهانه والدین برای تلاقی پلی‌کراس و طراحی راهبردهای اصلاحی فراهم شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و روش تحقیق آزمایش زراعی

مواد گیاهی مورد استفاده در این مطالعه شامل ۲۰ ژنوتیپ منتخب علف‌باغ (*D. glomerata* L.) بود که فهرست ژنوتیپ‌ها و محل جمع‌آوری آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. این ۲۰ ژنوتیپ برتر براساس نتایج مطالعات قبلی بر پایه‌ی داده‌های مربوط به عملکرد علوفه، تاریخ گرده‌افشانی و مقاومت به بیماری زنگ انجام شده بود. بخش عمده این خزانه شامل اکوتیپ‌های وحشی علف‌باغ جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران بود. دسترسی به ژرم‌پلاس اولیه علف‌باغ از طریق بانک ژن مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان مطابق با الزامات و مقررات ملی مربوط تبادل بذر نمونه‌های گیاهی فراهم گردید. همچنین، بذر شش اکسشن خارجی از کشور مجارستان (Hungarian Institute of Agrobotany – HIFA) در شهر تاپیوسله دریافت شد.

مناطق پرbaran تا مناطق با دما و بارندگی کمتر، رشد و تولید مطلوبی دارد (Madesis et al, 2014). از نظر اقتصادی، این گونه در مناطق معتدل و سرد به‌طور گسترده کشت می‌شود و به دلیل تحمل بالا به تنش‌های محیطی، درصد بالای برگ و ارزش غذایی مطلوب، در سامانه‌های تولید علوفه و چراگاه‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد (Şeker et al, 2014). علاوه بر این، سیلاز باکیفیت آن از طریق تخمیر مناسب، تولید مقادیر کافی اسیدلاکتیک، مهار رشد باکتری‌های مضر و بهبود نگهداری علوفه حاصل می‌شود (Tohno et al, 2013).

از دیگر ویژگی‌های بارز علف‌باغ، تحمل به سایه است که جذابیت آن را برای کشت در شرایط آب‌وهوایی گرم و معتدل افزایش می‌دهد (Xie et al, 2012). این ویژگی‌ها سبب شده تا علف‌باغ به یکی از گونه‌های کلیدی در سامانه‌های چرا و بهره‌برداری علوفه‌ای در سطح جهان تبدیل شود. پژوهش‌های پیشین، تنوع ژنتیکی گسترده این گیاه را نشان داده و بر ظرفیت آن به‌عنوان منبعی ارزشمند برای اصلاح نژاد تأکید داشته‌اند، اما استفاده مؤثر از این تنوع نیازمند بهره‌گیری از روش‌های نوین اصلاح مولکولی است (Mohammadi et al, 2020).

آغازگرهای ISSR به دلیل سادگی، تکرارپذیری، ارزان بودن و عدم نیاز به اطلاعات ژنتیکی قبلی، ابزاری کارآمد برای شناسایی تنوع ژنتیکی، روابط فیلوژنتیکی و تعیین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها هستند (Mohammadi et al, 2022; Bornet and Branchard, 2001; Adhikari et al, 2015). استفاده از این آغازگرها در اصلاح علف‌باغ می‌تواند با شناسایی ژنوتیپ‌های دارای فاصله ژنتیکی بیشتر، انتخاب والدین مناسب را برای ایجاد هتروزیس و بهبود پایداری عملکرد در ارقام سنتتیک تسهیل کند (Falconer and Mackay, 1983).

علف‌باغ در بخش‌هایی از شمال‌غرب و غرب تا مناطق مرتعی و کوهستانی کشور به‌صورت جمعیت‌های طبیعی

کد و منشأ ژنوتیپ‌های مورد بررسی در جدول ۱ ارائه شده است.

آزمایش زراعی با کشت و ارزیابی ۲۰ ژنوتیپ منتخب در مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی تبریز واقع در خسروشهر انجام شد. هریک از ژنوتیپ‌های منتخب در اوایل فصل پاییز ۱۳۹۹ در گلخانه به تعداد ۱۵ بوته کلون (پنج‌ه) تقسیم شدند. نشاءها در بهار ۱۴۰۰ به مزرعه منتقل و به صورت ردیفی (۵ بوته در کرت) به فاصله ۶۰ سانتیمتر کشت شدند. در بهار و تابستان سال ۱۴۰۰ عملیات وجین علف‌های هرز و آبیاری انجام شد و گیاهان کشت شده به‌طور کامل استقرار یافتند. از بهار سال ۱۴۰۱ صفات فنولوژیکی شامل تاریخ ظهور خوشه (تاریخ ظهور خوشه براساس تعداد روز از اول فروردین تا ظهور سه خوشه در هر بوته) و تاریخ گرده‌افشانی (تعداد روز از اول فروردین تا ظاهر شدن پرچم‌ها در سه خوشه از هر بوته) اندازه‌گیری شد. صفات مورفولوژیکی شامل ارتفاع بوته (ارتفاع بلندترین ساقه در زمان گرده‌افشانی)، طول خوشه (اندازه‌گیری میانگین طول سه خوشه از هر بوته)، تعداد ساقه (شمارش تعداد

ساقه‌های هر بوته در زمان گرده‌افشانی)، قطر تاج‌پوشش (اندازه‌گیری قطر گیاه قبل از ساقه‌دهی) و قطر طوقه (اندازه‌گیری قطر طوقه هر بوته پس از برداشت) اندازه‌گیری شدند. در زمان رسیدن بوته‌ها برداشت شدند. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد خشک و وزن خشک علوفه هر ژنوتیپ برحسب گرم در بوته توزین شدند. برای اندازه‌گیری عملکرد بذر، خوشه‌ها در زمان رسیدگی بذر، برداشت و استحصال شدند و وزن بذر برحسب گرم در بوته اندازه‌گیری شد.

داده‌های حاصل تجزیه واریانس شدند. پس از تأیید اختلاف‌های معنی‌دار، مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها، با روش LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از عملکرد و صفات مورفولوژیکی از تجزیه خوشه‌ای به روش وارد (Ward) استفاده شد. برای تجزیه آماری داده‌ها و تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار Minitab16 استفاده گردید.

جدول ۱- فهرست ژنوتیپ‌های منتخب علف‌باغ و محل جمع‌آوری آنها

Table 1. List of selected genotypes of cocksfoot (*Dactylis glomerata*) and their collection locations

Row	Genotype	Population No.	Initial Code	Collection and Seed Preparation Location
1	Dg1	D.g-05	RCAT041051	Szarvas, Hungary
2	Dg2	D.g-06	RCAT041050	Mosonmagyarovar, Hungary.
3	Dg3	D.g-15	4000/44	Seed Production Station, Semnan province, Shahroud, Iran.
4	Dg4	D.g-16	4000/25	Seed Bank, Shahid Fozveh Research Station. Isfahan, Iran.
5	Dg5	D.g-17	4000/24	Seed Bank, Shahid Fozveh Research Station. Isfahan, Iran.
6	Dg6	D.g-22	RCAT041111	Zalatarnok, Hungary.
7	Dg7	D.g-25	RCAT041111	Zalatarnok, Hungary.
8	Dg8	D.g-18	RCAT041052	Felsodinnye, Hungary.
9	Dg9	D.g-12	4000/26	Seed Bank, Shahid Fozveh Research Station. Isfahan, Iran.
10	Dg10	D.g-23	4000/2	Seed Bank, Shahid Fozveh Research Station. Isfahan, Iran.
11	Dg11	D.g-10	4000/29	Foreign
12	Dg12	D.g-17	4000/24	Seed Bank, Shahid Fozveh Research Station. Isfahan, Iran.
13	Dg13	D.g-11	RCAT041052	Felsodinnye, Hungary.
14	Dg14	D.g-20	4000/44	Shahroud, Seed Production Station Semnan, Iran.
15	Dg15	D.g-18	RCAT041052	Felsodinnye, Hungary.
16	Dg16	D.g-04	RCAT041050	Mosonmagyarovar, Hungary.
17	Dg17	D.g-18	RCAT041052	Felsodinnye, Hungary.
18	Dg18	D.g-24	4000/31	Lorak Farm, Najafabad, Isfahan, Iran.
19	Dg19	D.g-19	4000/2	Seed Bank, Shahid Fozveh Research Station. Isfahan, Iran.
20	Dg20	D.g-06	RCAT041050	Mosonmagyarovar, Hungary.

روش تحقیق ارزیابی مولکولی با استفاده از نشانگرهای

ISSR

استخراج DNA ژنومی از بافت‌های تازه علف‌باغ با استفاده از روش اصلاح‌شده CTAB انجام شد. بدین منظور، حدود ۰/۲ گرم از بافت گیاهی در نیتروژن مایع پودر شده و با بافر CTAB انکوبه گردید. پس از سانتریفوژ و جداسازی بخش آبی، مراحل خالص‌سازی با استفاده از مخلوط کلروفرم-ایزوامیل الکل انجام شد. DNA با ایزوپروپانول سرد رسوب داده شده، با اتانول ۷۰٪ شست‌وشو شد و پس از خشک شدن نسبی، در بافر TE حل گردید. DNA استخراج‌شده از کیفیت و خلوص مناسب برای انجام واکنش‌های PCR و تحلیل‌های مولکولی بعدی برخوردار بود.

برای ژنوتایپینگ کلون‌های علف‌باغ، از آغازگرهای مولکولی ISSR براساس روش گزارش‌شده توسط Mohammadi و همکاران (۲۰۲۰) استفاده شد. واکنش PCR با بهره‌گیری از Super Mastermix 2x حاوی آنزیم Taq DNA polymerase و سایر ترکیبات لازم انجام گردید. برنامه حرارتی PCR شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه دناتوراسیون، اتصال آغازگرها در دمای اختصاصی هر آغازگر (۴۸ تا ۵۸ درجه سلسیوس) و مرحله امتداد در ۷۲ درجه سلسیوس بود که با امتداد نهایی تکمیل شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٫۵٪ در بافر TBE الکتروفورز شده، با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و باندهای DNA با استفاده از سیستم مستندسازی ژل مشاهده و ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل نشانگرهای ملکولی ISSR

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از آغازگرهای ISSR، داده‌های حاصل از هر آغازگر به‌طور جداگانه ثبت و امتیازدهی شدند. از آنجا که داده‌ها ماهیت کیفی داشتند، الگوهای باند مشاهده‌شده روی ژل آغاز به داده‌های دودویی تبدیل شدند؛ به‌طوری‌که حضور باند با عدد ۱ و عدم حضور آن با عدد ۰ کدگذاری گردید. هر باند به‌عنوان یک جایگاه ژنی (locus) در نظر گرفته شد و ماتریس دودویی (۱-۰) به‌عنوان داده ورودی برای تحلیل‌های آماری مورد استفاده قرار گرفت. امتیازدهی اولیه در نرم‌افزار Excel انجام شد و تحلیل‌های مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx نسخه ۶.۴۱ و MEGA نسخه ۴.۰.۲ انجام گردید ([Kumar et al, 2018](#)). براساس این داده‌ها، شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل درصد باندهای پلی‌مورفیک (PPB)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، شاخص اطلاعاتی شانون (I) و تعداد مؤثر آلل‌ها (Ne) محاسبه شد. شاخص He براساس رابطه $He = 1 - \sum p_i^2$ ، شاخص I براساس رابطه $I = -\sum p_i \ln(p_i)$ و شاخص Ne مطابق رابطه $Ne = 1 / \sum p_i^2$ محاسبه گردید، که در آن p_i فراوانی آلل نام است. این شاخص‌ها به‌طور گسترده برای ارزیابی تنوع ژنتیکی با نشانگرهای ISSR استفاده شدند ([Shannon, 1948](#); [Nei, 1973](#); [Peakall and Smouse, 2006](#)).

تجزیه خوشه‌ای براساس نشانگرهای ISSR

برای سنجش میزان خویشاوندی ژنتیکی میان ۲۰ ژنوتیپ D. glomerata (علف‌باغ)، ماتریس شباهت ژنتیکی براساس ضریب Jaccard محاسبه شد. مقادیر شباهت جفتی (Pairwise Similarity) با استفاده از داده‌های دودویی به‌دست‌آمده از آغازگرهای ISSR تعیین گردید. ماتریس شباهت تولیدشده، مبنایی برای تعیین نزدیکی یا فاصله ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها فراهم کرد و در تبیین نتایج خوشه‌بندی و بررسی‌های ساختاری (structural analysis) مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA)

برای بررسی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها، تحلیل مؤلفه‌های اصلی (Principal Component Analysis – PCA) بر روی ماتریس شباهت حاصل از داده‌های آغازگر ISSR انجام شد. این تحلیل با استفاده از بسته adegenet در محیط نرم‌افزار R ([Jombart et al, 2018](#)) انجام شد که امکان پردازش و نمایش داده‌های ژنتیکی را فراهم می‌کند. دو مؤلفه اصلی نخست (PCoA1) و (PCoA2) که بیشترین میزان واریانس داده‌ها را شامل می‌شدند، استخراج گردیدند. سهم هر مؤلفه از تغییرات کل محاسبه شد تا اختلافات ژنتیکی بین گروه‌های ساختاری مشخص گردد. برای نمایش پراکنش ژنوتیپ‌ها در فضای چندبعدی، یک نمودار پراکنش دوبعدی (Biplot) ترسیم شد.

نتایج

بررسی صفات زراعی

نتایج تجزیه واریانس برای عملکرد و صفات مختلف مورفولوژیکی نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار میان ۲۰ ژنوتیپ انتخابی بود (جدول ۲). میانگین مربعات و ضریب تغییرات برای صفات مختلف از جمله تعداد روز تا خوشه‌دهی، ارتفاع بوته، طول خوشه، تعداد ساقه، قطر طوقه، عملکرد علوفه خشک و غیره نشان داد که برای بیشتر صفات، تفاوت‌های معنی‌دار در سطوح احتمال ۱٪ یا ۵٪ وجود داشت. این نشان‌دهنده تنوع قابل توجه میان ژنوتیپ‌های مختلف است (جدول ۲).

مقایسه میانگین صفات مختلف در ۲۰ ژنوتیپ نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل توجه در عملکرد علوفه و بذر بود. بالاترین عملکرد علوفه خشک و عملکرد بذر در ژنوتیپ‌های Dg1، Dg6، Dg10، Dg12 و Dg18 مشاهده شد که از لحاظ آماری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتری داشتند (جدول ۳).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس در ۲۰ ژنوتیپ برتر از گونه علف باغ (*D. glomerata*)Table 2. Result of Analysis of variance in 20 Superior Genotypes of cocksfoot (*D. glomerata*)

Traits	MS			CV%
	Block (df=2)	Genotype (df=19)	Error (df=38)	
Days to heading	14.46	80.94**	11.87	9.47
Days to pollination	26.01	30.95**	5.31	4.02
Plant height (cm)	437.45	168.18**	45.53	5.64
Panicle length (cm)	33.80	47.27**	11.15	18.76
Number of tillers at first cut	1187.46	2756.6**	517.80	15.98
Crown diameter at first cut (cm)	23.26	18.89**	6.04	9.26
Dry forage yield at first cut (g plant ⁻¹)	13725.30	6007.7**	1875.95	14.63
Seed yield at first cut (g plant ⁻¹)	216.26	343.03**	83.91	27.31
Canopy diameter (cm)	5.71	64.75*	28.66	10.01
Dry forage yield at second cut (g plant ⁻¹)	172.31	741.35**	301.01	30.14
Crown diameter at second cut (cm)	72.21	23.99**	6.35	8.88
Annual dry forage yield (g plant ⁻¹)	16954.11	8785.8**	2883.80	15.59

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

* and ** denote statistical significance at the 5% and 1% levels of probability, respectively

جدول ۳- مقایسه میانگین عملکرد علوفه و صفات مورفولوژیکی در ۲۰ ژنوتیپ برتر از گونه علف‌باغ

Table 3. Mean comparison of yield and morphological traits in the top 20 genotypes of cocksfoot (*D. glomerata*)

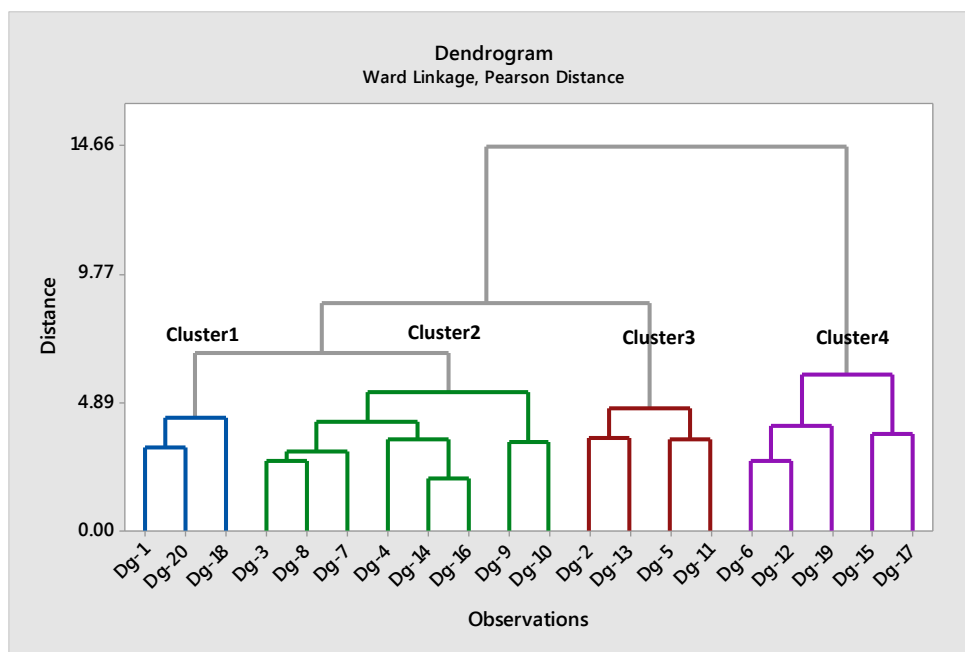
Genotypes	Days to heading	Days to pollination	Plant Height (cm)	Panicle Length (cm)	Tillers Number	Crown diameter cut1(cm)	DM yield Cut1 (g p ⁻¹)	Seed yield (g p ⁻¹)	Canopy Diameter Cut1(cm)	DM yield Cut2 (g p ⁻¹)	Crown diameter Cut2(cm)	Annual DM yield (g p ⁻¹)
Dg1	46.67 ^a	61.67 ^a	122.00	18.00	152.00 ^a	28.00 ^a	346.67 ^a	35.00 ^a	54.67	39.33	29.33 ^a	386.00 ^a
Dg2	35.33	57.00	97.33	13.33	161.67 ^a	25.33	275.33	42.00 ^a	50.00	22.33	25.00	278.67
Dg3	39.00	58.00	123.33	17.67	101.00	27.33 ^a	276.67	32.00	50.33	32.00	28.67 ^a	308.67
Dg4	40.00	59.67 ^a	130.67 ^a	17.33	109.67	22.00	293.00	21.33	48.00	43.00	23.33	336.00
Dg5	28.67	52.00	113.67	17.00	116.33	24.67	236.00	25.00	48.00	36.00	24.67	272.00
Dg6	31.67	54.33	118.67	20.33 ^a	175.33 ^a	28.33 ^a	379.00 ^a	42.33 ^a	57.33 ^a	66.67 ^a	30.67 ^a	445.67 ^a
Dg7	34.33	54.33	118.00	15.00	162.33 ^a	27.67 ^a	286.67	36.67	52.33	40.67	28.00 ^a	327.33
Dg8	36.00	57.00	128.33 ^a	14.00	108.00	25.00	286.67	32.00	58.00 ^a	36.67	25.00	323.33
Dg9	40.00	60.67 ^a	110.00	12.33	118.67	24.00	315.67 ^a	30.33	55.33 ^a	52.00	25.67	367.67 ^a
Dg10	38.33	58.33	125.33 ^a	14.33	169.67 ^a	22.33	349.33 ^a	47.67 ^a	57.67 ^a	62.67 ^a	26.00	412.00 ^a
Dg11	37.00	59.00	109.67	14.33	84.67	23.67	209.00	23.00	52.00	39.33	28.33 ^a	248.33
Dg12	37.67	53.67	112.67	16.67	186.67 ^a	30.00 ^a	312.67 ^a	43.33 ^a	60.00 ^a	73.00 ^a	33.00 ^a	385.67 ^a
Dg13	41.00 ^a	57.67	105.00	17.00	183.00 ^a	28.33 ^a	249.67	18.33	50.33	36.33	29.00 ^a	286.00
Dg14	42.33 ^a	60.33 ^a	119.67	20.33 ^a	166.00 ^a	25.33	305.33	36.33	46.67	41.33	27.00	346.67
Dg15	29.00	49.67	134.67 ^a	27.00 ^a	140.00	30.00 ^a	298.67	19.33	62.00 ^a	81.33 ^a	32.67 ^a	380.00 ^a
Dg16	39.67	59.67 ^a	120.00	15.33	143.33	25.33	270.00	31.67	46.67	35.33	27.33	305.33
Dg17	32.33	55.67	124.33 ^a	23.67 ^a	180.67 ^a	25.67	300.67	19.67	56.00 ^a	68.67 ^a	30.00 ^a	369.33 ^a
Dg18	37.67	60.67 ^a	133.33 ^a	25.67 ^a	124.00	29.00 ^a	385.00 ^a	44.67 ^a	55.00 ^a	52.00	31.33 ^a	437.00 ^a
Dg19	29.67	55.33	124.33 ^a	18.33	139.00	30.00 ^a	296.67	57.67 ^a	50.33	54.67 ^a	33.67 ^a	351.33
Dg20	41.00 ^a	59.67 ^a	120.00	18.33	126.00	28.33 ^a	264.33	31.33	59.00 ^a	57.33 ^a	31.67 ^a	321.67
LSD 5%	5.69	3.81	11.18	5.52	37.61	4.06	71.59	22.49	8.85	29.16	4.16	88.68

میانگین صفات در هر ستون که با حرف a مشخص شده‌اند براساس آزمون LSD 5% بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند.

In each column means followed by letter a has the highest values according to LSD 5%

به ترتیب دارای ۳، ۸، ۴ و ۵ ژنوتیپ بودند. نتایج نشان داد که خوشه ۴، بیشترین پراکندگی و تنوع ژنتیکی را داشت (شکل ۱).

تجزیه خوشه‌ای بر پایه صفات زراعی
براساس تجزیه خوشه‌ای ۲۰ ژنوتیپ علف باغ در ۴ گروه
مختلف قرار گرفتند (شکل ۱). گروه‌های ژنوتیپی ۱، ۲، ۳ و ۴



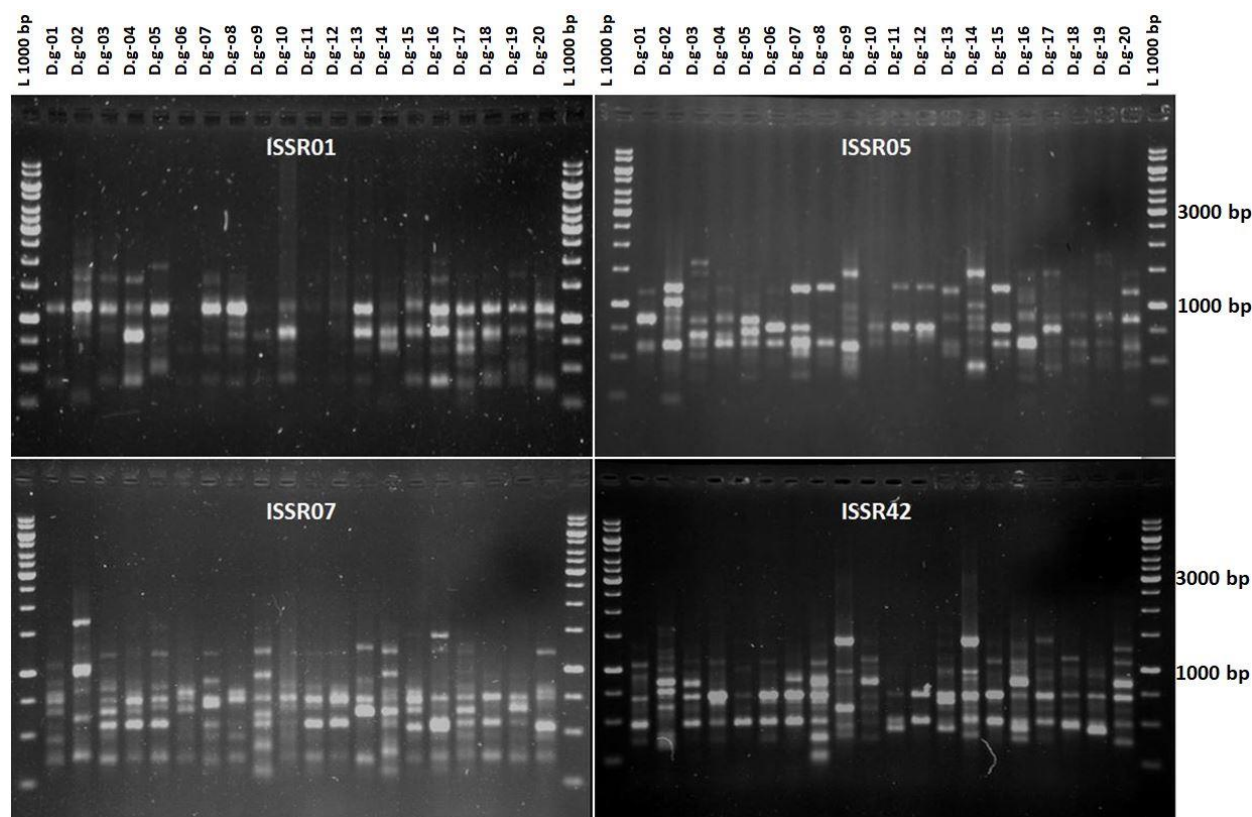
شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward روی ۲۰ ژنوتیپ منتخب از گونه علف باغ بر مبنای میانگین ۱۲ عملکرد و صفات مورفولوژیکی

Figure 1: Dendrogram obtained from cluster analysis (Ward method) of 20 selected genotypes of *D. glomerata* based on 12 morphological traits

بود و میانگین آن ۱۱/۹۳ آلل بود. آغازگرهای ISSR03، ISSR15 و ISSR17، ISSR32، ISSR06، ISSR25 واضح‌ترین و تکرارپذیرترین باندها را تولید کردند که به ترتیب دارای ۲۰، ۱۸، ۱۶، ۱۴ و ۱۶ باند بودند (شکل ۲ و جدول ۴). نمونه‌هایی از الگوهای باند حاصل از این آغازگرها در ۲۰ ژنوتیپ علف باغ در شکل ۲ نشان داده شده است.

نتایج تنوع ژنتیکی با آغازگرهای ISSR

در این مطالعه، تنوع ژنوتیپی ۲۰ ژنوتیپ منتخب علف باغ (*D. glomerata*) مورد بررسی قرار گرفت. از ۲۹ آغازگر ISSR برای ارزیابی این ژنوتیپ‌ها استفاده شد که منجر به شناسایی ۳۴۶ آلل گردید که از این تعداد، ۳۳۷ آلل (۹۷٪) چندشکلی (پلی مورفیک) بودند. تعداد آلل در هر آغازگر بین ۷ تا ۲۰ متغیر



شکل ۲- الگوی نواریندی ۲۰ ژنوتیپ برتر علف‌باغ با استفاده از چهار آغازگر ISSR مختلف

Figure 2. Banding pattern of the top 20 genotypes of *D. glomerata* using four different ISSR markers

نتایج مطالعه تنوع ژنتیکی *D. glomerata* با استفاده از آغازگرهای ISSR نشان‌دهنده ناهمگنی قابل توجه در ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. تعداد مؤثر آلل‌ها (Ne) بین ۱/۲۸۵ تا ۱/۷۲۷ متغیر بود و میانگین آن ۱/۵۳۳ به دست آمد که بیانگر تنوع ژنتیکی متوسط است. شاخص شانون (I) در دامنه ۰/۳۱۳ تا ۰/۵۹۱ با میانگین ۰/۴۴۷ قرار داشت که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجه است. هتروزیگوسیتی مورد انتظار نسبتاً مناسب برای انعطاف‌پذیری و سازگاری هستند (جدول ۴).

نتایج مطالعه تنوع ژنتیکی *D. glomerata* با استفاده از آغازگرهای ISSR نشان‌دهنده ناهمگنی قابل توجه در ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. تعداد مؤثر آلل‌ها (Ne) بین ۱/۲۸۵ تا ۱/۷۲۷ متغیر بود و میانگین آن ۱/۵۳۳ به دست آمد که بیانگر تنوع ژنتیکی متوسط است. شاخص شانون (I) در دامنه ۰/۳۱۳ تا ۰/۵۹۱ با میانگین ۰/۴۴۷ قرار داشت که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجه است. هتروزیگوسیتی مورد انتظار

جدول ۴- نام و مشخصات نشانگرها، توالی، دمای اتصال (TM)، تعداد کل باندها، تعداد باند چندشکلی، درصد چندشکلی، تعداد مؤثر آلل، شاخص

شانون و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در ژنوتیپ‌های علف‌باغ با استفاده از آغازگرهای ISSR

Table 4: 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) in genotypes of *D. glomerata* using ISSR markers

Marker Name	Marker Sequence	Melting Temp (°C)	N	PPB	PPB%	He	Ne	I
ISSR01	*(CA)8RG	52	12	12	100	0.239	1.401	0.375
ISSR02	(GA)8YT	52	12	11	91	0.216	1.361	0.341
ISSR03	***(GA)8YG	52	20	20	100	0.259	1.412	0.410
ISSR04	(AG)8YT	52	11	11	100	0.258	1.432	0.402
ISSR05	(AG)8T	52	13	13	100	0.366	1.615	0.546
ISSR06	(GA)8T	52	12	11	91	0.343	1.571	0.516
ISSR07	(GA)8A	52	11	10	90	0.289	1.489	0.435
ISSR08	CCC (GT)7	52	9	9	100	0.315	1.516	0.484
ISSR10	(GT)8T	52	10	10	100	0.412	1.723	0.600
ISSR11	(TC)8C	52	7	7	100	0.247	1.382	0.399
ISSR12	(AG)8GCC	52	12	11	91	0.324	1.527	0.490
ISSR15	(AC)8YT	52	14	14	100	0.281	1.456	0.434
ISSR16	(AC)8YA	52	13	13	100	0.320	1.523	0.490
ISSR17	(AC)8YG	52	16	16	100	0.329	1.543	0.502
ISSR18	(GACA)4	52	9	9	100	0.274	1.417	0.436
ISSR19	(GGAGA)3	52	10	9	90	0.288	1.475	0.439
ISSR20	(GA)8YA	52	11	10	90	0.270	1.455	0.413
ISSR22	(GGGGT)3	52	10	9	90	0.239	1.377	0.380
ISSR23	(AC)8GCT	52	11	11	100	0.325	1.526	0.497
ISSR24	(AC)8TG	52	12	12	100	0.398	1.690	0.583
ISSR25	(TCC)5TG	52	18	18	100	0.315	1.530	0.478
ISSR27	(AG)8TC	52	10	10	100	0.295	1.489	0.449
ISSR28	(GA)8GCC	52	10	10	100	0.424	1.788	0.607
ISSR29	ACT ACG ACT (TG)7	52	13	13	100	0.412	1.725	0.600
ISSR31	CGT AGT CGT (CA)7	52	9	9	100	0.370	1.660	0.537
ISSR32	AGT CGT AGT (AC)7	52	16	15	93	0.371	1.640	0.371
ISSR39	(CA)8RG	50	11	11	100	0.367	1.645	0.544
ISSR41	(GA)8YT	50	11	10	90	0.371	1.640	0.550
ISSR42	(AG)8YT	50	13	13	100	0.303	1.512	0.462
Overall Average			11.93	11.62	97	0.317	1.535	0.474

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

Ne: تعداد مؤثر آلل (Number of Effective Alleles)

I: شاخص شانون (Shannon's Index)

He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار (Expected Heterozygosity)

PPB: درصد چندشکلی (Percentage of Polymorphic Bands)

PPB%: درصد پلی مورفیزم (Polymorphism Percentage)

N: تعداد باندها (Number of Bands)

تجزیه خوشه‌ای بر پایه داده‌های ISSR

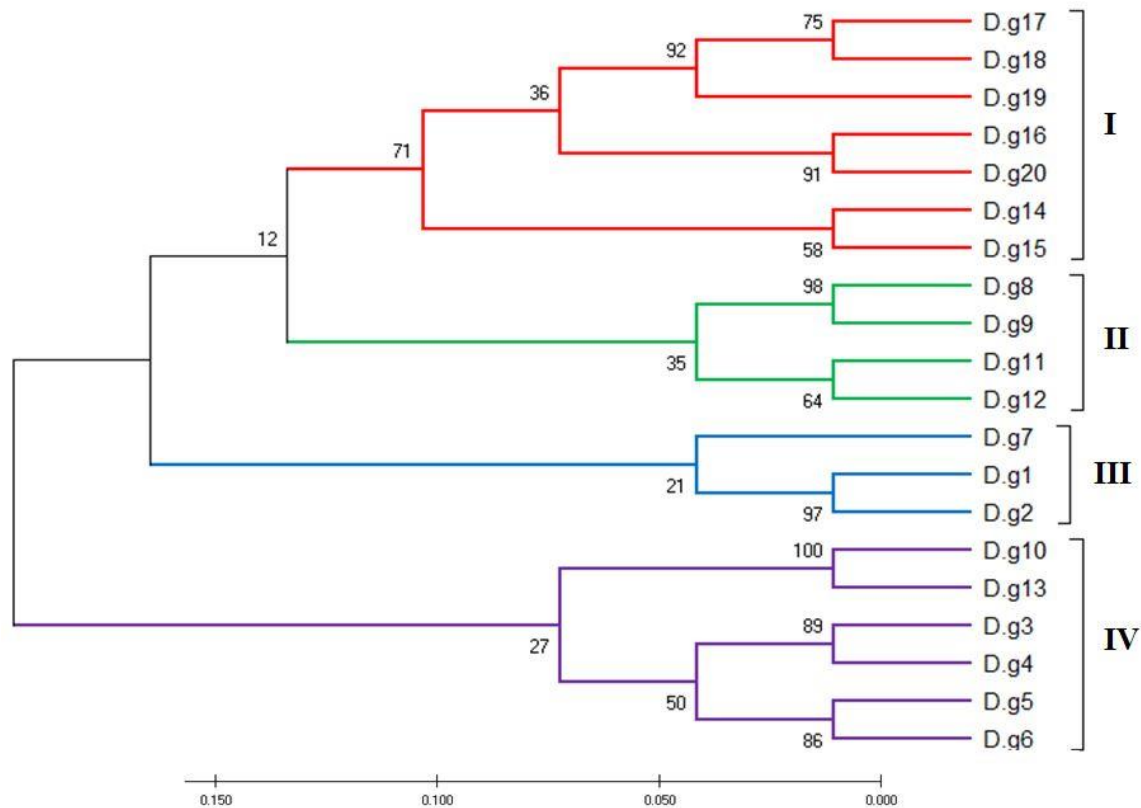
نتایج تجزیه خوشه‌ای بر پایه داده‌های ISSR نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا میان ۲۰ ژنوتیپ *D. glomerata* بود. دندروگرام حاصل از روش UPGMA با استفاده از ۲۹ آغازگر ISSR، ژنوتیپ‌ها را در چهار خوشه اصلی بشرح زیر گروه‌بندی کرد (شکل ۳).

✓ خوشه I: شامل ۷ ژنوتیپ (Dg14 تا Dg20) با شباهت ژنتیکی بالا.

✓ خوشه II: شامل ۴ ژنوتیپ (Dg8, Dg9, Dg11 و Dg12) با روابط ژنتیکی متوسط.

✓ خوشه III: شامل ۳ ژنوتیپ (Dg1, Dg2 و Dg7) با نزدیکی ژنتیکی بالا.

✓ خوشه IV: شامل ۶ ژنوتیپ (Dg3, Dg4, Dg5, Dg6, Dg10 و Dg13) با بیشترین فاصله ژنتیکی.



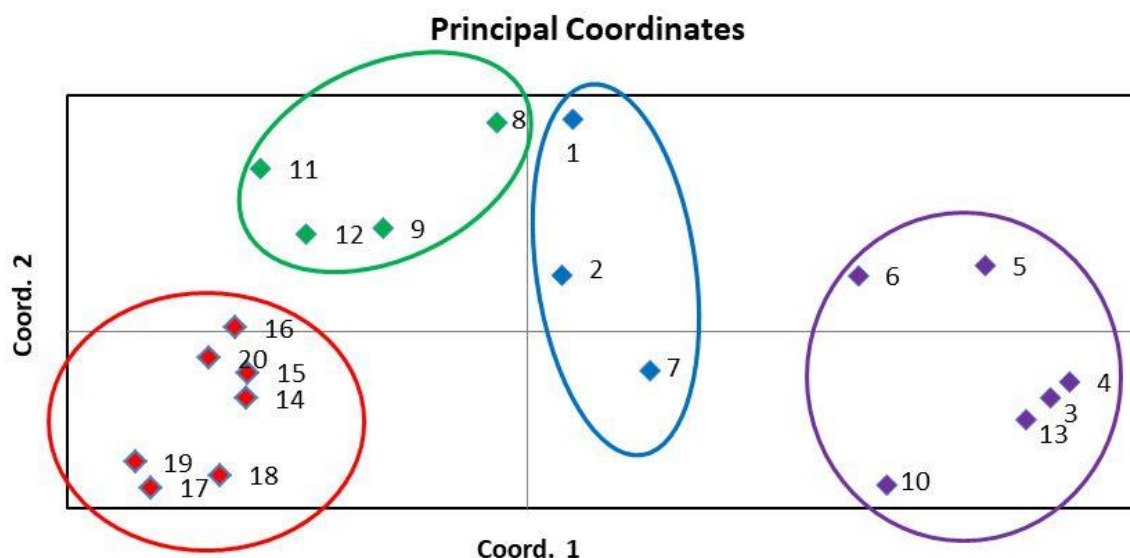
شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۰ ژنوتیپ علف باغ به روش UPGMA با استفاده از ۲۹ آغازگر ISSR چندشکل براساس ضریب تشابه ژاکارد

Figure 3. Dendrogram of UPGMA cluster analysis of 20 *D. glomerata* genotypes using 29 polymorphic ISSR markers based on Jaccard similarity coefficient.

تجزیه مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (PCA)

پراکنش ۲۰ ژنوتیپ براساس دو محور اول تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (PCA) در شکل ۴ آمده است. در این پراکنش، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در چهار خوشه متمایز شد.

این نتایج با دندروگرام تجزیه خوشه‌ای همخوانی داشت. دو محور اول (Coord.1 و Coord.2) بیشترین درصد تغییرات ژنتیکی را توضیح دادند. خوشه IV بیشترین پراکندگی و بالاترین تنوع ژنتیکی را نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴- نمودار پراکنش ۲۰ ژنوتیپ علف باغ براساس دو مؤلفه اصلی اول در تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی با استفاده از ۲۹ آغازگر

ISSR

Figure 4. Biplot of 20 *Dactylis glomerata* genotypes based on the first two principal coordinate components using 29 ISSR markers.

تحلیل شباهت ژنتیکی

ماتریس شباهت ژنتیکی مقادیر بین ۰/۴۱ تا ۰/۷۷ را نشان داد (جدول ۵). بیشترین شباهت (۰/۷۷) بیانگر خویشاوندی نزدیک یا منشأ ژنتیکی مشابه است، در حالی که مقادیر پایین‌تر (مانند ۰/۴۱) نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بالا بودند. ژنوتیپ‌هایی

با شباهت کمتر از ۰/۵۰ به عنوان گزینه‌های مطلوب برای تلاقی و ایجاد تنوع ژنتیکی جدید و هتروزیس شناسایی شدند. بر پایه ضریب شباهت جاکارد، کمترین شباهت (بیشترین فاصله) مربوط به فاصله ژنوتیپ Dg13 با ژنوتیپ‌های Dg18, Dg17 و Dg19 بود.

جدول ۵- ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های علف‌باغ با استفاده از آغازگرهای ISSR

Table 4. Similarity matrix between genotypes of *D. glomerata* using ISSR markers

Genotypes	Dg1	Dg2	Dg3	Dg4	Dg5	Dg6	Dg7	Dg8	Dg9	Dg10	Dg11	Dg12	Dg13	Dg14	Dg15	Dg16	Dg17	Dg18	Dg19	Dg20
Dg1	1.00																			
Dg2	0.66	1.00																		
Dg3	0.62	0.63	1.00																	
Dg4	0.59	0.59	0.71	1.00																
Dg5	0.54	0.54	0.70	0.65	1.00															
Dg6	0.57	0.54	0.62	0.62	0.72	1.00														
Dg7	0.50	0.54	0.58	0.55	0.56	0.68	1.00													
Dg8	0.54	0.47	0.54	0.55	0.64	0.63	0.66	1.00												
Dg9	0.49	0.46	0.55	0.55	0.60	0.59	0.64	0.77	1.00											
Dg10	0.49	0.53	0.54	0.52	0.55	0.59	0.64	0.63	0.66	1.00										
Dg11	0.50	0.48	0.52	0.50	0.59	0.58	0.60	0.68	0.68	0.72	1.00									
Dg12	0.46	0.49	0.54	0.48	0.51	0.54	0.59	0.60	0.60	0.62	0.71	1.00								
Dg13	0.47	0.44	0.45	0.44	0.44	0.46	0.42	0.47	0.45	0.51	0.46	0.47	1.00							
Dg14	0.47	0.53	0.54	0.52	0.50	0.52	0.61	0.58	0.54	0.58	0.58	0.61	0.49	1.00						
Dg15	0.52	0.52	0.55	0.49	0.54	0.57	0.61	0.57	0.57	0.62	0.64	0.59	0.48	0.67	1.00					
Dg16	0.51	0.53	0.57	0.49	0.58	0.60	0.60	0.63	0.62	0.65	0.65	0.61	0.48	0.67	0.74	1.00				
Dg17	0.43	0.51	0.53	0.50	0.50	0.52	0.57	0.48	0.51	0.55	0.57	0.54	0.41	0.65	0.62	0.64	1.00			
Dg18	0.45	0.49	0.48	0.48	0.50	0.52	0.55	0.48	0.51	0.57	0.52	0.47	0.41	0.54	0.61	0.61	0.72	1.00		
Dg19	0.46	0.49	0.49	0.48	0.45	0.49	0.57	0.51	0.53	0.52	0.56	0.55	0.41	0.63	0.61	0.59	0.72	0.64	1.00	
Dg20	0.53	0.52	0.52	0.52	0.53	0.56	0.56	0.59	0.58	0.61	0.69	0.58	0.46	0.61	0.60	0.65	0.65	0.59	0.66	1.00

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگرهای ISSR توان تفکیک مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در علف‌باغ دارند و می‌توانند ناهمگنی ژنتیکی موجود در کلون‌های منتخب را آشکار کنند. البته کارایی ISSR در گونه‌های گراس علوفه‌ای به‌ویژه به دلیل پوشش ژنومی نسبتاً گسترده و عدم نیاز به اطلاعات توالی قبلی، در مطالعات مشابه نیز گزارش شده است (Sun et al, 2014;)

شاخص‌های تنوع ژنتیکی (I, Ne, He) بیانگر وجود پایه ژنتیکی قابل قبول در مواد گیاهی بود. هم‌خوانی مقادیر به‌دست آمده با گزارش‌های پیشین در علف‌باغ و سایر گونه‌های دگرگشن می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که بخشی از تنوع مشاهده‌شده حاصل از سازوکارهای زیستی گونه (مانند دگرگشتی و جریان ژنی) و بخشی دیگر ناشی از منشأهای متفاوت ژرم‌پلاس و تاریخچه گزینش در برنامه‌های به‌نژادی است (Costa et al, 2016; Fehrer et al, 2022). همچنین ثبت مقادیر بالاتر برخی شاخص‌ها در تعدادی از آغازگرها (مانند ISSR24) می‌تواند بیانگر آن باشد که این آغازگرها نواحی پلی‌مورفیک‌تری از ژنوم را هدف قرار داده‌اند و برای غربالگری ژرم‌پلاس و تفکیک ژنوتیپ‌ها مفیدتر هستند (Porth and El- Kassaby, 2014).

یکی از نکات مهم در تفسیر ساختار ژنتیکی، بررسی نقش منشأ جغرافیایی در شکل‌گیری گروه‌هاست. در این مطالعه، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در دندروگرام UPGMA و نمودار PCA نشان داد که همگرایی ژنتیکی با منشأ جغرافیایی کامل نیست؛ یعنی ژنوتیپ‌ها الزاماً فقط براساس محل جمع‌آوری در یک گروه واحد قرار نگرفتند. این موضوع در گونه‌های دگرگشن مانند علف‌باغ می‌تواند به جریان ژنی، اختلاط ژرم‌پلاس‌ها و گزینش‌های اعمال‌شده در مراحل انتخاب کلون‌های برتر نسبت داده شود.

با این حال، بررسی دقیق ژنوتیپ‌های منشأ مجارستان (Table 1) نشان داد که این ژنوتیپ‌ها هم در برخی موارد خوشه‌بندی نزدیک دارند و هم پراکنش بین‌خوشه‌ای نشان می‌دهند.

✓ در خوشه I ژنوتیپ‌های Dg15, Dg16, Dg17 و Dg20 (همگی با منشأ مجارستان) قرار گرفتند که نشان می‌دهد بخشی دیگر از ژرم‌پلاس مجارستان در گروهی متفاوت خوشه شده است.

✓ در خوشه II ژنوتیپ Dg8 (مجاری) قرار گرفته است.

✓ در خوشه III ژنوتیپ‌های Dg1, Dg2 و Dg7 (همگی با منشأ مجارستان) کنار هم قرار گرفتند که می‌تواند نشان‌دهنده نزدیکی ژنتیکی/پایه مشترک بخشی از دسترسی‌های وارداتی باشد.

✓ و در خوشه IV ژنوتیپ‌های Dg6 و Dg13 (مجارستان) مشاهده شدند.

این الگو (وجود همزمان خوشه‌بندی و پراکنش ژنوتیپ‌های یک منشأ) نشان می‌دهد که منشأ جغرافیایی به‌تنهایی برای توضیح ساختار ژنتیکی کفایت نمی‌کند، اما می‌تواند در کنار داده‌های فاصله ژنتیکی به تصمیم‌گیری اصلاحی کمک کند؛ به‌ویژه در شرایطی که هدف، انتخاب والدین با بیشترین واگرایی ژنتیکی برای تولید ارقام سنتتیک/پلی‌کراس است.

نتایج صفات زراعی نشان داد برخی ژنوتیپ‌ها از نظر عملکرد علوفه خشک و عملکرد بذر برتر هستند (ازجمله Dg6, Dg18, Dg10, Dg1 و Dg12). اهمیت این یافته از منظر کاربردی آن است که در برنامه‌های اصلاحی، انتخاب والدین فقط براساس عملکرد می‌تواند باعث محدود شدن پایه ژنتیکی شود؛ بنابراین ترکیب اطلاعات عملکردی با اطلاعات فاصله ژنتیکی، امکان انتخاب والدین «برتر اما متفاوت» را فراهم می‌کند تا هم عملکرد بهبود یابد و هم خطر افت تنوع ژنتیکی کاهش پیدا کند.

ژنتیکی خنثی، تاریخچه تبارزایی و رانش ژنتیکی است تا تنوع عملکردی. در مقابل، صفات زراعی اغلب پلی‌ژنیک بوده و به‌شدت تحت تأثیر محیط قرار دارد (Falconer and Mackay, 1983). به‌گونه‌ای که ژنوتیپ‌های متفاوت از نظر نشانگرهای خنثی می‌توانند فنوتیپ‌های مشابهی بروز دهند. بنابراین نبود تطابق بین خوشه‌بندی مولکولی و فنوتیپی نه‌تنها غیرمنتظره نیست، بلکه نشان‌دهنده محدودیت ذاتی نشانگرهای ISSR در تبیین مستقیم تنوع صفات کمی است و استفاده از نشانگرهای مترکم‌تر یا عملکردی‌تر (مانند SSRهای ژنی یا SNP) می‌تواند در مطالعات آینده ارتباط ژنوتیپ-فنوتیپ را دقیق‌تر آشکار سازد (Panchariya et al, 2024; Özbek, 2024; Yang et al, 2025).

در مجموع، داده‌های مولکولی و فنوتیپی این مطالعه نشان می‌دهد که می‌توان یک راهبرد انتخاب والدین «دومرحله‌ای» پیشنهاد داد: ۱) غربال اولیه براساس عملکرد و صفات زراعی کلیدی، و ۲) انتخاب نهایی والدین براساس بیشترین فاصله ژنتیکی (به‌ویژه بین خوشه‌های دورتر یا جفت‌های با شباهت پایین‌تر) برای انتخاب والدین پلی‌کراس/سنتتیک. برای آینده، پیشنهاد می‌شود که داده‌های ISSR با آغازگرهای با تراکم بالاتر مانند SNP ترکیب شده و با داده‌های فنوتیپی و محیطی ادغام شود تا امکان انتخاب به کمک آغازگر (MAS) و انتخاب ژنومی (GS) فراهم شود. همچنین، مطالعات اثرهای متقابل ژنوم-محیط می‌تواند به شناسایی ژن‌ها یا مناطق ژنومی دخیل در سازگاری اقلیمی کمک کند (Malmberg et al, 2023; López et al, 2021).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ منتخب علف‌باغ با استفاده از نشانگرهای ISSR و صفات زراعی ارزیابی شد و نتایج نشان داد که مواد گیاهی مورد بررسی دارای پایه ژنتیکی مناسب برای برنامه‌های اصلاحی هستند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها

نتایج خوشه‌بندی و تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی (PCA) براساس نشانگرهای مولکولی ISSR، وجود چهار گروه ژنتیکی را تأیید کرد و از منظر اصلاح نباتات، چنین ساختاری به اصلاح‌گر اجازه می‌دهد والدین را از گروه‌های دورتر انتخاب کند تا احتمال بروز هتروزیس و افزایش تنوع در نتاج بیشتر شود؛ این منطق در مطالعات به‌نژادی گراس‌ها نیز مطرح شده است (Falconer and Mackay, 1983; Ahmed and Escobar-Gutiérrez, 2022).

دامنه شباهت ژنتیکی در تجزیه مولکولی نشان داد که هم ژنوتیپ‌های نسبتاً مشابه و هم ژنوتیپ‌های کاملاً متمایز در مجموعه وجود دارد؛ این وضعیت برای برنامه‌های اصلاحی مطلوب است، زیرا امکان طراحی تلاقی‌ها با اهداف متفاوت (تثبیت صفات با والدین نزدیک، یا افزایش تنوع با والدین دور) را فراهم می‌کند. در این میان، کمترین مقادیر شباهت در ماتریس جاکارد (~ 0.41) مربوط به جفت‌های (۱۳ با ۱۷)، (۱۳ با ۱۸) و (۱۳ با ۱۹) بود که به‌عنوان گزینه‌های مناسب برای تلاقی‌های دور و افزایش تنوع/هتروزیس قابل توجه هستند.

نتایج تجزیه خوشه‌ای بر پایه صفات زراعی، ۲۰ ژنوتیپ علف‌باغ را در ۴ گروه مختلف قرار داد. گروه‌های ژنوتیپی ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب دارای ۳، ۸، ۴ و ۵ ژنوتیپ بودند. نتایج نشان داد که خوشه ۴، بیشترین پراکندگی و تنوع ژنتیکی را داشت (شکل ۱).

مقایسه نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس نشانگرهای ISSR و صفات زراعی نشان داد که الگوی گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در این دو رویکرد همخوانی نداشت. چنین عدم تطابقی در مطالعات تنوع ژنتیکی در گزارش‌های متعددی مشاهده شده که عمدتاً ناشی از تفاوت ماهیت داده‌های مولکولی و فنوتیپی است. نشانگرهای ISSR به‌عنوان نشانگرهای غالب و عمدتاً خنثی، بخش‌هایی از ژنوم را نمونه‌برداری می‌کنند که الزاماً با ژن‌ها یا مسیرهای تنظیم‌کننده صفات کمی در ارتباط مستقیم نیستند؛ ازاین‌رو، خوشه‌بندی مبتنی بر ISSR بیشتر بازتاب ساختار

Dg1, Dg6, Dg12, Dg13 و Dg18 که براساس صفات زراعی برتر بودند، از نظر ژنوتیپی با فاصله ژنتیکی بیشتر در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند و می‌توانند به عنوان کاندیداهای بالقوه به‌عنوان والدین برای برنامه‌های اصلاحی پلی‌کراس و توسعه ارقام مصنوعی با هدف به حداکثر رساندن هتروزیس و گسترش پایه ژنتیکی ارقام علف باغ توصیه شوند. بنابراین، ادغام نشانگرهای تراکم‌بالا مانند SNP و رویکردهای انتخاب ژنومی در کنار داده‌های فنوتیپی می‌تواند در آینده دقت انتخاب والدین و کارایی برنامه‌های اصلاحی را افزایش دهد.

وجود چند گروه ژنتیکی را تأیید کرد و بررسی منشأ جغرافیایی نشان داد ژنوتیپ‌های مجارستان در همه خوشه‌ها حضور دارند، که بیانگر ناهمگنی ژرم‌پلاس و/یا اختلاط ژنتیکی است. براساس کیفیت باندها و توان تفکیک، آغازگرهای ISSR03, ISSR25, ISSR06, ISSR32, ISSR17 و ISSR15 به‌عنوان نشانگرهای کارآمدتر برای غربالگری ژرم‌پلاس علف‌باغ پیشنهاد شدند. همچنین، بر پایه ضریب شباهت جاکارد، کمترین شباهت (بیشترین فاصله ژنتیکی) مربوط به جفت‌های Dg13 با Dg17, Dg18 و Dg19 بود. بنابراین ژنوتیپ‌های

References

- Adhikari, S., Saha, S., Bandyopadhyay, T. K. & Ghosh, P. 2015. Efficiency of ISSR marker for characterization of *Cymbopogon* germplasms and their suitability in molecular barcoding. *Plant systematics and evolution*, 301, 439-450.
- Ahmed, L. Q. & Escobar-Gutierrez, A. J. 2022. Unexpected intraspecific variability of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in response to constant temperature during germination and initial heterotrophic growth. *Frontiers in Plant Science*, 13, 856099.
- Bornet, B. & Branchard, M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter*, 19, 209-215.
- Bruce, T. J. 2014. Variation in plant responsiveness to defense elicitors caused by genotype and environment. *Frontiers Media SA*.
- Chtourou-Ghorbel, N., Guenni, K., Bedoui, M., Chaddad, H., Sai-Kachout, S. & Trifi-Farah, N. 2024. Genetic and phenological diversity of Tunisian natural populations of *Dactylis glomerata* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-14.
- Costa, R., Pereira, G., Garrido, I., Tavares-De-Sousa, M. M. & Espinosa, F. 2016. Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP molecular markers to reveal and classify cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) germplasm variations. *PloS one*, 11, e0152972.
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. 1983. Quantitative genetics, Longman London.
- Fehrer, J., Nagy Nejedla, M., Hellquist, C. B., Bobrov, A. A. & Kaplan, Z. 2022. Evolutionary history and patterns of geographical variation, fertility, and hybridization in *Stuckenia* (Potamogetonaceae). *Frontiers in Plant Science*, 13, 1042517.
- Jombart, T., Kamvar, Z. N., Collins, C., Lustrik, R., Beugin, M. P., Knaus, B. J. & Jombart, M. T. 2018. Package 'adeigenet'. Github repository :<https://github.com/thibautjombart/adeigenet>.
- Kole, C. 2011. Wild crop relatives: genomic and breeding resources: millets and grasses, Springer.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35, 1547-1549.
- Lopez, A. S., Lopez, D. R., Arana, M. V., Batlla, D. & Marchelli, P. 2021. Germination response to water availability in populations of *Festuca pallens* along a Patagonian rainfall gradient based on hydrotime model parameters. *Scientific Reports*, 11, 10653.
- Madesis, P., Abraham, E., Kalivas, A., Ganopoulos, I. & Tsafaris, A. 2014. Genetic diversity and structure of natural *Dactylis glomerata* L. populations revealed by morphological and microsatellite-based (SSR/ISSR) markers. *Genet. Mol. Res*, 13, 4226-4240.
- Majidi, M. M., Hoseini, B., Abtahi, M., Mirlohi, A. & Araghi, B. 2015. Genetic analysis of seed related traits in Cocksfoot (*Dactylis glomerata*) under normal and drought stress conditions. *Euphytica*, 203, 409-420.
- Malmberg, M., Smith, C., Thakur, P., Drayton, M., Wilson, J., Shinozuka, M., Clayton, W., Inch, C., Spangenberg, G. & Smith, K. 2023. Developing an integrated genomic selection approach beyond biomass for varietal protection and nutritive traits in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 136, 44.

- Mohammadi, R., M. Khayyam-nekoei., A. F. Mirlohi., and Kh, Razmjoo. 2006. Investigation of genetic variation in tall wheat grass (*Agropyron elongatum* (Host) Beauv.) populations. *Iranian Journal of rangelands and forests plants breeding and genetic research*, 14(1), 15-24 (In Persian).
- Mohammadi, R., Panahi, B. & Amiri, S. 2020. ISSR based study of fine fescue (*Festuca ovina* L.) highlighted the genetic diversity of Iranian accessions. *Cytology and Genetics*, 54, 257-263.
- Mohammadi, R., Amiri, S. & Montakhabi Kalajahi, V. 2022. ISSR Markers Efficiency to Assess Cool-Season Grass Species Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 92, 691-699.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the national academy of sciences*, 70(12), 3321-3323.
- Özbek, Ö. 2024. Molecular markers used to reveal genetic diversity and phylogenetic relationships in crop plants. *OBM Genetics*, 8(4), 1-25.
- Panchariya, D. C., Dutta, P., Ananya, Mishra, A., Chawade, A., Nayee, N., & Kushwaha, S. K. 2024. Genetic marker: a genome mapping tool to decode genetic diversity of livestock animals. *Frontiers in Genetics*, 15, 1463474.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6, 288-295.
- Porth, I. & EL-Kassaby, Y. A. 2014. Assessment of the genetic diversity in forest tree populations using molecular markers. *Diversity*, 6, 283-295.
- Riley, A. C., Kagan, I. A., Davis, B. E., Lawrence, L. M., Teutsch, C. D., & Smith, S. R. 2025. Seasonal and diurnal variation in forage nutritive value of cool- season grasses as predicted by near- infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Crop, Forage & Turfgrass Management*, 11(2), e70079.
- Ren, J., Hu, J., Zhang, A., Ren, S., Jing, T., Wang, X., Sun, M., Huang, L. & Zeng, B. 2021. The whole-genome and expression profile analysis of WRKY and RGAs in *Dactylis glomerata* showed that DG6C02319. 1 and DgWRKYs may cooperate in the immunity against rust. *PeerJ*, 9, e11919.
- Sabouriazar, S., Mohammadi, R., & Nouraein, M. 2022. Evaluation of genetic diversity of native and non-native *Dactylis glomerata* L. ecotypes using ISSR molecular markers. *Agricultural Biotechnology Journal*, 14(2), 133-154.
- Şeker, H., Yazici, A. & Uysal, P. 2014. Analysis of variability, heritability, and genetic advance in seed yield and related traits of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) populations. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38, 633-643.
- Shannon, C. E. 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal*, 27(3), 379-423.
- Sun, X., Hu, L., Xie, Y. & Fu, J. 2014. Evaluation of genotypic variation in heat tolerance of tall fescue by functional traits. *Euphytica*, 199, 247-260.
- Tohno, M., Kitahara, M., Irisawa, T., Masuda, T., Uegaki, R., Ohkuma, M. & Tajima, K. 2013. Description of *Lactobacillus iwatensis* sp. nov., isolated from cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) silage, and *Lactobacillus backii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63, 3854-3860.
- Xie, W., Lu, X., Zhang, X., Huang, L. & Cheng, L. 2012. Genetic variation and comparison of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) cultivars and wild accessions as revealed by SSR markers. *Genet. Mol. Res*, 11, 425-433.
- Xie, W., Bushman, B. S., Ma, Y., West, M. S., Robins, J. G., Michaels, L., Jensen, K. B., Zhang, X., Casler, M. D. & Stratton, S. D. 2014. Genetic diversity and variation in North American cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) cultivars and breeding lines. *Grassland science*, 60, 185-193.
- Yang, R., Wu, X., Bai, Y. E., He, Y., Chang, S., & Hai, L. 2025. Genome-Wide SNP Analysis Reveals Population Structure and Genetic Diversity in *Lycium ruthenicum* Murr. *Plants*, 14(21), 3374.