

بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط صفات زراعی با نشانگرهای ISSR و EST-SSR در فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*)

زینب شهاب‌زاده¹، رضا درویش‌زاده^{2*}، رضا محمدی³، مراد جعفری⁴، هادی علیپور⁵

1. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات-ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

2. استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

3. استادیار، گروه ژنومیکس، انستیتو تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، شاخه شمال‌غرب و غرب، تبریز، ایران.

4. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

5. استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

(تاریخ دریافت: 1398/12/22 - تاریخ پذیرش: 1399/3/21)

Study of genetic diversity and association analysis of agronomic traits with ISSR and EST-SSR markers in tall fescue (*Festuca arundinacea*)

Zeinab Shahabzadeh¹, Reza Darvishzadeh^{2*}, Reza Mohammadi³, Morad Jafari⁴, Hadi Alipour⁵

1. Ph.D. Candidate in Plant Breeding-Molecular Genetics and Genetic Engineering, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

2. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North-West and West Region, Tabriz, Iran.

4. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

5. Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

(Received: Mar. 12, 2020 - Accepted: Jun. 10, 2020)

Abstract

Tall fescue (*Festuca arundinacea*) from Poaceae family is an allohexaploid ($2n = 6x = 42$) and cross pollinated plant that is used throughout the world as a forage plant. Most of economically important morphological traits have quantitative (polygenic) inheritance, and the expression of genes controlling these traits are widely influenced by the environment. So improving these traits with classical breeding methods is difficult and time consuming. In the last 40 years, the development of molecular markers technology and its integration with biometric methods has made possible identification of QTL and developing marker assisted selection. This research was aimed to study the genetic control and identification of genomic regions controlling agro-morphological traits in tall fescue germplasm using association analysis approach. In the molecular experiment, the genetic diversity of ninety tall fescue populations was assessed by 10 EST-SSR and 39 ISSR primers. In the phenotypic assessment, the phenotypic variability of ninety tall fescue populations for 10 agro-biological traits was assessed using randomized complete block design with three replications. Among studied agro-biological traits, the highest variation was observed for plant height and date to pollination. In principal component analysis based on agro-biological traits the studied tall fescue population subdivided into two main groups and four subgroups. In grouping population based on all studied molecular markers via UPGMA and Bayesian methods, the population divided into two main groups including grass and forage groups. The results showed that based on both morphological and molecular markers there are valuable genetic diversity among studied population. In association analysis with both GLM and MLM methods the highest number of markers was identified for data to pollination trait. In the GLM method, some common markers were identified for date to pollination and flowering date traits that could be used to study both traits simultaneously.

Keywords: Forage crops, genetic diversity, linkage disequilibrium mapping, molecular markers.

چکیده

گیاه فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*) از خانواده Poaceae یک گیاه آلوهاگزاپلوئید ($2n=6x=42$) دگربارور است که در سرتاسر دنیا به صورت گیاه علوفه‌ای استفاده می‌شود. اکثر صفات مورفولوژیک با ارزش اقتصادی بالا توارث کمی (پلی ژنتیک) داشته و بیان ژن‌های کنترل کننده این صفات به طور وسیعی تحت تاثیر محیط قرار می‌گیرند از این رو اصلاح این گونه صفات با روش‌های اصلاح کلاسیک مشکل و زمان‌بر است. در 40 سال اخیر توسعه تکنولوژی نشانگرهای مولکولی و تلفیق آن با روش‌های بیومتری امکان شناسایی QTL و توسعه گزینش به کمک نشانگر را فراهم نموده است. این تحقیق با هدف مطالعه ژنتیکی و شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات زراعی در ژرم‌پلاسِم فسکیوی پابلند و با استفاده از تجزیه ارتباطی انجام شد. در آزمایش مولکولی، تنوع ژنتیکی نود جمعیت فسکیوی پابلند با 10 جفت آغازگر EST-SSR و 39 آغازگر ISSR بررسی شد. در ارزیابی‌های مزرعه-ای، تنوع فنوتیپی نود جمعیت فسکیوی پابلند در رابطه با 10 صفت زراعی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار ارزیابی شد. از میان صفات زراعی مورد بررسی بیشترین تنوع در صفات تاریخ گرده‌افشانی و ارتفاع بوته مشاهده شد. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی براساس صفات زراعی مورد مطالعه جمعیت‌ها به دو گروه اصلی و چهار زیرگروه تقسیم‌بندی کنند. در گروه‌بندی جمعیت‌ها براساس کل نشانگرهای مولکولی به روش‌های UPGMA و بی‌زی، جمعیت‌های فسکیوی پابلند به دو گروه چمنی و علوفه‌ای تقسیم‌بندی شدند. نتایج نشان داد براساس هر دو نشانگر مورفولوژیک و ژنتیکی مورد استفاده تنوع خوبی بین جمعیت‌ها وجود دارد. در تجزیه ارتباطی با دو روش GLM و MLM بیشترین تعداد نشانگر برای تاریخ گرده‌افشانی شناسایی شد. در روش GLM تعدادی نشانگر مشترک بین دو صفت تاریخ گرده‌افشانی و تاریخ گلدهی مشاهده شد که می‌تواند برای مطالعه همزمان هر دو صفت به کار روند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، گیاهان علوفه‌ای، نشانگرهای مولکولی، نقشه‌یابی عدم تعادل پیوستگی.

مقدمه

کشور ما علی‌رغم دارا بودن تنوع اقلیمی وسیع و وجود منابع محیطی و ذخایر گیاهی غنی هنوز در زمره‌ی کشورهای وارد کننده مواد پروتئینی حیوانی است و هر ساله نیز تقاضا برای این مواد افزایش می‌یابد. هرچند توسعه صنعت دامپروری از راهکارهای رفع این مشکل است، اما کمبود علوفه از مهمترین عوامل محدودکننده آن به شمار می‌رود. در این راستا هر ساله شاهد چرای بی‌رویه و فشار بیش از حد دام بر مراتع (حدود چهار برابر ظرفیت استاندارد) هستیم که پیامد و تبعات آن تخریب مراتع، انهدام اکوسیستم و فرسایش خاک است (Sun et al., 2015). از سوی دیگر بحران کم آبی در جهان و افزایش خاک‌های شور و آلوده به فلزات سنگین باعث شده است توجه عمومی به سمت شناسایی و کشت گیاهان مقاوم به کم آبی و خاک شور و دارای خاصیت گیاه پالایی معطوف گردد. حدود 40 گونه گراس علوفه‌ای به دلیل داشتن پتانسیل تولید علوفه در دنیا مورد توجه می‌باشند که جنس‌های *Festuca*, *Dactylis*, *Bromus*, *Poa*, *Agrostis*, *Lolium* و *Cynodon* پرکاربردترین آن‌ها هستند. هر گونه‌ای از گراس‌ها به دلیل خصوصیات مورفولوژیک، بیولوژیک و فیزیولوژیک، در منطقه رویش خود کاربرد خاصی دارد (Saha et al., 2006).

گیاه فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*) در خانواده Poaceae طبقه‌بندی می‌شود. این خانواده 500 جنس و 8000 گونه را در خود جا داده است (Rostami et al., 2015). فسکیوی پابلند یک گیاه دگربارور و آلوپلوئید ($2n=6x=42$) است و این گیاه به‌عنوان گیاه علوفه‌ای استفاده می‌شود (Sun et al., 2011). از دیدگاه کشاورزی پایدار کشت فسکیوی پابلند علاوه بر تولید علوفه و پروتئین، از لحاظ کاهش مصرف آب، جذب نمک و متعادل‌سازی زمین‌های شور و جذب فلزات سنگین (گیاه پالایی) نیز حائز اهمیت است (Amombo et al., 2018).

همچنین این گیاه به علت برگ‌های زیاد در قسمت پائین گیاه، دوام خوبی در برابر چرای بی‌رویه دام دارد. بنابراین گونه‌ای مناسب به منظور احیای مراتع کشور، احداث چراگاه‌ها و تولید علوفه مناسب به ویژه در مناطق شور و کم‌آب می‌باشد (Chtouro-Ghorbel et al., 2011).

اصلاح گیاهان از دو روش کلاسیک و مهندسی ژنتیک انجام می‌گیرد و برای انجام فعالیت‌های اصلاحی و تولید و توسعه ارقام گیاهی با عملکرد و کیفیت بالا نیاز به تنوع ژنتیکی است. در صورت نبود تنوع به‌عنوان نمونه می‌توان با انجام تلاقی‌های بین گونه‌ای و ترکیب ژن‌های جدید، تنوع را به وجود آورد (Saha et al., 2006). در فرآیند گزینش در جمعیت در حال تفکیک، بسته به ماهیت صفت و وراثت‌پذیری؛ گزینش به صورت فنوتیپی یا براساس آزمون نتایج انجام می‌گیرد. با ابداع و توسعه نشانگرهای مولکولی، روش جایگزینی که برای گزینش براساس آزمون نتایج پیشنهاد شده است گزینش به‌کمک نشانگر (MAS)¹ است. برای بهره‌گیری از تکنیک گزینش به‌کمک نشانگر باید نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفات شناسایی گردند (Collard et al., 2005). هرچند بیشتر ارقام اصلاح شده برای مقاومت به تنش‌های محیطی از طریق اصلاح به روش‌های مرسوم تولید شده است؛ ولی امروزه اصلاح به‌کمک نشانگر به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Davar et al., 2012). در این راستا تعداد زیادی نشانگر مولکولی مبتنی بر DNA معرفی شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به RAPD، AFLP، SSR، IRAP و... اشاره کرد. نشانگرهای بین ریزماهوره‌ای (ISSR) به دلیل چندشکلی بالا، عدم نیاز به توالی‌یابی DNA برای تولید آغازگر و همچنین

ماتریس روابط خویشاوندی را نیز وارد مدل می‌کنند (Mahendar *et al.*, 2014). روش تجزیه ارتباطی برای شناسایی روابط نشانگر- صفت در ذرت (Nielsen *et al.*, 2001; Ghaffari Azar *et al.*, 2018, 2019)، گندم (Mengistu *et al.*, 2015)، یونجه (Li *et al.*, 2011)، جو (Kraakman *et al.*, 2006)، برنج (Kumar *et al.*, 2015) و آفتابگردان (Davar *et al.*, 2012) استفاده شده است. نتایج پژوهشگران نشان داده است که EST-SSR و ISSR از نشانگرهای مولکولی قدرتمند در بررسی تنوع ژنتیکی و انجام تجزیه ارتباطی است (Ghaffari Azar *et al.*, 2018, 2019). Sun و همکاران (2015) در فسکیوی پابلند با استفاده از نشانگر SSR به بررسی ارتباط نشانگر- صفت پرداخت؛ در مجموع 11 مکان ژنی برای دو صفت ارتفاع بوته و تاریخ گلدهی شناسایی شد. تا به حال گزارشی در فسکیوی پابلند در رابطه با استفاده از نشانگرهای ISSR و EST-SSR در تجزیه ارتباطی منتشر نشده است. تشخیص و بررسی روابط بین نشانگر مولکولی و صفات زراعی فواید زیادی دارد که از جمله آن می‌توان به امکان بررسی ژنتیکی ژنوتیپ‌های مطلوب قبل از بررسی فنوتیپی، یافتن آلل‌های مرتبط با صفت مطلوب، کمک به پیدا کردن دقیق QTLها و همچنین تأیید ژن‌هایی که برای کنترل صفت کمی خاصی قبلاً کاندید شده‌اند، اشاره کرد (Gebhardt *et al.*, 2004). در این راستا، پژوهش حاضر با هدف بررسی ارتباط بین تنوع فنوتیپی صفات زراعی با الگوی پلی مورفیسم نشانگرهای ISSR و EST-SSR در فسکیوی پابلند انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد نود ژنوتیپ فسکیوی پابلند در گلدان‌های پنج کیلویی حاوی رس، ماسه بادی و کود حیوانی (به نسبت 1:1:1) در گلخانه پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال و شمال‌غرب، واقع در تبریز کشت شد (جدول 1).

پوشش ژنومی بالا از پر اهمیت‌ترین نشانگرها در مطالعات ژنتیکی و نقشه‌یابی ژنتیکی هستند (Zhao *et al.*, 2007). همچنین نشانگرهای EST-SSR به دلیل قرارگیری در نواحی کدکننده ژن، توانایی در نشان دادن تکامل ژن‌های مرتبط به آن‌ها و محفوظ بودن نواحی جانبی‌شان در بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعات ژنی بسیار کارآمد هستند (Cai *et al.*, 2019).

اولین بار مکان‌یابی سیستماتیک صفات کمی (QTL mapping¹) در سال 1988 انجام پذیرفت (Paterson *et al.*, 1990). بعد از آن این روش در گیاهان برای بررسی ژن‌های دخیل در عملکرد و مقاومت به بیماری‌ها به صورت گسترده مورد استفاده قرار گرفت (Bernardo, 2008). در سال‌های اخیر روش مؤثرتری به نام تجزیه ارتباطی معرفی شده است، که نه تنها محل دقیق ژن‌ها و نواحی ژنی مرتبط با صفات کمی را مشخص می‌نماید، بلکه کمک می‌کند تا نواحی کروموزومی دیگری که در روش‌های پیشین قابل شناسایی نبودند، مشخص شود (Sun *et al.*, 2015; Abdurakhmonov *et al.*, 2008). در روش تجزیه ارتباطی از همبستگی بین فنوتیپ و ژنوتیپ در افراد غیر مرتبط استفاده می‌گردد و با افزایش اندازه جمعیت، تنوع ژنتیکی و فراوانی آلل جزئی می‌توان بر کیفیت این روش افزود. همچنین برای کم‌کردن خطای ارتباط کاذب بین نشانگر و صفت زراعی، می‌توان تجزیه‌های مرتبط با ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها را وارد مدل نمود (Yu, 2013). روش‌های مدل خطی عمومی (GLM)² و مدل خطی مخلوط (MLM)³ برای تجزیه ارتباطی پیشنهاد شده است. در مدل خطی عمومی به منظور کاهش خطای مثبت کاذب، ماتریس ساختار جمعیت را وارد مدل می‌کنند. در مدل خطی مخلوط علاوه بر ماتریس ساختار جمعیت،

1. Quantitative Trait Loci mapping
2. General Linear Model
3. Mixed Linear Model

جدول 1. نام و خصوصیات جمعیت‌های فسیکوی پابلند (*Festuca arundinacea*) مورد بررسی در پژوهش حاضر

| شماره جمعیت | اسم/اکد جمعیت | خصوصیت | منشا | شماره جمعیت | اسم/اکد جمعیت | خصوصیت | منشأ |
|-------------|---------------|----------------|-----------------------|-------------|--------------------|----------------|-------------------|
| 1 | 6000/68-1 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 46 | 6000/39-3 | زودرس/علوفه‌ای | کاشان-اصفهان |
| 2 | 4000/247-1 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 47 | RCAT041815-3 | زودرس/علوفه‌ای | Sarkad-مجارستان |
| 3 | 6000/9-1 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 48 | 6000/39-4 | زودرس/علوفه‌ای | یزدآباد-کاشان |
| 4 | 4000/44 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 49 | 6000/11-2 | زودرس/علوفه‌ای | اصفهان |
| 5 | 4000/247-2 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 50 | RCAT041877 | زودرس/علوفه‌ای | Csesznek-مجارستان |
| 6 | 6000/68-2 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 51 | 6000/9 Fozveh | علوفه‌ای | فوزوه-اصفهان |
| 7 | 12000/31 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 52 | Yazdabad | علوفه‌ای | کاشان-اصفهان |
| 8 | 1000/52 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 53 | Poshtkoh | علوفه‌ای | پشتکوه-اصفهان |
| 9 | 6000/11-1 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 54 | Abyaneh 4+ | علوفه‌ای | ایبانه-اصفهان |
| 10 | 6000/L12-1 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 55 | 6000/67 Borojen | علوفه‌ای | لرستان |
| 11 | 6000/38 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 56 | Honjan 2+ | علوفه‌ای | اصفهان |
| 12 | 6000/9-2 | دیررس/علوفه‌ای | مبارکه-اصفهان | 57 | 6000/65 | علوفه‌ای | هونجان-اصفهان |
| 13 | 6000/39-1 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 58 | Kentacky 31 | علوفه‌ای | امریکا |
| 14 | 6000/38-2 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 59 | Kamyaran Kordestan | علوفه‌ای | کامیاران-کردستان |
| 15 | 6000/30 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 60 | Thorough bred | علوفه‌ای | امریکا |
| 16 | 6000/9-3 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 61 | Azərbayjan5 | علوفه‌ای | جمهوری آذربایجان |
| 17 | 6000/G6 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 62 | Azərbayjan6 | علوفه‌ای | جمهوری آذربایجان |
| 18 | 6000/L12-2 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 63 | Azərbayjan2 | علوفه‌ای | جمهوری آذربایجان |
| 19 | 6000/8 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 64 | Honjan 3+ | علوفه‌ای | هونجان-اصفهان |
| 20 | 6000/68-3 | دیررس/علوفه‌ای | اصفهان | 65 | Fawn | علوفه‌ای | امریکا |
| 21 | 6000/112-1 | دیررس/علوفه‌ای | داران-اصفهان | 66 | Fariman 83D+ | چمنی | فریمان-کردستان |
| 22 | 6000/39-2 | دیررس/علوفه‌ای | یزدآباد-کاشان | 67 | Arid | چمنی | امریکا |
| 23 | 6000/112-2 | دیررس/علوفه‌ای | داران-اصفهان | 68 | Bartes | چمنی | امریکا |
| 24 | RCAT064767 | دیررس/علوفه‌ای | Pacin-مجارستان | 69 | Fariman 83C+ | چمنی | فریمان-کردستان |
| 25 | 6000/112-3 | دیررس/علوفه‌ای | داران-اصفهان | 70 | Pcer | چمنی | امریکا |
| 26 | 6000/119-1 | زودرس/علوفه‌ای | فریدونشهر-اصفهان | 71 | Meltra | چمنی | انگلستان |
| 27 | RCAT064769-1 | زودرس/علوفه‌ای | Taktabaj-مجارستان | 72 | Azərbayjan7 | چمنی | جمهوری آذربایجان |
| 28 | 6000/68-4 | زودرس/علوفه‌ای | اصفهان | 73 | Fariman 83B+ | چمنی | فریمان-کردستان |
| 29 | RCAT042281-1 | زودرس/علوفه‌ای | PakoZd-مجارستان | 74 | Rebel-Ch22 | چمنی | امریکا |
| 30 | 6000/119-2 | زودرس/علوفه‌ای | فریدونشهر-اصفهان | 75 | Mesa | چمنی | سوئیس |
| 31 | RCAT064772 | زودرس/علوفه‌ای | Tyukod-مجارستان | 76 | Bonsai | چمنی | امریکا |
| 32 | RCAT064769-2 | زودرس/علوفه‌ای | Taktabaj-مجارستان | 77 | Era | چمنی | امریکا |
| 33 | 6000/L12-3 | زودرس/علوفه‌ای | مبارکه-اصفهان | 78 | Austin | چمنی | امریکا |
| 34 | RCAT041849 | زودرس/علوفه‌ای | Szeleveny-مجارستان | 79 | Tirbute | چمنی | امریکا |
| 35 | RCAT040739 | زودرس/علوفه‌ای | Ibafa-مجارستان | 80 | Olympic | چمنی | دانمارک |
| 36 | 6000/L12-3 | زودرس/علوفه‌ای | مبارکه-اصفهان | 81 | Sakini | چمنی | امریکا |
| 37 | 6000/119-3 | زودرس/علوفه‌ای | فریدونشهر-اصفهان | 82 | Mini Mustang | چمنی | امریکا |
| 38 | RCAT041815-1 | زودرس/علوفه‌ای | Sarkad-مجارستان | 83 | Fiesta2 | چمنی | امریکا |
| 39 | 6000/L12-5 | زودرس/علوفه‌ای | مبارکه-اصفهان | 84 | Ho-sh | چمنی | امریکا |
| 40 | RCAT041815-2 | زودرس/علوفه‌ای | Sarkad-مجارستان | 85 | Rebel,JR | چمنی | امریکا |
| 41 | RCAT042281-2 | زودرس/علوفه‌ای | PakoZd-مجارستان | 86 | Melba | چمنی | امریکا |
| 42 | 6000/L12-6 | زودرس/علوفه‌ای | مبارکه-اصفهان | 87 | Fariman 83A+ | چمنی | فریمان-کردستان |
| 43 | RCAT042279 | زودرس/علوفه‌ای | KecskeT-solt-مجارستان | 88 | Rebel, USA | چمنی | امریکا |
| 44 | 6000/L6 | زودرس/علوفه‌ای | سمیرم-اصفهان | 89 | Lafalla | چمنی | امریکا |
| 45 | RCAT042281-3 | زودرس/علوفه‌ای | PakoZd-مجارستان | 90 | Rebel-Ch10 | چمنی | امریکا |



شکل 1. مزرعه فسکیوی پابلند. الف) مزرعه در سال اول (سال استقرار)؛ ب) مزرعه در سال دوم و اندازه‌گیری صفات (ارزیابی فنوتیپی)

ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)، تعداد ساقه، طول برگ (سانتی‌متر)، طول پدانکل (سانتی‌متر)، قطر یقه (میلی‌متر)، عملکرد دانه (گرم)، عملکرد علوفه خشک (گرم) و طول خوشه (سانتی‌متر) اندازه‌گیری و ثبت شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با نشانگرهای ISSR و EST-SSR

از تمامی 30 بوته یک جمعیت به صورت مخلوط نمونه برگ برداشت شد و استخراج DNA به روش CTAB¹ انجام گرفت (Sun *et al.*, 2015). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (NanoDrop One C Thermo, USA) و همچنین الکتروفورس ژل آگارز (1 درصد) تعیین شد (Fu *et al.*, 2016; Amini *et al.*, 2011). برای این مطالعه تعداد 39 نشانگر ISSR با میزان چندشکلی بالا براساس مقالات مختلف در نظر گرفته شد (جدول 4).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR)² با استفاده از دستگاه ترموسایکلر TECHNE TC-512 (Termo, USA) انجام شد. برای حصول تکثیر

گیاهان شش ماه در گلخانه با دمای 25 درجه سانتیگراد، 14 ساعت نور و 10 ساعت تاریکی و رطوبت 15 درصد نگهداری شدند و در طول این مدت هر هفته هرس انجام گرفت تا این که بوته‌ها به تعداد پنجه کافی (در حدود 10 پنجه) برای کشت در مزرعه رسیدند. زمین اصلی واقع در باسمنج تبریز پس از انجام شخم، هموار نمودن و کوددهی برای کشت گیاهان آماده شدند. کود ازته به میزان 150 کیلوگرم در هکتار و فسفات به میزان 50 کیلوگرم در هکتار، شش ماه قبل از کاشت به وسیله دیسک به خاک اضافه شد. گیاهان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه کشت شدند. در هر ردیف گیاهان با فاصله 30 سانتی‌متر از هم کشت شدند (شکل 1). فاصله بین ردیف‌ها، فاصله ردیف‌ها از طرفین و فاصله تکرارها از هم یک متر در نظر گرفته شد. در ضمن آبیاری به صورت قطره‌ای و هر روز انجام گرفت. بعد از سال استقرار، در سال دوم کوددهی قبل از شروع فصل رشد (بهار و تابستان)، با 90 کیلوگرم در هکتار کود ازته و 35 کیلوگرم در هکتار کود فسفات انجام شد.

در سال دوم بعد از کاشت، صفات تاریخ گرده‌افشانی (روز تا گرده‌افشانی)، تاریخ گلدهی (روز تا گلدهی)،

1. Cetyl trimethylammonium bromide

2. Polymerase Chain Reaction

چرخه 0/5 درجه سانتی‌گراد کم می‌شد (مرحله 3) + 19 سیکل (50 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد + 50 ثانیه در دمای 60 درجه سانتی‌گراد + 10 ثانیه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد (مرحله 4) + 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد (مرحله 5) (Fu *et al.*, 2016). پس از اتمام PCR، محصول حاصل روی ژل الکتروفورز عمودی (اکریل آمید 8 درصد) بارگزاری شد. سپس ژل حاصل با اتیدیوم بروماید (5 میکرولیتر در 100 سی‌سی) رنگ‌آمیزی شد و پس از عکسبرداری با ژل داک (Biometra, USA)، امتیازبندی به صورت هم بارز انجام گرفت.

تجزیه تحلیل داده‌ها

بعد از بررسی مفروضات تجزیه واریانس شامل توزیع نرمال اشتباهات آزمایشی، تجزیه واریانس صفات در قالب مدل آماری طرح بلوک‌های کامل تصادفی با مدل خطی عمومی (GLM) در نرم‌افزار SPSS² نسخه 26 انجام شد. مقایسه میانگین صفات در سطح احتمال 0/01 با استفاده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD³) انجام گرفت. گروه‌بندی جمعیت‌ها براساس داده‌های زراعی با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در نرم‌افزار MINITAB نسخه 16/2 انجام گرفت (Jemes, 1992). قبل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ابتدا به منظور تشخیص مناسب بودن داده‌ها برای تجزیه، از دو شاخص KMO (کایزر-میر-اولکین) و آزمون کرویت بارلت استفاده شد. مقدار KMO بزرگ‌تر از 0/7 و آزمون کرویت بارلت معنی‌دار، نشان‌دهنده وجود همبستگی بین متغیرها بود. بنابراین داده‌ها برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مناسب بودند. همچنین، برای تعیین اعتبار داده‌ها برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌ها به دو گروه تصادفی تقسیم شده و برای هر گروه به صورت جداگانه تجزیه به مؤلفه‌های

مناسب و حذف تکثیرهای غیر هدف از شیب دمایی، شیب MgCl₂ و برنامه Touch down PCR در چند نمونه تصادفی استفاده شد. سپس با توجه به این شرایط مناسب‌ترین برنامه PCR و ترکیب مواد انتخاب شد. برنامه ترموسایکلر برای هر آغازگر شامل 5 دقیقه دمای واسرشته‌سازی اولیه (95 درجه سانتی‌گراد)، 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 ثانیه (دمای واسرشته‌سازی ثانویه)، دمای اتصال¹ مختص هر آغازگر به مدت 60 ثانیه، یک دقیقه دمای 72 درجه سانتی‌گراد (دمای گسترش اولیه) و در آخر 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه برای گسترش نهایی بود. محصولات واکنش روی ژل آگارز 1/2 درصد بارگزاری شد و سپس ژل حاصل با اتیدیوم بروماید 7 درصد رنگ‌آمیزی شد و پس از عکسبرداری با ژل داک (Biometra, USA)، امتیازبندی به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) انجام شد.

همچنین با بررسی مقالات چاپ‌شده روی فسکیوی و خانواده گرس‌ها تعداد 10 نشانگر EST-SSR با بالاترین میزان چندشکلی انتخاب شد (Fu *et al.*, 2016). برای حصول تکثیر مناسب و حذف تکثیرهای غیر هدف همچون نشانگر قبلی از شیب دمایی، شیب MgCl₂ و برنامه Touch down PCR در چند نمونه تصادفی استفاده شد. سپس با توجه به این شرایط مناسب‌ترین برنامه PCR و ترکیب مواد انتخاب شد. برنامه ترموسایکلر به صورت زیر بود: 5 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد (مرحله 1) + یک سیکل (30 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد + 50 ثانیه در دمای 68 درجه سانتی‌گراد + 60 ثانیه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد) (مرحله 2) + 16 سیکل که در آن، همان برنامه مرحله 2 اعمال شد؛ منتها از دمای اتصال در هر

2. Statistical Package for the Social Sciences
3. Least Significant Difference

1. Annealing temperature

جمعیت و خویشاوندی به‌عنوان کواریت) انجام گرفت (Pritchard *et al.*, 2000).

نتایج و بحث

بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از صفات زراعی تجزیه واریانس نشان داد که در رابطه با تمامی صفات مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری بین جمعیت‌های فسکیوی پابلند وجود دارد. همچنین تفاوت بین بلوک‌ها در کلیه صفات به غیر از وزن خشک علوفه و طول برگ در سطح احتمال 0/05 معنی‌دار بود (جدول 2). براساس آماره‌های توصیفی صفاتی مانند روز تا گلدهی، روز تا گرده‌افشانی، ارتفاع بوته و تعداد ساقه دارای بالاترین دامنه تغییرات بودند. دامنه تغییرات در تاریخ گرده‌افشانی از 42/22 تا 79/54 با میانگین 73/24 بود. دامنه تغییرات ارتفاع بوته از 92/89 و 143/33 سانتی‌متر با میانگین 124/71 سانتی‌متر بود. دامنه تغییرات عملکرد بین 10-61/89 با میانگین 31/63 بود. برای آگاهی از نحوه پراکندگی و مقایسه میزان تغییرات صفات باهم، ضریب تغییرات هر یک از صفات در درون هر یک از جمعیت‌ها، در مجموعه جمعیت‌های علوفه‌ای، در مجموعه جمعیت‌های چمنی و در مجموعه 90 جمعیت مورد مطالعه محاسبه شد. بیشترین ضریب تغییرات با در نظر گرفتن مجموعه 90 جمعیت مورد مطالعه در ارتفاع بوته به میزان 16/45 مشاهده شد و در مرتبه بعدی تاریخ گرده‌افشانی با میزان 15/27 قرار داشت (جدول 3). کمترین میزان ضریب تغییرات در عملکرد دانه به میزان 3/14 مشاهده شد (جدول 3). بیشترین میزان ضریب تغییرات در مجموعه جمعیت‌های علوفه‌ای در صفت روز تا گرده‌افشانی (18/60) و کمترین در صفت قطر یقه (9/25) مشاهده شد. در حالی که بیشترین میزان ضریب تغییرات در مجموعه جمعیت‌های علوفه‌ای در صفت عملکرد علوفه (10/88) و کمترین آن در صفت قطر تاجپوش (3/11) مشاهده شد (جدول 3).

اصلی انجام شد. از آنجایی که نتایج گروه‌بندی براساس داده‌های دو گروه یکسان بود نتیجه‌گیری شد که تغییر افراد روی نتایج تجزیه به مؤلفه‌ها تأثیر نداشته و برای داده‌ها به طور کلی می‌توان تجزیه به مؤلفه‌ها را انجام داد. برای برآورد آماره‌های مربوط به تنوع ژنتیکی براساس نشانگرهای مولکولی از نرم‌افزار GenAlex نسخه 6/5 استفاده شد (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000). میزان محتوی چندشکلی با فرمول $PIC = (1 - \sum P_i) \times 2$ و شاخص شانون با فرمول $H' = - \sum P_i \ln(P_i)$ توسط نرم‌افزار GenAlex 6.5 محاسبه شد (Avval *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2018). تجزیه ساختار جمعیت بر پایه روش بی‌زی با استفاده از نرم‌افزار Structure 2.3.3 انجام گرفت. برای این منظور، مقادیر زیرجمعیت فرضی اولیه (K) بین 1 تا 10 در نظر گرفته شد و برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها برای افزایش دقت، 10 تکرار لحاظ شد (Buckler *et al.*, 2014). برای حصول منحنی حداکثر درست‌نمایی از مدل Admixture و استقلال فراوانی آلی با 100000 تکرار آزمایش (Burn-in) و 100000 تکرار MCMC استفاده شد (Evanno *et al.*, 2005). نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (زیر جمعیت‌ها) یک ماتریس به نام Qst را محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیر جمعیت‌ها است. گروه‌بندی جمعیت‌ها براساس داده‌های مولکولی براساس تشابه ژنتیکی جمعیت‌ها با استفاده از روش UPGMA در نرم‌افزار DARwin³ نسخه 5 نیز انجام گرفت. تجزیه ارتباطی صفات با استفاده از نرم‌افزار TASSEL نسخه 3/5 به دو روش GLM (در نظر گرفتن ماتریس ساختار جمعیت به‌عنوان کواریت) و MLM (در نظر گرفتن هر دو ماتریس ساختار

1. Markov Chain Monte Carlo
2. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
3. Dissimilarity Analysis and Representation for Windows

جدول 2. تجزیه واریانس صفات زراعی در جمعیت‌های مختلف فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*)

| منابع تغییرات | df | میانگین مربعات | | | | | | | | | |
|---------------|-----|----------------|-------------------|-------------|-----------------------|-----------|---------------|-----------------------|-----------|------------|----------|
| | | تاریخ گل‌دهی | تاریخ گرده افشانی | ارتفاع بوته | تعداد ساقه طول پدانکل | قطر یقه | وزن خشک علوفه | وزن دانه | طول برگ | قطر تاجپوش | |
| جمعیت | 89 | 374.908* | 30.329* | 1386.928* | 60.423* | 2931.377* | 739.734* | 2014.293* | 174.5575* | 397.502* | 150.960* |
| تکرار | 2 | 1271.786* | 125.813* | 2234.851* | 132.559* | 5076.938* | 610.37* | 196.112 ^{ns} | 252.2552* | 2151.602* | 102.131* |
| خطا | 178 | 27.219 | 6.337 | 239.456 | 24.456 | 400.562 | 23.088 | 160.211 | 109.928 | 56.332 | 83.089 |

* معنی دار در سطح احتمال 0/05، ns: عدم تفاوت معنی دار.

جدول 3. آماره‌های توصیفی برای صفات زراعی و عملکردی در جمعیت‌های فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*)

| صفات مورد بررسی | دامنه تغییرات (Rang) | میانگین (Mean) | ضریب تغییرات (CV) صفت X در مجموعه 90 جمعیت مورد مطالعه | دامنه ضریب تغییرات صفت X در درون جمعیت‌ها | ضریب تغییرات در مجموعه جمعیت‌های علوفه‌ای | ضریب تغییرات در مجموعه جمعیت‌های چمنی |
|--------------------------|----------------------|----------------|--|---|---|---------------------------------------|
| روز تا گلدهی (روز) | 63.33-40 | 52.21 | 13.5 | 5.76-17.5 | 13.75 | 4.32 |
| روز تا گرده افشانی (روز) | 79.54-42.22 | 73.24 | 15.27 | 6.71-21.36 | 18.60 | 5.35 |
| ارتفاع بوته (سانتی متر) | 143.33-92.89 | 124.71 | 16.45 | 7.24-21.31 | 16.72 | 4.89 |
| طول پدانکل (سانتی متر) | 33.28-15.11 | 21.57 | 11.70 | 8.24-19.32 | 12.45 | 9.91 |
| تعداد ساقه | 175.50-166.90 | 171.5 | 13.81 | 8.25-18.30 | 14.89 | 6.39 |
| قطر تاجپوش (سانتی متر) | 55.78-31.89 | 43.61 | 8.92 | 1.39-11.39 | 10.31 | 3.11 |
| قطر یقه (میلی متر) | 34.39-24.16 | 26.11 | 10.14 | 2.37-12.5 | 9.25 | 3.79 |
| طول برگ (سانتی متر) | 45-17.44 | 35.14 | 7.15 | 7.16-17.22 | 13.5 | 10.28 |
| عملکرد دانه (گرم) | 61.89-10 | 31.63 | 3.14 | 4.71-11.75 | 9.68 | 6.39 |
| عملکرد علوفه (گرم) | 365-70.5 | 175 | 11.5 | 6.35-16.63 | 12.48 | 10.88 |

CV: Coefficient of variation

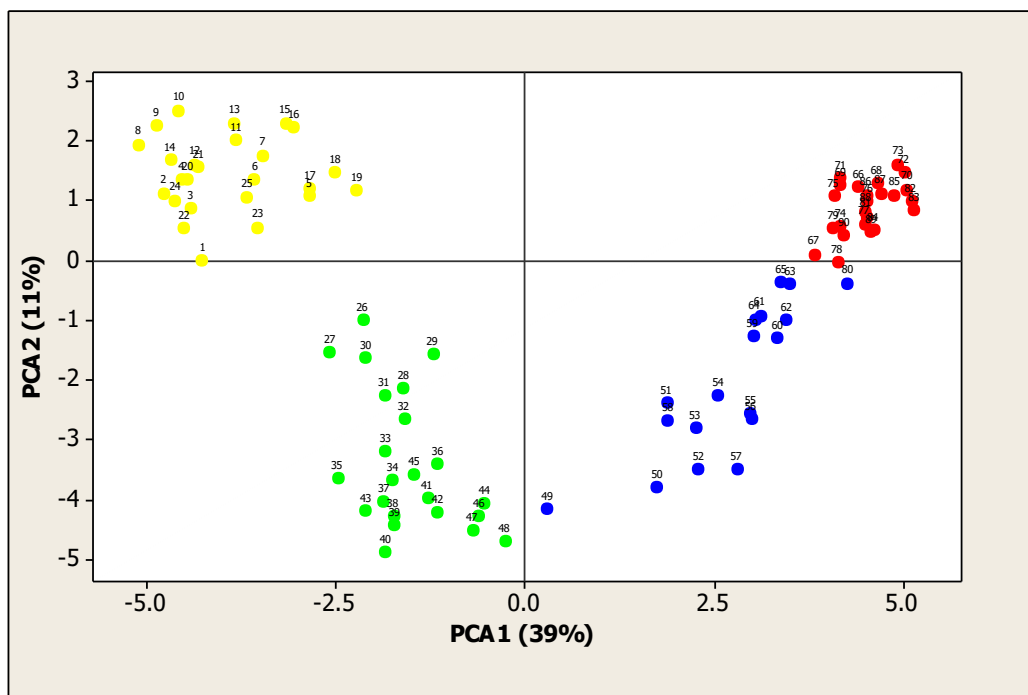
برای نمونه، الگوی پلی مورفیسم افراد با آغازگر NFA012 در شکل 3 نشان داده شده است. تعداد آلل برای مکان‌های نشانگرهای مورد مطالعه بین 4 تا 13 و با میانگین 9/2 بود. اندازه باندهای تکثیر شده بین 50 تا 700 جفت باز بود. آغازگرهای NFA012، NFA037، NFA040، NFA065، NFA071 و NFA113 صد درصد چند شکلی نشان دادند درحالی‌که آغازگرهای NFA108، NFA138 و NFA140 کمترین میزان چند شکلی؛ کمتر از یا برابر با 75 درصد نشان دادند (جدول 4 و شکل 3). در کل 90/6 درصد مکان‌ها چند شکلی نشان دادند.

تعداد آلل مؤثر در دامنه 1/392 تا 1/901 به ترتیب برای آغازگرهای NFA012 و NFA140 مشاهده شد. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC)¹ بین 0/228 در مکان NFA071 تا 0/961 در مکان NFA012 متغیر بود که این شاخص می‌تواند اختلاف ایجاد شده بوسیله آغازگرها در بین جمعیت‌ها را با تعداد آلل‌ها و فراوانی آن‌ها نشان دهد.

در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، دو مؤلفه اصلی اول 50 درصد واریانس اصلی را توجیه نمودند که در این میان مؤلفه اصلی اول (PCA1) 39 درصد و مؤلفه اصلی دوم (PCA2) 11 درصد واریانس کل را توجیه کردند (شکل 2). نمودار دو وجهی براساس مؤلفه‌های اصلی اول و دوم حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از تمامی صفات زراعی اندازه‌گیری شده به وضوح نود جمعیت فسکیوی پابلند را در دو مختصات جدا که نشان‌دهنده گروه‌های اصلی و چهار منطقه جداگانه که نشان‌دهنده زیرگروه‌های متفاوت فسکیوی پابلند می‌باشد، تقسیم‌بندی نمود (شکل 2). درست است میزان درصد تغییرات توجیه شده توسط دو مؤلفه اول و دوم نسبتاً پایین است؛ اما این مقدار درصد تغییرات برای تفکیک ژنوتیپ‌ها نسبتاً کافی بوده است و نتایج تجزیه به مؤلفه‌های انطباق نسبتاً خوبی با گروه-بندی ژنوتیپ‌ها از نظر ویژگی زراعی داشت.

بررسی تنوع ژنتیکی با استفاد از نشانگرهای مولکولی ISSR و EST-SSR

با استفاده از 10 جفت آغازگر EST-SSR حدود 92 آلل در 90 جمعیت فسکیوی پابلند شناسایی شد.



شکل 2. تجزیه به مؤلفه اصلی براساس صفات زراعی در نود جمعیت فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*)

پابلند با استفاده از 39 آغازگر ISSR، 387 باند قابل نمره‌دهی شناسایی شد که از میان آن‌ها 335 باند یا به عبارتی 86/6 درصد باندهای تولیدشده پلی‌مورفیک بودند. برای نمونه، الگوی پلی‌مورفیک افراد با آغازگر ISSR32 در شکل 3 نشان داده شده است. تعداد نشانگرهای شناسایی شده برای آغازگرها بین 6 تا 14 و با میانگین 9/92 نشانگر بود (جدول 4). میانگین تعداد نشانگر پلی‌مورفیک برای هر آغازگر حدود 8/6 بود. درصد نشانگرهای پلی‌مورفیک بین 50 برای نشانگر ISSR14 تا 100 برای نشانگرهای ISSR10، ISSR4، ISSR1، ISSR20، ISSR18، ISSR17، ISSR16، ISSR26، ISSR27، ISSR28 و ISSR32 بود. میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار (He)، شاخص اطلاعات شانون (I) و تعداد آل مؤثر (Ne) برای هر یک از 39 نشانگر ISSR در جدول 4 آمده است. کمترین تعداد آل مؤثر به میزان 1/16 در ISSR39 و بیشترین در ISSR32 به میزان 2/1 مشاهده شد. دامنه شاخص اطلاعات شانون (I) از 0/120

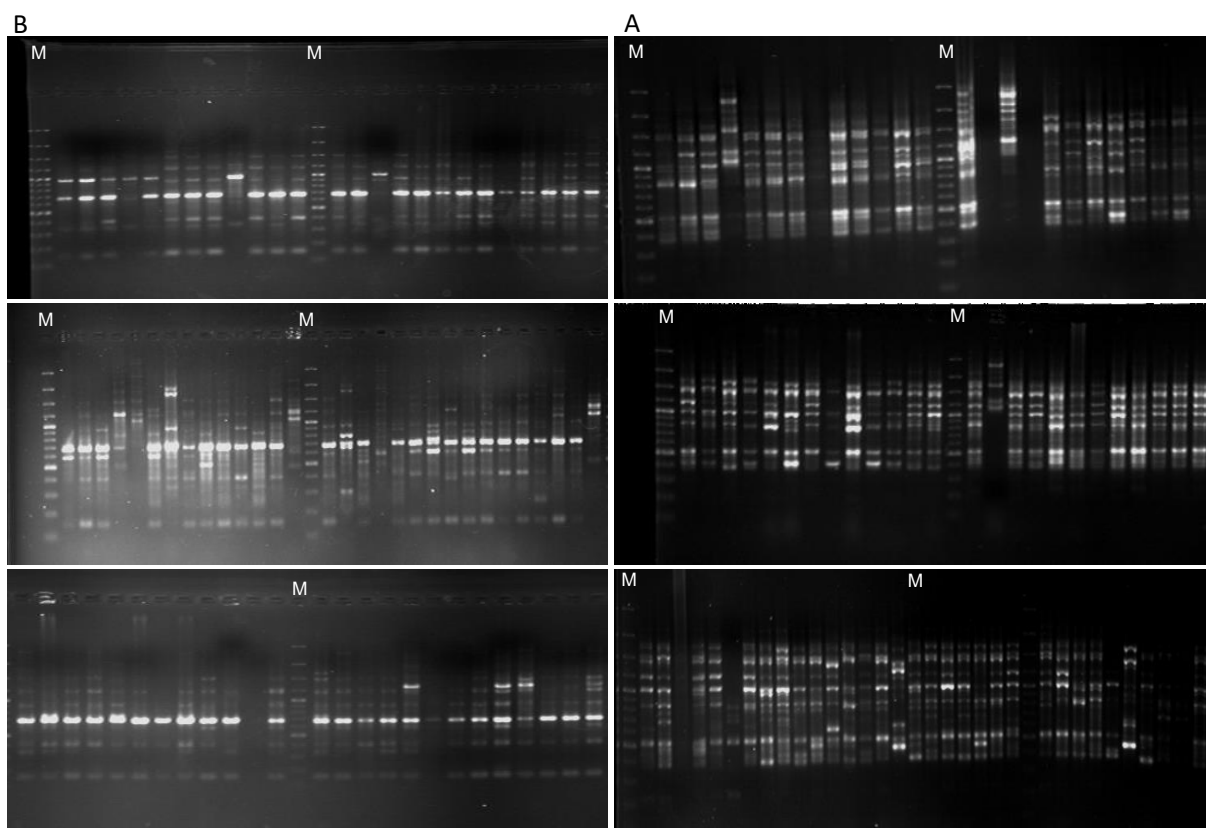
فرمول‌های مختلفی برای محاسبه میزان PIC نشانگرها ارایه شده است و برخی نرم‌افزارها مقدار آن را مابین صفر تا 0/5 و برخی نرم‌افزارها آن را مابین صفر تا یک محاسبه می‌کنند. در این مطالعه برای تعیین مقادیر PIC از نرم‌افزار GenAlex استفاده شد که این نرم‌افزار براساس فرمولی که در راهنمای این نرم‌افزار آمده مقدار PIC را مابین صفر تا یک محاسبه می‌کند (Pagnotta, 2018). البته مشابه نتایج ما، در گزارشات (Avval *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2018) نیز عدد PIC بیش از 0/5 می‌باشد. میزان شاخص شانون برای 90 جمعیت مورد بررسی از 0/395 (NFA108) تا 0/538 (NFA103) با میانگین 0/460 بود. بررسی میزان هتروزیگوتی در بین مکان‌های EST-SSR مورد مطالعه نشان داد که کمترین مقدار میزان این شاخص در آغازگر NFA140 به میزان 0/228 و بیشترین آن مربوط به آغازگر NFA012 و برابر 0/368 بود. در تکثیر DNA ژنومی 90 جمعیت فسکیوی

در گروه اول (I) قرار گرفتند که شامل دو زیر گروه متفاوت بودند. درحالی که تمامی جمعیت چمنی همگی در گروه دوم (II) با دو زیر شاخه قرار گرفتند (شکل 4).

تجزیه ساختار جمعیت براساس تمامی نشانگرهای مورد مطالعه نشان داد که 90 جمعیت فسکیوی پابلند در $K=2$ به دو گروه (رنگ سبز و قرمز) تقسیم بندی شد. اولین گروه (رنگ سبز) شامل جمعیت های علوفه ای زودرس و دیررس و گروه دوم (رنگ قرمز) شامل جمعیت های چمنی بود. کلاستر بندی مبتنی بر روش Bayesian مطابق با خوشه بندی براساس UPGMA بود. الگوریتم مربوط به نرم افزار Structure براساس فاصله ژنتیکی تمامی افراد را به راحتی از یکدیگر جدا می کند پس می تواند یک ابزار قوی تری نسبت به سایر آنالیزهای جمعیت برای گروه بندی باشد (شکل 5).

(ISSR13) تا 1/216 (ISSR36) متغیر بود. نشانگر ISSR26 دارای بیشترین میزان PIC به میزان 1/10 بود، درحالی که کمترین محتوی اطلاعات پلی مورفیک (PIC) در آغازگر ISSR33 به میزان 0/398 مشاهده شد. کمترین هتروزیگوتی مورد انتظار مربوط به ISSR13 به میزان 0/120 و بیشترین آن برابر 1/465 در آغازگر ISSR35 مشاهده شد. میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار در بین 39 نشانگر برابر 0/4407 برآورد شد (جدول 4).

طبقه بندی جمعیت ها براساس مجموع کل نشانگرهای مورد استفاده در این مطالعه (-EST- SSR و ISSR) با استفاده از ضریب شباهت جاکارد و روش UPGMA انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که همه جمعیت ها در دو گروه کلی دسته بندی شدند (شکل 4). جمعیت های دیررس و زودرس علوفه ای



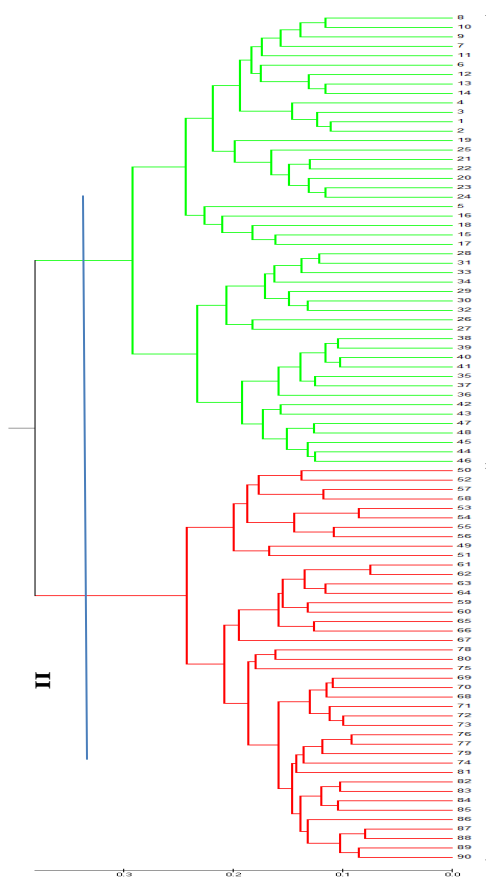
شکل 3. نتیجه PCR و الکتروفورز روی DNA افراد 1 تا 90 در جمعیت های فسکیوی تحت بررسی. A: ژل های مربوط به PCR با آغازگر ISSR32. B: ژل های مربوط به PCR با آغازگر NFA012. M: نردبان DNA (به عنوان استاندارد وزن مولکولی یا خط کش مولکولی) 100 کیلو باز.

جدول 4. نام، توالی و شاخص‌های برآورد تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*) با استفاده از

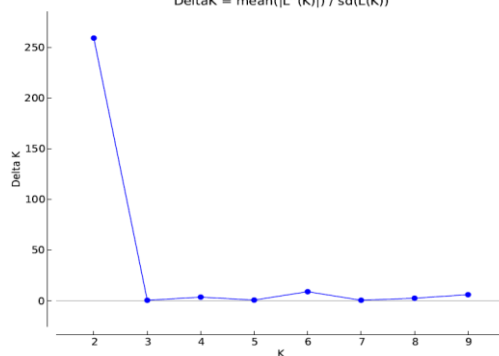
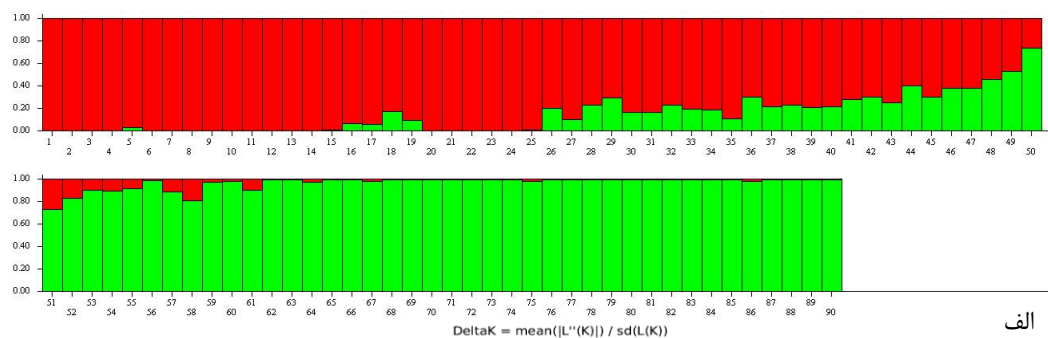
نشانگرهای ISSR و EST-SSR

| نام نشانگر | نوع نشانگر | توالی نشانگر | دمای ذوب (Tm, °C) | تعداد کل مکان | تعداد مکان‌های چند شکلی | درصد باندهای چند شکل (PPB) | محتوی چندشکلی اطلاعات (PIC) | هتروزیگوتی مورد انتظار (He) | تعداد آلل مؤثر (Ne) | شاخص شانون (I) |
|------------|------------|---|-------------------|---------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|----------------|
| NFA012 | EST-SSR | 5'TTGCCAGGAAATTTGCTCT3' 3'ATGGTATTGGCAGCAAGAGG5' | 60 | 12 | 12 | 100 | 0.961 | 0.368 | 1.901 | 0.432 |
| NFA037 | EST-SSR | 5'GCATCGACCTACCCTGACTA3' 3'GTGTCCTGGCGATCTTG5' | 62 | 12 | 12 | 100 | 0.841 | 0.361 | 1.630 | 0.601 |
| NFA040 | EST-SSR | 5'TCATTGTGTTTCGCTCTCCTG3' 3'CCTTCTTTGTCGCCATGGTA5' | 60 | 13 | 13 | 100 | 0.615 | 0.290 | 1.487 | 0.445 |
| NFA065 | EST-SSR | 5'GGATGGATCCTCACAATGCT3' 3'CTCCTCTCTCTCCAGCTC5' | 64 | 9 | 9 | 100 | 0.824 | 0.271 | 1.457 | 0.408 |
| NFA071 | EST-SSR | 5'TCCTAAGCAGAGCTCGATCC3' 3'GAGGTTGGCGAACTTCTCT5' | 62 | 7 | 7 | 100 | 0.228 | 0.344 | 1.580 | 0.520 |
| NFA103 | EST-SSR | 5'GCAAGACATCATAGCTGTCG3' 3'CTCGTACCGCCCCACAAG5' | 62 | 11 | 9 | 81 | 0.615 | 0.291 | 1.528 | 0.538 |
| NFA108 | EST-SSR | 5'ATCAAACCTGAGAAGCAAAAC3' 3'GTTCCGTCGCGTACATTCT5' | 59 | 8 | 6 | 75 | 0.518 | 0.269 | 1.460 | 0.395 |
| NFA113 | EST-SSR | 5'CTCGAAGTAGGCGGAGATGAC3' 3'AGTACGAGGAGGGGATGGAGAT5' | 64 | 4 | 4 | 100 | 0.753 | 0.329 | 1.551 | 0.505 |
| NFA138 | EST-SSR | 5'GCCTTGAGAAGAATATCCACA3' 3'CAGTGGGGAATTGCAGATAGAT5' | 61 | 12 | 9 | 75 | 0.488 | 0.271 | 1.460 | 0.408 |
| NFA140 | EST-SSR | 5'CTCACAAGCATCAACCAAGTC3' 3'GGAGTACCAGCAGTACCAGGAC5' | 61 | 4 | 3 | 75 | 0.416 | 0.228 | 1.392 | 0.453 |
| ISSR1 | ISSR | CACACACACACACACARG | 52 | 11 | 11 | 100 | 0.831 | 0.290 | 1.550 | 0.411 |
| ISSR2 | ISSR | GAGAGAGAGAGAG8AGAYT | 52 | 11 | 9 | 81 | 0.416 | 0.220 | 1.380 | 0.333 |
| ISSR3 | ISSR | GAGAGAGAGAGAGA13GAYG | 52 | 9 | 6 | 66 | 0.641 | 0.159 | 1.294 | 0.245 |
| ISSR4 | ISSR | AGAGAGAGAGAGAGA9GYC | 52 | 8 | 8 | 100 | 0.91 | 0.391 | 1.763 | 0.556 |
| ISSR5 | ISSR | AGAGAGAGAGAGAG13T | 52 | 11 | 7 | 61 | 0.611 | 0.316 | 1.285 | 0.556 |
| ISSR6 | ISSR | GAGAGAGAGAGAGAGAT | 52 | 8 | 8 | 100 | 0.516 | 0.358 | 1.628 | 0.520 |
| ISSR7 | ISSR | GAGAGAGAGAGAGAGAA | 52 | 12 | 11 | 92 | 0.722 | 0.392 | 1.740 | 0.557 |
| ISSR8 | ISSR | CCCGTGTGTGTGTGTGT | 52 | 8 | 7 | 87 | 0.453 | 0.357 | 1.628 | 0.520 |
| ISSR9 | ISSR | CACACACACACACAA | 52 | 13 | 12 | 92 | 0.513 | 0.387 | 1.679 | 0.550 |
| ISSR10 | ISSR | GTGTGTGTGTGTGTGT | 52 | 9 | 9 | 100 | 0.844 | 0.455 | 1.828 | 0.646 |
| ISSR11 | ISSR | TCTCTCTCTCTCTCTCC | 52 | 13 | 7 | 54 | 0.556 | 0.220 | 1.375 | 0.333 |
| ISSR12 | ISSR | AGAGAGAGAGAGAGGCC | 52 | 11 | 4 | 36 | 0.674 | 0.238 | 1.408 | 0.352 |
| ISSR13 | ISSR | AGAGAGAGAGAGAGAGYA | 52 | 10 | 5 | 50 | 0.611 | 0.120 | 1.192 | 0.186 |
| ISSR14 | ISSR | AGAGAGAGAGAGAGAGYA | 52 | 8 | 4 | 50 | 0.913 | 0.355 | 1.618 | 0.519 |
| ISSR15 | ISSR | ACACACACACACACACYT | 52 | 13 | 8 | 61 | 0.843 | 0.309 | 1.60 | 0.437 |
| ISSR16 | ISSR | ACACACACACACACACYA | 52 | 9 | 9 | 100 | 1.02 | 0.275 | 1.534 | 0.389 |
| ISSR17 | ISSR | ACACACACACACACACYT | 52 | 13 | 13 | 100 | 0.415 | 0.369 | 1.915 | 0.517 |
| ISSR18 | ISSR | ACACACACACACACACYG | 52 | 8 | 8 | 100 | 0.568 | 0.243 | 1.360 | 0.324 |
| ISSR19 | ISSR | GGAGAGAGAGAGAGAGA | 52 | 13 | 12 | 92 | 0.642 | 0.304 | 1.538 | 0.445 |
| ISSR20 | ISSR | GAGAGAGAGAGAGAGARC | 52 | 12 | 12 | 100 | 0.591 | 0.296 | 1.621 | 0.365 |
| ISSR21 | ISSR | GGGGTGGGGTGGGGT | 52 | 11 | 10 | 91 | 0.712 | 0.155 | 1.277 | 0.224 |
| ISSR22 | ISSR | A10CACACACACACACGCT | 52 | 11 | 7 | 64 | 0.398 | 0.430 | 1.775 | 0.619 |
| ISSR23 | ISSR | ACACACACACACACAC | 52 | 10 | 8 | 80 | 0.415 | 0.332 | 1.604 | 0.480 |
| ISSR24 | ISSR | ACACACACACACACTG | 52 | 12 | 11 | 91 | 0.744 | 0.305 | 1.576 | 0.432 |
| ISSR25 | ISSR | TCCTCTCTCTCTCTCTG | 52 | 11 | 11 | 100 | 0.754 | 0.227 | 1.401 | 0.330 |
| ISSR26 | ISSR | ACACACACA12CACACACGT | 52 | 9 | 9 | 100 | 1.10 | 0.223 | 1.319 | 0.341 |
| ISSR27 | ISSR | AGAGAGAGAGAGAGATC | 52 | 11 | 11 | 100 | 0.415 | 0.327 | 1.591 | 0.375 |
| ISSR28 | ISSR | GAGAGAGAGAGAGAGGCC | 52 | 14 | 9 | 64 | 0.914 | 0.371 | 1.698 | 0.525 |
| ISSR29 | ISSR | ACTACGACTTGTGTGTGTGTG | 52 | 8 | 7 | 87 | 0.754 | 0.158 | 1.285 | 0.279 |
| ISSR30 | ISSR | ACTCGTACTAGAGAGAGAGAGA | 52 | 9 | 8 | 89 | 0.615 | 0.285 | 1.502 | 0.401 |
| ISSR31 | ISSR | CGTAGTCGTACACACACACA | 52 | 9 | 8 | 89 | 0.611 | 0.399 | 1.872 | 0.570 |
| ISSR32 | ISSR | AGT CGT AGT ACACACACACAC | 52 | 9 | 9 | 100 | 0.622 | 1.117 | 2.100 | 0.514 |
| ISSR33 | ISSR | GAGAGAGAGAGAGAGAGAC | 52 | 7 | 6 | 86 | 0.321 | 0.781 | 1.420 | 0.338 |
| ISSR34 | ISSR | CTCTCTCTCTCTCTCTG | 54 | 8 | 8 | 100 | 0.621 | 1.11 | 1.541 | 0.425 |
| ISSR35 | ISSR | CACCACCACCACCACCACCG | 54 | 12 | 8 | 66 | 0.415 | 1.465 | 1.735 | 0.595 |
| ISSR36 | ISSR | GTGGTGGTGGTGGTGGTGC | 56 | 12 | 8 | 67 | 0.356 | 1.216 | 1.570 | 0.470 |
| ISSR37 | ISSR | CACACACACACACACACAG | 56 | 8 | 7 | 87 | 0.415 | 0.411 | 1.279 | 0.327 |
| ISSR38 | ISSR | CACCACCACCACCACCACCT | 54 | 8 | 8 | 100 | 0.714 | 0.980 | 1.778 | 0.625 |
| ISSR39 | ISSR | GTCACCACCACCACCACCAC | 55 | 7 | 6 | 86 | 0.515 | 0.836 | 1.160 | 0.341 |

Tm: Temperature melting, PPB: Percentage of polymorphic bands, PIC: Polymorphism information content, He: Expected heterozygosity, Ne: Effective number of allele, I: Shannon diversity index. ISSR: Intersimple sequence repeat, EST-SSR: Expressed sequence tag-simple sequence repeats.



شکل 4. دسته‌بندی جمعیت‌های فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*) با استفاده از الگوریتم UPGMA و نشانگرهای ISSR و EST-SSR



ب

شکل 5. الف) بررسی ساختار جمعیت در بین جمعیت‌های فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*) با استفاده از نرم‌افزار Structure و نشانگر ISSR و EST-SSR، ب) نمودار دوطرفه برای تعیین تعداد زیر جمعیت‌ها در ژرم‌پلاسم فسکیوی پابلند مورد مطالعه ($K=2$) براساس نشانگرهای نشانگر ISSR و EST-SSR در نرم‌افزار Structure Harverter

تمتایز از هم بودند. همچنین مکان 237 در صفت عملکرد دانه با دو صفت تاریخ گلدهی و گرده‌افشانی مشترک بود. مکان 25 بین دو صفت تعداد ساقه و تاریخ گرده‌افشانی مشترک بود و بقیه مکان‌ها برای صفات مختلف متمایز از یکدیگر بودند (جدول 5). در تجزیه ارتباط با استفاده از روش MLM، تعداد 15 مکان برای هشت صفت مختلف در سطح احتمال 0/05 شناسایی شد که پس از تصحیح بونفرونی این تعداد به 2 مکان برای صفت تاریخ گرده‌افشانی (271 و 313) کاهش یافت (جدول 6). این دو مکان مرتبط با نشانگر ISSR28 و ISSR32 بود. پایین بودن تعداد مکان در MLM به دلیل وارد کردن فاکتور تصحیح روابط خویشاوندی در این روش است که احتمال ایجاد ارتباط دروغین بین مکان‌های ژنی و صفات را به شدت کاهش داده است.

تجزیه ارتباطی صفات زراعی با نشانگرهای ISSR و EST-SSR

در تجزیه ارتباطی با روش GLM، 156 مکان ژنی مرتبط با هفت صفت در سطح احتمال 0/05 شناسایی شد که پس از تصحیح بنفرونی تعداد به 46 مکان برای 5 صفت تقلیل یافت (جدول 5). میزان دامنه تغییرات فنوتیپی توجیه‌شده (R^2) توسط QTLها از 0/083 تا 0/208 متغیر بود که بیشترین تعداد مکان مربوط به صفات تاریخ گلدهی و تاریخ گرده‌افشانی با 20 مکان ژنی بود. کمترین تعداد مکان برای صفت طول پدانکل (1 مکان) شناسایی شد (جدول 5). مکان‌های 297، 187، 197، 37، 110، 206، 109، 70، 237 و 58 بین دو صفت تاریخ گلدهی و تاریخ گرده‌افشانی مشترک بودند و بقیه مکان‌ها در بین این دو صفت

جدول 5. نتایج تجزیه ارتباط برای صفات زراعی در جمعیت‌های فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*) با استفاده از داده‌های نشانگرهای ISSR و EST-SSR براساس مدل خطی عمومی (GLM)

| صفت | نشانگرها | مکان | سطح معنی‌داری (P-value) | R^2 | صفت | نشانگرها | مکان | سطح معنی‌داری (P-value) | R^2 |
|-------------|----------|-----------|-------------------------|--------|-------------|----------|-----------|-------------------------|-------|
| تاریخ گلدهی | ISSR12 | 110 | 0.000103 | 0.092 | گرده‌افشانی | ISSR7 | 58 | 0.000103 | 0.109 |
| | ISSR23 | 223 | 0.000102 | 0.105 | | ISSR12 | 110 | 0.000102 | 0.109 |
| | ISSR16 | 146 | 0.000106 | 0.094 | | ISSR2 | 18 | 0.0000982 | 0.124 |
| | ISSR24 | 236 | 0.000102 | 0.096 | | ISSR12 | 109 | 0.0000785 | 0.129 |
| | ISSR8 | 70 | 0.000101 | 0.096 | | ISSR20 | 187 | 0.0000781 | 0.099 |
| | ISSR24 | 232 | 0.0000946 | 0.094 | | EST7 | 431 | 0.0000774 | 0.086 |
| | ISSR19 | 179 | 0.0000878 | 0.097 | | ISSR11 | 104 | 0.0000625 | 0.091 |
| | ISSR20 | 188 | 0.0000792 | 0.099 | | ISSR27 | 260 | 0.0000368 | 0.094 |
| | ISSR7 | 58 | 0.0000515 | 0.103 | | ISSR22 | 206 | 0.0000175 | 0.127 |
| | ISSR24 | 237 | 0.0000398 | 0.106 | | ISSR3 | 25 | 0.000015 | 0.086 |
| | ISSR22 | 206 | 0.0000374 | 0.107 | | ISSR5 | 37 | 0.0000144 | 0.089 |
| | ISSR12 | 109 | 0.0000332 | 0.108 | | ISSR17 | 152 | 0.00000897 | 0.083 |
| | ISSR16 | 140 | 0.0000229 | 0.112 | | ISSR31 | 297 | 0.00000429 | 0.101 |
| | ISSR31 | 297 | 0.0000845 | 0.122 | | ISSR8 | 70 | 0.00000258 | 0.096 |
| | ISSR27 | 260 | 0.00000692 | 0.125 | | ISSR21 | 197 | 0.000000365 | 0.111 |
| | ISSR20 | 187 | 0.0000035 | 0.099 | | ISSR20 | 187 | 0.000102 | 0.099 |
| | ISSR5 | 37 | 0.00000269 | 0.134 | | ISSR24 | 237 | 0.000101 | 0.106 |
| | ISSR2 | 18 | 0.00000111 | 0.110 | | ISSR31 | 298 | 0.0000102 | 0.101 |
| | ISSR21 | 197 | 0.000000015 | 0.177 | | ISSR39 | 372 | 0.000101 | 0.109 |
| ISSR24 | 234 | 0.0001045 | 0.091 | ISSR18 | 171 | 0.000103 | 0.105 | | |
| طول پدانکل | ISSR26 | 253 | 0.000101 | 0.090 | ISSR22 | 212 | 0.000101 | 0.105 | |
| تعداد ساقه | ISSR3 | 25 | 0.0000407 | 0.173 | عملکرد دانه | ISSR27 | 269 | 0.0001026 | 0.152 |
| | ISSR31 | 300 | 0.00000544 | 0.208 | ISSR24 | 237 | 0.0000827 | 0.128 | |

R^2 : Coefficient of determination, P-value: Probability value, GLM: General linear model

جدول 6. نتایج تجزیه ارتباط برای صفات زراعی در جمعیت‌های فسکیوی پابلند (*Festuca arundinacea*) با استفاده از داده های نشانگرهای ISSR و EST-SSR براساس مدل خطی مخلوط (MLM)

| صف | نشانگرها | لوکوس | سطح معنی‌داری (P-value) | R ² |
|--|----------|-------|-------------------------|----------------|
| تاریخ گرده‌افشانی | ISSR28 | 271 | 0.000211 | 0.170 |
| | ISSR32 | 313 | 0.000540 | 0.146 |
| | EST1 | 381 | 0.00304 | 0.105 |
| طول برگ | ISSR18 | 166 | 0.000123 | 0.108 |
| تاریخ گلدهی | ISSR39 | 367 | 0.00201 | 0.111 |
| | ISSR25 | 241 | 0.00214 | 0.113 |
| تعداد ساقه | ISSR4 | 31 | 0.00230 | 0.104 |
| | ISSR22 | 213 | 0.00471 | 0.095 |
| | ISSR39 | 367 | 0.00304 | 0.104 |
| ارتفاع پدانکل | ISSR32 | 303 | 0.00413 | 0.094 |
| | EST4 | 403 | 0.00466 | 0.092 |
| ارتفاع گیاه | ISSR7 | 50 | 0.00432 | 0.105 |
| قطر تاجپوش | ISSR6 | 47 | 0.00499 | 0.093 |
| | ISSR8 | 67 | 0.00499 | 0.093 |
| | ISSR36 | 350 | 0.00499 | 0.093 |
| نشانگرهای معنی‌دار با تصحیح بونفرونی (Bonferroni) در سطح احتمال 0/05 | | | | |
| تاریخ گرده‌افشانی | ISSR28 | 271 | 0.000211 | 0.170 |
| | ISSR32 | 313 | 0.000540 | 0.146 |

R²: Coefficient of determination, P-value: Probability value, MLM: Mixed linear model.

جمعیت‌ها و در نتیجه تنوع بالای ژنتیکی و فنوتیپی در بین افراد موجود در این جمعیت می‌باشد. همچنین جمعیت‌های Azarbayjan7، 6000/L12-1، Fariman 83B+، Tirbute، 6000/9 Fozveh، Fariman 83D+، Pcer، Mini Mustang، Arid، Fariman 83D+ و Rebel، JR دارای کمترین ضریب تغییرات برای صفات بررسی شده بود، که می‌تواند به دلیل تنوع کمتر درون این جمعیت‌ها از نظر صفات اندازه‌گیری شده باشد. نتایج بررسی تنوع در مجموعه جمعیت‌های علوفه‌ای و چمنی نشان داد جمعیت‌های علوفه‌ای از ضریب تغییرات بیشتری در کل صفات نسبت به جمعیت‌های چمنی برخوردار بودند. احتمالاً دلیل این امر این باشد که جمعیت‌های علوفه‌ای مورد استفاده در این آزمایش به دلیل نداشتن سابقه اصلاحی قبلی و وحشی بودن نسبت به جمعیت‌های چمنی که سابقه اصلاحی داشته دارای پلی‌مورفیسم بیشتری از نظر صفات اندازه‌گیری شده در درون خود بودند.

نتایج گروه‌بندی با تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که از چهار زیرگروه به دست آمده، زیرگروه دوم و سوم حاوی اکثر جمعیت‌های اصلاح شده برای

تجزیه تنوع صفات مورفولوژیکی و عملکردی نشان داد که در رابطه با کلیه صفات مورد مطالعه تنوع گسترده‌ای در مواد آزمایشی وجود دارد. این امر می‌تواند به دلیل سازگاری متفاوت جمعیت‌های تحت بررسی در شرایط آب و هوایی محل آزمایش باشد. صفت ارتفاع بوته (16/45) و تاریخ گرده‌افشانی (15/27) دارای بالاترین ضریب تغییرات بودند و بنابراین پتانسیل خوبی برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی دارند. Augustyniak *et al.* (2018) دریافتند که وارپته‌های مختلف فسکیوی پابلند، پاسخ متفاوت رشدی در شرایط آب و هوایی سرد نشان می‌دهند. Sun *et al.* (2015) گزارش کردند که چند شکلی مشاهده شده در صفات مورفولوژیکی با سازگاری به شرایط آب و هوایی و سابقه اصلاحی ژنوتیپ‌ها ارتباط دارد. نتایج نشان داد جمعیت‌های 4000/247-2، Kamyaran Kordestan، 6000/9Fozveh، 6000/112-2، 4000/247-2 و 6000/L12-3 دارای بیشترین ضریب تغییرات درون گروهی برای صفات مورد بررسی بودند که نشان‌دهنده بالابودن میزان دگرگشتی در این

روی فسکیوی پابلند به دلیل محدودبودن جمعیت‌های در دسترس آن بسیار کم است و تا به امروز مطالعه‌ای برای مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر نشان دادن بهتر تنوع ژنتیکی صورت نپذیرفته است (Sun *et al.*, 2015). در این مطالعه دو تا از نشانگرهای متداول در بررسی تنوع ژنتیکی (ISSR و EST-SSR) مورد استفاده قرار گرفت و سطح بالایی از تنوع براساس هر دو نشانگر مشاهده شد. در این پژوهش نشانگرهای EST-SSR، یک الگوی باندهای قابل تشخیص خوبی را نشان دادند که منطبق با گزارش‌های Fu *et al.* (2016) بود. آنها نتیجه گرفتند که نشانگر NFA37 بالاترین میزان تنوع را در بین سایر نشانگرها نشان می‌دهد که بیانگر این است که این نشانگر توانایی بالایی برای نشان دادن چندشکلی در فسکیوی پابلند دارد (Fu *et al.*, 2011; Amini *et al.*, 2016). از 387 باند به دست آمده 335 باند (86/56٪) دارای چند شکلی بودند که این نتایج با نتایج بررسی‌های قبلی روی برخی از ژنوتیپ‌های فسکیوی پابلند (12 ژنوتیپ) با بیشتر از 90 درصد چندشکلی، همخوانی داشت (Pivoriene *et al.*, 2008). نتایج به دست آمده از نشانگرهای ISSR نشان داد که بهترین نشانگرها از لحاظ پارامترهای تنوع ژنتیکی (He I، Ne و PPL) نشانگرهای ISSR35، ISSR26 و ISSR39 می‌باشد درحالی‌که بهترین نشانگر براساس میزان PIC نشانگر ISSR32 بود. این نتایج نشان داد که نشانگر ISSR می‌تواند به عنوان یک ابزار قوی برای نشان دادن تنوع ژنتیکی برای انتخاب بهترین والدین برای ایجاد ارقام جدید با هتروزیس بالا به کار رود (Bornet *et al.*, 2001; Pivoriene *et al.*, 2008). مطالعه اخیر با گزارش‌هایی روی فسکیوی پابلند (Malay *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2016)، گندم (Eujay *et al.*, 2002)، برنج (Cho *et al.*, 2000) و لولیوم (Xie *et al.*, 2010) با استفاده از

علوفه و بذر بودند، درحالی‌که زیرگروه اول و دوم شامل اکثر جمعیت‌های محلی ایرانی و مجارستانی بودند که کار اصلاحی کمتری روی آن‌ها صورت پذیرفته است. در گزارش‌های قبلی نیز نشان داده شده است که انواع مختلف چمنی و علوفه‌ای فسکیوی پابلند به صورت واضح با استفاده از صفات مورفولوژیکی و زراعی قابل تفکیک از هم هستند (Zhang *et al.*, 2019; Shahabzadeh *et al.*, 2019). از طرف دیگر، تنوع زیادی بین جمعیت‌های تحت بررسی وجود داشت که می‌تواند به عنوان یک منبع ژرم‌پلاسمی خوب برای اصلاح فسکیوی پابلند و اهداف مکان‌یابی ژن (پانل ارتباطی) استفاده گردد. از آنجایی که امروزه مهم‌ترین راه اصلاحی گراس‌ها تولید ارقام ترکیبی می‌باشد انتخاب جمعیت‌هایی با فاصله اقلیدسی زیاد از یکدیگر به عنوان والد در تولید ارقام ترکیبی می‌تواند سبب تولید ارقامی با میزان نمود فنوتیپی بالا گردد (Borna *et al.*, 2017). شناخت تنوع ژنتیکی برای تولید ارقام جدید، مدیریت ژرم‌پلاسم و انتخاب والدین مناسب برای برنامه‌های اصلاحی، بسیار پر اهمیت است (Lou *et al.*, 2018). از آنجایی‌که تنها با اتکا بر ارزیابی مورفولوژی و عملکردی جمعیت‌های مورد مطالعه نمی‌توان به صورت دقیق والدین مناسب برای تلاقی را انتخاب نمود پس در این آزمایش بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر ISSR و EST-SSR نیز انجام گرفت. نشانگرهای مولکولی متفاوتی برای بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی پیشنهاد و استفاده شده است (Awasthi *et al.*, 2004; Dangi *et al.*, 2004; Sehgal *et al.*, 2009). انتخاب یک نشانگر مناسب برای هر پژوهش بستگی به هدف تحقیق و ساختار ژنتیکی و بیولوژیکی گونه دارد (Aggarwal *et al.*, 2007). بنابراین، مقایسه بین نشانگرها برای به دست آوردن تنوع مطلوب امری ضروری است (Borna *et al.*, 2017). مطالعات

تجزیه ارتباط را نشان می‌دهد.

در این مطالعه برای بررسی نشانگرهای پیوسته با صفات زراعی مورد مطالعه از دو روش GLM و MLM استفاده شد. در روش GLM تعداد بالایی نشانگر معنی‌دار در سطح 0/05 شناسایی شد اما با تصحیح بنفرونی تعداد به 46 نشانگر برای پنج صفت کاهش یافت. همچنین در روش MLM به منظور کاهش پیوستگی دروغین نشانگر و صفت روابط خویشاوندی هم علاوه بر ساختار جمعیت وارد مدل شد تا مکان‌هایی با اطمینان بیشتر از لحاظ پیوسته بودن به صفت شناسایی شوند که 15 مکان برای 7 صفت شناسایی شد که بعد از تصحیح بنفرونی به 2 مکان برای تاریخ گرده‌افشانی کاهش یافت. در روش GLM مکان‌های ژنی زیادی بین تاریخ گلدهی و تاریخ گرده‌افشانی مشترک بود که این امر می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد که اهمیت زیادی در اصلاح گیاهان دارد و بهبود و دستکاری چندین صفت را به صورت همزمان مهیا می‌کند. Lou و همکاران (2015) نیز با استفاده از نشانگرهای SSR روی جمعیت‌های فسکیوی پابلند دریافتند که این نشانگر ریزماهواره توانایی خاصی در نشان دادن تنوع ژنتیکی و تحلیل روابط ژنتیکی دارد و 13 مکان مرتبط با استفاده از روش GLM برای صفات مورفولوژیک در فسکیوی پابلند شناسایی کردند. همچنین Sun و همکاران (2015) مکان‌هایی مرتبط با صفت گرده‌افشانی و گلدهی با استفاده از روش MLM روی ژنوم فسکیوی پابلند شناسایی کردند. Lou و همکاران (2018) 12 مکان مرتبط با گرده‌افشانی و چهار مکان مرتبط با عملکرد علوفه را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره به کمک روش GLM روی جمعیت‌های فسکیوی پابلند آمریکایی شناسایی کردند، که این گزارش با نتایج ما در روش GLM تطابق بالایی داشت. در پژوهش حاضر میزان R^2 بین 0/086 تا 0/208 بود که نشان می‌دهد هرچه میزان این شاخص بالاتر

نشانگرهای مختلف ریزماهواره (EST-SSR و ISSR) مطابقت داشت.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ارتباطی بین تعداد آلل‌ها با محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) وجود ندارد. برای مثال ISSR19 با 12 آلل دارای میزان PIC 0/642 در حالی که ISSR14 با 5 آلل دارای میزان PIC 0/913 بود. همچنین نشانگر NFA065 و NFA138 با 9 آلل چندشکل دارای میزان PIC به ترتیب 0/824 و 0/488 بودند. این مشاهدات با گزارش Lal و همکاران (2018) در مورد ارتباط بین نوع گیاه، تعداد آلل و مکان چندشکل در یک راستا بود (Lal et al., 2018).

نتایج گروه‌بندی براساس مجموع نشانگرها (ISSR و EST-SSR) نشان داد که دو نشانگر به خوبی جمعیت‌های تحت بررسی را به دو گروه کلی چمنی و علوفه‌ای تقسیم کردند که هر گروه دارای دو زیرگروه بود که این نتایج با نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از صفات زراعی منطبق بود. همچنین این نتایج با مشاهدات حاصل از تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در تطابق بود. این نتایج نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره و بین ریزماهواره‌ها به خوبی بین گروه‌ها و زیرگروه‌های فسکیوی پابلند تمایز ایجاد می‌کنند (Amini et al., 2011; Semagn et al., 2006; Belaj et al., 2003; Dreisigacker et al., 2005). این نتایج می‌تواند به اصلاح‌گران در انتخاب ژنوتیپ‌های با میزان چندشکلی بالا به‌عنوان والدین پلی‌گراس برای به‌دست‌آوردن نتایجی با بیشترین هتروزیس کمک نماید (Hand et al., 2012; Yu et al., 2013). از طرفی، یکی از ملزومات تجزیه ارتباط داشتن تنوع در پنل ارتباطی (جمعیت مورد استفاده) است. بنابراین تجزیه‌های چند متغیره از قبیل تجزیه کلاستر و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (چه براساس داده‌های مورفولوژیکی و چه براساس داده‌های مولکولی) اطلاعات کلی در ارتباط با تمایز بین جمعیت‌ها از نظر صفات مورد بررسی و امکان انجام

برنامه‌های اصلاحی فسکیوی پابلند استفاده نمود. در جمعیت‌های مورد بررسی فسکیوی پابلند تنوع فنوتیپی و مولکولی گسترده‌ای مشاهده شد که به خوبی جمعیت‌های چمنی و علوفه‌ای فسکیوی پابلند را از هم تفکیک نمود. در تجزیه ارتباط براساس نشانگرهای ISSR و EST-SSR تعدادی نشانگر مولکولی پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفات مورد مطالعه شناسایی شد. برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت در ارتباط بودند بنابراین می‌توانند برای اصلاح همزمان صفات متعدد به صورت همزمان به کار روند. لازم است به منظور تأیید و اطمینان آماری بیشتر به نتایج حاصل، تکرارپذیری نشانگرهای پیوسته در جمعیت‌های بزرگ‌تر با استفاده از یادداشت‌برداری از صفات مورد مطالعه در چندین محیط صورت گیرد و سپس، از نشانگرهای مولکولی تأییدشده در برنامه‌های به‌نژادی فسکیوی پابلند به منظور اصلاح صفات مورفولوژیک و توسعه ارقامی با عملکرد بالاتر از طریق انتخاب به‌کمک نشانگر استفاده شود.

رفته احتمال معنی‌داری پیوستگی یک صفت با نشانگر نیز بالاتر رفته است. از این رو می‌توان امید داشت که با یافتن مکان‌های ژنی با R^2 بالا به یافتن صفات زراعی مرتبط با آن نشانگر دست یافت (Amombo *et al.*, 2018). صفات کمی توسط تعداد زیادی مکان ژن کنترل می‌شوند این که تنها یک مکان ژنی بتواند 0/086 تا 0/208 تغییرات مربوط به آن صفت را توجیه کند میزان بالایی برای آن مکان ژنی می‌باشد. در تطابق با مطالعه حاضر در مقالات مختلف این مورد به‌وفور مشاهده می‌شود (Simko *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2015;) نشانگر بیشتر و انجام آزمایش روی تعداد بیشتری جمعیت گیاهی با تنوع بالا می‌توان از صحت ارتباط و پیوستگی این صفات با نشانگرهای مربوطه مطمئن شد. بنابراین با مکان‌یابی دقیق نشانگرهای پیوسته با صفت می‌توان کارایی آن نشانگر در برنامه اصلاحی را بالا برد و همچنین از این نشانگرها در تسریع اصلاح به کمک نشانگر و بالابردن سرعت

REFERENCES

- Abdurakhmonov IY, Kohel RJ, Yu JZ, Pepper AE, Abdullaev AA, Kushanov FN, Salakhutdinov IBZ, Buriev TS, Saha BE, Scheffler JN, Abdurkarimov A (2008) Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasm. *Genomics* 92: 478-487.
- Aggarwal RK, Hendre PS, Varshney RK, Bhat PR, Krishnakumar V, Singh L (2007) Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theor. Appl. Genet.* 114: 359-372.
- Amini F, Mirlohi AF, Majidi MM, Shojaiefar S, Kolliker R (2011) Improved Polycross Breeding of Tall Fescue through Marker-based Parental Selection. *Plant Breeding* 130: 701-707.
- Amombo E, Li X, Wang G, Fan S, Shao A, Zhang Y, Fu J (2018) Screening of diverse tall fescue population for salinity tolerance based on SSR marker-physiological trait association. *Euphytica* 214: 220-232.
- Augustyniak A, Perlikowski D, Rapacz M, Kościelniak J, Kosmala A (2018) Insight into cellular proteome of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms to decipher crucial mechanisms of cold acclimation in forage grasses. *Plant Sci.* 272: 22-31.
- Avval SE (2017) Assessing polymorphism information content (PIC) using SSR molecular markers on local species of *Citrullus Colocynthis*. Case Study: Iran, Sistan-Balouchestan Province. *J. Mol.*

- Biol. Res. 7: 42-49.
- Awasthi, AK, Nagaraja GM, Naik GV, Kanginakudru S (2004) Genetic diversity and relationships in mulberry (*Morus genus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. BMC Genet. 5:1-9.
- Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L, Trujillo I (2003) Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theor. Appl. Genet. 107: 736-744.
- Borna F, Luo S, Ahmad NM (2017) Genetic diversity in populations of the medicinal plant *Leonurus cardiaca* L. revealed by inter-primer binding site (iPBS) markers. Genet. Resour. Crop Evol. 64: 479-492.
- Bornet B and Branchard M (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol. Biol. Rep. 19: 209-215.
- Buckler E, Casstevens T, Bradbury P, Zhang Z, Kroon D, Glaubitz J (2014) User manual for TASSEL, trait analysis by association, evolution and linkage [Internet]. NewYork: Cornell University.
- Bernardo R (2008) Molecular marker and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. Crop Sci. 48: 1649-1664.
- Cai K, Zhu L, Zhang K, Li K, Zhao Z, Zeng W, Lin X (2019) Development and characterization of EST-SSR markers from RNA-Seq data in *Phyllostachys violascens*. Front. Plant Sci. 7: 12-31.
- Chtourou-Ghorbel N, Chakroun M, Elazreg H, Trifi-Farah N. 2011. Agronomic evaluation and genetic variation of Tunisian tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Int. J. Agron. 3:21-40.
- Collard BC, Jahufer ZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. Euphytica 142: 169-196.
- Dangi RS, Lagu MD, Choudhary LB, Ranjekar PK, Gupta VS (2004) Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. BMC Plant Biol.4: 1-11.
- Davar R, Darvishzadeh R, Rezaee Danesh Y, Kholghi M, Azizi M, Shah DA (2012) Single sequence repeat markers associated with partial resistance in sunflower to *Phoma macdonaldii*. Phytopathol. Mediterr. 51: 541-8.
- Dreisigacker S, Zhang P, Warburton ML, Skovmand D, Hoisington D, Melchinger AE (2005) Genetic diversity among and within CIMMYT wheat landrace accessions investigated with SSRs and implications for plant genetic resources management. Crop. Sci. 45: 653-661.
- Ferreira F, Scapim AB, Maldonado C, Mora F (2018) SSR-based genetic analysis of sweet corn inbred lines using artificial neural networks. Crop Breed Appl Biotechnol. 8:13-24.
- Fu K, Zhihui G, Xinquan Z, Yan F, Wendan W, Daxu L, Yan P, Linkai H, Ming S, Shiqie B, Xiao M (2016) Insight into the genetic variability analysis and cultivar identification of tall fescue by using SSR markers. Hereditas 153: 9-20.
- Ghaffari Azar A, Darvishzadeh R, Hatami Maleki H, Kahrizi D, Darvishi B, Bernoosi I (2018) Identification of inter simple sequence repeat regions associated with agro-morphological traits in maize genome. Cereal Research 8(1): 97-109.
- Ghaffari Azar A, Darvishzadeh R, Aghaali Z, Kahrizi D, Darvishi B (2019) Assessment of genetic diversity and grouping of maize lines (*Zea mays*

- L.) using ISSR markers. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)* 32(2): 194-204.
- Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B, Oberhagemann P, and Schuler, K (2004) Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: A case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Mol. Breed.* 13: 93-102.
- Hand ML, Cogan NOI, and Forster JW (2012) Molecular characterization and interpretation of genetic diversity within globally distributed germplasm collections of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and meadow fescue (*F. pratensis* Huds.). *Theor. Appl. Genet.* 124: 1127–1137.
- Jemes. H (1992) Teaching Bayesian Statistics Using Sampling Methods and MINITAB. *Teacher's Corner*. PP. 182-191.
- Kraakman ATW, Martínez F, Mussiraliev B, Van Eeuwijk FA, Niks RE (2006) Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Mol. Breed.* 171:41-58.
- Kolliker R, Herrmann D, Boller B, Widmer F (2003) Swiss Mattenklee landraces, a distinct and diverse genetic resource of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 306-315.
- Kumar V, Singh A, Mithra ASV, Krishnamurthy SL, Swarup K, Jain PJ, Tiwari KK, Kumar P, Rao AR, Sharma SK, Khurana JP, Singh NK, Mohapatra T (2015) Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). *DNA Res.* 22: 133-145.
- Lal RK, Gupta P, Sarkar S (2018) Phylogenetic relationships, path and principal component analysis for genetic variability and high oil yielding clone selection in vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) nash. *J. Plant Genet. Breed.* 2: 1-8.
- Li X, Wei Y, Moore KJ, Michaud R, Viands DR, Julie L. Hansen, Ananta Acharya, and Brummer EC. (2011) Association mapping of biomass yield and stem composition in a tetraploid alfalfa breeding population. *The Plant Genome* 4: 24–35.
- Lou Y, Hu L, Chen L, Sun X, Yang Y, Liu H, Xu O (2015) Association analysis of simple sequence repeat (SSR) markers with agronomic traits in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *PLoS ONE.* 10(7): e0133054.
- Lou Y, Sun X, Chao Y, Amombo E, Wang H, Song F, Xu Q, Zhuge Y (2018) Association mapping of quality traits with SSR markers in tall fescue (*Festuca arundia* Schreb.). *Journal of Animal and Plant Sciences* 286: 1787-1794.
- Mahendar T, Hari DU, Abhishek R (2014) Genetic dissection of drought and heat S, tolerance in chickpea through genome-wide and candidate gene-based association mapping approaches. *Plos ONE.* 6: 32-50.
- Malay MC, Mian MAR, Zwonitzer JC, Chekhovskiy K, Hopkins AA (2005) An SSR- and AFLP-based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theor. Appl. Genet.* 110:323-336.
- Nielsen D, Buckler ES, Dwarf D (2001) Polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nat. Genet.* 283:286-9.
- Paterson AH, DeVerna JW, Lanini B, Tanksley SD (1990) Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. *Genetics* 124: 735-742.
- Pivoriene O, Pasakinskiene I, Brazauskas G, Lideikyte L, Jenen LB, Lubberstedt T

- (2008) Inter-simple sequence repeat (ISSR) loci mapping in the genome of perennial ryegrass. *Agronomy* 54: 17-21.
- Pritchard JK, Stephanes M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000) Association mapping in structured populations. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 170-81.
- Rostami F, Moghaddam F K, Sabbaghand SK, Saridi S (2015) Comparison of PCR-RFLP based on ribosomal regions and SSR markers in genetic diversity of pistachio die-back caused by *Paecilomyces variotii*. *Gene, Cell and Tissue* 4: 13-29.
- Sehgal D, Rajpal VR, Raina SN, Sasanuma T, Sasakuma T (2009) Assaying polymorphism at DNA level for genetic diversity diagnostics of the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) world germplasm resources. *Genetica* 135: 457-470.
- Saha M, Kirigwi F, Chekhovskiy K, Black J, Hopkins A (2006) Molecular mapping of QTLs associated with important forage traits in tall fescue. *Molecular Breeding of Forage and Turf* 4: 251-258.
- Semagn K, Bjørnstad A, Ndjiondjop MN (2006). Review an overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 25: 2540-2568.
- Shahabzadeh Z, Darvishzadeh R, Mohammadi R, Jafari M (2019) Genetic structure and diversity analysis of tall fescue populations by EST-SSR and ISSR markers. *Mol Biol Rep* 1: 1-15.
- Simko I, Pechenick DA, McHale LK, Truco MJ, Ochoa OE, Michelmores RW, Scheffler BE (2009) Association mapping and marker-assisted selection of the lettuce dieback resistance gene *Tvr1*. *BMC Plant Biol.* 9: 135-148.
- Sun D F, Ren WB, Sun GL, Peng JH (2011) Molecular diversity and association mapping of quantitative traits in Tibetan wild and worldwide originated barley. *Euphytica* 178: 31-43.
- Sun X, Du Z, Ren J, Amombo E, Hu T, Fu G (2015) Association of SSR markers with functional traits from heat stress in diverse tall fescue accessions. *BMC Plant Biol.* 15: 116-126.
- Sved JA (1971) Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theor. Popul. Biol.* 2:125-141.
- Vaishnav V, Wali SA, Tripathi SB, Negi MS, Ansar SA (2018) A preliminary investigation on AFLP marker-wood density trait association in teak (*Tectona grandis* L. f.). *Ann. For. Res.* 61(1): 49-63.
- Wei Z, Zhang G, Du Q, Zhang J, Li B, Zhang D (2015). Association mapping for morphological and physiological traits in *Populus simonii*. *BMC Genet.* 15: 16-31.
- Xie WG, Zhang XQ, Ma X, Cai HW, Huang LK, Peng Y, Zeng B (2010) Diversity comparison and phylogenetic relationships of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) germplasm as revealed by SSR markers. *Can. J. Plant Sci.* 90: 13-21.
- Yu X, Bai G, Liu S (2013) Association of candidate genes with drought tolerance traits in diverse perennial ryegrass accessions. *J. Exp. Bot.* 64:1537-51.
- Zhang H, Wang Y, Wang W, Bao M, Chan Z (2019) Physiological changes and *DREB1s* expression profiles of tall fescue in response to freezing stress. *Scientia Horticulturae* 4: 116-124.
- Zhao W, Wang Y, Chen T, Jia G, Wang X, Qi J, Pang Y, Wang S, Li Z, Huang Y, Yile P, Yang Y (2007) Genetic structure of mulberry from different ecotypes revealed by ISSRs in china: An implication for conservation of local mulberry varieties *Scientia Horticulturae* 115: 47-55.