

بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌هایی از رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) بر اساس صفات ریخت‌شناختی و نشانگر مولکولی SCoT

محسن فرشادفر^{۱*}، نازنین مرادزاده^۲، عزت اله فرشادفر^۳ و هومن شیروانی^۴

*۱- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور پست الکترونیک: farshadfarmohsen@yahoo.com

۲- دانش‌آموخته گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳- استاد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی، کرمانشاه

۴- مدرس گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶

چکیده

تنوع فنوتیپی و مولکولی گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) در ۱۶ اکسشن از این گونه ارزیابی شد. این بررسی با استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه در سال ۱۳۹۳ اجرا شد. از ۱۱ صفت ریخت‌شناختی یادداشت‌برداری، و چندشکلی DNA با ۱۵ آغازگر SCoT محاسبه شد. تجزیه واریانس صفات ریخت‌شناختی اختلاف معنی‌داری (p 0.05) را بین اکسشن‌ها برای تمام صفات نشان داد. مقایسه میانگین اکسشن‌ها برای صفات مورد مطالعه به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن اکسشن‌ها را در گروه‌های مختلف قرار داد. اکسشن ۱۴۶۵۰ از لرستان با ارتفاع بوته، وزن هزار دانه و تعداد دانه در چترچه و عملکرد برتر از دیگر اکسشن‌ها بود. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، ۸۱/۴۰ درصد از واریانس کل توسط چهار مؤلفه بیان شد. تجزیه خوشه‌ای صفات ریخت‌شناختی، اکسشن‌ها را در چهار گروه قرار داد. بیشترین مقدار وراثت‌پذیری (۷۱/۳۴) به صفت تعداد ساقه اصلی تعلق داشت. آغازگرهای SCoT در مجموع ۵۵ باند تولید کردند که آغازگرهای SC5 و SC29 به ترتیب با ۱۰ و ۹ باند بیشترین تعداد را داشتند. شاخص‌های مولکولی شامل محتوای اطلاعات چندشکلی برابر با ۰/۳۶، شاخص نشانگری برابر با ۱/۸۲، نسبت چندگانه مؤثر برابر با ۴/۸۰ و شاخص قدرت تفکیک برابر با ۵/۸۶ بودند. میزان شباهت ژنتیکی مشاهده شده نیز بر اساس اطلاعات این نشانگرها برابر ۰/۶۷ بود. همچنین، تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی، اکسشن‌ها را در ۳ دسته قرار داد که این گروه‌بندی با نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCo) همخوانی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، رازیانه، صفات ریخت‌شناختی، مارکر مولکولی

مقدمه

تعداد رقم‌های مفید به دست آمده بر اثر اصلاح گیاهان دارویی اندک است. هدف از اصلاح گیاهان دارویی، افزایش کمیت و کیفیت آن دسته از مواد مؤثره در این گیاهان است که در صنایع دارویی از اهمیت خاصی برخوردار هستند. در

اگرچه کاشت گیاهان دارویی به هزاران سال پیش برمی‌گردد، ولی باید گفت که در مورد اصلاح آنها تاکنون پیشرفت قابل ملاحظه‌ای انجام نشده است و در حال حاضر،

معمولاً ۱۸-۲۴ نوکلئوتیدی هستند و محتوای C و G آنها ۵۰٪ تا ۷۲٪ است (Kalendar, 2007). با توجه به این مسئله که برای بهبود عملکرد هر گیاه، آگاهی از عوامل افزایش دهنده کمیت و کیفیت آن ضروری به نظر می‌رسد. این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در سطح صفات ریخت‌شناختی و مولکولی در اکسشن‌های مختلف رازیانه، شناسایی توده‌های برتر از نظر صفات زراعی و بررسی ارتباط میان نشانگر مورفولوژیکی و مولکولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

ارزیابی مورفولوژیکی

در این تحقیق تعداد ۱۶ اکسشن از گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) تهیه شده از بانک ژن منابع طبیعی کشور (جدول ۱) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه با مشخصات طول جغرافیایی ۵۹° ۴۶'، عرض جغرافیایی ۳۴° ۰۸'، ارتفاع از سطح دریا ۱۲۶۰ متر، میانگین بارندگی سالانه ۴۰۰ میلی‌متر و متوسط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دارای خاک لوم (بافت متوسط) انجام شد. بیشترین میزان بارندگی، براساس آمار هواشناسی در اسفند ماه و کمترین تغییرات بارندگی در فروردین ماه می‌باشد. هر کرت آزمایشی دارای ۶ خط با فاصله ۵۰ سانتی‌متر از یکدیگر بوده و طول هر کرت ۵ متر انتخاب شد. مبارزه با علف‌های هرز به صورت مکانیکی انجام شد. یادداشت‌برداری از ۵ بوته که به‌طور تصادفی از هر کرت انتخاب شده بود، انجام گردید.

صفات مورفولوژیک که مورد بررسی قرار گرفتند به‌همراه علامت اختصاری در جدول ۲ نشان داده شده است. در پایان نیز با استفاده از نرم‌افزارهای Minitab و MSTATC تجزیه واریانس انجام شد. آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد، همبستگی فنوتیپی بین صفات مورفولوژیک، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مؤلفه‌ها و دیاگرام پراکنشی اکسشن‌ها بر اساس مؤلفه‌های اول و دوم رسم شد.

سال‌های اخیر توجه خاصی از جانب سازمان‌های مختلف در کشورهای جهان در ارتباط با اصلاح این گیاهان انجام شده است (Omidi and Farzin, 2009). رازیانه از خانواده چتریان، بومی مناطق مدیترانه، دو و چند ساله، دارای برگ‌های پر مانند و گل‌های کوچک زرد رنگ می‌باشد. این گیاه در صنایع دارویی، غذایی و عطرسازی کاربرد فراوان دارد و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی قوی است (Izadi Darbandi & Bahmani, 2011). وجود تنوع ژنتیکی از عوامل مهم موفقیت به‌نژادگران در برنامه‌های اصلاحی در گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آنها است. به‌نژادگران از این تنوع در تولید ارقام جدید، انتقال ژن‌های مطلوب و تولید پایه‌های ژنتیکی قوی بهره برده‌اند (Rostaei et al., 2004). اساس برنامه‌های اصلاحی، تنوع ژنتیکی بوده و تنوع ژنتیکی مطلوب از نظر ویژگی‌های مورد بررسی، لازمه گزینش می‌باشد (Mohamadi 2006). مطالعه تنوع ژنتیکی فرایندی است که تفاوت، یا شباهت‌های گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا افراد را با استفاده از روشها و مدل‌های آماری خاصی بر اساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره‌ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می‌کند (Mohammadi & Prasanna, 2003). نشانگرهای مورفولوژیکی مبتنی بر صفات ریخت‌شناسی که معیار تنوع می‌باشد، در گذشته اهمیت زیادی داشت، ولی همواره با مشکلاتی مواجه بود، که اصلی‌ترین آنها غیر مستقیم بودن روش مورد نظر می‌باشد. صفات مورفولوژیک اغلب توارث غالب و مغلوبی داشته و توسط یک یا چند ژن کنترل می‌شوند و تحت تأثیر شرایط محیطی و مرحله رشد قرار می‌گیرند (Naghavi et al., 2007). نشانگرهای مولکولی ابزار-های مفید و قوی در ارزیابی روابط خویشاوندی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف می‌باشند. نشانگر مولکولی SCoT که در برگردان فارسی؛ کدون‌های آغاز هدف واقع شده، نامیده می‌شود. بر اساس توالی‌های آغاز (ATG) پرایمرها طراحی می‌شوند و نواحی بین کدون‌های آغاز طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر می‌شود و تفاوت‌ها آشکار می‌شود. پرایمرهای SCoT

جدول ۱- فهرست ۱۶ اکسشن رازیانه تهیه شده از بانک ژن منابع طبیعی

شماره	منطقه	کد بانک ژن	شماره	منطقه	کد بانک ژن
۱	مازندران	۱۳۶۶۲	۹	تهران ۲	۱۸۸۷۰
۲	کرمانشاه	۱۴۵۸۴	۱۰	سیستان و بلوچستان	۲۲۰۸۴
۳	لرستان	۱۴۶۵۰	۱۱	هرمزگان ۱	۲۴۴۸۲
۴	مرکزی	۱۴۷۲۶	۱۲	بانک ژن ۱	۲۵۱۹۷
۵	یزد	۱۵۵۱۳	۱۳	هرمزگان ۲	۲۶۸۶۰
۶	اردبیل ۱	۱۸۶۱۵	۱۴	هرمزگان ۳	۲۶۸۶۶
۷	اردبیل ۲	۱۸۶۱۸	۱۵	قزوین	۲۹۶۶۷
۸	تهران ۱	۱۸۸۶۹	۱۶	بانک ژن ۲	۳۰۴۰۶

جدول ۲- لیست صفات مورد مطالعه برای بررسی تنوع ژنتیکی

ردیف	صفت مورد مطالعه	علامت اختصاری
۱	تعداد چتر در بوته	N.U.P.P
۲	وزن خشک تک بوته	D.W.P.P
۳	ارتفاع بوته	H.P
۴	وزن هزار دانه	T.W.S
۵	تعداد چترک در چتر	N.M.U
۶	تعداد دانه در چترک	N.S.U
۷	تعداد ساقه اصلی	N.M.S
۸	تعداد ساقه فرعی	N.L.S
۹	تعداد گل در چترک	N.F.U
۱۰	طول ساقه گل دهنده	F.S.L
۱۱	طول برگ	L.L

ارزیابی مولکولی

پس از کشت بذره‌های هر نمونه، استخراج DNA به روش CTAB (Torres *et al.*, 1993) و به صورت تک بوته برای هر اکسشن در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام شد. بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گردید. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد

و به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود. همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد استفاده شد. به منظور تزریق نمونه

ارتفاع بوته در اکسشن‌های مورد بررسی ۹۳/۸۷ سانتی-متر بود. اکسشن ۱۴۶۵۰ (لرستان)، با بیشترین ارتفاع در گروه a قرار گرفت و اکسشن‌های ۱۸۸۷۰ (تهران) و ۲۲۰۸۴ (سیستان و بلوچستان) با کمترین ارتفاع در گروه e قرار گرفتند. میانگین تعداد ساقه اصلی اکسشن‌های مورد بررسی ۴/۷۴ عدد بود. اکسشن ۳۰۴۰۶ (بانک ژن)، دارای بیشترین تعداد ساقه اصلی و اکسشن ۱۸۶۱۵ (اردبیل) کمترین تعداد ساقه اصلی را داشت. میانگین تعداد ساقه فرعی در اکسشن‌های مورد بررسی ۷/۲۲ عدد بود که اکسشن ۳۰۴۰۶ (بانک ژن)، بیشترین تعداد ساقه فرعی و اکسشن ۱۸۶۱۵ (اردبیل) کمترین تعداد ساقه فرعی را داشت. میانگین تعداد چتر در بوته اکسشن‌های مورد بررسی ۱۴/۶۰ عدد بود. اکسشن ۲۶۸۶۰ (هرمزگان)، بیشترین تعداد چتر در بوته را به خود اختصاص داد و اکسشن ۱۸۶۱۵ (اردبیل) کمترین تعداد چتر در بوته را داشت. میانگین طول برگ اکسشن‌های مورد بررسی ۵/۲۸ سانتی-متر بود. اکسشن ۱۴۵۸۴ (کرمانشاه) بیشترین طول برگ را داشت و در گروه a قرار گرفت و اکسشن ۲۵۱۹۷ (بانک ژن)، کمترین طول برگ را به خود اختصاص داد و در گروه e قرار گرفت. میانگین طول ساقه گل‌دهنده اکسشن‌های مورد بررسی ۹/۸۵ سانتی-متر بود. اکسشن ۲۶۸۶۶ (هرمزگان) بیشترین طول ساقه گل‌دهنده را داشت و در گروه a قرار گرفت. اکسشن‌های ۱۸۶۱۵ (اردبیل) و ۱۸۸۷۰ (تهران) کمترین طول ساقه گل‌دهنده را به خود اختصاص دادند و در گروه h قرار گرفتند. میانگین تعداد گل در چترچه اکسشن‌های مورد بررسی ۲۳/۳۵ عدد بود. اکسشن ۱۸۸۷۰ (تهران)، بیشترین تعداد گل در چترچه را به خود اختصاص داد و اکسشن ۱۸۶۱۵ (اردبیل) کمترین تعداد گل در چترچه را داشت. میانگین تعداد چترچه در چتر اکسشن‌های مورد بررسی ۱۵/۳۴ عدد بود.

در ژل، ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNA-های تکثیر شده اضافه و بعد میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز بار شد و با ولتاژ ۱۲۰ و مدت ۲ ساعت حرکت انجام شد و بعد ژل را برای رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم برمایید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document برای نمایان شدن باندها استفاده شد. با توجه به غالب بودن نشانگر SCOT محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC^۱) از طریق فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n PI^2$ محاسبه شد (Hou et al., 2005). همچنین شاخص نشانگری (MI^۲) از رابطه $MI = PIC \times E$ به دست آمد (Powell et al., 1996). شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR^۳) از رابطه $EMR = NPB \times RP$ محاسبه شد (Altintas et al., 2008). در پایان نیز با استفاده از نرم‌افزارهای DARwin 6 و GenA1Ex 6.2 داده‌های حاصل بررسی شدند.

نتایج

الف- تجزیه واریانس صفات ریخت‌شناسی

نتایج تجزیه واریانس صفات ظاهری در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به جدول تجزیه واریانس در بین اکسشن‌ها، تنها صفت تعداد دانه در چترک غیرمعنی‌دار بود و برای صفات ارتفاع بوته و وزن خشک بوته، اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد و سایر صفات دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بودند.

مقایسه میانگین‌ها

مقایسه میانگین اکسشن‌ها برای صفات مورد مطالعه به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد انجام شد. نتایج در جدول ۴ ارائه شده است. میانگین

1- Polymorphic information content
2- Marker Index
3- Effective multiplex ratio
4- Resolving power

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس یک طرفه برای صفات مورفولوژیک

وزن خشک بوته	تعداد دانه در چترچه	وزن هزاردانه	تعداد چترچه در چتر	تعداد گل در چترچه	طول ساقه گل دهنده	طول برگ	تعداد چتر در بوته	تعداد ساقه فرعی	تعداد ساقه اصلی	ارتفاع بوته	درجه آزادی	منابع تغییرات
۴۸/۱۸۸ *	۱۱۷/۸۵۵ *	۴۸/۴۳۹ **	۴۸/۲۳۷ **	۵۴/۹۷۳ **	۴۹/۰۵۸ **	۵۰/۹۷۸ **	۴۹/۱۴۰ ^{ns}	۰/۰۸۶ ^{ns}	۰/۳۳۸ *	۸۱۸/۷۹۶ *	۲	تکرار
۱۹/۸۸۱ *	۳۶/۵۷۶ ^{ns}	۰/۵۵۱ **	۱۹/۸۳۲ **	۳۷/۸۳۰ **	۲/۶۵۲ **	۲/۸۲۰ **	۱۰۵/۴۸۹ **	۱/۹۷۰ **	۰/۶۵۲ **	۴۴۵/۵۶۷ *	۱۵	اکسشن
۹/۷۹۸	۲۲/۰۸۷	۰/۱۲۴	۳/۱۱۷	۹/۴۰۳	۰/۶۵۸	۰/۷۸۱	۱۷/۸۳۷	۰/۲۳۳	۰/۰۷۷	۲۰۵/۳۷۶	۳۰	خطا
۱۷/۹۴	۲۳/۶۲	۸/۲۲	۱۲/۲۴	۱۴/۱۵	۹/۸۴	۲۴/۹۱	۳۰/۴۸	۶/۷۰	۵/۷۹	۱۶/۶۵		ضریب تغییرات (CV%)
۱۸/۹۵	۲۱/۵۳	۵/۸۱	۱۵/۳۴	۲۳/۳۵	۹/۸۵	۵/۲۸	۱۴/۰۶	۷/۲۲	۴/۷۴	۹۳/۸۷		میانگین

*، ** : اختلاف در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار -^{ns} : اختلاف غیر معنی‌دار

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات در اکسشن‌های مورد مطالعه به‌روش دانکن در سطح ۵ درصد

اکسشن	طول ساقه گل‌دهنده	طول برگ	تعداد چتر در بوته	تعداد ساقه فرعی	تعداد ساقه اصلی	ارتفاع بوته
۱۳۶۶۲	۸/۶۱ abcdefg	۴/۱۵ abcd	۱۶/۱۵ bcd	۸/۵۰ b	۴/۸۳ bcd	۹۸/۰۳ abc
۱۴۵۸۴	۹/۲۱ abc	۵/۶۸ a	۱۰/۶۳ cdef	۷/۱۷ cd	۴/۳۳ de	۸۵/۱۱ abcd
۱۴۶۵۰	۸/۸۷ abcdef	۳/۱۵ bcde	۹/۶۵ def	۶/۶۶ de	۴/۳۳ de	۱۰۷/۷۸ a
۱۴۷۲۶	۸/۹۸ abcde	۲/۸۶ cde	۹/۰۰ def	۶/۸۳ cd	۵/۱۷ bc	۱۰۳/۱۱ ab
۱۵۵۱۳	۸/۱۴ bcdefgh	۴/۷۸ ab	۷/۸۳ ef	۶/۸۳ cd	۴/۶۶ cde	۸۹/۵۸ abcd
۱۸۶۱۵	۶/۹۰ h	۲/۴۹ de	۵/۵۰ f	۵/۸۳ e	۴/۱۶ e	۹۲/۲۰ abcd
۱۸۶۱۸	۷/۴۷ efgh	۲/۸۳ cde	۱۴/۸۰ bcde	۷/۰۰ cd	۴/۳۳ de	۸۰/۱۹ abcd
۱۸۸۶۹	۷/۳۰ gh	۴/۰۹ abcd	۱۵/۳۲ bcde	۶/۵۰ de	۵/۱۷ bc	۹۹/۹۸ ab
۱۸۸۷۰	۶/۹۶ h	۴/۲۸ abc	۲۲/۵۰ ab	۷/۶۷ c	۵/۱۷ bc	۷۰/۷۴ cd
۲۲۰۸۴	۹/۵۶ ab	۳/۹۴ bcd	۱۷/۸۳ bc	۷/۱۶ cd	۴/۵۰ de	۷۱/۳۳ cd
۲۴۴۸۲	۷/۳۹ fgh	۳/۳۵ bcde	۱۵/۱۳ bcde	۷/۰۰ cd	۴/۵۰ de	۸۸/۴۱ abcd
۲۵۱۹۷	۷/۹۷ cdefgh	۱/۷۳ e	۱۱/۰۰ cdef	۶/۸۳ cd	۴/۶۶ cde	۸۴/۷۷ abcd
۲۶۸۶۰	۹/۰۸ abcd	۳/۵۶ bcd	۲۶/۴۲ a	۷/۱۶ cd	۴/۵۰ de	۷۵/۵۸ bcd
۲۶۸۶۶	۹/۸۳ a	۲/۵۳ de	۷/۱۵ ef	۷/۰۰ cd	۵/۳۳ b	۸۵/۲۶ abcd
۲۹۶۶۷	۷/۶۳ defgh	۳/۷۳ bcd	۱۱/۶۵ cdef	۷/۶۶ bc	۵/۱۶ bc	۷۹/۸۳ abcd
۳۰۴۰۶	۸/۰۲ bcdefgh	۳/۶۳ bcd	۲۱/۱۷ ab	۹/۳۳ a	۵/۸۳ a	۶۵/۲۱ d

اعداد دارای حروف مشترک بیانگر اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال

ادامه جدول ۴-

تعداد گل در چترچه	تعداد چترچه در چتر	وزن هزاردانه	تعداد دانه در چترچه	وزن خشک بوته	اکسشن
۲۶/۸۶ ab	۱۸/۵۰ a	۴/۳۵ abc	۲۳/۵۰ ab	۱۹/۳۶ abc	۱۳۶۶۲
۲۵/۰۳ abcd	۱۶/۰۰ ab	۳/۷۰ cde	۲۳/۸۳ ab	۱۹/۱۱ abc	۱۴۵۸۴
۲۲/۰۵ abcde	۱۳/۸۳ bcd	۵/۰۰ a	۲۵/۵۰ a	۲۱/۲۹ a	۱۴۶۵۰
۲۰/۵۲ cde	۱۳/۴۴ bcd	۴/۲۰ bc	۱۶/۸۳ abc	۲۰/۳۱ ab	۱۴۷۲۶
۲۶/۰۰ abc	۱۶/۶۱ ab	۴/۴۰ ab	۲۱/۹۵ abc	۱۸/۶۶ abcd	۱۵۵۱۳
۱۴/۴۷ f	۹/۴۳ e	۴/۵۵ ab	۱۷/۲۲ abc	۲۰/۱۲ ab	۱۸۶۱۵
۱۹/۳۳ def	۱۳/۹۰ bcd	۴/۲۵ bc	۱۸/۲۷ abc	۱۷/۰۴ abcd	۱۸۶۱۸
۲۱/۴۴ bcde	۱۶/۸۳ ab	۴/۱۰ bcd	۲۰/۵۳ abc	۱۸/۴۹ abcd	۱۸۸۶۹
۲۷/۵۰ a	۱۶/۸۱ ab	۴/۴۵ ab	۲۰/۷۳ abc	۱۵/۰۷ bcd	۱۸۸۷۰
۲۰/۷۲ cde	۱۵/۷۸ abc	۴/۹۵ a	۲۰/۶۵ abc	۱۸/۱۵ abcd	۲۲۰۸۴
۱۸/۳۹ ef	۱۲/۳۳ de	۴/۳۵ abc	۲۳/۵۰ ab	۱۲/۷۸ d	۲۴۴۸۲
۱۷/۷۳ ef	۹/۳۹ e	۴/۲۵ bc	۱۴/۶۱ bc	۱۴/۵۱ bcd	۲۵۱۹۷
۱۹/۰۸ def	۱۴/۹۲ bcd	۳/۵۵ de	۱۹/۳۰ abc	۱۳/۹۱ cd	۲۶۸۶۰
۲۲/۸۰ abcd	۱۲/۵۴ cde	۳/۴۵ e	۱۵/۵۸ bc	۱۶/۴۶ abcd	۲۶۸۶۶
۲۳/۶۷ abcd	۱۴/۷۷ bcd	۴/۴۰ ab	۲۲/۱۶ abc	۱۹/۱۷ abc	۲۹۶۶۷
۲۱/۲۲ bcde	۱۵/۷۸ abc	۴/۵۰ ab	۱۴/۱۶ c	۱۴/۷۸ bcd	۳۰۴۰۶

اعداد دارای حروف مشترک بیانگر اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال

همبستگی فنوتیپی

به منظور بررسی ارتباط بین صفات مورفولوژیک برای انتخاب بهترین اکسشن‌های مطلوب با توجه به صفات همبستگی فنوتیپی برای صفات محاسبه شده و نتایج در جدول ۵ ارائه شده است. بین صفت ارتفاع گیاه با تعداد ساقه فرعی و تعداد چتر در گیاه همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح ۵ درصد و با صفت وزن خشک بوته، همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح ۵ درصد وجود داشت. تعداد ساقه اصلی و تعداد ساقه فرعی دارای همبستگی معنی‌دار و مثبت در سطح ۵ درصد بودند. همچنین میان تعداد ساقه فرعی با صفت تعداد چتر در بوته و تعداد چترچه در چتر نیز همبستگی معنی‌دار و مثبت در سطح ۵ درصد مشاهده شد. در بین صفت طول برگ با تعداد دانه در چترچه و تعداد گل در چترچه همبستگی معنی‌دار و مثبتی در سطح ۱ درصد وجود داشت. صفت تعداد گل در چترچه با صفت تعداد چترچه در چتر نیز دارای همبستگی معنی‌دار و مثبتی در سطح ۱ درصد بود.

اکسشن ۱۳۶۶۲ (مازندران)، بیشترین تعداد چترچه را در چتر به خود اختصاص داد و اکسشن‌های ۱۸۶۱۵ (اردبیل) و ۲۵۱۹۷ (بانک ژن)، کمترین تعداد چترچه را در چتر داشتند. میانگین وزن هزار دانه اکسشن‌های مورد بررسی ۵/۸۱ گرم بود که اکسشن‌های ۱۴۶۵۰ (لرستان) و ۲۲۰۸۴ (سیستان و بلوچستان)، بیشترین وزن هزاردانه را داشتند و در گروه a قرار گرفتند. همچنین اکسشن ۲۶۸۶۶ (هرمزگان) با کمترین میزان وزن هزاردانه در گروه e قرار گرفت. میانگین تعداد دانه در چترچه اکسشن‌های مورد بررسی ۲۱/۵۳ عدد بود. اکسشن ۱۴۶۵۰ (لرستان)، بیشترین تعداد دانه در چترچه را به خود اختصاص داد و اکسشن ۳۰۴۰۶ (بانک ژن)، کمترین تعداد دانه را در چترچه داشت. میانگین وزن خشک بوته اکسشن‌های مورد بررسی ۱۸/۹۵ گرم بود که اکسشن ۱۴۶۵۰ (لرستان)، بیشترین وزن خشک بوته را داشت و در گروه a قرار گرفت. همچنین اکسشن ۲۴۴۸۲ (هرمزگان)، با کمترین وزن خشک هر بوته در گروه d قرار گرفت.

جدول ۵- همبستگی صفات مورفولوژیکی مورد مطالعه

	HP (ارتفاع بوته)	NMS (تعداد ساقه اصلی)	NLS (تعداد ساقه فرعی)	NUPP (تعداد چتردر بوته)	LL (طول برگ)	FSL (طول ساقه گل- دهنده)	NFU (تعداد گل در چترچه)	NMU (تعداد چترچه در چتر)	TWS (وزن هزاردانه)	NSU (تعداد دانه در چترچه)
NMS	-۰/۲۶۳									
NLS	-۰/۵۰۰*	۰/۶۱۸*								
NUPP	-۰/۶۰۰*	۰/۲۲۸	۰/۵۵۱*							
LL	-۰/۱۲۹	۰/۰۱۰	۰/۲۹۲	۰/۲۴۴						
FSL	۰/۰۵۶	-۰/۰۰۱	۰/۰۹۲	-۰/۰۶۵	۰/۱۰۲					
NFU	-۰/۰۳۹	۰/۳۴۶	۰/۴۷۳	۰/۱۳۵	۰/۷۰۳**	۰/۱۹۰				
NMU	۰/۱۲۳	۰/۳۰۶	۰/۵۴۷*	۰/۴۷۵	۰/۸۱۱**	۰/۱۴۸	۰/۷۹۹**			
TWS	۰/۰۷۸	-۰/۱۴۹	۰/۰۴۷	-۰/۰۴۸	-۰/۰۵۳	-۰/۲۹۳	-۰/۰۵۲	۰/۰۲۳		
NSU	۰/۳۵۲	-۰/۴۳۳	-۰/۰۷۷	-۰/۰۰۲	۰/۶۱۹*	۰/۰۲۷	۰/۴۶۴	۰/۴۷۳	۰/۲۵۸	
DWPP	۰/۶۲۲*	-۰/۲۰۲	-۰/۲۹۱	-۰/۵۹۴*	۰/۱۷۵	۰/۱۷۳	۰/۱۸۵	۰/۱۴۴	۰/۳۱۸	۰/۳۳۹

*: اختلاف در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار

اجزاء واریانس ژنتیکی

با توجه به پارامترهای ژنتیکی به دست آمده (جدول ۶) برای صفات ریخت‌شناختی، بیشترین مقدار ضریب تنوع ژنتیکی ۳۹ برای صفت تعداد چتر در بوته و کمترین مقدار آن برابر ۸/۸۱ برای صفت وزن هزار دانه بود. بالاترین

مقدار ضریب تنوع فنوتیپی ۴۹/۵۰ برای صفت تعداد چتر در بوته و کمترین آن ۱۰/۸۲ برای تعداد ساقه اصلی محاسبه شد. بزرگترین مقدار وراثت‌پذیری عمومی با ۷۱/۳۴ درصد برای ساقه اصلی و کمترین وراثت‌پذیری با ۱۷/۹۴ درصد برای تعداد دانه در چترچه محاسبه شد.

جدول ۶- نتایج برآورد اجزاء واریانس، ضریب تنوع و قابلیت توارث صفات برای اکسشن‌های رازیانه

صفات	برآورد اجزاء واریانس					وراثت‌پذیری عمومی (%)
	فنوتیپی	ژنتیکی	محیطی	ژنتیکی	ضریب تنوع	
ارتفاع بوته	۲۸۵/۴۴	۸۰/۰۶	۲۰۵/۳۷	۱۰/۳۹	۱۹/۶۲	۲۸/۰۴
تعداد ساقه اصلی	۰/۲۶	۰/۱۹	۰/۰۷	۹/۱۴	۱۰/۸۲	۷۱/۳۴
تعداد ساقه فرعی	۰/۸۱	۰/۵۷	۰/۲۳	۱۰/۵۷	۱۲/۵۲	۷۱/۳۰
تعداد چتر در بوته	۴۷/۰۵	۲۹/۲۱	۱۷/۸۳	۳۹/۰۰	۴۹/۵۰	۶۲/۰۹
طول برگ	۱/۴۶	۰/۶۷	۰/۷۸	۲۳/۲۴	۳۴/۰۷	۴۶/۵۳
طول ساقه گل‌دهنده	۱/۳۱	۰/۶۵	۰/۶۵	۹/۸۲	۱۳/۹۰	۴۹/۹۱
تعداد گل در چترچه	۱۸/۸۷	۹/۴۷	۹/۴۰	۱۴/۲۰	۲۰/۰۴	۵۰/۱۹
تعداد چترچه در چتر	۸/۶۸	۵/۵۷	۳/۱۱	۱۶/۳۶	۲۰/۴۳	۶۴/۱۲
وزن هزاردانه	۰/۲۶	۰/۱۴	۰/۱۲	۸/۸۱	۱۲/۰۶	۵۲/۴۴
تعداد دانه در چترچه	۲۶/۹۱	۴/۸۲	۲۲/۰۸	۱۱/۰۴	۲۶/۰۸	۱۷/۹۴
وزن خشک بوته	۱۳/۱۵	۳/۳۶	۹/۷۹	۱۰/۵۰	۲۰/۹۷	۲۵/۵۴

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

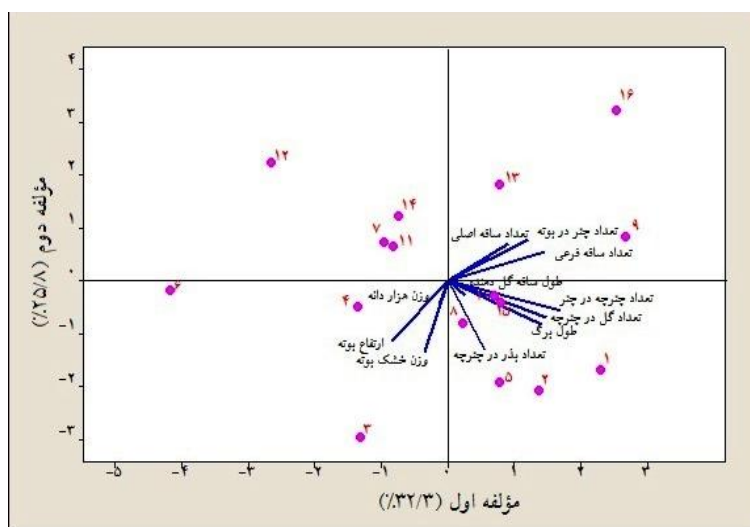
برای تعیین میزان سهم صفات مورفولوژیک در واریانس کل تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام شد. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، مقادیر ویژه حاصل از مؤلفه‌های ۱ تا ۴ بیشتر از یک بود و در مجموع ۸۱/۴۰ درصد از واریانس کل متغیرها را توجیه کردند (جدول ۷). مؤلفه اول روی صفات تعداد ساقه فرعی، تعداد چتر در بوته، طول برگ، تعداد گل در چترچه و تعداد چترچه در چتر مؤثر بود. در مؤلفه دوم صفات ارتفاع بوته، تعداد دانه در چترچه و وزن خشک بوته اثر داشتند. در مؤلفه سوم صفات طول ساقه گل‌دهنده و وزن هزار دانه مؤثرند و در مؤلفه چهارم صفت تعداد ساقه اصلی تأثیر داشت. دیاگرام

پراکنشی اکسشن‌ها با توجه به مؤلفه اول و دوم (شکل ۱) نشان داد که اکسشن‌های ۳ (لرستان)، ۴ (مرکزی) و ۶ (اردبیل)، بر اساس این دو مؤلفه وزن هزار دانه، ارتفاع و وزن خشک بوته بیشتری نسبت به دیگر اکسشن‌ها داشتند، همچنین اکسشن‌های ۹ (تهران ۲)، ۱۳ (هرمزگان ۲) و ۱۶ (بانک ژن ۲) بر اساس این دو مؤلفه تعداد ساقه اصلی، تعداد ساقه فرعی و تعداد چتر در بوته بیشتری داشتند. اکسشن‌های ۱ (مازندران)، ۲ (کرمانشاه)، ۵ (یزد)، ۸ (تهران ۱)، ۱۰ (سیستان و بلوچستان) و ۱۵ (قزوین) بیشترین طول برگ، طول ساقه گل‌دهنده، تعداد گل در چترچه، تعداد چترچه در چتر و تعداد دانه را در چترچه داشتند.

جدول ۷- ماتریس ضرایب مؤلفه‌ها در صفات مورفولوژیک

صفات	مؤلفه ۱	مؤلفه ۲	مؤلفه ۳	مؤلفه ۴
ارتفاع بوته	-۰/۲۳۸	-۰/۴۰۳	۰/۱۷۷	-۰/۱۴۶
تعداد ساقه اصلی	۰/۲۵۳	۰/۲۵۴	۰/۳۲۵	-۰/۵۳۴
تعداد ساقه فرعی	۰/۴۱۳	۰/۱۹۷	۰/۰۲۹	-۰/۲۸۶
تعداد چتر در بوته	۰/۳۳۷	۰/۲۷۶	-۰/۲۹۶	-۰/۲۳۵
طول برگ	۰/۳۹۳	-۰/۲۸۷	-۰/۰۶۵	-۰/۲۲۰
طول ساقه گل‌دهنده	۰/۰۷۴	-۰/۰۹۶	۰/۵۸۵	-۰/۲۷۱
تعداد گل در چترچه	۰/۴۱۷	-۰/۲۴۱	۰/۱۷۰	-۰/۱۱۰
تعداد چترچه در چتر	۰/۴۷۵	-۰/۲۰۰	-۰/۰۰۴	-۰/۰۲۴
وزن هزاردانه	-۰/۰۳۸	-۰/۱۶۰	-۰/۵۴۱	-۰/۵۰۴
تعداد دانه در چترچه	۰/۱۵۵	-۰/۴۶۶	-۰/۲۸۴	-۰/۲۴۲
وزن خشک بوته	-۰/۰۹۹	-۰/۴۷۶	۰/۱۶۱	-۰/۳۳۲
مقادیر ویژه	۳/۵۵	۲/۸۳	۱/۴۰	۱/۱۷
درصد واریانس	۳۲/۳۰	۲۵/۵۰	۱۲/۸۰	۱۰/۶۰
درصد واریانس تجمعی	۳۲/۳۰	۵۸/۱۰	۷۰/۸۰	۸۱/۴۰

ضرایبی که زیر آنها خط کشیده شده است معنی‌دار می‌باشند.



شکل ۱- دیاگرام پراکنشی اکسشن‌ها بر اساس مؤلفه اول و دوم در صفات مورفولوژیک

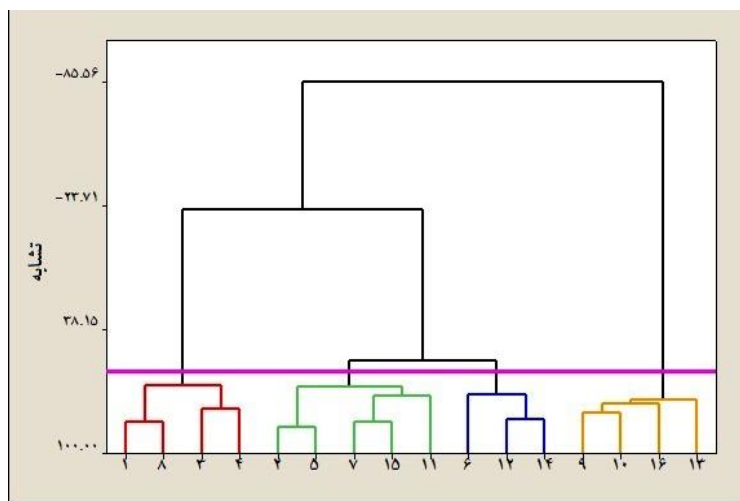
تجزیه خوشه‌ای

با استفاده از میانگین به‌دست آمده برای صفات در اکسشن‌های مورد مطالعه به‌روش Ward تجزیه خوشه‌ای انجام شد، دندروگرام حاصل از این گروه‌بندی در شکل ۲ نشان داده شد.

همچنانکه ملاحظه می‌شود، اکسشن‌های مورد مطالعه به چهار

گروه تقسیم شدند. گروه اول اکسشن‌های شماره ۹ (تهران ۲)، ۱۰ (سیستان و بلوچستان)، ۱۳ (هرمزگان ۲) و ۱۶ (بانک ژن ۲)، گروه دوم اکسشن‌های ۶ (اردبیل ۱)، ۱۲ (بانک ژن ۱) و

۱۴ (هرمزگان ۳)، گروه سوم شامل اکسشن‌های ۲ (کرمانشاه)، ۵ (یزد)، ۷ (اردبیل ۲)، ۱۱ (هرمزگان ۱) و ۱۵ (قزوین) بود و ۴ (مرکزی) و ۸ (تهران ۱) اکسشن‌های گروه چهارم عبارتند از: ۱ (مازندران)، ۳ (لرستان)،

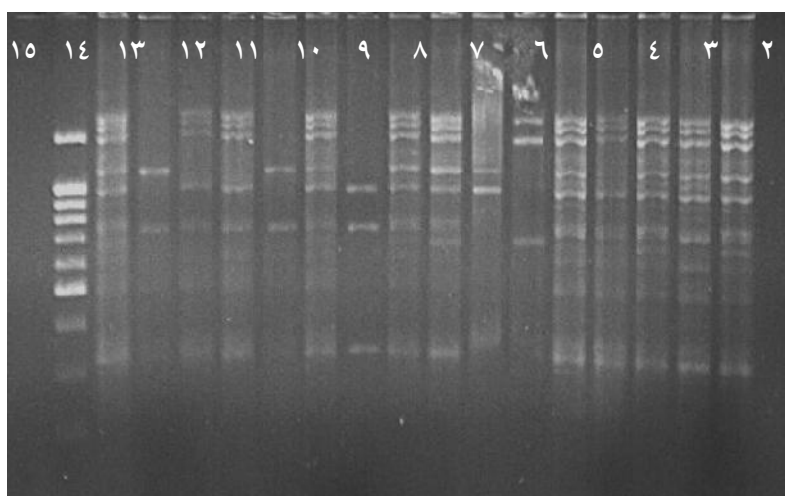


شکل ۲- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای صفات مورفولوژیک برای اکسشن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش Ward

تکثیر شده برای ۱۵ آغازگر برابر ۳۵/۵۳ بود. آغازگرهای SC5 و SC29 به ترتیب با ۱۰ و ۹ باند بیشترین تعداد و آغازگرهای SC10، SC26 و SC44 با ۲ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند. اکسشن ۳ (لرستان) بیشترین باند (۴۷) و اکسشن ۱۲ (بانک ژن ۱) کمترین باند (۲۲) را در بین اکسشن‌های مورد بررسی داشتند. شکل ۳ الگوی باندهای ۱۶ اکسشن مورد بررسی با استفاده از آغازگر SC5 را نشان می‌دهد.

ب- بررسی چند شکلی نشانگر مولکولی SCoT

تنوع ژنتیکی اکسشن‌های مورد مطالعه با استفاده از ۱۰ آغازگر SCoT بررسی شد. آغازگرهای SCoT در مجموع توانستند ۵۵ باند تولید کنند که از این تعداد، ۴ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند. میانگین تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر برای اکسشن‌ها برابر ۳/۴۳ بود. همچنین آغازگرهای SCoT در مجموع تعداد ۵۳۳ مکان را تکثیر کردند که میانگین تعداد مکان



شکل ۳ - تصویر ژل الکتروفورزی اکسشن‌های مورد بررسی برای آغازگر SCoT5

جدول ۸ - درصد چند شکلی، تعداد کل باند، محتوای اطلاعات چند شکلی، شاخص نشانگری، نسبت چندگانه مؤثر و شاخص قدرت تفکیک در آغازگرهای مورد بررسی

کد آغازگر	توالی آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC	MI	EMR	RP
SC36	5'-GCAACAATGGCTACCAC-3'	۵	۳	٪۶۰	۰/۲۴	۰/۴۳	۱/۸۰	۴
SC35	5'-CATGGCTACCACCGGCC-3'	۳	۳	٪۱۰۰	۰/۳۰	۰/۹۰	۳	۴/۲۵
SC44	5'-CAATGGCTACCATTAGCC-3'	۲	۲	٪۱۰۰	۰/۴۲	۰/۸۵	۲	۲/۷۵
SC63	5'-ACCATGGCTACCACGGG-3'	۹	۹	٪۱۰۰	۰/۴۲	۳/۸۵	۹	۱۰/۶۲
SC26	5'-CACCATGGCTACCACCAT-3'	۲	۲	٪۱۰۰	۰/۴۲	۰/۸۴	۲	۲/۷۵
SC20	5'-ACCATGGCTACCACCGC-3'	۷	۷	٪۱۰۰	۰/۴۱	۲/۹۳	۷	۶/۵۰
SC15	5'-CCATGGCTACCACCGGC-3'	۸	۸	٪۱۰۰	۰/۴۴	۳/۵۷	۸	۸/۲۵
SC11	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	۷	۶	٪۸۵/۷۱	۰/۳۹	۲/۰۱	۵/۱۴	۵/۸۷
SC5	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	۱۰	۹	٪۹۰	۰/۲۶	۲/۱۱	۸/۱۰	۱۱/۸۷
SC10	5'-CAACAATGGCTACCAGC-3'	۲	۲	٪۱۰۰	۰/۳۶	۰/۷۳	۲	۱/۷۵
میانگین		۵/۵	۵/۱	۹۳/۵۷	۳۶/۶	۱/۸۲	۴/۸۰	۵/۸۶

محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR) و شاخص قدرت تفکیک (RP)

جدول ۹ - ماتریس تشابه اکسشن‌ها برای پرایمرهای SCoT استفاده شده بر اساس ضریب جاکارد

	مازندران	کرمانشاه	لرستان	مرکزی	یزد	اردبیل ۱	اردبیل ۲	تهران ۱	تهران ۲	سیستان	هرمزگان	بانک زن ۱	هرمزگان ۲	هرمزگان ۳	قزوین	بانک زن ۲
مازندران	۱															
کرمانشاه	۰/۷۳	۱														
لرستان	۰/۸۵	۰/۸	۱													
مرکزی	۰/۷۷	۰/۶۸	۰/۸۳	۱												
یزد	۰/۸۷	۰/۷۴	۰/۸۹	۰/۷۹	۱											
اردبیل ۱	۰/۷	۰/۵۶	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۷۵	۱										
اردبیل ۲	۰/۶۹	۰/۵۵	۰/۷۳	۰/۶۳	۰/۷۷	۰/۸۸	۱									
تهران ۱	۰/۷۹	۰/۶۸	۰/۸۲	۰/۷۸	۰/۸۱	۰/۷۴	۰/۷۳	۱								
تهران ۲	۰/۷۴	۰/۸۵	۰/۷۷	۰/۶۷	۰/۷۸	۰/۵۲	۰/۵۸	۰/۶۹	۱							
سیستان	۰/۶۹	۰/۶۲	۰/۷۳	۰/۶۴	۰/۶۶	۰/۶۸	۰/۶۷	۰/۶۴	۰/۶۴	۱						
هرمزگان	۰/۶۹	۰/۷۹	۰/۷۵	۰/۷۲	۰/۶۸	۰/۵۶	۰/۶۲	۰/۶۹	۰/۷۸	۰/۵۹	۱					
بانک زن ۱	۰/۵۹	۰/۶۳	۰/۶۱	۰/۵۸	۰/۵۸	۰/۶۷	۰/۷۳	۰/۵۵	۰/۶۲	۰/۶۵	۰/۶	۱				
هرمزگان ۲	۰/۷۱	۰/۵۸	۰/۷۹	۰/۸۱	۰/۷۵	۰/۶	۰/۵۹	۰/۷۷	۰/۶۳	۰/۶۶	۰/۵۸	۰/۵	۱			
هرمزگان ۳	۰/۶۷	۰/۷۷	۰/۷۳	۰/۷	۰/۶۸	۰/۵۱	۰/۵۷	۰/۶۱	۰/۷۹	۰/۵۷	۰/۶۹	۰/۶۵	۰/۶۶	۱		
قزوین	۰/۴۷	۰/۴۲	۰/۵۲	۰/۴۷	۰/۴۶	۰/۴۳	۰/۵۴	۰/۴۵	۰/۴۸	۰/۵۵	۰/۴۸	۰/۴۵	۰/۶۴	۰/۵۴	۱	
بانک زن ۲	۰/۶۹	۰/۷۴	۰/۷۸	۰/۷۶	۰/۷۶	۰/۵۵	۰/۶۳	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۵۵	۰/۷۲	۰/۶۵	۰/۶۹	۰/۷۳	۰/۵۱	۱

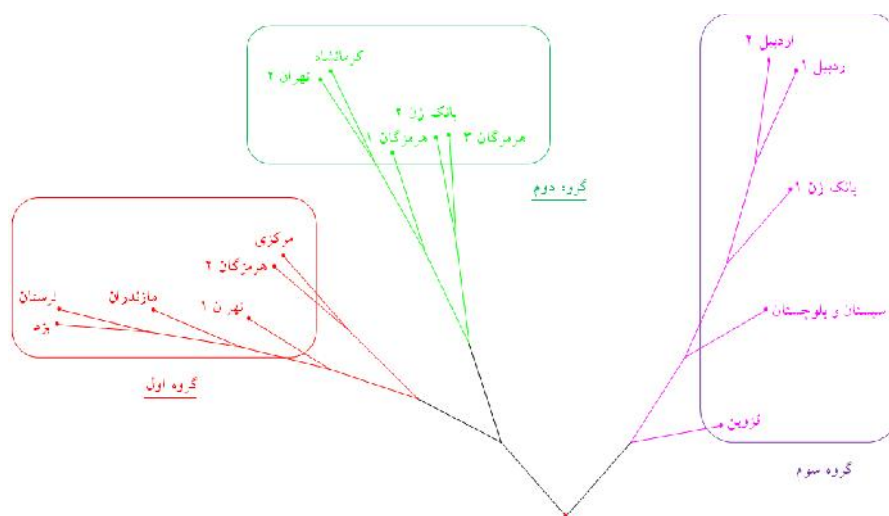
ماتریس تشابه

تشابه ژنتیکی اکسشن‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از ۰/۴۲ تا ۰/۸۸ متغیر بود (جدول ۹)، میانگین تشابه بین اکسشن‌ها برابر ۰/۶۷ بود که نشان‌دهنده وجود تنوع قابل قبول در بین اکسشن‌های رازیانه بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. بیشترین تشابه را اکسشن ۳ (لرستان) با ۵ (یزد)، و کمترین تشابه را اکسشن ۱۵ (قزوین) با ۲ (کرمانشاه) داشت.

تجزیه خوشه‌ای داده‌های ملکولی

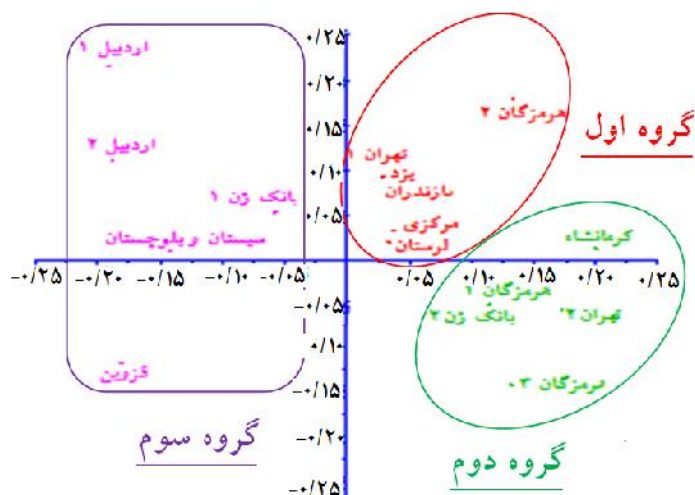
نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای اکسشن‌ها در شکل ۴ ارائه شده است. اکسشن‌های مورد مطالعه در ۳ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل اکسشن‌های ۱ (مازندران)، ۳ (لرستان)، ۴ (مرکزی)، ۵ (یزد)، ۸ (تهران) و ۱۳ (هرمزگان) بود. در گروه دوم اکسشن‌های ۲ (کرمانشاه)، ۹ (تهران)، ۱۱ (هرمزگان)، ۱۴ (هرمزگان) و ۳ (بانک ژن) قرار گرفتند. گروه سوم شامل اکسشن‌های ۶ (اردبیل)، ۷ (اردبیل)، ۱۰ (سیستان و بلوچستان)، ۱۲ (بانک ژن) و ۱۵ (قزوین) بود.

نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۸ ارائه شده است. میانگین درصد چند شکل در بین اکسشن‌های مورد بررسی برابر ۹۳/۵۷ درصد بود که کمترین درصد چند شکلی را آغازگر SC36 (۶۰٪) داشت. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۰/۳۶ بود که بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای SC15، SC44، SC63، SC28 و SC26 بود که این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) توانستند فاصله ژنتیکی اکسشن‌ها را مشخص کنند. آغازگرهای SC36 و SC5 با کمترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) توانایی خوبی در جداسازی اکسشن‌ها نداشتند. میانگین شاخص قدرت تفکیک (RP) برابر ۵/۸۶ بود که آغازگرهای SC5، SC15 و SC63 بیشترین میزان و آغازگر SC10، SC44 و SC26 کمترین میزان را داشتند. همچنین میانگین شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) به ترتیب برابر ۱/۸۲ و ۴/۸۰ بود. بیشترین میزان شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) را آغازگرهای SC5، SC63 و SC15 و کمترین میزان را آغازگرهای SC44، SC10 و SC26 داشتند.



شکل ۴ - دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر SCoT برای اکسشن‌های مورد مطالعه

مجموع ۳۲/۷۰ درصد از واریانس با این دو محور بیان گردید. بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی اکسشن‌ها رسم شد (شکل ۵). این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت و اکسشن‌ها به سه گروه تقسیم شدند.



شکل ۵ - بای پلات اکسشن‌ها برای نشانگر SCoT بر اساس محور مختصات اصلی اول و دوم

کافی بین نمونه‌ها وجود دارد و می‌توان در بین اکسشن‌ها برای صفات اقدام به گزینش و انتخاب کرد. در مطالعه Bahmani و همکاران (۲۰۱۱) تنوع مورفولوژی ۵۰ اکسشن رازیانه با اندازه‌گیری ۲۶ صفت مختلف در دو سال متوالی مورد بررسی قرار گرفت و نشان دادند که اثر سال در اکسشن معنی‌دار است و بین اکسشن‌های رازیانه از نظر صفات بررسی شده در هر سال اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین Sharma و Meena (۲۰۱۳) تنوع ژنتیکی ۱۲ گونه رازیانه را بر اساس ۸ صفت مورفولوژیکی بررسی و نشان دادند که تنوع معنی‌داری در بین کلیه صفات وجود داشت و در نهایت با استفاده از تجزیه خوشه‌ای واریته‌ها را در ۵ گروه تقسیم‌بندی کردند. مقایسه میانگین صفات نشان داد که اکسشن ۱۴۶۵۰ (لرستان) به دلیل ارتفاع، وزن هزار دانه و تعداد دانه در چترچه بیشتر نسبت به سایر اکسشن‌ها، از نظر تولیدی مناسب‌تر می‌باشد. همچنین اکسشن‌های

ارتباط میان نشانگرها

ضریب همبستگی بین ماتریس‌های تشابه ژنتیکی نشانگر مولکولی SCoT و صفات مورفولوژیکی اکسشن‌های رازیانه با استفاده از آزمون مانتل (Mantel, 1976) محاسبه شد. نتایج نشان داد که همبستگی بین ماتریس‌های تشابه بسیار کم بود و از نظر آماری نیز این همبستگی معنی‌دار نبود ($R^2=0.16^{ns}$).

بحث

نتایج حاصل از آزمایش‌های زراعی نشان داد از لحاظ تمامی صفات اندازه‌گیری شده با شدت و ضعف متفاوت در میان تمامی اکسشن‌ها اختلاف وجود داشت. این اختلاف در میان بعضی توده‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود؛ که این مطلب با نتایج مقایسه میانگین انجام شده مطابقت داشت. اکسشن‌ها در گروه‌های مختلفی قرار گرفتند. بنابراین تنوع

۱۸۸۷۰ (تهران) و ۲۲۰۸۴ (سیستان و بلوچستان) کمترین ارتفاع را داشتند. از این رو در صورت ایجاد ارقام پاکوتاه می توان از آنها به عنوان یک والد در تلاقی ها استفاده کرد. در بررسی Safaei و همکاران (۲۰۱۱) تنوع ژنتیکی صفات زراعی، اکسشن های برتر رازیانه از نظر صفات ارتفاع بوته، تعداد شاخه فرعی، تعداد گل آذین، تعداد چترک، تعداد گل در چترک و وزن هزاردانه با استفاده از مقایسه میانگین معرفی شد. همبستگی فنوتیپی صفات نشان داد که در شرایط آبی بین صفت ارتفاع گیاه با وزن خشک بوته، تعداد ساقه اصلی با تعداد ساقه فرعی، تعداد ساقه فرعی با تعداد چتر در بوته و تعداد چترچه در چتر همبستگی مثبت و معنی داری وجود داشت و برای صفت طول برگ با تعداد دانه در چترچه و تعداد گل در چترچه، تعداد گل در چترچه با صفت تعداد چترچه در چتر نیز همبستگی معنی دار و مثبتی با شدت بیشتری وجود داشت. این موضوع نشانگر این است که می توان به صورت غیر مستقیم از طریق این صفات نسبت به گزینش اقدام کرد. در گزارشی از Safaei و همکاران (۲۰۱۴) عملکرد گیاه همبستگی مثبت و معنی داری با صفات روز تا رسیدگی کامل، تعداد چترک و درصد اسانس مشاهده شد. با مقایسه عملکرد دانه و اجزاء مرتبط با آن در اکسشن های رازیانه نشان داده شد که اکسشن ها از نظر کلیه صفات مورد مطالعه به جز صفت تعداد شاخه فرعی، تفاوت معنی داری داشتند. نتایج ضرایب همبستگی صفات نشان داد که وزن هزار دانه، تعداد روز تا رسیدگی کامل و تعداد چترک در گیاه همبستگی مثبت و معنی داری با عملکرد دانه در مترمربع داشتند. همچنین Zhahid و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه صفات ریختی و میزان روغن اکسشن های رازیانه جمع آوری شده از مناطق مختلف پاکستان نشان دادند که اکسشن های رازیانه از نظر تمام صفات مورد بررسی تفاوت معنی داری داشتند و بین صفات میزان روغن، تعداد چتر در هر گیاه، وزن گیاه و وزن چتر همبستگی مثبت وجود داشت. با توجه به اینکه در یک ساختار چند متغیره، تجزیه های چند متغیره قادر به تفسیر آسانتر ساختار موجود در میان داده ها می باشند، در تجزیه به مؤلفه ها، بر اساس چهار مؤلفه اصلی

۸۱/۴۰ درصد از واریانس کل متغیرها توجیه شد و از آنجایی که دو مؤلفه اصلی اول تنها ۵۸/۱۰ درصد تغییرات کل بین اکسشن ها را توجیه می کرد، گروه بندی براساس این دو مؤلفه اصلی کارایی زیادی نخواهد داشت و گروه بندی از طریق روش تجزیه خوشه ای انجام شد. در مطالعه Safaei و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های رازیانه، با استفاده از تجزیه به مؤلفه های اصلی گزارش کردند که چهار مؤلفه اول در تجزیه به مؤلفه های اصلی ۸۵ درصد از کل واریانس متغیرها را توجیه کردند. صفات تعداد شاخه فرعی، تعداد گل عقیم، عملکرد دانه، وزن ۱۰۰۰ دانه، روز تا ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد گلدهی، روز تا رسیدگی کامل و ارتفاع در ۵۰ درصد گلدهی عمده ترین نقش را در تبیین مؤلفه اول داشتند. در مؤلفه دوم، صفات ارتفاع در ۱۰۰ درصد گلدهی، درصد اسانس و درصد خاکستر اهمیت بیشتری داشتند. در مؤلفه سوم صفات تعداد چترک و تعداد گل در چترک و در مؤلفه چهارم صفت تعداد گل آذین بیشترین اهمیت را در تبیین این مؤلفه ها داشتند. با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه خوشه ای و گروه بندی حاصل از آن اکسشن ها در ۴ گروه قرار گرفتند. به منظور بررسی تنوع ژنوتیپ های رازیانه، براساس تجزیه خوشه ای ۱۲ ژنوتیپ مورد بررسی در سه دسته مختلف قرار گرفتند و گزارش شد که اختلاف چشمگیری به ویژه در عملکرد بذر، درصد اسانس، زمان رسیدگی و ارتفاع گیاه در بین گروه ها وجود داشت. همچنین Maghsoudi و همکاران (۲۰۱۱) بر اساس تجزیه خوشه ای، ۱۵ توده رازیانه بررسی شده را در ۴ دسته قرار دادند و اختلاف معنی داری را به ویژه در عملکرد بذر، زمان رسیدگی و ارتفاع گیاه در بین خوشه ها گزارش کردند. در نهایت با توجه به ارزیابی های آماری انجام شده بر روی صفات مورفولوژیک و بر اساس آزمون دانکن، اکسشن ۱۴۶۵۰ (لرستان) برتر از اکسشن های دیگر بود و با در نظر گرفتن اینکه پژوهش در شرایط آب هوایی استان کرمانشاه انجام شد، بر اساس صفات مهم اقتصادی می توان این اکسشن را برای کشت در منطقه پیشنهاد کرد. از طرف دیگر محققان می توانند این اکسشن را به عنوان مواد ژنتیکی

۲۵۰ نوار چند شکلی نشان داده و آغازگر E11-M20 با تعداد ۲۰ باند و آغازگرهای ETG-M20 و E46-M35 با تعداد ۸ باند به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد نوار چندشکلی را به خود اختصاص دادند. میانگین تشابه بین اکسشن‌ها برابر ۰/۶۶ بود که نشان‌دهنده وجود تنوع قابل قبول در بین اکسشن‌های رازیانه بر اساس آغازگرهای مورد بررسی بود. بنابراین پیشنهاد می‌شود از اکسشن‌هایی که حداکثر فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مورد استفاده داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. در تحقیق Hasani و همکاران (۲۰۱۱) بر روی رازیانه با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP گزارش شد که میزان شباهت ژنتیکی مشاهده شده بر اساس اطلاعات این نشانگر برابر ۶۰ درصد بود. به طوری که بیشترین شباهت ژنتیکی مشاهده شده بین دو ژنوتیپ از کشور مجارستان برابر ۹۷ درصد و در نمونه‌های ایرانی مربوط به دو اکسشن از شهرهای کرج و کاشان برابر ۸۹ درصد بود. بر اساس تجزیه خوشه‌ای اکسشن‌ها در ۳ گروه قرار گرفتند که نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت و اکسشن‌ها به سه گروه تقسیم شدند. همچنین نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطبیق نداشت. در مطالعه Bahmani و همکاران (۲۰۱۲) بر روی ۲۵ اکسشن رازیانه جمع‌آوری شده از سراسر ایران که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از ۱۰ نشانگر RAPD انجام شد گزارش کردند که تعداد ۱۰۴۳ قطعه DNA چند شکل تولید شد. کمترین فاصله ژنتیکی بین اکسشن‌های ساری و کلیبر و بیشترین آن بین اکسشن‌های همدان و اردبیل مشاهده شد. گروه‌بندی این اکسشن‌ها بر اساس اطلاعات آغازگرهای RAPD و با روش UPGMA انجام شد و اکسشن‌ها به ۱۰ گروه تقسیم شدند. این بررسی نشان داد که رازیانه‌های ایران دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند و نشانگر RAPD به خوبی اکسشن‌های رازیانه را بر اساس توزیع جغرافیایی و تشابهات اقلیمی از هم تفکیک کرد. نتایج آزمون مانتل نشان داد که میان دو نشانگر مورد استفاده همبستگی وجود نداشت،

مناسب در برنامه‌های اصلاح نبات استفاده کنند. با استفاده از آغازگرهای SCoT همانطور که مشاهده شد تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین اکسشن‌های رازیانه وجود داشت و چند شکلی مطلوبی بر اساس نشانگر SCoT در بین اکسشن‌ها مشاهده شد. در بررسی Shabaniyan و همکاران (۲۰۱۵) که به منظور تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی جمعیت‌های بلوط ایرانی در جنگل‌های در حال کاهش زاگرس شمالی با استفاده از ۱۰ آغازگر SCoT انجام شد، گزارش شد که از مجموعه ۱۱۳ نوار مشاهده شده ۹۵٪ چند شکل بودند و در سطح گونه نیز این آغازگرها تنوع ژنتیکی بالایی را آشکار کردند. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی فقط ۲۳ درصد از تنوع ژنتیکی کل، ناشی از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها بود. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در نشانگرهای غالب از صفر تا نیم متغیر بود. هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چند شکلی برای آن جایگاه در اکسشن‌های تحت بررسی است. بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم تعداد آلل تأثیرپذیری دارد. با توجه به نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌شود از آغازگرهای SC15، SC44، SC63، SC28 و SC26 که شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، قدرت تفکیک (RP) و درصد چندشکلی بالایی را نشان دادند، برای تجزیه و تحلیل مجموعه ژرم پلاسما دیگر اکسشن‌های رازیانه در تحقیقات بعدی استفاده شود. در مطالعه Zahid و همکاران (۲۰۰۹) که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه رازیانه با استفاده از مارکر RAPD انجام شد، نتیجه گرفتند که از ۳۰ پرایمر مورد استفاده ۲۴ پرایمر دارای پلی مورفیسم بودند. در این مطالعه در مجموع ۱۴۵ باند واضح تشخیص داده شد که ۷۰ باند (۴۸ درصد) آنها پلی مورف بودند. همچنین Hasani و همکاران (۲۰۱۱) با انجام تحقیقی بر روی ۳۰ نمونه بذر رازیانه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران و چندین کشور اروپایی به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی بخشی از ژرم پلاسما این گونه با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP نتیجه گرفتند که از مجموع ۱۱۲۷ نوار مشاهده شده،

- additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. Available at www.biocenter.helsinki.fi/programs/fastpcr.htm.
- Kumar, M., Mishra, G. P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P. K. and Singh, Sh.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.
 - Maghsoudi Kelardashti, H., Rahim Malek, M., Sabzalian, M.H. and Talebi, M., 2014. Study of genetic variability using morphological traits of fennel populations. *Taxonomy and Biosystematics*, 6(18): 77-86. (In Persian)
 - Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
 - Mohamadi, S.A., 2006. Analysis of molecular data in genetic variability research. 9th Congress of Agronomy and Plant Breeding. 96-119.
 - Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants –salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43:1235-1248.
 - Naghavi, M., Gharayazi, B. and Hosseini, G.H., 2007. Molecular markers. Tehran University Publishing. (In Persian)
 - Omid, M. and Farzin, N., 2009. Strategical biotechnology increasing efficiency of medicinal plant. Conference of Food and Biotechnology. Islamic Azad University of Kermanshah. (In Persian).
 - Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
 - Rostaei, M.K., Hassani, M., Hossainpor, T. and Kalate, M., 2014. Stability of grain yield of wheat genotypes in tropical and subtropical region. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 35: (2) (In Persian).
 - Safaei, L., Zainali, H. and Afioni, D., 2011. Study of genetic variability of fennel genotypes using agronomic traits. *Iranian Journal of Rangelands and Forest plant Breeding and Genetic Research*. 19(1): 167-180. (In Persian).
 - Safaei, L., Zainali, H. and Afioni, D., 2014. Grain yield comparison and yield components in fennel genotypes. *Journal of Seed and Seedlings Breeding*, 2(1-3): 289-303 (In Persian).
 - Schaut, J.W., Qi, X. and Stam, P., 1997. Association گزارش‌های متناقضی در زمینه وجود یا عدم وجود رابطه بین نتایج حاصل از نشانگرها وجود دارد، مانند بررسی Schaut و همکاران (۱۹۹۷) که همبستگی غیر معنی‌داری را در بین صفات زراعی و مولکولی جو گزارش کردند و همچنین Hamza و همکاران (۲۰۰۴) ارتباط بالایی را بین نشانگر مولکولی و ریخت‌شناسی در جو گزارش کردند.
- ### سپاسگزاری
- این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام شده است که از این بابت از مسولان مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود. در ضمن کلیه حقوق مادی و معنوی آن متعلق به دانشگاه پیام نور می باشد.
- ### منابع مورد استفاده
- Altintas, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A. and Zkan H O., 2008. Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey Using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 127: 9-14.
 - Bahmani, K., 2001. Study of morphological and genetic diversity of fennel populations. M.Sc. Thesis, Tehran University. Iran. (In Persian)
 - Bahmani, K., Izadi darbandi, A. and Baghchghi, R., 2012. The study of genetic variation Iranian fennel using RAPD molecular marker. Fourteenth Iranian Genetics Congress (In Persian).
 - Chawla, H S., 2000. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers Inc. USA
 - Hamza, S., Hamida, W.B., Rebai, A. and Hrrabi, M., 2004. SSR-based genetic diversity assessment among Tunisian winter barley and relationship with morphological traits. *Euphytica*, 135:107-118.
 - Hasani, M.H., Torabi S., Omid, M., Etminan, A.R. and Dastmalchi T., 2011. The study of genetic variation *Foeniculum vulgare* Mill. Using AFLP molecular marker. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 42(3):597-604. (In Persian).
 - Hou, Y., Yan, Z. and Wei, Y., 2005. Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis Barely. *Genetics Newsletter*, 35:9-22.
 - Izadi Darbandi, A. and Bahmani, K., 2011. Principle of Fennel Cultivation and Breeding. Tamadone Pars Publishing. (In Persian).
 - Kalendar, R., 2007. Fast PCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with

- Torres, A.M., Weeden, N.F. and Martin, A., 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 935-945.
- Zahid, N.Y., Abbasi, N.A., Hafiz, I.A. and Ahmad, Z., 2009. Genetic diversity of indigenous fennel, (*Foeniculum vulgare*. germplasm in Pakistan assessed by RAPD markers. *Pakistan Journal of Botany*, 41(4): 1759-1767.
- Zhaheed, N., Abbasi, A.N., Hafiz, A. and Ahmad, Z., 2008. Morphological characteristics and oil contents of fennel (*Foeniculum vulgare*) accessions from different regions of Pakistan. *Journal Chem. Soc. Pak.*, 30:6.
- between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 1161-1168.
- Shabanian, N., Alikhani, L. and Rahmani, M.S., 2015. Phenotypic and genotypic diversity in rant oak (*Quercus brantii*) populations of declining North-Zagros forests using biochemical characteristics and molecular SCoT marker. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetics Research*, 23(1): 23-29. (In Persian)
- Sharma, M. and Meena, R.S., 2013. Genetic Diversity in Fennel (*Foeniculum vulgare*). *International Journal of Scientific Reaserch*, 2(8): 2277-8179.

Genetic diversity among fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions using morphological and SCoT markers

M. Farshadfar^{1*}, N. Moradzade², E. Farshadfar³ and H. Shirvani⁴

1*- Associ. Prof., Department of Agriculture, Payame Noor University, I.R. Iran Email: mohsenfarshadfar@Yahoo.com

2- M.Sc. in biotechnology, Razi University. Kermanshah, I.R.Iran

3- Prof., Department of Agronomi and Plant breeding. Razi University. Kermanshah, I.R.Iran

4- Lecturer, Department of Agriculture, Payame Noor University, I.R. Iran

Received: 29.10.2016 Accepted: 06.01.2017

Abstract

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) is one of the well-known medicinal and aromatic plants. To determine variability between 16 Iranian fennel accessions based on a molecular marker and morphological traits an experiment was carried out based on a completely randomized design with three replications at Payame Noor University of Kermanshah, Iran, during 2014. Eleven morphological traits were recorded. Genotypes were evaluated based on 10 SCoT primer markers as well. Analysis of variance showed significant differences among the genotypes for the studied characters. Mean comparison according to DMRT was carried out and significant differences were revealed for all of the studied traits ($p < 0.05$). Cluster analyses classified the accessions into four groups. Principle components analysis revealed that 81.4 percent of variance explained by four PCAs. The strongest heritability (%71.37) belonged to main stem. SCoT primers showed 55 visible bands. SC5 and SC29 primers had the most number of bands with 10 and 9 bands respectively. Means of polymorphic information content (PIC=0.36), marker index (MI= 1.82), effective multiplex ratio (EMR= 4.8) and resolving power (RP= 5.86) indices were calculated for all primers. Total genetic similarity based on the primers was 0.66 percent. Cluster analysis classified the accessions into 3 groups. The clustering results was confirmed by principal coordinate analysis.

Key words: *Foeniculum vulgare*, genetic variability, molecular marker, SCoT.