

Identification of ISSR Molecular Markers Associated with Morphological and Qualitative Forage Traits in *Elymus hispidus* (Opiz) Melderis var. villosus (Hackel) Assadi

Hooman Shirvani^{1*}, Alireza Etminan², Hooshmand Safari³

1. Ph.D. in Plant Breeding, Young Researchers and Elites Club, Islamic Azad University, Kermanshah Branch, Iran

2. Department of Genetics and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.

3. Forests and Rangelands Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran.

Correspondence:

Hooman Shirvani

Email: hooman.sh1366@yahoo.com

Received: 2, Jul. 2025

Accepted: 19, Nov. 2025

How to cite:

Shirvani, H., Etminan, A., & Safari, H. (2025). Identification of ISSR Molecular Markers Associated with Morphological and Qualitative Forage Traits in *Elymus hispidus* (Opiz) Melderis var. villosus (Hackel) Assadi. *Crop Biotechnology*, 15 (1), 29-46.
(DOI: [10.30473/cb.2025.75043.2012](https://doi.org/10.30473/cb.2025.75043.2012))

ABSTRACT

Due to its adaptability to environmental stresses such as drought and salinity, as well as its favorable forage quality, *Elymus hispidus* var. *villosus* plays a key role in sustainable rangeland management and forage production in arid and semi-arid ecosystems. This study was conducted to identify ISSR molecular markers associated with morphological traits and forage quality in 24 genotypes of this species. Morphological traits including plant height, number of stems per plant, flag leaf length, and dry forage yield, along with quality traits such as crude protein percentage, dry matter digestibility, and acid detergent fiber, were evaluated using near-infrared reflectance spectroscopy (NIR). Molecular analysis using 13 ISSR primers revealed a polymorphism rate of 97.94% and high genetic diversity among the genotypes, confirmed by PIC, EMR, MI, and RP indices. Analysis of variance showed significant differences in morphological traits (at 1% and 5% levels), while forage quality traits exhibited more limited variation. Mean comparison identified genotypes 23 and 10 as promising candidates for breeding programs due to their superior performance and morphological traits. Phenotypic correlations revealed a significant positive association (at the 5% level) between dry forage yield and plant height, internode length, and flag leaf length, with a stronger correlation (at the 1% level) with the number of stems per plant. Stepwise regression analysis demonstrated a significant association of marker IS11 with seven traits, and markers UBC880, UBC825, and UBC808 with several traits. These findings highlight the efficiency of ISSR markers in enhancing genetic improvement strategies for sustainable forage production.

KEYWORDS

Genetic diversity, forage, molecular marker, association mapping.



«مقاله پژوهشی»

شناسایی نشانگرهای مولکولی ISSR مرتبط با صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه *Elymus hispidus* (Opiz) Melderis var. *villosus* (Hackel) Assadi

هومن شیروانی^{۱*}، علیرضا اطمینان^۲، هوشمند صفری^۳

چکیده

گونه *Elymus hispidus* var. *villosus* به دلیل سازگاری با تنش‌های محیطی نظیر خشکی و شوری و کیفیت علوفه‌ای مطلوب، نقش کلیدی در مدیریت پایدار مراتع و تولید علوفه در اکوسیستم‌های خشک و نیمه‌خشک ایفا می‌کند. این پژوهش با هدف شناسایی نشانگرهای مولکولی ISSR مرتبط با صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه در ۲۴ ژنوتیپ این گونه انجام شد. صفات مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته، تعداد ساقه در بوته، طول برگ پرچم، و عملکرد وزن خشک علوفه، و صفات کیفی نظیر درصد پروتئین خام، قابلیت هضم ماده خشک، و فیبر محلول در شوینده اسیدی با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک (NIR) ارزیابی شدند. تحلیل مولکولی با ۱۳ آغازگر ISSR، چندشکلی ۹۷/۹۴٪ و تنوع ژنتیکی بالای ژنوتیپ‌ها را با شاخص‌های PIC، EMR، MI و RP تأیید کرد. تجزیه واریانس، تفاوت‌های معنی‌دار در صفات مورفولوژیک (سطوح ۱٪ و ۵٪) و تنوع محدودتر در صفات کیفیت علوفه را نشان داد. نتایج مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۱۰ را به دلیل برتری در عملکرد و صفات مورفولوژیک به‌عنوان کاندیداهای مطلوب برای برنامه‌های اصلاحی معرفی کرد. همبستگی فنوتیپی، ارتباط مثبت و معنی‌دار (سطح ۵٪) بین عملکرد وزن خشک علوفه با ارتفاع بوته، طول میانگره، و طول برگ پرچم، و ارتباط قوی‌تر (سطح ۱٪) با تعداد ساقه در بوته را نشان داد. تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام، ارتباط معنی‌دار نشانگر IS11 با هفت صفت و نشانگرهای UBC808، UBC825، UBC880 با چندین صفت را آشکار ساخت. این یافته‌ها بر کارایی نشانگرهای ISSR در تقویت راهبردهای اصلاح ژنتیکی برای تولید علوفه پایدار تأکید دارد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی، علوفه، نشانگر مولکولی، مکان‌یابی ارتباطی.

۱. دکتری اصلاح نباتات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، ایران.
۲. گروه ژنتیک و بهنجاری گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران.
۳. استادیار بخش تحقیقات جنگلها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرمانشاه، ایران.

نویسنده مسئول:

هومن شیروانی

رایانامه: hooman.sh1366@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۸

استناد به این مقاله:

شیروانی، هومن؛ اطمینان، علیرضا و صفری، هوشمند (۱۴۰۴). شناسایی نشانگرهای مولکولی ISSR مرتبط با صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه *Elymus hispidus* (Opiz) Melderis var. *villosus* (Hackel) Assadi، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۱)، ۲۹-۴۶.

(DOI: [10.30473/cb.2025.75043.2012](https://doi.org/10.30473/cb.2025.75043.2012))

مقدمه

گیاهان مرتعی و علوفه‌ای به‌عنوان منبعی حیاتی برای تغذیه دام و حفظ پایداری اکوسیستم‌های مرتعی، نقش کلیدی در کشاورزی و مدیریت منابع طبیعی ایفا می‌کنند. این گیاهان با توانایی رشد در شرایط محیطی سخت، مانند خاک‌های فقیر و مناطق کم‌آب، به کاهش فرسایش خاک و افزایش بهره‌وری مراتع کمک می‌کنند (کارلیر و همکاران، ۲۰۰۹). در شرایط تغییرات اقلیمی و افزایش تقاضا برای محصولات دامی، شناسایی گونه‌های علوفه‌ای با عملکرد و کیفیت بالا برای تضمین تولید پایدار علوفه ضروری است. مراتع، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع تأمین علوفه، نیازمند مدیریت و بهبود ژنتیکی هستند تا پاسخگوی نیازهای فزاینده باشند (وو و همکاران، ۲۰۲۵).

گونه *Elymus hispidus* (Opiz) Melderis var. *villosus* (Hackel) Assadi که در منابع گذشته *Agropyron trichophorum* شناخته می‌شد (اسدی، ۱۹۹۵)، به دلیل تحمل به تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری، و همچنین کیفیت علوفه‌ای مطلوب، از اهمیت ویژه‌ای در مراتع برخوردار است (ملکی و همکاران، ۲۰۲۳).

این گیاه به دلیل رشد سریع و توانایی تولید علوفه با ارزش تغذیه‌ای بالا، گزینه‌ای مناسب برای احیای مراتع و تولید علوفه در مناطق معتدل و نیمه‌خشک محسوب می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که این گونه می‌تواند در بهبود نظام‌های چرا و افزایش پایداری تولید علوفه نقش مؤثری داشته باشد (جونز و براون، ۲۰۲۰). تنوع ژنتیکی در *E. hispidus* var. *villosus* یکی از عوامل کلیدی برای موفقیت برنامه‌های اصلاحی است. این تنوع امکان شناسایی ژنوتیپ‌هایی با صفات برتر، مانند عملکرد بالا و مقاومت به شرایط نامساعد، را فراهم می‌کند (ملکی و همکاران، ۲۰۲۳).

بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که جمعیت‌های طبیعی این گونه دارای سطح بالایی از پلی‌مورفیسم ژنتیکی هستند که می‌تواند برای انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب بهره‌برداری شود (کارادوس و چپمن، ۲۰۲۴).

صفات مورفولوژیک، مانند ارتفاع گیاه، تعداد پنجه، و سطح برگ، و صفات کیفی، مانند محتوای پروتئین خام و قابلیت هضم، از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده ارزش

علوفه‌ای گیاهان مرتعی هستند (وو و همکاران، ۲۰۲۵). در *E. hispidus* var. *villosus*، این صفات می‌توانند به‌طور مستقیم بر عملکرد علوفه و کیفیت تغذیه‌ای آن برای دام تأثیر بگذارند. شناسایی ژنوتیپ‌هایی با ترکیب بهینه این صفات، به‌ویژه در شرایط محیطی چالش‌برانگیز، می‌تواند به بهبود بهره‌وری مراتع منجر شود (کارلیر و همکاران، ۲۰۰۹). با این حال، شناسایی دقیق این صفات و ارتباط آن‌ها با پایه ژنتیکی نیازمند ابزارهای مولکولی است.

مارکرهای ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) به‌عنوان یکی از روش‌های مولکولی نسبتاً ارزان و فنی ساده، ابزار مناسبی برای مطالعات ژنتیکی در پروژه‌هایی با محدودیت منابع مالی محسوب می‌شوند. این روش هم به‌صورت دستی با استفاده از ژل‌های آگارز یا پلی‌آکریل‌آمید و هم به‌صورت خودکار با بهره‌گیری از پرایمرهای فلورسانس‌دار قابل اجرا است (گمیل و گریسون، ۲۰۲۱). نشانگرهای ISSR به‌دلیل پلی‌مورفیسم بالا، کاربرد گسترده‌ای در ارزیابی تنوع ژنتیکی، نقشه‌برداری ژنتیکی و برنامه‌های اصلاح نباتات مبتنی بر نشانگر (MAS)، به‌ویژه در محصولات باغی و زراعی دارند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۲). از جمله مزایای مهم این تکنیک، نیاز به مقدار اندک DNA ژنومی است که آن را به گزینه‌ای مناسب برای گونه‌هایی با منابع محدود DNA، نظیر گونه‌های نادر، در معرض خطر یا مورد حفاظت تبدیل می‌کند (پرینس، ۲۰۱۵).

عملکرد این نشانگرها مبتنی بر تقویت نواحی بین توالی‌های تکراری ساده (microsatellites) است که الگوهای قابل تفسیری از پلی‌مورفیسم ژنتیکی را آشکار می‌سازند و برای شناسایی ژنوتیپ‌های مرتبط با صفات هدف، بسیار مؤثرند.

تجزیه ارتباط (Association Mapping) یک ابزار قدرتمند در ژنتیک گیاهی محسوب می‌شود که امکان نقشه‌برداری دقیق صفات را تا سطح ژن فراهم می‌سازد (ساهو و همکاران، ۲۰۱۵). برخلاف روش‌های سنتی نقشه‌یابی پیوستگی، تجزیه ارتباط می‌تواند بر پایه‌ی افراد غیرخویشاوند انجام شود، که این امر موجب می‌شود بتوان از آن در جمعیت‌هایی با زمینه‌های ژنتیکی متنوع بهره گرفت (خان و کوربان، ۲۰۱۲). از مهم‌ترین مزایای این روش، توانایی آن در شناسایی آلل‌های نادر است؛ این آلل‌ها ممکن است تأثیر مهمی در تنوع صفات داشته باشند و از این‌رو،

(جدول ۱). این ژنوتیپ‌ها برای ارزیابی صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه و همچنین بررسی مولکولی با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد استفاده قرار گرفتند.

طرح آزمایشی

آزمایش در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، واقع در شهرستان اسلام‌آباد غرب، با مختصات جغرافیایی ۴۶ درجه و ۵۹ دقیقه طول شرقی، ۳۴ درجه و ۰۸ دقیقه عرض شمالی، ارتفاع ۱۲۶۰ متر از سطح دریا، میانگین بارندگی سالانه ۴۰۰ میلی‌متر و متوسط دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. خاک مزرعه از نوع لوم (بافت متوسط) بود. بر اساس آمار هواشناسی، بیشترین بارندگی در اسفندماه و کمترین تغییرات بارندگی در فروردین‌ماه مشاهده شد. بارندگی انتهایی از عوامل کلیدی تأثیرگذار بر عملکرد مرتع در این منطقه است. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در محیط آبی اجرا شد. هر کرت آزمایشی شامل چهار خط کاشت با فاصله ۵۰ سانتی‌متر از یکدیگر و طول ۲ متر بود. فاصله بین کرت‌ها ۷۵ سانتی‌متر و فاصله بین تکرارها ۱ متر در نظر گرفته شد. کاشت به‌صورت خطی و دستی در تاریخ اول آبان‌ماه انجام شد. آبیاری هفتگی و مبارزه با علف‌های هرز به‌صورت مکانیکی صورت گرفت.

می‌تواند اهداف ارزشمندی برای برنامه‌های اصلاحی پیشرفته فراهم کنند (ابراهیم و همکاران، ۲۰۲۰). تاکنون، تجزیه ارتباط به‌طور موفق برای شناسایی مارکرهای مرتبط با صفات زراعی در گیاهان مختلف استفاده شده و زمینه‌ساز توسعه راهبردهای اصلاحی هدفمند گردیده است (چنگ و همکاران، ۲۰۱۵؛ لیو و همکاران، ۲۰۱۱). در گیاهان علوفه‌ای، تجزیه ارتباط می‌تواند به شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با عملکرد علوفه و کیفیت تغذیه‌ای کمک کند، که در نهایت به بهبود برنامه‌های اصلاحی منجر می‌شود (لی و چن، ۲۰۲۳).

هدف این پژوهش، شناسایی نشانگرهای مولکولی ISSR مرتبط با صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه *E. hispidus* var. *villosus* است تا ژنوتیپ‌های برتر برای تولید علوفه پایدار و باکیفیت در مراتع توسعه یابند. این مطالعه با بهره‌گیری از تجزیه ارتباط و ابزارهای مولکولی، به دنبال ارائه راهکارهای نوین برای اصلاح ژنتیکی گیاهان مرتعی و تقویت نظام‌های کشاورزی پایدار در برابر چالش‌های محیطی است.

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی

در این پژوهش، ۲۴ ژنوتیپ از گونه *E. hispidus* var. *villosus* از بانک ژن منابع طبیعی ایران تهیه شد.

جدول ۱. فهرست ۲۴ ژنوتیپ انتخاب شده از بانک ژن منابع طبیعی

Table 1. List of 24 genotypes selected from the Natural Resources Gene Bank

شماره	منطقه	کد بانک ژن	شماره	منطقه	کد بانک ژن
Genotype number	Location/ Region	Accession number	Genotype number	Location/ Region	Accession number
1	چهار تاغ - شهرکرد	۶-۱۰	13	گردنه قوشچی - سلماس	۲ قوشچی
2	پاتاوه - یاسوج	۱۳-۱۳	14	قلعه آرزومند - سمیرم	۱۳-۱
3	فریدن - اصفهان	۴۰-۷	15	قلعه آرزومند - سمیرم	۱۳-۲
4	قلعه آرزومند - سمیرم	۱۳-۳	16	ایستگاه خنا - سمیرم	۱۳-۸
5	سبزکوه - چهارمحال	۷-۱۰	17	میمند - یاسوج	۴-۸
6	ایستگاه البرز - کرج	۱۳-۶	18	فیروزآباد - یاسوج	۸-۶
7	کوه نثار - بیجار	۱ بیجار	19	بیدسبحان - اقلید	۷-۸
8	بید قطار - بروجن	۸-۱۰	20	پاسهلکی - اقلید	۷-۶
9	دجکرد - اقلید	۵-۷	21	دیزین - تهران	۳۱۶
10	سمیرم	۱۳-۱۲	22	اصفهان	۱۶۸
11	چشمه خونی - اصفهان	۱۳-۱۴	23	نور بلده - مازندران	۳۱۳
12	ریمله - خرم‌آباد	۴-۱۱	24	خوش ییلاق - گرگان	۳۱۴

PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ با بافر TBE 1X و ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. ژل‌ها با محلول اتیدیوم بروماید (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و با دستگاه Gel Documentation تصویربرداری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس، آزمون چنددامنه‌ای دانکن (سطح احتمال ۵٪) و همبستگی فنوتیپی بین صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و MSTAT-C انجام شد. تجزیه خوشه‌ای (Cluster Analysis) با نرم‌افزار Minitab 16 صورت گرفت. داده‌های مولکولی به صورت صفر برای عدم حضور باند و یک برای حضور باند امتیازدهی شدند. محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) از طریق رابطه (۱) محاسبه شد (هو و همکاران، ۲۰۰۵).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n PI^2 \quad \text{رابطه (۱)}$$

همچنین شاخص نشانگری (MI) از رابطه (۲)

بدست آمد (پاول و همکاران، ۱۹۹۶).

$$MI = PIC \times E \quad \text{رابطه (۲)}$$

شاخص نسبت چندگانه موثر (EMR) از رابطه (۳)

(کومار و همکاران، ۲۰۰۹) و قدرت تفکیک (RP) از

رابطه (۴) محاسبه گردید (آلتینتاش و همکاران، ۲۰۰۸).

$$EMR = NPB \times \beta \quad \text{رابطه (۳)}$$

$$RP = \sum IB \quad \text{رابطه (۴)}$$

در پایان نیز با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ماتریس تشابه، تجزیه خوشه‌ای و آزمون مانتل مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات کمی و کیفی علوفه، از رگرسیون خطی گام‌به‌گام (Stepwise Linear Regression) با استفاده از داده‌های ژنوتیپی حاصل از نشانگرهای ISSR به عنوان متغیر مستقل و داده‌های فنوتیپی به عنوان متغیر وابسته، در محیط نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه

صفات مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته (PLH)، طول میانگره (INL)، تعداد سنبلچه در سنبله (NSS)، طول برگ پرچم (FLL)، طول خوشه (SPL)، تعداد ساقه در بوته (NSB)، و عملکرد وزن خشک علوفه (DW) اندازه‌گیری شد. این صفات بر روی حداقل پنج بوته به صورت تصادفی از هر کرت انتخاب و پس از میانگین‌گیری ثبت شدند. برای ارزیابی کیفیت علوفه، صفات درصد قابلیت هضم ماده خشک (DMD)، درصد پروتئین خام (CP)، درصد خاکستر کل (ASH)، و درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC) با استفاده از دستگاه مادون قرمز نزدیک (NIR) در آزمایشگاه بخش دامپروری مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه و بر اساس روش ارائه‌شده توسط جعفری و همکاران (۲۰۰۳) اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA و تحلیل مولکولی

استخراج DNA از برگ‌های ۲۴ ژنوتیپ به صورت بالک و با استفاده از روش اصلاح‌شده تورس و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۰/۸٪ بررسی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجمی معادل ۲۰ میکرولیتر انجام شد. ترکیبات واکنش شامل ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۵ میلی‌مولار از هر یک از نوکلئوتیدهای چهارگانه (dNTPs)، ۲ میکرومول از هر پرایمر، یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمرز و بافر واکنش در غلظت 1X بود. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه)، ۳۵ سیکل حرارتی (واسرشت‌سازی: ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه؛ اتصال آغازگر: دمای متفاوت برای هر آغازگر، ۳۰ ثانیه؛ توسعه رشته: ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه) و توسعه نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه) بود. محصولات

1 Polymorphic information content

2 Marker Index

3 Effective multiplex ratio

4 Resolving power

یافته‌های پژوهش

مورفولوژیک و کیفیت علوفه

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه تحت شرایط آبیاری نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، تفاوت‌های آماری معنی‌داری در صفات ارتفاع بوته، تعداد سنبلیچه در سنبله، طول برگ پرچم و طول خوشه در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد. سایر صفات نیز در سطح احتمال ۱ درصد از تفاوت معنی‌دار برخوردار بودند که بیانگر تنوع ژنتیکی قابل توجه و گسترده‌تر در این صفات است. در مقابل، صفات کیفیت علوفه عموماً فاقد اختلاف معنی‌دار بودند و تنها درصد خاکستر کل به‌عنوان استثنا، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ نشان داد. این نتایج مؤید آن است که صفات مورفولوژیک نسبت به صفات کیفیت علوفه از تنوع ژنتیکی بیشتری برخوردار بوده و پتانسیل بالاتری برای انتخاب و اصلاح در برنامه‌های بهبود ژنتیکی دارند. کاهش تنوع در صفات کیفیت علوفه ممکن است ناشی از کنترل ژنتیکی پیچیده‌تر، اثرات محیطی یا محدودیت در تعداد ژنوتیپ‌های بررسی شده باشد. بنابراین، بهره‌برداری مؤثر از تنوع ژنتیکی در صفات کیفیت علوفه مستلزم استفاده از رویکردهای مولکولی و نقشه‌یابی ژنومی جهت کشف نواحی مؤثر بر این صفات و توسعه نشانگرهای مولکولی مرتبط خواهد بود. سیدمحمدی و همکاران (۲۰۱۲) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و روابط عملکرد دانه و اجزای آن، ۳۱ ژنوتیپ از *Ag. desertorum* را در شرایط آب و هوایی شهر اراک مورد بررسی قرار دادند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها

اختلافات قابل توجهی در صفات مورد مطالعه وجود دارد

که مبنای مناسبی برای تحلیل‌های بعدی است. مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها برای صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد و نتایج آن در جدول ۳ ارائه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، در میان ژنوتیپ‌ها، تنوع در صفات مورفولوژیک نسبت به صفات کیفیت علوفه بیشتر بوده که این یافته با نتایج حاصل از تجزیه واریانس نیز هم‌راستا است. میانگین ارتفاع بوته ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر با ۷۸/۰۴ سانتی‌متر با انحراف معیار ۶/۹۰ بود. ژنوتیپ ۲۴ بیشترین ارتفاع را داشت و در گروه a قرار گرفت، در حالی که ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ کمترین ارتفاع را داشته و در گروه e طبقه‌بندی شدند. میانگین طول میانگره برابر با ۱۵/۲۵ سانتی‌متر با انحراف معیار ۲/۲۳ بود. ژنوتیپ‌های ۲۰، ۱۰ و ۱۱ دارای بلندترین و ژنوتیپ‌های ۲ و ۲۲ دارای کوتاه‌ترین طول میانگره بودند. میانگین تعداد سنبلیچه در سنبله ۱۰/۹۳ با انحراف معیار ۱/۵۶ بود. ژنوتیپ‌های ۲۴ و ۱۱ بیشترین تعداد سنبلیچه در سنبله را داشتند و ژنوتیپ ۱۶ کمترین مقدار را نشان داد. میانگین طول برگ پرچم برابر با ۱۱/۲۳ سانتی‌متر با انحراف معیار ۱/۵۳ بود. ژنوتیپ ۲۴ بیشترین و ژنوتیپ ۲۲ کمترین طول برگ پرچم را به خود اختصاص دادند. میانگین طول خوشه ژنوتیپ‌ها ۱۴/۸۹ سانتی‌متر با انحراف معیار ۲/۴۶ بود. ژنوتیپ ۸ دارای بیشترین طول خوشه و در گروه a و ژنوتیپ ۲۲ دارای کمترین مقدار و در گروه e قرار گرفت. میانگین تعداد ساقه در بوته برابر با ۱۸/۲۷ با انحراف معیار ۵/۰۵ بود.

جدول ۲. تجزیه واریانس برای صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

Table 2. Analysis of variance for morphological traits and forage quality in the studied genotypes

S.O.V	df	MS											
		PLH	INL	NSS	FLL	SPL	NSB	DW	DMD	CP	WSC	ADF	ASH
Replication	2	38.488	1.282	0.486	1.39	3.727	32.03	93750.68	16.697	4.287	0.602	9.92	0.947
Genotypes	23	72.201*	18.559**	3.964*	3.498*	9.054*	53.744**	1521738.512**	3.653 ^{ns}	0.731 ^{ns}	0.444 ^{ns}	3.549 ^{ns}	0.378*
Error	46	35.844	6.199	1.79	1.827	4.688	6.847	98343.12	3.985	0.586	0.426	4.367	0.192
CV (%)		7.67%	16.33%	12.24%	12.04%	14.54%	14.32%	10.65%	5.05%	4.99%	17.55%	4.31%	5.19%

***، * و ns: در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار و عدم وجود اختلاف معنی‌دار

ارتفاع بوته (PLH)، طول میانگره (INL)، تعداد سنبلیچه در سنبله (NSS)، طول برگ پرچم (FLL)، طول خوشه (SPL)، تعداد ساقه در بوته (NSB)، عملکرد وزن خشک علوفه (DW)، درصد قابلیت هضم ماده خشک (DMD)، درصد پروتئین خام (CP)، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی (ADF)، درصد خاکستر کل (ASH) و درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC).

خطاست، در مواردی ممکن است ساختار داده‌ها به گونه‌ای باشد که علی‌رغم وجود تنوع، هم‌پوشانی بین ژنوتیپ‌ها موجب کاهش واریانس بین‌ژنتیکی شده و در نتیجه اثر ژنوتیپ معنی‌دار نشود. از این‌رو، حتی در صورت معنی‌دار نبودن اثر ژنوتیپ در تجزیه واریانس، انجام آزمون مقایسه میانگین می‌تواند وجود تنوع پنهان را آشکار سازد. بر اساس نتایج آزمون دانکن، ژنوتیپ ۴ با ۱۶/۴۶ درصد دارای بیشترین میزان پروتئین خام و ژنوتیپ ۶ با ۱۴/۴۷ درصد دارای کمترین میزان پروتئین خام و میانگین قابلیت هضم ماده خشک ژنوتیپ‌ها برابر با ۳۹/۵۳ درصد و انحراف معیار ۰/۹۲ بود. ژنوتیپ‌های ۲۴، ۱۹، ۱۱ و ۲ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند و در گروه a قرار گرفتند، در حالی که ژنوتیپ ۲۳ با کمترین مقدار در گروه b طبقه‌بندی شد. میانگین کربوهیدرات‌های محلول در آب ژنوتیپ‌ها ۳/۷۲ درصد با انحراف معیار ۰/۲۲ بود. طبق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد، تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها برای این صفت مشاهده نشد و همگی در یک گروه قرار گرفتند. میانگین فیبر نامحلول در شوینده اسیدی ژنوتیپ‌ها برابر با ۴۸/۴۴ درصد با انحراف معیار ۰/۹۲ بود. ژنوتیپ ۲۳ با ۵۰/۹۷ درصد دارای بیشترین مقدار بود. ژنوتیپ ۱۹ نیز با قرار گرفتن در گروه b از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با سایر ژنوتیپ‌ها نداشت. میانگین خاکستر ژنوتیپ‌ها برابر با ۸/۴۴ درصد با انحراف معیار ۰/۲۳ بود. ژنوتیپ ۱۶ با ۹/۰۶ درصد دارای بیشترین و ژنوتیپ ۲۰ دارای کمترین میزان خاکستر بود. تنوع ژنتیکی محدودتر در صفات کیفیت علوفه نسبت به صفات مورفولوژیک، بیانگر پیچیدگی کنترل ژنتیکی و احتمال تأثیر بیشتر عوامل محیطی بر این دسته از صفات است. هم‌پوشانی ویژگی‌ها میان ژنوتیپ‌ها می‌تواند باعث کاهش واریانس بین‌ژنتیکی شده و به دنبال آن، آزمون‌های سنتی نظیر تجزیه واریانس قادر به شناسایی تفاوت‌های معنادار نباشند. این امر ضرورت استفاده از روش‌های تکمیلی مانند آزمون‌های مقایسه میانگین را در ارزیابی دقیق‌تر تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد. همچنین، این وضعیت حاکی از این است که صفات کیفی اغلب تحت کنترل ژن‌های

ژنوتیپ ۲۳ بیشترین تعداد ساقه را داشت و در گروه a قرار گرفت، در حالی که ژنوتیپ ۲۲ کمترین مقدار را نشان داد و در گروه e قرار گرفت. میانگین عملکرد علوفه خشک ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر با ۲۹۴۳ کیلوگرم در هکتار با انحراف معیار ۷۴۷/۸۷ بود. ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۱۰ بیشترین عملکرد را داشته و در گروه a قرار گرفتند، در حالی که ژنوتیپ ۷ با کمترین مقدار عملکرد در گروه J طبقه‌بندی شد. نتایج آزمون دانکن نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی قابل توجه در صفات مورفولوژیک و عملکردی بود که این تنوع، اساس انتخاب مؤثر و پیشرفت در برنامه‌های اصلاح نباتات را فراهم می‌آورد. صفات مورفولوژیک که به رشد و توسعه گیاه مرتبط هستند، همچون ارتفاع بوته و طول خوشه، نقش کلیدی در تعیین ظرفیت تولید بیوماس و عملکرد علوفه خشک دارند و بنابراین به عنوان شاخص‌های مهم در ارزیابی ژنوتیپ‌ها قابل توجه می‌باشند. تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها در این صفات، بیانگر کنترل پلی‌ژنی و تأثیر متقابل ژنتیکی و محیطی است که نیازمند بررسی‌های ژنتیکی عمیق‌تر و استفاده از ابزارهای مولکولی برای کشف نواحی تأثیرگذار ژنومی می‌باشد. این یافته‌ها همسو با مطالعات پیشین تأکید می‌کنند که بهره‌برداری از تنوع ژنتیکی موجود در صفات مورفولوژیک، راهکاری مؤثر برای افزایش عملکرد و بهبود کیفیت علوفه در گونه‌های مرتعی است و نشان‌دهنده ضرورت توسعه برنامه‌های اصلاحی هدفمند مبتنی بر نشانگرهای مولکولی و نقشه‌یابی ژنومی می‌باشد. فرشادفر و فرشادفر (۲۰۰۳) در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف *Ag. Gaernt* با استفاده از صفات ریخت‌شناختی و شیمیایی، در صد خاکستر در صفات شیمیایی و طول سنبله و ارتفاع گیاه را در صفات ریخت‌شناختی به عنوان متنوع‌ترین صفات معرفی نمودند و در پایان جمعیت‌های برتر را با توجه به مقایسه میانگین صفات معرفی نمودند.

در صفات کیفیت علوفه، تنوع مشاهده‌شده در بین ژنوتیپ‌ها نسبت به صفات مورفولوژیک کمتر بود. در این زمینه، کاکران و کاکس (۱۹۵۷) اشاره کرده‌اند که چون آزمون F حاصل تقسیم واریانس ژنوتیپ‌ها بر واریانس

متعدد با اثرات کوچک قرار دارند که شناسایی و بهره‌برداری از آن‌ها نیازمند رویکردهای پیشرفته مولکولی و نقشه‌یابی ژنومی است. بنابراین، برای بهبود و اصلاح این صفات، روش‌های مبتنی بر نشانگرهای مولکولی و تحلیل ژنومی می‌تواند نقش کلیدی در کشف منابع نهفته تنوع ژنتیکی و افزایش کارایی برنامه‌های اصلاحی ایفا کند. رحمانی و همکاران (۲۰۰۶) به بررسی عملکرد و کیفیت علوفه ۱۸ رقم و اکوتیپ *Ag. cristatum* L. پرداختند. نتایج بررسی اختلاف میان اکوتیپ‌ها برای عملکرد علوفه و درصد قابلیت هضم معنی‌دار بود. ایشان همچنین درصد پروتئین خام را در شرایط آبی برای جمعیت‌های مورد بررسی بیشتر گزارش کردند.

به‌منظور بررسی ارتباط میان صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه جهت شناسایی ژنوتیپ‌های مطلوب با تأکید بر عملکرد خشک و کیفیت علوفه، ضریب همبستگی فنوتیپی بین صفات مختلف محاسبه شد. نتایج این تجزیه در جدول (۴) ارائه شده است. بین عملکرد خشک علوفه با صفات ارتفاع گیاه، طول میان‌گره و طول

برگ پرچم، همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ مشاهده شد. همچنین، بین عملکرد خشک علوفه و تعداد ساقه در بوته، همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ به‌دست آمد. در مقابل، برخی صفات کیفیت علوفه با عملکرد خشک علوفه رابطه منفی نشان دادند، اما این روابط از نظر آماری معنی‌دار نبودند. تنها صفات خاکستر و فیبر محلول در شوینده اسیدی، همبستگی مثبت (و در عین حال غیرمعنی‌دار) با عملکرد علوفه خشک داشتند. نتایج ضریب همبستگی فنوتیپی بین صفات مورفولوژیک، کیفیت و عملکرد خشک علوفه نشان‌دهنده وجود روابط معنی‌دار مثبت بین عملکرد و برخی صفات مورفولوژیک کلیدی است که به رشد و توسعه گیاه مرتبط هستند. این روابط مثبت تأکید می‌کند که صفاتی مانند ارتفاع گیاه، طول میان‌گره، طول برگ پرچم و تعداد ساقه در بوته می‌توانند به‌عنوان شاخص‌های پیش‌بینی عملکرد علوفه خشک مورد توجه قرار گیرند و در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر برای برنامه‌های اصلاحی نقش مؤثری ایفا کنند.

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به روش دانکن در سطح ۵ درصد

Table 3. Comparison of mean morphological traits and forage quality in the studied genotypes using Duncan's method at the 5% level.

Genotype	PLH	INL	NSS	FLL	SPL	NSB	DW	DMD	CP	WSC	ASH	ADF
1	69.01e	16.70a-f	11.00a-f	11.11a-e	15.21a-e	20.47b	2636fgh	40.89a	14.91bc	46.93ab	8.27a-e	46.93ab
2	69.01e	11.43g	9.973b-f	10.38b-e	13.01a-e	17.53b-e	2693efg	37.93ab	15.42abc	50.13ab	8.30a-e	50.13ab
3	73.24cde	17.02a-d	11.20a-f	11.99a-d	16.89ab	18.27bcd	2995def	38.39ab	15.47abc	50.06ab	8.94abc	50.06ab
4	79.03b-e	15.39a-g	11.27a-f	11.40a-e	15.75a-e	17.13b-e	2762def	39.52ab	16.46a	48.93ab	8.46a-e	48.93ab
5	80.61a-e	14.82a-g	11.27a-f	11.39a-e	15.27a-e	20.27b	3590bc	40.54ab	15.16abc	47.31ab	8.73a-d	47.31ab
6	77.91b-e	12.99b-g	11.33a-e	10.22b-e	12.22de	15.53b-e	2097hi	39.40ab	14.47c	48.16ab	8.05de	48.16ab
7	74.07cde	14.63a-g	11.10a-f	11.35a-e	17.14ab	14.80cde	1430j	39.12ab	15.28abc	48.79ab	8.49a-e	48.79ab
8	78.05b-e	17.61ab	12.60ab	12.25abc	17.27a	15.67b-e	2794def	39.57ab	15.64abc	48.94ab	8.98ab	48.94ab
9	72.41cde	12.43c-g	10.60a-f	9.81cde	12.29cde	16.67b-e	2977def	39.49ab	15.68abc	48.61ab	8.67a-d	48.61ab
10	86.71ab	18.89a	11.47a-d	12.83ab	15.67a-e	19.67b-e	4556a	40.96a	15.56abc	47.32ab	8.88a-d	47.32ab
11	77.92b-e	18.61a	12.67a	11.49a-e	16.95ab	17.33b-e	3708b	38.97ab	14.81bc	48.67ab	8.50a-e	48.67ab
12	78.89b-e	12.40d-g	10.27a-f	10.53a-e	13.52a-e	17.33b-e	2925def	39.13ab	15.41abc	48.70ab	8.07cde	48.70ab
13	74.03cde	14.18a-g	8.800ef	9.457de	15.47a-e	19.00bcd	3356bcd	40.24ab	15.39abc	47.77ab	8.29a-e	47.77ab
14	77.85b-e	16.97a-d	10.40a-f	12.86ab	16.33a-d	18.67bcd	3294bcde	39.15ab	15.67abc	48.68ab	8.18b-e	48.68ab
15	84.01abc	17.62ab	11.20a-f	11.81a-d	13.90a-e	14.67de	3365bcd	38.83ab	14.80bc	49.25ab	8.65a-d	49.25ab
16	78.36b-e	12.87b-g	8.667f	10.77a-e	12.87b-e	17.80b-e	2545f-i	40.45ab	15.47abc	47.42ab	9.06a	47.42ab
17	78.78b-e	12.10efg	9.867c-f	10.71a-e	13.29a-e	15.80b-e	3049c-f	38.46 b	15.04abc	49.44ab	8.32a-e	49.44ab
18	80.31a-e	17.17a-d	9.467def	10.49a-e	13.81a-e	20.53b	2160ghi	39.28ab	16.03ab	48.79ab	8.28a-e	48.79ab
19	78.27b-e	11.92fg	10.51a-f	11.39a-e	14.53a-e	17.73b-e	2001i	41.17a	14.96bc	46.53b	8.43a-e	46.53b
20	79.30b-e	18.66a	11.67a-d	11.27a-e	16.94ab	16.07b-e	2772def	38.49ab	14.79bc	48.58ab	7.73e	48.58ab
21	78.00b-e	15.59a-g	12.27abc	11.48a-e	14.98a-e	19.93bc	2753def	40.34ab	14.71bc	47.39ab	8.03de	39.47ab
22	70.99de	11.78g	9.733c-f	8.827e	11.67e	12.97e	2602fgh	40.74ab	16.14ab	47.40ab	8.11b-e	40.47ab
23	82.06a-d	17.30abc	12.20abc	12.47abc	15.76a-e	35.80a	4525a	36.79b	14.94bc	50.97a	8.19a-e	50.97a
24	90.71a	16.83a-e	12.80a	13.15a	16.57abc	18.87bcd	3054c-f	40.93a	15.76abc	47.72ab	8.96ab	47.72ab

ارتفاع بوته (PLH)، طول میانگره (INL)، تعداد سنبله در سنبله (NSS)، طول برگ پرچم (FLL)، طول خوشه (SPL)، تعداد ساقه در بوته (NSB)، عملکرد وزن خشک علوفه (DW)، درصد قابلیت هضم ماده خشک (DMD)، درصد پروتئین خام (CP)، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی (ADF)، درصد خاکستر کل (ASH) و درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC).

جدول ۴. همبستگی صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه

Table 4. Correlation between morphological traits and forage quality

صفات	PLH	INL	NSS	FLL	SPL	NSB	DW	DMD	CP	WSC	ADF
INL	.436*										
NSS	.410*	.604**									
FLL	.640**	.691**	.657**								
SPL	.248	.740**	.594**	.707**							
NSB	.239	.293	.211	.362	.212						
DW	.423*	.456*	.285	.407*	.220	.544**					
DMD	.065	-.124	-.107	-.076	-.096	-.331	-.186				
CP	-.017	-.088	-.289	-.084	-.047	-.145	-.057	.185			
WSC	.057	-.130	.110	-.157	-.085	-.243	-.395	-.078	-.506*		
ADF	-.010	.143	.128	.147	.128	.306	.220	-.951**	.032	-.099	
ASH	.285	.154	.116	.383	.199	-.072	.177	.275	.302	-.226	-.060

** و *: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ارتفاع بوته (PLH)، طول میانگره (INL)، تعداد سنبلچه در سنبله (NSS)، طول برگ پرچم (FLL)، طول خوشه (SPL)، تعداد ساقه در بوته (NSB)، عملکرد وزن خشک علوفه (DW)، درصد قابلیت هضم ماده خشک (DMD)، درصد پروتئین خام (CP)، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی (ADF)، درصد خاکستر کل (ASH) و درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC).

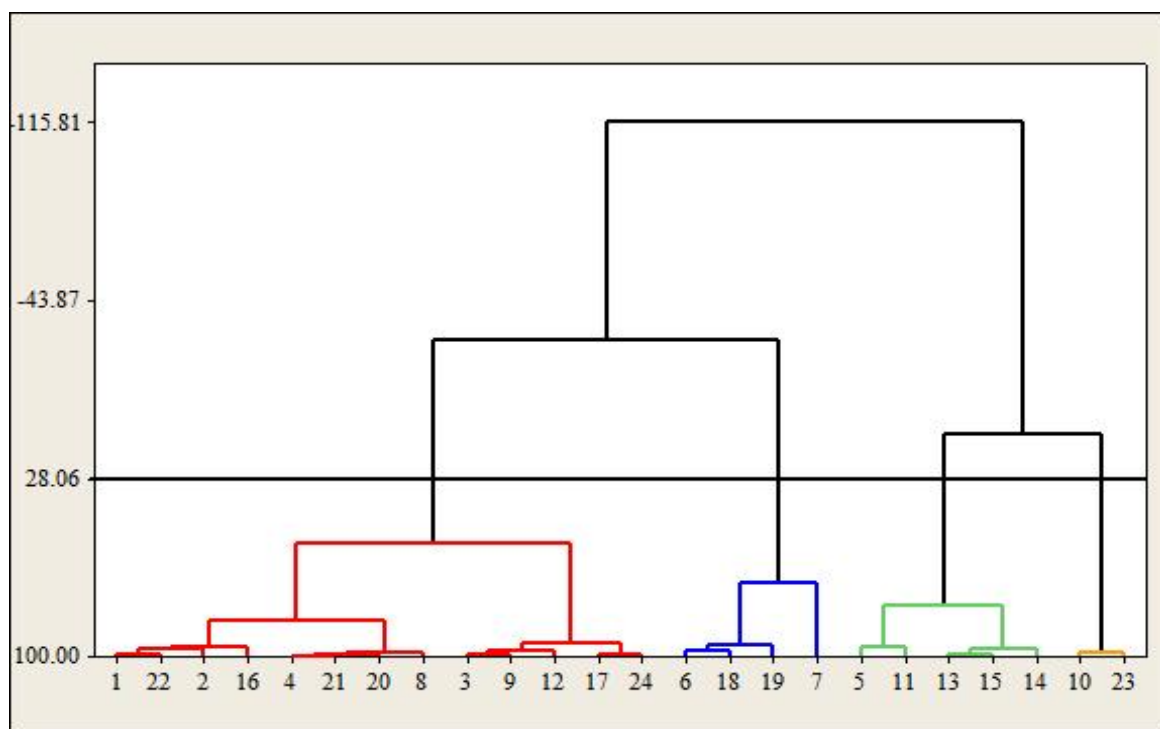
تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس میانگین صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه با استفاده از روش UPGMA، تفکیک واضحی را در قالب چهار خوشه متمایز نشان داد. خوشه چهارم شامل ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۱۰ بود که بر اساس معیارهای عملکرد خشک علوفه و سایر صفات مورفولوژیک، در صدر قرار داشتند و به‌عنوان منابع ارزشمند تنوع ژنتیکی با صفات مطلوب شناخته شدند. این امر نشان‌دهنده پتانسیل بالای این ژنوتیپ‌ها برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی به منظور افزایش بهره‌وری و کیفیت علوفه است. در مقابل، خوشه سوم که شامل ژنوتیپ‌های ۷، ۱۹، ۱۶ و ۶ بود، از نظر عملکرد و اغلب صفات مورفولوژیک در سطوح پایین‌تری قرار داشت و احتمالاً نشان‌دهنده گروهی با ظرفیت محدودتر در تولید و رشد می‌باشد که در برنامه‌های اصلاحی نیازمند توجه کمتر یا بررسی‌های تکمیلی است. خوشه دوم متشکل از ژنوتیپ‌هایی است که پس از خوشه چهارم، از نظر بیشتر صفات در جایگاه بالاتری قرار داشتند و می‌توانند به‌عنوان کاندیداهای مناسبی برای انتخاب و ترکیب در برنامه‌های بهبود معرفی شوند. خوشه اول نیز شامل ژنوتیپ‌هایی بود که نسبت به خوشه دوم، در اکثر صفات در جایگاه پایین‌تری قرار گرفتند و نمایانگر تنوع فوتوتیپی متوسط تا پایین در این جمعیت می‌باشند (شکل ۱). این الگوی خوشه‌ای نمایانگر ساختار ژنتیکی پیچیده و چندوجهی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است و اهمیت کاربرد روش‌های آماری چندمتغیره نظیر تجزیه خوشه‌ای را در

از سوی دیگر، عدم وجود همبستگی معنی‌دار بین صفات کیفیت و عملکرد خشک علوفه نشان می‌دهد که این صفات ممکن است تحت کنترل مکانیسم‌های ژنتیکی و محیطی متفاوتی باشند و تأثیر آن‌ها بر عملکرد کلی گیاه پیچیده‌تر باشد. به‌ویژه، ارتباط غیرمعنی‌دار مثبت صفات خاکستر و فیبر محلول در شوینده اسیدی با عملکرد خشک علوفه، می‌تواند نشان‌دهنده اثرات محدود این عوامل بر تولید بیوماس باشد. این یافته‌ها بر اهمیت تمرکز بر صفات مورفولوژیک در فرآیند انتخاب و اصلاح تأکید دارد. رحمانی و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی عملکرد بذر و علوفه اکسشن‌های *Ag. cristatum* بین کلیه صفات در شرایط دیم و آبی تنوع معنی‌داری را مشاهده کرده و رابطه بین عملکرد علوفه خشک با صفات تاریخ سنبله دهی، تاریخ گرده افشانی، تاریخ شیری شدن و رسیدن بذر، منفی و معنی‌دار گزارش کردند. محمدی و همکاران (۲۰۰۶)، به بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین ۲۳ جمعیت مختلف گونه *Ag. elongatum* بر اساس صفات مورفولوژیک پرداختند. بر اساس نتایج بدست آمده صفات عملکرد علوفه خشک و تعداد ساقه در گیاه را به عنوان مهمترین فاکتورهای تأثیرگذار در تنوع مورفولوژیکی معرفی و همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تمامی صفات با استثناء صفات طول خوشه و طول برگ پرچم با عملکرد خشک علوفه گزارش نمودند.

مولکولی

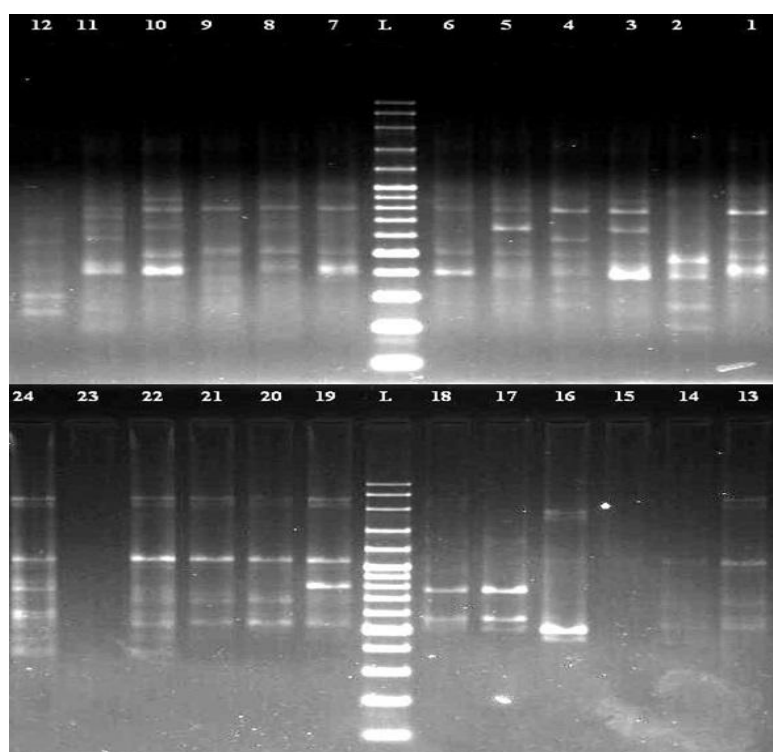
تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آگروپیرون مورد مطالعه با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت که از این ۲۰ آغازگر تنها ۱۳ عدد دارای باندهای قابل امتیاز دهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۸۹ مکان ژنی را شناسایی کنند که از این تعداد تنها ۲ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند، که آغازگر IS11 بیشترین تعداد باند (۱۴) و آغازگر ۸۴۲ کمترین تعداد باند (۲) را نشان دادند (شکل ۲). در مطالعه‌ای که توسط مرادی و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، تنوع ژنتیکی میان ۱۳ ژنوتیپ از گونه *Ag. cristatum* با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۶۵ باند تکثیرشده توسط ۱۲ پرایمر، ۶۰ باند چندشکلی (با دامنه درصد چندشکلی ۶۰ تا ۱۰۰) بودند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجه درون‌گونه‌ای بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب دایس، ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه ژنتیکی متمایز تقسیم کرد و بای‌پلات نیز این نتایج را تأیید نمود.

شناسایی گروه‌های ژنوتیپی با ویژگی‌های فنوتیپی مشابه و تسهیل فرآیند انتخاب ژنوتیپ‌های برتر در برنامه‌های اصلاحی برجسته می‌سازد. به‌طور خاص، شناخت خوشه‌هایی با صفات برتر می‌تواند به بهینه‌سازی منابع اصلاحی، کاهش هزینه‌ها و افزایش سرعت پیشرفت اصلاحات کمک کند. بنابراین، بهره‌گیری از تجزیه خوشه‌ای به‌عنوان ابزاری کلیدی در طراحی برنامه‌های اصلاحی و مدیریت تنوع ژنتیکی، نقش تعیین‌کننده‌ای در توسعه پایدار گونه‌های مرتعی خواهد داشت. صفری و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی ۱۱ اکسشن از گونه *Ag. intermedium* تنوع مورفولوژیکی قابل توجهی را میان اکسشن‌ها گزارش کردند. تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی تفاوت‌های معناداری را میان اکسشن‌ها نشان داد و تجزیه خوشه‌ای، اکسشن‌ها را به سه گروه متمایز تقسیم نمود. همچنین، اکسشن‌های ۴-۸۹۰ و ۱۳-۸۹۰ بیشترین میزان تولید علوفه خشک را داشتند که می‌تواند به عنوان منبعی ارزشمند در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱. دندروگرام تجزیه کلاستر صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از روش UPGMA

Figure 1. Dendrogram of cluster analysis of morphological traits and forage quality for the studied genotypes using the UPGMA method



شکل ۲. الگوی باندی ۲۴ ژنوتیپ مورد مطالعه با استفاده از آغازگر IS6
Figure 2. Banding pattern of the 24 genotypes studied using the IS6 primer

کمترین میزان درصد چند شکلی را آغازگرهای UBC840 (۸۵/۷۱) و UBC884 (۸۷/۵) داشتند و درصد چند شکلی برای سایر آغازگرها ۱۰۰٪ می‌باشد، همچنین میانگین درصد چند شکلی برابر ۹۷/۹۴٪ بود. متوسط تعداد باندهای تولیدشده توسط هر آغازگر برای ۲۴ ژنوتیپ برابر ۶/۹۲ بدست آمد، نتایج بدست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول (۵) نشان داده شده است. بیشترین مقدار شاخص EMR متعلق به نشانگر IS11 با مقدار ۱۴ بود و کمترین مقدار مربوط به نشانگر UBC811 با مقدار ۴ است. شاخص PIC بیشترین مقدار خود را در نشانگر UBC842 با ۰/۴۹۱ و کمترین مقدار را در نشانگر UBC811 با ۰/۲۵۹ نشان داد. در شاخص MI، بیشترین مقدار مربوط به نشانگر IS11 با ۵/۰۴۹ و کمترین مقدار مربوط به نشانگر UBC811 با ۱/۰۳۵ بود. شاخص RP بیشترین مقدار را در نشانگر UBC884 با ۵/۹۱۷ و کمترین مقدار را در نشانگر UBC823 با ۲/۷۵۰ داشت. فرشادفر و همکاران (۲۰۱۸) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۱۳ ژنوتیپ

Ag. desertorum از ۱۵ پرایمر ISSR استفاده کردند که از این میان، ۱۲ پرایمر باندهای قابل تجزیه تولید کردند. در مجموع ۶۱ باند حاصل شد که ۶۰ مورد آن چندشکلی بودند و شاخص PIC از ۰/۲۷ تا ۰/۴۴ متغیر بود. پرایمر IS3 با بالاترین مقدار PIC (۰/۴۴) کارایی بالایی در تفکیک ژنوتیپ‌ها داشت، در حالی که IS9 ضعیف‌ترین قدرت تمایز را نشان داد. نتایج RP، MI و EMR نیز نشان دادند که پرایمرهای IS5، IS11 و IS13 بهترین توانایی را در آشکارسازی تنوع ژنتیکی دارند. تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی معمولاً با استفاده از شاخص‌های مولکولی متعددی ارزیابی می‌شود که هر یک از این شاخص‌ها جنبه‌های متفاوتی از تنوع و کارایی نشانگرها را بازتاب می‌دهند. درصد پلی‌مورفیسم به عنوان معیاری کلیدی، بیانگر میزان تنوع در میان نمونه‌هاست و مقادیر بالای آن نشان‌دهنده گستردگی تنوع ژنتیکی است که برای برنامه‌های اصلاحی و حفظ منابع ژنتیکی اهمیت زیادی دارد.

جدول ۵. پارامترهای مولکولی محاسبه شده در آغازگرهای ISSR

Table 5. Molecular parameters calculated in ISSR primers

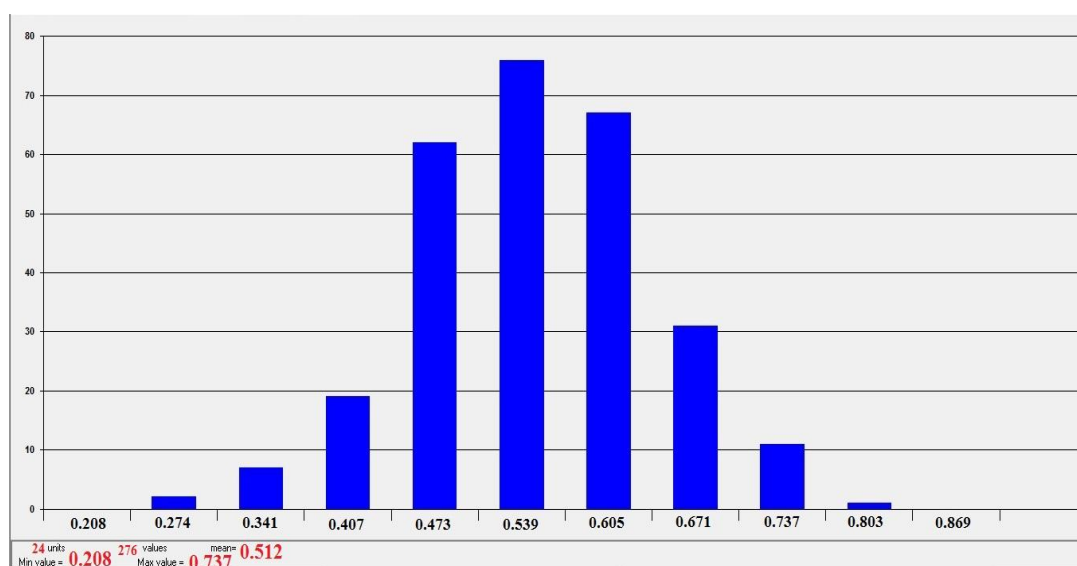
آغازگر Primers	توالی آغازگر Primer sequence	Na	NPB	PP%	EMR	PIC	MI	RP
IS6	5'-CACACACACACACAG-3'	7	7	100	7	0.372	2.601	4.583
UBC884	5'-AGAGAGAGAGAGAG-3'	8	7	87.50	7	0.370	2.592	5.917
IS11	5'-ACACACACACACACC-3'	14	14	100	14	0.361	5.049	9.167
SI14	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	10	10	100	10	0.401	4.014	7.000
UBC808	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	7	7	100	7	0.467	3.267	5.917
UBC811	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	4	4	100	4	0.259	1.035	3.667
UBC823	5'-TCTCTCTCTCTCTCC-3'	6	6	100	6	0.299	1.795	2.750
UBC825	5'-ACACACACACACACAG-3'	6	6	100	6	0.353	2.118	4.000
UBC886	5'-CTCTCTCTCTCTCTC-3'	6	6	100	6	0.418	2.507	4.333
UBC880	5'-GGAGAGAGAGAGAGAGA-3'	5	5	100	5	0.347	1.733	3.583
UBC840	5'-GAGAGAGAGAGAGAGA-3'	7	6	85.71	6	0.367	2.199	6.250
UBC835	5'-AGAGAGAGAGAGAGAG-3'	7	7	100	7	0.397	2.781	6.083
UBC842	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	2	2	100	2	0.491	0.983	1.917
میانگین		6.846	6.692	97.940	6.692	0.377	2.513	5.013

تعداد باند (Na)، تعداد باند چند شکل (NPB)، درصد چند شکلی (PP%)، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، نسبت چندگانه موثر (EMR) و شاخص قدرت تفکیک (RP).

بهتری در بررسی تنوع ژنتیکی داشتند؛ از مجموع ۷۳ باند، ۷۰ باند چندشکلی بودند و درصد چندشکلی به ۹۶/۲۵٪ رسید. گروه بندی ژنوتیپها بر اساس داده های ISSR کاملاً با توزیع جغرافیایی آنها هماهنگ بود.

فاصله ژنتیکی میان ژنوتیپهای مورد مطالعه، با استفاده از ضریب دایس، در بازه ای وسیع از ۰/۲۰۸ تا ۰/۷۳۷ متغیر بود و میانگین این فاصله برابر با ۰/۵۱۲ گزارش شد (شکل ۳). این مقادیر نشان دهنده میزان پایین شباهت ژنتیکی و در نتیجه تنوع ژنتیکی بالای ژنوتیپهای مورد مطالعه است. شناسایی ژنوتیپهای دارای بیشترین شباهت (ژنوتیپهای ۲۱ و ۲۲ از گروه اول) و کمترین شباهت (ژنوتیپ ۱ از گروه اول و ژنوتیپ ۱۳ از گروه سوم) بیانگر وجود ساختار ژنتیکی پیچیده و متنوع در جمعیت مورد مطالعه است. این گستردگی در فاصله های ژنتیکی نشان دهنده تفاوت های قابل توجه در ترکیب ژنتیکی بین ژنوتیپهاست که اهمیت بالایی در حفظ منابع ژنتیکی و بهره برداری بهینه در برنامه های اصلاحی دارد. تشخیص نمونه هایی با شباهت های ژنتیکی متفاوت، امکان شناسایی منابع ژنتیکی منحصر به فرد و گروه هایی با ویژگی های مشترک را فراهم می کند، که این امر زمینه را برای انتخاب هدفمند ژنوتیپهای دارای خصوصیات مطلوب و افزایش کارایی برنامه های اصلاحی فراهم می سازد.

همچنین، شاخص هایی مانند EMR، PIC، MI و RP هر کدام نقش ویژه ای در تعیین قدرت تفکیک و توانایی اطلاعاتی نشانگرها ایفا می کنند. شاخص EMR نشان دهنده تعداد لوکوس های چندشکل قابل شناسایی توسط هر نشانگر است و مقادیر بالای آن نشانگر کارایی بالاتر در کشف تنوع ژنتیکی می باشد. شاخص PIC میزان اطلاعات ژنتیکی قابل استخراج از هر نشانگر را منعکس می کند و می تواند در انتخاب نشانگرهای مناسب برای مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد. شاخص MI که ترکیبی از EMR و PIC است، معیار جامعی برای سنجش توان اطلاعاتی کلی نشانگرها فراهم می آورد، و شاخص RP بیانگر قدرت تفکیک نشانگرها در تمایز ژنوتیپها است. بهره گیری از نشانگرهایی با مقادیر بالای این شاخص ها می تواند به بهبود دقت تحلیل های ژنتیکی و افزایش کارایی برنامه های اصلاحی منجر شود. به طور کلی، انتخاب آغازگرهای مولکولی با کارایی بالا، نقش مهمی در موفقیت مطالعات تنوع ژنتیکی و توسعه استراتژی های بهینه در بهبود گیاهان ایفا می کند و می تواند به عنوان پایه ای مستحکم برای مدیریت منابع ژنتیکی و ارتقای کیفیت و عملکرد گونه های گیاهی مطرح گردد. صفری و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی اثربخشی نشانگرهای ISSR و پروتئین های محلول برگ در ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۲ ژنوتیپ *Ag. elongatum* پرداختند. نتایج نشان داد که نشانگرهای ISSR عملکرد



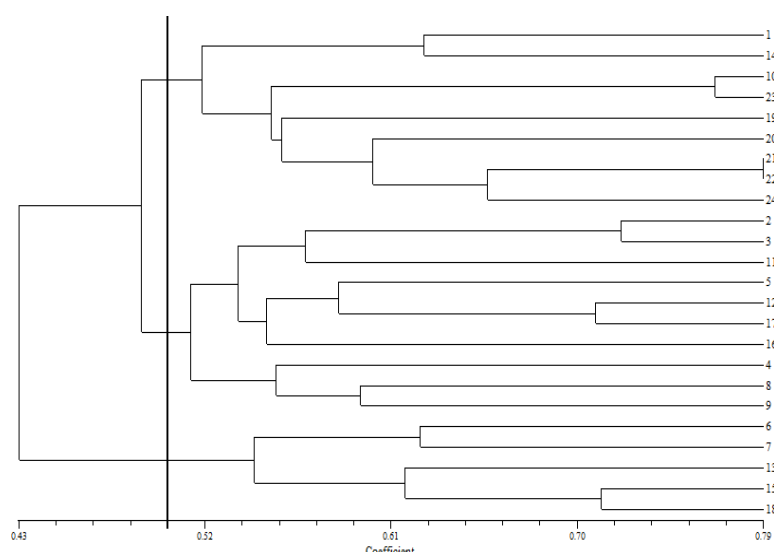
شکل ۳. نمودار توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه
Figure 3. Frequency distribution diagram of genetic distances between the studied genotypes

ژنوتیپ‌های ۱۷ و ۸ کمترین تشابه و ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ بیشترین تشابه را با یکدیگر داشتند. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های (۶، ۷، ۱۳، ۱۵ و ۱۸) می‌باشد. میانگین تشابه در این گروه ۰/۵۷ بود که در بین ژنوتیپ‌های این گروه ژنوتیپ‌های ۷ و ۱۸ دارای بیشترین تشابه و ژنوتیپ‌های ۷ و ۱۳ دارای کمترین تشابه می‌باشند. صفری و همکاران (۲۰۲۲) تنوع ژنتیکی ۱۳ ژنوتیپ *Ag. intermedium* را با استفاده از نشانگرهای ISSR و پروتئین‌های محلول برگ مورد بررسی قرار دادند. از ۱۵ پرایمر ISSR، ۱۲ پرایمر قابلیت امتیازدهی داشتند و در مجموع ۶۱ باند حاصل شد که ۶۰ مورد آن چندشکلی بود. خوشه‌ای بر اساس ضریب دایس، ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه متمایز تقسیم کرد. این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ISSR ابزارهای مؤثری برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در گونه‌های *Agropyron* هستند.

گزارش‌های متناقضی درباره وجود یا عدم وجود رابطه بین نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی و داده‌های مورفولوژیکی ارائه شده است. نتایج آزمون مانتل نشان داد که همبستگی بین ماتریس‌های تشابه صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی ۳۴٪ و غیرمعنی‌دار بود. همچنین، همبستگی بین صفات کیفیت علوفه و نشانگرهای مولکولی ۱۵٪ و غیرمعنی‌دار گزارش شد.

در نهایت، فهم دقیق ساختار جمعیتی و الگوی فاصله‌های ژنتیکی به برنامه‌ریزان اصلاح نباتات کمک می‌کند تا با اتخاذ رویکردهای هدفمند، حفظ تنوع ژنتیکی را تضمین کرده و از طریق به‌کارگیری ژنوتیپ‌های متنوع، استراتژی‌های مؤثری جهت بهبود عملکرد و سازگاری گیاهان توسعه دهند. آینه‌کوا و همکاران (۲۰۲۳) با استفاده از هفت پرایمر ISSR، تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی پنج گونه *Agropyron* را در جنوب‌شرقی قزاقستان بررسی کردند. ماتریس تشابه حاصل نشان داد که ISSRها ابزار مؤثری برای تعیین پلی‌مورفیسم و تفکیک گونه‌ها هستند.

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس در شکل (۴) آمده است. خط برش دندروگرام از محل فاصله ژنتیکی ۰/۵۰ باعث گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه گردید. که گروه اول شامل ژنوتیپ‌های (۱، ۱۴، ۱۰، ۲۳، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۴) می‌باشد. میانگین تشابه ژنوتیپ‌های این گروه برابر ۰/۵۶ می‌باشد که در بین ژنوتیپ‌های این گروه، ژنوتیپ‌های ۲۱ و ۲۲ دارای بیشترین تشابه و ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۲۰ دارای کمترین تشابه بودند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های (۲، ۳، ۱۱، ۵، ۱۲، ۱۷، ۱۶، ۴ و ۸) قرار گرفتند. میانگین تشابه این گروه ۰/۵۴، که



شکل ۴. دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر ISSR برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه
Figure 4. Dendrogram obtained from ISSR marker data for the studied genotypes.

مورفولوژیکی و کیفیت علوفه در گونه *E. hispidus* var. *villosus*، از تجزیه رگرسیون گام به گام استفاده شد. نتایج این تجزیه نشان داد که برخی از نشانگرها دارای ضریب تعیین تعدیل شده بالا و سطح معنی داری قابل توجهی هستند و ارتباط چشمگیری با صفات مورد بررسی دارند. بررسی فراوانی تکرار نشانگرهای ISSR در صفات مختلف نشان داد که برخی از آن‌ها نقش کلیدی و چندمنظوره‌ای در کنترل ویژگی‌های *E. hispidus* var. *villosus* ایفا می‌کنند. از مجموع ۱۳ نشانگر ISSR مورد استفاده، تعداد ۱۲ نشانگر با حداقل یکی از صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه بررسی شده ارتباط آماری معنی دار نشان دادند. این موضوع بیانگر کارایی بالای نشانگرهای به کاررفته در آشکارسازی نواحی ژنومی مؤثر بر صفات مختلف در گونه *E. hispidus* var. *villosus* است. تنها یک نشانگر فاقد ارتباط معنی دار با صفات بود که ممکن است ناشی از عدم هم‌پوشانی آن با نواحی ژنی مرتبط یا محدودیت‌های آماری در شرایط آزمایشی باشد. در این میان، نشانگر IS11 با ارتباط معنی دار آماری با هفت صفت شامل ارتفاع بوته، تعداد ساقه در بوته، عملکرد وزن خشک علوفه، درصد قابلیت هضم ماده خشک، درصد پروتئین خام، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی و درصد خاکستر کل، بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد و به عنوان نشانگری با پتانسیل بالا برای

با توجه به اینکه صفات ریخت‌شناسی معمولاً مربوط به بخش‌های رمزکننده ژنوم هستند، در حالی که قطعات DNA تکثیر شده توسط نشانگرهای ISSR هم شامل بخش‌های رمزکننده و هم بخش‌های غیررمزکننده ژنوم می‌شوند، و از سوی دیگر، صفات ریخت‌شناسی تحت تأثیر شرایط محیطی نیز قرار دارند، بنابراین عدم وجود همبستگی بالا بین نشانگرهای مولکولی ISSR و صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه چندان غیرمنتظره نیست. از جمله عوامل احتمالی این مسئله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: اول، با توجه به وجود توالی‌های تکراری فراوان در ژنوم گونه مورد بررسی و اینکه آغازگرهای ISSR نیز شامل بخش‌هایی از این توالی‌های تکراری هستند، احتمال دارد آغازگرها نواحی مربوط به اینترون‌ها را تکثیر کرده باشند. دوم، تعداد پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه به اندازه کافی زیاد نبوده است تا تصویر جامع و کاملی از پروفایل DNA گیاه فراهم کند. بنابراین، استفاده از تعداد بیشتری پرایمر و بررسی جامع‌تر ژنوم ممکن است منجر به دستیابی به مقادیر همبستگی بالاتری بین داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیکی شود.

نقشه بای‌ارتباطی

به منظور شناسایی نشانگرهای ISSR مرتبط با صفات

خوشه نیز با چندین نشانگر ارتباط معنی داری نشان داد. از جمله، UBC823 با ضریب $0/856$ و تأثیر منفی، اثر کاهشی بر این صفت داشت. درحالی که UBC808 با ضریب تأثیر مثبت بالا به عنوان عامل افزایشده طول خوشه شناخته شد. تعداد ساقه در بوته تحت تأثیر مثبت و قابل توجه نشانگرهای IS11 با ضریب $0/409$ و IS6 با ضریب $0/596$ قرار داشت و این نشانگرها ارتباط معناداری با افزایش شاخه زایی داشتند. عملکرد وزن خشک علوفه به طور عمده با نشانگر UBC825 با ضریب $0/546$ و تأثیر بالا مرتبط بود. همچنین IS11 با تأثیر منفی، به عنوان عامل کاهش عملکرد معرفی شد. درصد قابلیت هضم ماده خشک نیز بیشترین ارتباط را با نشانگر UBC880 با ضریب $0/477$ داشت. همچنین UBC808 نیز با ضریب تأثیر مثبت، عامل افزایش این صفت بود. درصد پروتئین خام تحت تأثیر مثبت نشانگر UBC880 با ضریب $0/277$ قرار داشت، درحالی که IS11 و UBC886 با ضریب های منفی، نقش کاهنده ای داشتند. برای صفت درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی، نشانگر UBC823 با ضریب تأثیر منفی قوی، اثر کاهشی چشمگیری داشت. از طرفی، IS11 و UBC880 با اثر مثبت در افزایش فیبر محلول نقش داشتند. در مورد درصد خاکستر کل، IS11 با ضریب $0/380$ و تأثیر مثبت بیشترین اثر را داشت و همچنین نشانگرهای UBC808 و UBC835 نیز با اثر افزایشی معنادار شناسایی شدند. در نهایت، درصد کربوهیدرات های محلول در آب به شدت تحت تأثیر نشانگر UBC842 با ضریب $0/662$ قرار داشت که این نشانگر، نقش افزایشی معناداری در بهبود این صفت ایفا کرد. ملکی و همکاران (۲۰۲۳) با استفاده از ۲۸ پرایمر ISSR، تنوع ژنتیکی در ۳۴ ژنوتیپ *Ag. desertorum* را مورد بررسی قرار دادند و ۴۴۸ مکان را تکثیر کردند که ۹۰٪ آن ها چندشکلی بودند. آنالیز ساختار جمعیتی با روش های بیزی و WPGMA، ژنوتیپ ها را به دو گروه عمده به همراه تعدادی ژنوتیپ آمیخته تقسیم کرد. این مطالعه توانست ژنوتیپ های زودرس و دیررس را از هم تفکیک کند و نشان داد که نشانگرهای ISSR می توانند در انتخاب ژنوتیپ های با عملکرد بالا در تولید علوفه مؤثر باشند.

برنامه های اصلاحی معرفی می شود. پس از آن، نشانگر UBC880 در شش صفت و نشانگرهای UBC825 و UBC808 هر کدام در پنج صفت مختلف حضور معنی دار داشتند. این یافته ها نشان می دهد که برخی نشانگرها با عملکرد چندگانه، می توانند به عنوان ابزارهای مؤثر در شناسایی ژن های کنترل کننده صفات پیچیده در برنامه های ژن یابی و اصلاح نباتات مورد استفاده قرار گیرند. بررسی الگوی توزیع نشانگرهای ISSR در ارتباط با صفات مختلف نشان داد که صفات ارتفاع بوته، طول میانگره و طول خوشه، هر یک با شش نشانگر مختلف ارتباط آماری معنی دار داشتند و در صدر صفاتی قرار گرفتند که بیشترین وابستگی را با نشانگرهای مورد استفاده نشان دادند. این امر حاکی از ماهیت پلی ژنی این صفات و حساسیت آن ها به کنترل ژنتیکی چندگانه است. از این رو، این صفات می توانند شاخص های مناسبی برای برنامه های اصلاحی مبتنی بر نشانگر و نقشه یابی ارتباطی در این گونه ارزشمند مرتعی باشند.

برای صفت ارتفاع بوته، نشانگر UBC823 با ضریب تعیین تعدیل شده $0/929$ و مقدار معناداری $0/005$ به عنوان قوی ترین عامل مؤثر شناخته شد. همچنین نشانگرهای UBC835 و IS14 به ترتیب با ضریب های $0/885$ و $0/848$ و مقادیر معنی داری $0/022$ و $0/023$ در رتبه های بعدی قرار گرفتند و اثر مثبتی بر افزایش ارتفاع بوته داشتند. در صفت طول میانگره، نشانگر UBC886 با ضریب $0/862$ و ضریب تأثیر منفی، نقش مهمی در کاهش این صفت ایفا نمود. همچنین نشانگر UBC808 با ضریب $0/552$ و تأثیر مثبت، در افزایش طول میانگره مؤثر بود. در خصوص تعداد سنبلیچه در سنبله، نشانگر UBC825 با ضریب $0/684$ و UBC808 با ضریب $0/570$ اثر گذاری مثبتی داشتند. این ارتباط نشان می دهد که این نشانگرها با افزایش تعداد سنبلیچه ها در ارتباط مستقیم هستند. طول برگ پرچم به شدت تحت تأثیر نشانگر UBC808 قرار داشت که با ضریب $0/425$ و ضریب تأثیر بالا نقش افزایشی بر این صفت داشت. در مقابل، UBC880 با ضریب تأثیر منفی موجب کاهش این صفت گردید. طول

جدول ۶. نقشه‌یابی ارتباطی نشانگر مولکولی ISSR و صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه *E. hispidus* var. *villosus*Table 6. Linkage mapping of ISSR molecular markers and morphological traits and forage quality of *E. hispidus* var. *villosus*

Traits	Primers	Adjusted R Square	R Square Change	B	Beta	Sig	Traits	Primers	Adjusted R Square	R Square Change	B	Beta	Sig
PLH	IS11	.242	.275	7.012	.404	.009	NSB	IS11	.409	.435	8.427	.562	.000
	UBC825	.564	.135	6.038	.620	.015		IS6	.596	.197	4.599	.367	.003
	UBC880	.750	.173	7.441	.629	.001	DW	UBC825	.525	.546	1284.277	.686	.000
	UBC825	.804	.053	4.038	.420	.023		UBC811	.652	.137	232.978	.158	.007
	IS14	.848	.041	-5.306	-.449	.023	DMD	IS11	.758	.107	-391.933	-.265	.005
	UBC835	.885	.032	-3.792	-.321	.022		IS11	.142	.179	-.798	-.275	.039
	UBC823	.929	.033	-1.068	-.110	.005		UBC808	.291	.174	.843	.390	.027
	UBC825	.200	.234	5.019	.972	.017		UBC880	.477	.192	-2.145	-.549	.009
INL	UBC880	.358	.179	-4.613	-.947	.019	CP	UBC823	.578	.107	.829	.384	.026
	UBC808	.552	.197	5.470	.912	.005		UBC880	.277	.308	.895	.752	.005
	IS11	.671	.117	-5.752	-.880	.010	WSC	IS11	.477	.215	-.528	-.515	.006
	IS14	.757	.082	-3.387	-.565	.012		UBC886	.677	.196	-.550	-.517	.001
NSS	UBC886	.862	.089	-2.865	-.478	.001		IS14	.224	.258	.348	.375	.011
	IS11	.913	.041	3.872	.440	.005		UBC811	.373	.170	.414	.363	.021
	UBC835	.261	.293	1.285	.426	.006	ADF	UBC886	.525	.159	-.244	-.319	.012
	IS14	.390	.149	1.292	.522	.027		UBC842	.662	.134	.408	.534	.007
FLL	UBC808	.570	.183	1.590	.574	.005	ASH	IS11	.258	.290	1.181	.413	.007
	UBC825	.684	.113	.858	.376	.010		UBC823	.497	.251	-1.365	-.641	.003
	UBC808	.425	.179	1.458	.560	.014	ADF	UBC880	.679	.180	1.786	.464	.002
	UBC880	.538	.123	-1.426	-.674	.022		UBC808	.189	.224	.348	.407	.019
SPL	UBC880	.276	.308	-3.164	-.930	.005	ADF	IS11	.380	.210	.332	.477	.011
	UBC808	.517	.251	4.433	1.059	.002		UBC835	.516	.145	.336	.393	.016
	IS11	.632	.120	-3.342	-.732	.013							
	UBC825	.751	.114	1.036	.287	.004							
	UBC823	.856	.093	-1.951	-.574	.001							
	UBC840	.892	.033	-.994	-.292	.017							

ارتفاع بوته (PLH)، طول میانگره (INL)، تعداد سنبله در سنبله (NSS)، طول برگ پرچم (FLL)، طول خوشه (SPL)، تعداد ساقه در بوته (NSB)، عملکرد وزن خشک علوفه (DW)، درصد قابلیت هضم ماده خشک (DMD)، درصد پروتئین خام (CP)، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی (ADF)، درصد خاکستر کل (ASH) و درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

مطالعه حاضر با ارزیابی ۲۴ ژنوتیپ *E. hispidus* var. *villosus* و بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی ISSR، تنوع ژنتیکی قابل‌ملاحظه‌ای را در صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه این گونه آشکار ساخت. تجزیه واریانس نشان داد که صفات مورفولوژیک، از جمله ارتفاع بوته، تعداد ساقه در بوته، طول برگ پرچم، و عملکرد وزن خشک علوفه، دارای تفاوت‌های آماری معنی‌دار در سطوح ۱٪ و ۵٪ بودند، در حالی که صفات کیفی نظیر درصد پروتئین خام و قابلیت هضم ماده خشک تنوع کمتری از خود نشان دادند. تجزیه همبستگی فنوتیپی، ارتباط مثبت و معنی‌دار بین عملکرد وزن خشک علوفه و صفات مورفولوژیک کلیدی مانند ارتفاع بوته (سطح ۵٪) و تعداد ساقه در بوته (سطح ۱٪) را تأیید کرد که بر اهمیت این صفات در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر برای برنامه‌های اصلاحی تأکید دارد. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA، ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۱۰ را به دلیل برتری در عملکرد وزن خشک علوفه و صفات مورفولوژیک، به‌عنوان کاندیداهای برتر برای برنامه‌های اصلاحی معرفی کرد. این ژنوتیپ‌ها

پتانسیل بالایی برای استفاده در احیای مراتع و تولید علوفه پایدار در شرایط محیطی چالش‌برانگیز نشان دادند. یافته‌های این پژوهش نشان‌دهنده اهمیت ترکیب ابزارهای مولکولی و فنوتیپی در شناسایی ژنوتیپ‌های ممتاز و توسعه راهبردهای اصلاحی هدفمند برای تقویت نظام‌های کشاورزی پایدار است.

تحلیل مولکولی با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR، چندشکلی ۹۷/۹۴٪ را نشان داد و شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR)، شاخص نشانگری (MI) و قدرت تفکیک (RP) حاکی از تنوع ژنتیکی بالای جمعیت مورد مطالعه بود. نتایج ماتریس تشابه مبتنی بر ضریب دایس، حاکی از تنوع ژنتیکی قابل‌توجه و ساختار ژنتیکی پیچیده است. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در سه گروه متمایز دسته‌بندی کرد. نشانگر IS11 با ارتباط معنی‌دار با هفت صفت مورفولوژیک و کیفیت علوفه، و نشانگرهای UBC880، UBC825 و UBC808 با ارتباط با چندین صفت، به‌عنوان ابزارهای مؤثر برای نقشه‌یابی ژنومی شناسایی شدند. صفات ارتفاع بوته، طول میانگره، و طول خوشه هر

توجه به تأثیر عوامل محیطی بر صفات کیفی و تنوع محدودتر آن‌ها، پیشنهاد می‌شود آزمایش‌های چندمکانی در شرایط محیطی متنوع انجام شود تا تعاملات ژنوتیپ و محیط بررسی گردد. حفظ ژنوتیپ‌های برتر، به‌ویژه ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۱۰ در بانک‌های ژن و بهره‌برداری از آن‌ها در برنامه‌های احیای مراتع نیز توصیه می‌شود تا پایداری تولید علوفه در برابر چالش‌های اقلیمی تضمین شود. این راهکارها می‌توانند به بهبود بهره‌وری مراتع، تقویت نظام‌های کشاورزی پایدار، و حمایت از امنیت غذایی در مناطق خشک و نیمه‌خشک کمک کنند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

یک با شش نشانگر ارتباط معنی‌دار داشتند، که نشان‌دهنده ماهیت پلی‌ژنی این صفات است. برای بهره‌برداری مؤثر از تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده، پیشنهاد می‌شود از نشانگرهای ISSR در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر (MAS) استفاده شود تا ژنوتیپ‌های برتر با صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه مطلوب به‌سرعت شناسایی و گزینش شوند. همچنین، انجام مطالعات تکمیلی با تعداد بیشتری ژنوتیپ و آغازگرهای SSR و SNP، همراه با فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS)، می‌تواند دقت نقشه‌یابی ژنومی را افزایش داده و ژن‌های کنترل‌کننده صفات پیچیده را با وضوح بیشتری شناسایی کند. این رویکرد می‌تواند به توسعه استراتژی‌های اصلاحی پیشرفته و تسریع فرآیند بهبود عملکرد و کیفیت علوفه کمک کند. با

منابع

- Ainebekova, B. A., Yerzhanova, S. T., Dossybayev, K., Seitbattalova, A. I., Tilek, K., Kambarbekov, E. A., ... & Meiirman, G. T. (2023). Genetic analysis and molecular characterization of the wheatgrass (*Agropyron cristatum* L. Gaertn.) in South-East Kazakhstan. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 55(4), 1132–1141.
- Altintas, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A., & Ozkan, H. O. (2008). Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 127, 9–14.
- Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D., & Sorrells, M. E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36(1), 181–186.
- Assadi, M. (1995). Meiotic configuration and chromosome number in some Iranian species of *Elymus* L. and *Agropyron* Gaertner (*Poaceae: Triticeae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 117(2), 159–168. <https://doi.org/10.1006/bojl.1995.0013>
- Caradus, J. R., & Chapman, D. F. (2024). Evaluating pasture forage plant breeding achievements: a review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1–75.
- Carrier, L., Van Waes, C., Rotar, I., Vlahova, M., & Vidican, R. (2009). Forage quality evaluation. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 66(1), [no page numbers provided].
- Cheng, P., Holdsworth, W., Ma, Y., Coyne, C. J., Mazourek, M., Grusak, M. A., ... & McGee, R. J. (2015). Association mapping of agronomic and quality traits in USDA pea single-plant collection. *Molecular Breeding*, 35, 1–13.
- Farshadfar, M., & Farshadfar, A. (2003). Evaluation of genetic diversity in various *Agropyron* accessions based on morphological and biochemical traits. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources, Isfahan University of Technology*, 8(2). (in Persian)
- Farshadfar, M., Nowrozi, R., Safari, H., Shirvani, H., & Amjadian, M. (2018). Assessment of genetic diversity in *Agropyron desertorum* accessions using ISSR molecular marker. *Future of Food: Journal of Food and Agricultural Society*, 6(1), 20–27.
- Gemmell, C. E., & Grierson, E. R. (2021). Inter-simple sequence repeats (ISSR), microsatellite-primed genomic profiling using universal primers. In: *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, 249–262.
- Hatami Maleki, H., Mohammadi, R., Firouzkuhi, F., Darvishzadeh, R., & Zeinalzadeh-Tabrizi, H. (2023). Molecular evidence depicts genetic divergence among *Agropyron elongatum* and *A. cristatum* accessions from gene pool of Iran. *PLOS ONE*, 18(11), e0294694.
- Hou, Y., Yan, Z., & Wei, Y. (2005). Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. *Barley Genetics Newsletter*, 35, 9–22.

- Ibrahim, A. K., Zhang, L., Niyitanga, S., Afzal, M. Z., Xu, Y., Zhang, L., ... & Qi, J. (2020). Principles and approaches of association mapping in plant breeding. *Tropical Plant Biology*, 13, 212–224.
- Jafari, A., Connolly, V., & Walsh, E. J. (2003). Genetic analysis of yield and quality in forage crops. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 42(2), 209–221.
- Jones, A., & Brown, T. (2020). *Agropyron* species in rangeland improvement. *Grassland Science*, 12(4), 89–97.
- Khan, M. A., & Korban, S. S. (2012). Association mapping in forest trees and fruit crops. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 4045–4060.
- Kumar, M., Mishra, G. P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P. K., & Singh, S. B. (2009). Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of Trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3), 225–236.
- Li, Y., & Chen, Z. (2023). Advances in association mapping for crop improvement. *Molecular Plant Breeding*, 14(1), 56–67.
- Liu, W., Gowda, M., Steinhoff, J., Maurer, H. P., Würschum, T., Longin, C. F. H., ... & Reif, J. C. (2011). Association mapping in an elite maize breeding population. *Theoretical and Applied Genetics*, 123, 847–858.
- Maleki, H. H., Mohammadi, R., Arshad, M., Hasanzadeh, M., & Rafiee, M. (2023). Genetic variability and population structure of *Agropyron desertorum* accessions from Iran based on inter simple sequence repeat (ISSR) assay. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 70(8), 2511–2520.
- Mohammadi, R., Khayam Nekouei, M., Mirlouhi, A., & Razmjoo, K. (2006). Evaluation of genetic diversity among different populations of the forage and rangeland species *Agropyron elongatum*. *Iranian Journal of Genetics and Breeding of Rangeland and Forest Plants*, 14(1). (in Persian)
- Moradi, M., Farshadfar, E., & Safari, H. (2015). Evaluation of genetic diversity in *Agropyron cristatum* using ISSR molecular marker. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 6(5), 425–432. (in Persian)
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225–238.
- Prince, L. M. (2015). Plant genotyping using fluorescently tagged inter-simple sequence repeats (ISSRs): basic principles and methodology. In: *Plant Genotyping: Methods and Protocols*, 63–75.
- Rahmani, A., Jafari, A. A., & Ghaleh Nader, E. (2009). Evaluation of seed yield and forage production in cultivars and accessions of *Agropyron cristatum* under rainfed and irrigated conditions in the cold temperate region of northern Lorestan. *Iranian Journal of Range and Desert Research*, 16(1), 66–78. (in Persian)
- Rahmani, A., Jafari, A. A., & Torkaman, M. (2006). Evaluation of forage yield and quality of 18 *Agropyron cristatum* ecotypes for rangeland improvement and pasture development. *Iranian Journal of Range and Desert Research*, 13(1), 53–61. (in Persian)
- Safari, H., Afzali, P., Etminan, A., Shirvani, H., & Fereidooni, L. (2022). The study of genetic diversity in *Agropyron intermedium* genotypes using ISSR and leaf soluble proteins markers. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 1(3), 358–374. (in Persian)
- Safari, H., Miri, E., Etminan, A., Shirvani, H., & Fereidooni, L. (2022). Evaluating the effectiveness of ISSR and leaf soluble proteins markers in investigating the conformity of the genetic diversity of *Agropyron elongatum* genotypes with their geographical distribution. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 1(4), 463–480. (in Persian)
- Safari, H., Shirvani, H., & Etminan, A. (2017). Assessment of genetic variation in *Agropyron intermedium* accessions using cytogenetic and morphological traits. *MGJ*, 11(4), 623–627. (in Persian)
- Sahu, H. E. M. A. N. T., Amadabade, J. A. I. R. A. M., & Dhiri, N. A. M. R. A. T. A. (2015). Association mapping: a useful tool. *International Journal of Plant Sciences*, 10, 85–94.
- Sayedmohammadi, S. A., Jafari, A. A., Seyedmohammadi, N. S., & Sadat, S. (2012). Determining diversity and genetic distance of 31 genotypes of *Agropyron desertorum* for grain yield and its components using multivariate statistical methods. *Romanian Agricultural Research*, 29, 95–102. (in Persian)
- Torres, A. M., Weeden, N. F., & Martin, A. (1993). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 935–945.
- Wang, J. B., Deng, J. Y., & Fang, F. X. (2002). ISSR molecular marker technique and its application in horticultural crops. *Hereditas*, 24, 613–616.
- Wu, S., Lü, X., Liu, Q., Wuda, E., Li, L., Zhao, C., ... & Yin, C. (2025). The geographical variation in grassland forage quality on the eastern Qinghai-Tibet Plateau is driven mainly by climate. *Ecological Processes*, 14(1), 1–14.