

Assessment of Genetic Variation of *Rubus* spp. in Golestan Province using AFLP Markers

Razieh Kasalkheh ¹, Eisa Jorjani ^{2*}, Hossein Sabouri ³, Meisam Habibi ⁴, Ali Sattarian ⁵

¹ M. Sc Graduate of Systematic Plant, University of Gonbad-e- Kavous, Gonbad-e- Kavous, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

³ Associate Professor, Department of of Plant Productions, Faculty of Agricultural and Natural Resources Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

⁴ Lecturer, Department of Biology, Faculty of Science and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

Abstract

The genus *Rubus*, from the family of Rosaceae Juss, has about 750 species worldwide, of which 8 species and 5 hybrids have been reported from Iran. The present study was conducted to evaluate the genetic diversity of 21 populations of 6 species of *Rubus* from different parts of Golestan province using 9 AFLP primer combinations. Excel and Pop Gen software were used for data analysis. Similarity matrix and cluster analysis were used by PAST software. The dendrogram was plotted based on unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA), using Jaccard's similarity coefficient. The results showed that eight out of nine selected primer combinations had appropriate polymorphic primer combinations. M160-E110 with 0.203 had the highest genetic variation among all used markers. All selected primer combinations found 505 position and 277 loci locations. Based on the results of the dendrogram, the studied populations were divided into two groups. Based on the results of the dendrogram, the studied populations were divided into two groups and the Caspian-Irano-Turanian populations were partially separated from the Caspian populations. According to the results of correlation analysis, the highest number of markers were related to traits of petiole length, terminal leaflet length, lateral leaf length, inflorescence length, lateral leaf width, and peduncle length. Results showed that AFLP marker was highly efficient in the separation and isolation of populations of species of *Rubus* species in this study.

Key words: *Rubus*, Genetic Variation, Golestan, AFLP Markers.

* eisa_jorjani@yahoo.com

بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های تمشک (*Rubus spp.*) در استان گلستان با استفاده از نشانگر AFLP

راضیه کسلخه^۱، عیسی جرجانی^{۲*}، حسین صبوری^۳، میثم حبیبی^۴، علی ستاریان^۵

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوسیستماتیک گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
^۲ استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
^۳ دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
^۴ مربی گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
^۵ دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

چکیده

جنس تمشک (*Rubus*) از خانواده Rosaceae حدود ۷۵۰ گونه در دنیا دارد که ۸ گونه و ۵ دورگه آن از ایران گزارش شده است. پژوهش حاضر به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۱ جمعیت از ۶ گونه جنس *Rubus* در نقاط مختلف استان گلستان با استفاده از ۹ ترکیب آغازگری AFLP انجام شد. نرم‌افزارهای Pop Gen و Excel به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شدند. ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار Past محاسبه و نمودار بر اساس الگوریتم و UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد ترسیم شد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، ۸ ترکیب (از ۹ ترکیب آغازگر بررسی شده) چندشکلی مناسبی نشان دادند. از بین ترکیب‌های آغازگری، M160-E110 با مقدار ۰/۲۰۳، بیشترین میزان تنوع ژنتیکی را نشان داد و برای بررسی تنوع ژنتیکی بهتر است. آغازگرها در مجموع توانستند ۵۰۵ مکان را شناسایی کنند که ۲۷۷ مکان از آنها، چندشکلی نشان دادند. بر اساس نتایج نمودار، جمعیت‌های مطالعه‌شده به دو گروه تقسیم شدند و جمعیت‌های ناحیه خزری و ایرانی - تورانی تا حدودی از جمعیت‌های متعلق به ناحیه خزری جدا شدند. طبق نتایج تجزیه ارتباط، بیشترین تعداد نشانگرها با صفت‌های طول دمبرگ، طول برگچه انتهایی، طول برگچه جانبی، طول گل‌آذین، عرض برگچه جانبی و طول دمگل ارتباط داشتند. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند نشانگر AFLP کارایی زیادی در جداسازی جمعیت‌های گونه‌های بررسی شده از جنس *Rubus* دارد.

واژه‌های کلیدی: تمشک، تنوع ژنتیکی، گلستان، نشانگر AFLP.

مقدمه

جنس تمشک (*Rubus L.*) به تیره Rosaceae و زیرتیره Rosoideae تعلق دارد و شامل حدود ۷۵۰

* eisa_jorjani@yahoo.com

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

Doi: [10.22108/tbj.2019.114450.1082](https://doi.org/10.22108/tbj.2019.114450.1082)

مترادف *Rubus ulmifolius* Schott در نظر گرفته شده است (IPNI, 2019).

تمشک یکی از پرچالش‌ترین جنس‌ها بین گیاهان گل‌دار است (Aalders and Hall, 1966; Robertson, 1974; Lu, 1983; Richards *et al.*, 1996). این چالش‌ها از وجود فرایندهای زیست‌شناختی نظیر پلی‌پلوئیدی، آپومیکسی و دورگه‌گیری زیاد بین گونه‌های یک زیرجنس یا گونه‌های زیرجنس‌های مختلف ناشی می‌شوند و به نظر می‌رسد استفاده از صفات ریخت‌شناختی به‌تنهایی در روشن‌شدن وضعیت رده‌بندی این جنس کارایی نداشته باشد (Gustafsson, 1942; Weber, 1995).

نشانگرهای مولکولی از جمله AFLP، RAPD (Marulanda *et al.*, 2007) و SSRs (Marulanda *et al.*, 2011) برای مطالعه تنوع ژنتیکی گونه‌های تمشک در ناحیه کوه‌های آند (Andean) استفاده شده‌اند؛ همچنین Marulanda و همکاران (۲۰۰۷) و López و Marulanda (۲۰۰۹) گونه *R. glaucus* L. را در بررسی تنوع ژنتیکی تمشک‌های سیاه کلمبیا به کار گرفته‌اند. نتایج بررسی‌های یادشده نشان می‌دهند تولیدمثل جنسی نقش مهمی در حفظ تنوع ژنتیکی بازی می‌کند و همه گونه‌ها باتوجه‌به الگوی نواربندی بسیار ویژه‌ای که ایجاد می‌کنند، از یکدیگر افتراق می‌یابند. هر دو نشانگر AFLP و SSR باندهای منحصربه‌فردی را برای هریک از گونه‌های *R. urticifolius* Poir.، *R. robustus* C. Presl. و *R. glaucus* و *R. rosifolius* Sm. نشان می‌دهند و نشانگر SSR جمعیت‌های دیپلوئید و تتراپلوئید را از یکدیگر تفکیک می‌کند.

گونه در دنیا است (Robertson, 1974; Lu, 1983; Gu *et al.*, 1993; Thompson, 1995) که در بیشتر نواحی جهان به‌جز ناحیه قطب جنوب پراکنش دارند (Focke, 1910, 1911, 1914; Hummer, 1996). گونه‌های مختلف این جنس با داشتن میوه‌های خوراکی و ارزش تزئینی از نظر اقتصادی و بوم‌شناسی اهمیت دارند؛ همچنین گیاهانی هرز و مهاجمند و نقش اساسی در شکل‌گیری توالی اولیه جنگل دارند (Thompson, 1995). این جنس با داشتن شکل رویشی درختچه‌ای و رونده، ساقه خاردار و میوه خوراکی از نوع شفت مجتمع متشکل از شفتچه‌های کوچک به‌آسانی تشخیص داده می‌شود؛ گرچه تشخیص گونه‌ها باتوجه‌به تنوع ریخت‌شناختی جمعیت‌ها بسیار مشکل است.

Focke (۱۹۱۰، ۱۹۱۱ و ۱۹۱۴) این جنس را به ۱۲ زیرجنس طبقه‌بندی کرده است که بزرگ‌ترین زیرجنس آن، *Rubus* با ۶ بخش و ۱۳۲ گونه و کوچک‌ترین زیرجنس آن، *Chamaemorus* با یک گونه است. زیرجنس *Rubus* شامل گونه‌هایی است که در اروپا، آسیا و آمریکای شمالی یافت می‌شوند (Ballington *et al.*, 1993). Khatamsaz (۱۹۹۲) ۸ گونه و ۵ دورگه این جنس را که به دو زیرجنس *Rubus* L. و *Cylactis* Raf. تعلق دارند، از ایران نام برده است؛ *R. saxatilis* L. تنها گونه علفی این جنس در ایران است که به زیرجنس *Cylactis* تعلق دارد و ۷ گونه *R. discolor* Weihe & *R. caesius* L.، *R. hirtus* Waldst. & *R. dolichocarpus* Juz.، *R. persicus* Boiss.، *R. hyrcanus* Juz. & *R. sanctus* Schreb. به زیرجنس *Rubus* تعلق دارند. گفتنی است بین گونه‌های معرفی‌شده در ایران طبق آخرین تغییرات، *Rubus discolor* Weihe & Nees

نتایج مشخص نکرد. به‌طور کلی در محدوده گونه‌ها، هیبریداسیون بین گونه‌ها با سطوح پلوئیدی مختلف بین جمعیت‌های *Rubus* رخ داده و منوط به الگوی جغرافیایی خاصی نبوده است. مطالعه دیگری که Ataei-e Jaliseh و همکاران (۲۰۱۵) در زمینه تنوع ژنتیکی ۷ گونه از جنس *Rubus* شامل ۶۰ جمعیت مختلف در شمال ایران (گیلان و مازندران) با استفاده از نشانگر SSR انجام دادند، نشان داد تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها بسیار زیاد و تفکیک ژنتیکی بین جمعیت‌ها بسیار کم است. آنها بر اساس نتایج این پژوهش، جدایی جغرافیایی، موانع طبیعی، انتقال کرده به‌وسیله حشرات، هیبریداسیون و پلی‌پلوئیدی را از عوامل مهم ایجاد و حفظ تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها معرفی کردند (Ataei-e Jaliseh et al., 2015).

مطالعه *R. coreanus* با استفاده از نشانگر ریزماهواره و Cross-Amplification در گونه‌های *Rubus* که Lee و همکاران (۲۰۱۵) انجام دادند، نشان داد این نشانگرها برای مطالعه تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت‌ها و روابط تکاملی بین گونه‌های *Rubus* مفیدند.

ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۵ جمعیت از گونه *R. hyrcanus* و ۱ جمعیت از گونه *R. discolor* با استفاده از نشانگر ISSR و صفات ریخت‌شناختی آنها در نواحی شمال‌غربی، شمال‌شرقی و مرکزی ایران نشان داد تنوع ژنتیکی زیادی بین جمعیت‌های مطالعه‌شده *R. hyrcanus* وجود دارد و نتایج تجزیه و تحلیل ریخت‌شناختی در بیشتر موارد با نتایج تجزیه و تحلیل مولکولی مطابقت دارند (Sedighi and Rahimmalek, 2015).

مطالعه Dossett و همکاران (۲۰۱۲) روی تنوع ژنتیکی ۱۴۸ جمعیت خودرو و ارقام مختلف کشت‌شده *Rubus occidentalis* L. با استفاده از ۲۱ نشانگر SSR چندشکل نشان داد میزان هتروزیگوتی در ارقام زراعی این گونه بیش از حد انتظار و در گونه‌های وحشی کم است.

مقایسه تنوع ژنتیکی علف هرز مهاجم *R. alceifolius* Poir. در جنوب‌شرقی آسیا و بخش‌هایی از جزایر اقیانوس هند و استرالیا با استفاده از نشانگر AFLP در پژوهش Amsellem و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد این گونه در محدوده بومی خود درون و میان جمعیت‌هایی که از نظر جغرافیایی به یکدیگر نزدیکند (شمال ویتنام تا جاوا)، تنوع ژنتیکی زیادی دارد و گاهی تنوع ژنتیکی در ماداگاسکار کمتر است و جمعیت‌های جزایر اقیانوس هند و جمعیت‌های کوئزلند (Queensland) یک ژنوتیپ را شامل می‌شوند. بر اساس نتایج مطالعه یادشده، گونه *R. alceifolius* برای نخستین بار از ماداگاسکار گزارش شده است و به نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی آن در اثر رویدادهای پی‌درپی کاهش یافته است (Amsellem et al., 2000).

Ataei-e Jaliseh و همکاران (۲۰۱۴) مطالعه‌های ریخت‌شناختی و مولکولی ۷ گونه شناسایی‌شده و ۴ گونه نامشخص از جنس *Rubus* را با استفاده از ۲۷ صفت ریخت‌شناختی و ۴ جفت آغازگر SSR در شمال ایران (گیلان و مازندران) انجام دادند. نمودار بر پایه صفات کمی ریخت‌شناختی، گونه‌ها را کاملاً از هم تفکیک کرد و جمعیت‌ها بر اساس الگوی جغرافیایی از یکدیگر متمایز شدند. نمودار بر پایه نشانگر ریزماهواره، الگوی جغرافیایی را برای تفسیر

نظر به وجود گونه‌های مختلف جنس *Rubus* در استان گلستان، هدف پژوهش حاضر عبارتست از: بررسی تنوع ژنتیکی و قابلیت نشانگر AFLP در گروه‌بندی گونه‌های جنس *Rubus* در استان گلستان.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در پژوهش حاضر، ۶ گونه از جنس *Rubus* مطالعه شد. نمونه‌های گیاهی در فصل گل‌دهی سال ۱۳۹۴ و طی عملیات صحرایی مختلف از جمعیت‌های خودرو در نقاط مختلف استان گلستان جمع‌آوری و نمونه‌های هرباریومی آنها تهیه شدند که در هرباریوم دانشگاه گنبد کاووس (GKUH) نگهداری می‌شوند (جدول ۱). به‌منظور انجام مطالعه مولکولی، برگ‌های عاری از

حشرات کوچک و قارچ نمونه‌برداری و در ازت مایع منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مطالعه‌های ریخت‌شناختی روی نمونه‌های هرباریومی تهیه‌شده انجام شدند. شناسایی نمونه‌های هرباریومی با مراجعه به منابع مختلف از جمله فلورا ایرانیکا (Gilli, 1969) و فلور ایران (Khatamsaz, 1992) انجام شد. به‌منظور انتخاب صفت‌های کمی و کیفی برای انجام مطالعه‌های ریخت‌شناختی، شرح گونه‌ها در فلورهای مختلف بررسی و یادداشت‌برداری شد و در مرحله بعد، تعدادی از صفت‌های کمی و کیفی انتخاب شدند. تعدادی از صفت‌ها بر اساس مشاهده‌های شخصی در زمان مطالعه نمونه‌های هرباریومی انتخاب شدند؛ درنهایت، تعداد ۳۳ صفت کیفی (جدول ۲) و ۱۷ صفت کمی (جدول ۳) که بین نمونه‌های بررسی‌شده تنوع نشان دادند، برای انجام مطالعه‌های بیومتری و تاکسونومی عددی انتخاب شدند.

جدول ۱- فهرست تاکسون‌های مطالعه‌شده، محل جمع‌آوری و شماره نمونه هرباریومی هریک از آنها

جمعیت	گونه	محل جمع‌آوری نمونه	شماره هرباریومی
Pop 1	<i>R. sanctus</i> Schreb.	گلستان، زرین گل، ۶۶۰ متر	803222-GKUH
Pop 2	<i>R. discolor</i> Weihe and Nees.	گلستان، زرین گل، ۶۸۰ متر	803249-GKUH
Pop 3	<i>R. caesius</i> L.	گلستان، زرین گل، ۶۵۰ متر	803020-GKUH
Pop 4	<i>R. dolichocarpus</i> Juz.	گلستان، پارک ملی گلستان، ۵۱۰ متر	803119-GKUH
Pop 5	<i>R. sanctus</i> Schreb.	گلستان، جاده آزادشهر به مینودشت، ۱۷۵ متر	803250-GKUH
Pop 6	<i>R. persicus</i> Boiss.	گلستان، کردکوی، جنگل امام رضا، ۲۰۰ متر	803150-GKUH
Pop 7	<i>R. caesius</i> L.	گلستان، بندر گز، گز غربی، ۹۵ متر	803025-GKUH
Pop 8	<i>R. caesius</i> L.	گلستان، بندر گز، گز غربی، ۹۵ متر	803021-GKUH
Pop 9	<i>R. caesius</i> L.	گلستان، زرین گل، ۷۰۰ متر	803248-GKUH
Pop 10	<i>R. hyrcanus</i> Juz.	گلستان، خان‌بین به سمت شیرآباد، ۹۰ متر	803251-GKUH
Pop 11	<i>R. sanctus</i> Schreb.	گلستان، پارک جنگلی دلد، ۶۰ متر	803240-GKUH
Pop 12	<i>R. caesius</i> L.	گلستان، گنبد کاووس، کمربندی بسیج، ۵۰ متر	803247-GKUH
Pop 13	<i>R. sanctus</i> Schreb.	گلستان، نگین شهر، ۵ کیلومتری گنبد، ۶۰ متر	803241-GKUH
Pop 14	<i>R. sanctus</i> Schreb.	گلستان، علی‌آباد به سمت کبودوال، ۱۷۰ متر	803242-GKUH
Pop 15	<i>R. sanctus</i> Schreb.	گلستان، آزادشهر روستای وادیات سادات به سمت کوه میان، ۲۵۰ متر	803243-GKUH
Pop 16	<i>R. hyrcanus</i> Juz.	گلستان، علی‌آباد جنگل کبودوال، ۱۶۰ متر	803252-GKUH

803244-GKUH	گلستان، جاده گلد به آزادشهر، ۵۰ متر	<i>R. sanctus</i> Schreb.	Pop 17
803245-GKUH	گلستان، جنگل شیرآباد، ۹۰ متر	<i>R. sanctus</i> Schreb.	Pop 18
803253-GKUH	گلستان، جنگل شیرآباد، ۱۶۵ متر	<i>R. hyrcanus</i> Juz.	Pop 19
803246-GKUH	گلستان، خان‌بین، ۱۵ متر	<i>R. sanctus</i> Schreb.	Pop 20
803255-GKUH	گلستان، جنگل کبودال، ۱۸۰ متر	<i>R. hyrcanus</i> Juz.	Pop 21

جدول ۲- فهرست صفات‌های کیفی ریخت‌شناختی بررسی شده و کدگذاری حالت‌های صفی

ردیف	صفات‌ها	کد حالت‌های صفی
۱	شکل رویشی	بوته‌ای (صفر)، درختچه‌ای (۱)
۲	حالت ساقه	خوابیده (صفر)، خمیده (۱)، افراشته (۲)، بالارونده (۳)
۳	شکل شاخه گل‌دهنده	گرد (صفر)، تا حدودی زاویه‌دار (۱)، زاویه‌دار (۲)
۴	شکل خار شاخه گل‌دهنده	مستقیم کوتاه (صفر)، خمیده کوچک (۱)، خمیده درشت (۲)، سوزنی (۳)، خمیده سوزنی (۴)، خمیده و مستقیم (۵)
۵	حضور کرک در شاخه گل‌دهنده	بدون کرک (صفر)، تا حدودی کرک‌دار (۱)، کرک‌دار (۲)
۶	نوع کرک در شاخه گل‌دهنده	موئی (صفر)، ستاره (۱)، موئی و ستاره (۲)، نمدی (۳)
۷	حضور غده پایک‌دار در شاخه	حضورداشتن (صفر)، حضورنداشتن (۱)، غده بدون پایک (۲)
۸	شکل برگچه جانبی	تخم‌مرغی (صفر)، واژتخم‌مرغی (۱)، بیضوی (۲)، بیضوی پهن (۳)، لوزی (۴)، دایره‌ای (۵)، تخم‌مرغی - بیضوی (۶)، واژتخم‌مرغی - بیضوی (۷)
۹	شکل برگچه انتهایی	تخم‌مرغی (صفر)، واژتخم‌مرغی (۱)، بیضوی (۲)، لوزی (۳)، بیضوی پهن (۴)، دایره‌ای (۵)
۱۰	نوک برگچه جانبی	بدون نوک (صفر)، تیز یا کمی کشیده (۱)، نوک کشیده (۲)، نوک کند (۳)
۱۱	نوک برگچه انتهایی	بدون نوک (صفر)، تیز یا کمی کشیده (۱)، نوک کشیده (۲)، نوک کند (۳)
۱۲	قاعده برگچه جانبی	قلبی (صفر)، دایره‌ای (۱)، قلبی - دایره‌ای (۲)
۱۳	قاعده برگچه انتهایی	قلبی (صفر)، دایره‌ای (۱)، قلبی - دایره‌ای (۲)
۱۴	رنگ سطح زیری برگچه	سبز (صفر)، سفید (۱)، تا حدودی سبز (۲)، تا حدودی سفید (۳)
۱۵	پوشش کرک سطح بالایی برگچه	بدون کرک (صفر)، پراکنده (۱)، متوسط (۲)، متراکم (۳)
۱۶	پوشش کرک سطح زیری برگچه	بدون کرک (صفر)، پراکنده (۱)، متوسط (۲)، متراکم (۳)
۱۷	نوع کرک سطح بالایی برگچه	بدون کرک (صفر)، اکثراً موئی (۱)، اکثراً ستاره‌ای (۲)، موئی و ستاره‌ای (۳)، نمدی (۴)
۱۸	نوع کرک سطح زیری برگچه	بدون کرک (صفر)، اکثراً موئی (۱)، اکثراً ستاره‌ای (۲)، نمدی (۳)
۱۹	شکل خار دمبرگ	مستقیم کوتاه (صفر)، خمیده کوچک (۱)، خمیده درشت (۲)، سوزنی (۳)، سوزنی خمیده (۴)
۲۰	نوع کرک دمبرگ	اکثراً موئی (صفر)، اکثراً ستاره‌ای (۱)، نمدی (۳)، موئی و ستاره‌ای (۴)
۲۱	وضعیت دمبرگچه جانبی	بدون دمبرگچه (صفر)، دارای دمبرگچه (۱)، دمبرگچه خیلی کوتاه (۲)
۲۲	نوع گل‌آذین	دیپیم (صفر)، خوشه ساده (۱)، خوشه گرزن مرکب (۲)، خوشه مرکب (۳)
۲۳	حضور غده در گل‌آذین	غده‌دار (صفر)، بدون غده (۱)
۲۴	شکل کاسبرگ	تخم‌مرغی (صفر)، مستطیلی (۱)، تخم‌مرغی - مستطیلی (۲)
۲۵	نوک کاسبرگ	بدون نوک تا کمی نوک‌دار (۰)، تیز (۱)، سیخک‌دار (۲)
۲۶	نوع کرک کاسبرگ	نمدی (صفر)، موئی و ستاره‌ای (۱)
۲۷	غده پایک‌دار در کاسبرگ	غده‌دار (صفر)، بدون غده (۱)
۲۸	شکل گلبرگ	واژتخم‌مرغی کشیده (صفر)، بیضوی (۱)، بیضوی پهن (۲)، واژتخم‌مرغی پهن - گرد (۳)

۲۹	رنگ گلبرگ	صورتی (صفر)، سفید (۱)، سفید - صورتی (۲)
۳۰	رنگ میله	صورتی (صفر)، سفید (۱)
۳۱	کرک بساک	بدون کرک (صفر)، کرک دار (۱)
۳۲	شکل گوشوارک	خطی (صفر)، خنجر - نیزه ای (۱)، نیزه ای پهن (۲)
۳۳	تعداد برچه	۱ (صفر)، ۲-۲۰ (۱)، ۲۱-۴۰ (۲)، ۴۱-۶۰ (۳)

جدول ۳- فهرست و واحد اندازه گیری صفت های کمی استفاده شده در مطالعه ریخت شناختی

ردیف	صفت ها	واحد اندازه گیری
۱	طول دمبرگ	cm
۲	طول برگچه انتهایی	cm
۳	طول برگچه جانبی	cm
۴	عرض برگچه انتهایی	cm
۵	عرض برگچه جانبی	cm
۶	طول دمبرگچه برگچه انتهایی	cm
۷	طول دمبرگچه برگچه جانبی	cm
۸	طول کاسبرگ	mm
۹	عرض کاسبرگ	mm
۱۰	نسبت طول به عرض کاسبرگ	mm
۱۱	طول گلبرگ	mm
۱۲	عرض گلبرگ	mm
۱۳	نسبت طول به عرض گلبرگ	mm
۱۴	تعداد گل در گل آذین	-
۱۵	طول گل آذین	cm
۱۶	عرض گل آذین	cm
۱۷	طول دمگل	mm

استخراج DNA

DNA برگ ها به روش CTAB تغییر یافته (Saghai Maroof *et al.*, 1994) استخراج شد؛ به این منظور، ابتدا برگ های نمونه برداری شده از هر نمونه به تفکیک و به کمک ازت مایع در هاون چینی به طور یکنواخت پودر شدند و سپس مقداری از پودر حاصل درون لوله های ۱/۵ میلی لیتری (به میزان یک سوم حجم لوله) ریخته و تا زمان پودر شدن همه نمونه های برگ در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. مقدار

۵۳۴ میکرولیتر از بافر استخراج که دمای آن در حمام آب گرم به ۶۵ درجه سانتی گراد رسیده بود، به لوله های حاوی نمونه ها اضافه و با شیکر لوله (ورتکس) به آرامی تکان داده شد تا مخلوط همگنی به دست آید؛ پس از آن، لوله ها در سطح یخ نگهداری شدند. میزان ۲۸ میکرولیتر SDS ۲۰ درصد به مخلوط اضافه و سپس به مدت ۴ دقیقه روی دستگاه تکان دهنده (شیکر) با دور کم تکان داده شد. لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی گراد گذاشته و طی این مدت

تکان داده شدند تا پودر برگ، محلول استخراج و SDS کاملاً مخلوط شوند و دمای مخلوط به طور یکنواخت و همگن به ۶۵ درجه سانتی گراد برسد. پس از خارج کردن لوله‌ها از حمام آب گرم، میزان ۹۲ میکرولیتر NaCl ۵ مولار به آنها اضافه و با ورتکس (شیکر لوله) کاملاً مخلوط شد. مقدار ۷۲ میکرولیتر محلول CTAB به مخلوط حاصل اضافه و دوباره تکان داده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. میزان ۷۲۳ میکرولیتر کلروفرم:ایزوآمیل الکل با نسبت ۲۴:۱ زیر هود به نمونه‌ها اضافه و به آرامی با دست تکان داده شد. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. روشنای (Supernatant) هر لوله به دقت برداشته و به لوله دیگری منتقل شد. میزان ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد (۴ درجه سانتی گراد) به نمونه‌ها اضافه و به آرامی تکان داده شد تا کلاف‌های DNA تشکیل شوند. لوله‌ها به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند تا کلاف‌های DNA رسوب کنند. محلول رویی به آرامی دور ریخته و رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد سرد شستشو شد؛ سپس لوله‌ها در دمای محیط قرار گرفتند تا رسوب DNA خشک شود. میزان ۱۸۰ میکرولیتر محلول TE سرد به نمونه‌های DNA اضافه و رسوب DNA در محلول یادشده حل شد. لوله‌های حاوی DNA به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۷۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند؛ در نهایت، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه به منظور رسوب پروتئین‌های احتمالی موجود در محلول DNA سانتریفیوژ شدند و فاز بالایی به لوله‌های جدید منتقل شد.

تعیین کمیت و کیفیت DNA

ژل آگارز ۰/۸ درصد به منظور تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده استفاده شد. تعیین غلظت نمونه‌های DNA به کمک DNA فاژ لامبدا با غلظت مشخص انجام و کیفیت نمونه‌های DNA از شیوه تشکیل نوارها مشخص شد؛ گفتنی است DNA سالم به شکل نوار واضح (نه به شکل کشیده) ظاهر می‌شود.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

به منظور تجزیه و تحلیل آماری، نوارهای حاصل از تجزیه AFLP روی ژل به شکل داده‌های صفر و یک امتیازدهی شدند. محتوای اطلاعات ژنتیکی (PIC) از رابطه ۱ محاسبه شد. در این رابطه، PICi: PIC نشانگر iام، fi: فراوانی قطعه نشانگر iام هنگام وجود داشتن نوار و (1-fi): فراوانی قطعه نشانگر iام در حالت وجود نداشتن نوار است (Roldain-Ruiz et al., 2000).

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{PIC}_i = 2 f_i (1 - f_i)$$

شاخص نشانگری (MI) بیان کننده میزان چندشکلی است و از رابطه ۲ محاسبه می‌شود. در این رابطه، EMR: نسبت چندگانه مؤثر است که تعداد جایگاه‌های چندشکل موجود در ژرم پلاسما را بیان می‌کند و از رابطه ۳ محاسبه می‌شود. در رابطه ۳، n_p : تعداد کل نوارهای چندشکل و β : نسبت تعداد نوارهای چندشکل n_p به تعداد کل نوارهاست.

$$\text{رابطه ۲} \quad \text{MI} = \text{PIC} \times \text{EMR}$$

$$\text{رابطه ۳} \quad \text{EMR} = n_p \times \beta$$

سایر آماره‌های تنوع ژنتیکی مانند تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون (Shannon and Weaver, 1963) با نرم‌افزار Pop Gene (Yeh et al., 1997) محاسبه شدند. داده‌ها به‌منظور تجزیه و تحلیل به نرم‌افزار Excel منتقل شدند و تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی و ماتریس تشابه با نرم‌افزار Past محاسبه و نمودار بر اساس الگوریتم و UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد ترسیم شد.

نتایج

شناسایی نشانگرهای مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی

آغازگرهای استفاده‌شده برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف تمشک در مجموع به شناسایی ۵۰۵ مکان منجر شدند که ۲۷۷ مکان از آنها چندشکلی نشان دادند. بیشترین تعداد مکان (۷۷ مکان) به آغازگر M160-E100 و کمترین تعداد مکان (۳۶ مکان) به آغازگر M140-E120 مربوط بود. بیشترین و کمترین درصد چندشکلی به ترتیب به آغازگرهای M160-E110 با ۷۲/۸۵ درصد و آغازگرهای M160-E120 و M140-E100 با ۲۰/۴۵ درصد تعلق داشت. مقدار متوسط درصد چندشکلی به دست‌آمده برای نشانگرهای استفاده‌شده برابر ۵۱/۲۳ درصد محاسبه شد و متوسط تعداد باندهای چندشکلی که هر آغازگر تولید کرد و متوسط تعداد کل باندها در ۲۱ ژنوتیپ تمشک به ترتیب ۳۰/۷۷ و ۵۶/۱۱ به دست آمد.

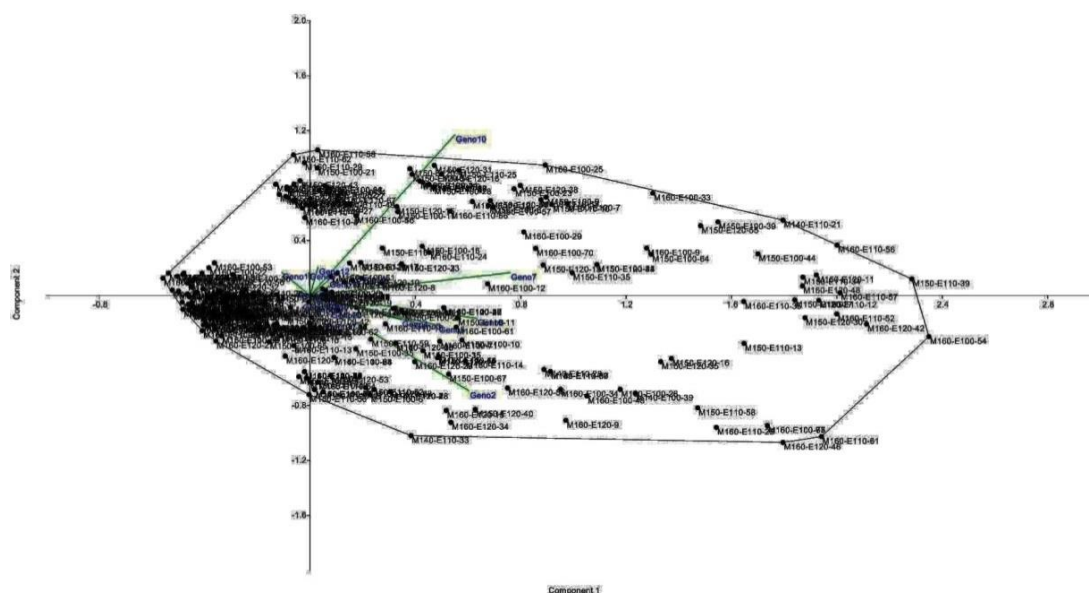
جدول ۴- نتایج بررسی ۲۱ ژنوتیپ تمشک با استفاده از نشانگر AFLP

تعداد آلل مؤثر (Ne)	تنوع ژنتیکی (H)	شاخص شانون (I)	محتوای اطلاعات ژنتیکی (PIC)	شاخص تنوع ژنتیکی	درصد چندشکلی	تعداد باندهای چندشکلی	تعداد کل باندها	دمای اتصال آغازگر	ترکیب آغازگری
۱/۲۶۹	۰/۱۹۴	۰/۳۳۴	۰/۲۱۱	۱۴/۲۴	۶۷/۵۳	۵۲	۷۷	۶۵	M160-E100
۱/۲۹۳	۰/۲۰۳	۰/۳۴۳	۰/۲۳۴	۱۷/۰۴	۷۲/۸۵	۵۱	۷۰	۶۵	M160-E110
۱/۲۳۰	۰/۱۶۸	۰/۲۹۷	۰/۱۸۳	۳/۷۴	۲۰/۴۵	۹	۴۴	۶۵	M160-E120
۱/۲۵۹	۰/۱۹۲	۰/۳۳۲	۰/۲۰۲	۱۲/۴۵	۶۱/۶۴	۴۵	۷۳	۶۵	M150-E100
۱/۲۷۱	۰/۱۹۷	۰/۳۳۸	۰/۲۲۳	۱۵/۱۱	۶۷/۸۰	۴۰	۵۹	۶۵	M150-E110
۱/۲۷۷	۰/۲۰۰	۰/۳۳۷	۰/۲۱۴	۱۳/۴۱	۶۲/۷۱	۳۷	۵۹	۶۵	M150-E120
۱/۱۳۵	۰/۱۱۴	۰/۲۲۳	۰/۱۱۷	۲/۳۹	۲۰/۴۵	۹	۴۴	۶۵	M140-E100
۱/۰۸۹	۰/۰۷۶	۰/۱۶۰	۰/۱۴۶	۵/۰۹	۳۴/۸۸	۱۵	۴۳	۶۵	M140-E110
۱/۱۸۰	۰/۱۴۶	۰/۲۶۹	۰/۱۵۰	۷/۹۱	۵۲/۷۷	۱۹	۳۶	۶۵	M140-E120

بیشترین محتوای اطلاعات ژنتیکی با مقدار ۰/۲۳۴ به آغازگر M160-E110 و کمترین محتوای اطلاعات ژنتیکی با مقدار ۰/۱۱۷ به آغازگر M140-E100 مربوط بود. آغازگر M160-E110 با مقدار ۰/۳۴۳،

بیشترین میزان شاخص شانون و آغازگر M140-E110 با مقدار ۰/۱۶۰، کمترین میزان شاخص شانون را نشان داد. بیشترین میزان تنوع ژنتیکی با مقدار ۰/۲۰۳ در آغازگر M160-E110 و کمترین میزان تنوع ژنتیکی با

مقدار ۰/۰۷۶ در آغازگر M140-E110 مشاهده شد. بیشترین تعداد آلل مؤثر با مقدار ۱/۲۹۳ برای آغازگر M160-E110 و کمترین تعداد آلل مؤثر با مقدار ۱/۰۸۹ برای آغازگر M140-E110 به دست آمد. بیشترین میزان شاخص نشانگری با مقدار ۱۷/۰۴ در آغازگر M160-E110 مشاهده شد که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بیشتر این آغازگر نسبت به سایر آغازگرهاست و کمترین شاخص نشانگری با مقدار ۲/۳۹ به آغازگر M140-E100 مربوط بود (جدول ۴). شکل (۱)، نتایج تعیین آلل‌های تکثیر یافته تأثیرگذار و بحرانی را با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، نشانگرهای M140-E110، M150-E110، M160-E100، M160-E110 و M160-E120 جزو نشانگرهای بحرانی و تأثیرگذارند و نقش بسزایی در گروه‌بندی نشانگرها دارند.



شکل ۱- تعیین آلل‌های تکثیر یافته تأثیرگذار و بحرانی با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با نشانگرهای AFLP

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس جمعیت‌های مختلف

تجزیه بای‌پلات با استفاده از نتایج PCOA نشان داد جمعیت‌های ۲ Pop (*R. discolor* زرین‌گل)، ۷ Pop (*R. caesius* بندرگز)، ۱۰ Pop (*R. hyrcanus* خان‌بین به شیرآباد)، ۱۱ Pop (*R. sanctus* دلند) و ۱۹ Pop (*R. hyrcanus* شیرآباد) جزو جمعیت‌های بحرانی‌اند و نقش مهمی در گروه‌بندی جمعیت‌ها ایفا می‌کنند (شکل ۲).

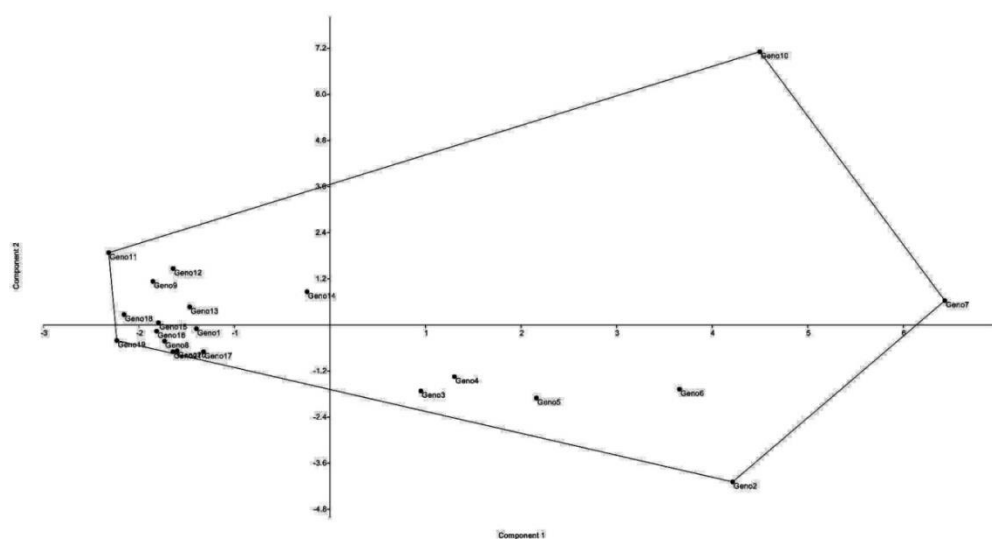
تجزیه به مختصات اصلی بر اساس نشانگرهای AFLP

نتایج تجزیه به مختصات اصلی PCOA در جدول (۵) ارائه شده‌اند و نشان می‌دهند ۱۰ مؤلفه اول، ۶۹/۲۴ درصد از تغییرات را توجیه می‌کنند. مؤلفه اول، ۱۵/۹۵ درصد و مؤلفه دوم و سوم به ترتیب ۸/۲۴ و ۷/۱۵ درصد از تغییرات را توجیه می‌کنند.

جدول ۵- مقادیر ویژه، نسبت واریانس تجمعی عامل‌های استخراج شده

درصد واریانس	مقدار ویژه	PC
۱۵/۹۵	۰/۳۲	۱
۸/۲۴	۰/۱۶	۲
۷/۱۵	۰/۱۴	۳
۶/۲۱	۰/۱۲	۴

۵	۰/۱۱	۵/۹۸
۶	۰/۱۱	۵/۷۴
۷	۰/۱۰	۵/۲۹
۸	۰/۱۰	۵/۱۲
۹	۰/۰۹	۴/۹۵
۱۰	۰/۰۹	۴/۶۱



شکل ۲- تعیین جمعیت‌های بحرانی با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

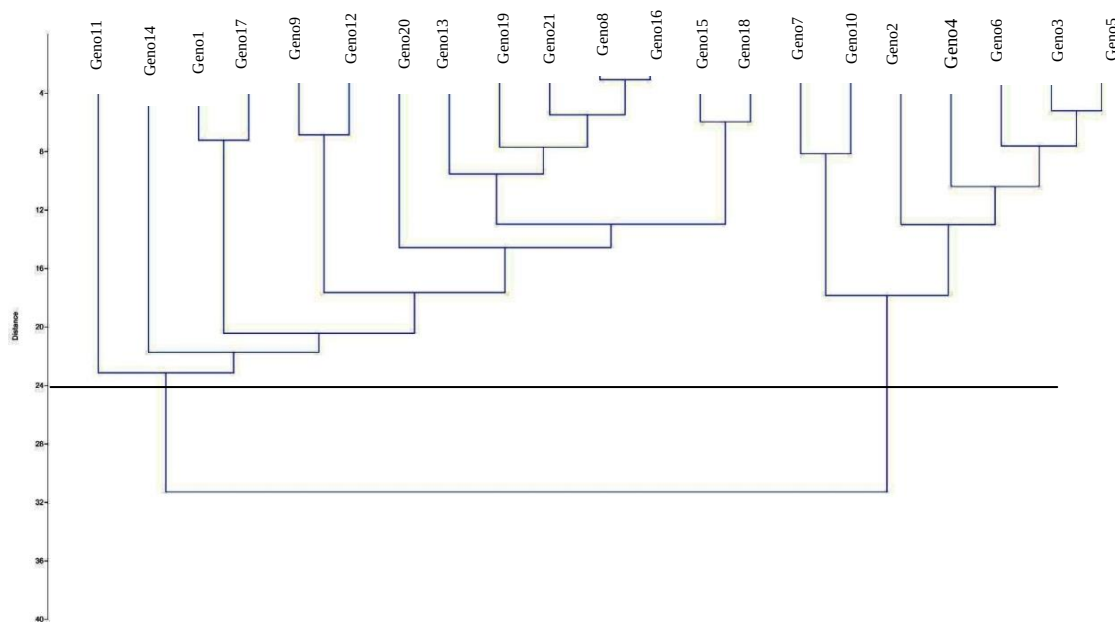
تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها

نمودار حاصل از تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های بررسی‌شده در شکل (۳) نشان داده شده است. گروه‌بندی جمعیت‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد و برش نمودار در فاصله ۲۶، جمعیت‌ها را به دو گروه تقسیم کرد. آزمون منتل به منظور تعیین بهترین ضریب فاصله و الگوریتم طبقه‌بندی بهتر استفاده شد. بر اساس ضریب جاکارد و روش UPGMA، بیشترین همبستگی ($r=0/91$) به دست آمد. در گروه اول، جمعیت‌های *R. sanctus* دلند، علی‌آباد به کبودال، زرین‌گل، گلند به آزادشهر، نگین‌شهر، وادیات سادات، شیرآباد و

خان‌بین، *R. caesius* زرین‌گل ۷۰۰ متری، کمربندی بسیج‌گنبد، بندرگز ۱۰۰ متری، *R. hyrcanus* کبودال ۱۶۰ متری، شیرآباد و کبودال ۱۸۰ متری و در گروه دوم، گونه‌های *R. sanctus* آزادشهر به مینودشت، *R. caesius* بندرگز ۹۵ متری و زرین‌گل ۶۵۰ متری، *R. discolor* زرین‌گل، *R. dolichocarpus* پارک ملی گلستان و *R. persicus* جنگل کردکوی قرار دارند. در گروه اول، هرکدام از جمعیت‌های *R. sanctus* دلند، *R. sanctus* علی‌آباد به کبودال و *R. sanctus* خان‌بین در گروه‌های مجزا قرار گرفته‌اند، گونه *R. sanctus* زرین‌گل و گلند به آزادشهر در یک گروه قرار گرفته‌اند، گونه *R. caesius* زرین‌گل و کمربندی

R. caesius ۹۵ متری و *R. hyrcanus* خان‌بین به شیرآباد در یک خوشه قرار گرفته‌اند و پنج جمعیت *R. discolor* زرین‌گل، *R. dolichocarpus* پارک ملی گلستان و *R. persicus* کردکوی و *R. caesius* زرین‌گل ۶۵۰ متری یک خوشه را تشکیل داده‌اند (شکل ۳).

بسیج در گروهی دیگر و پنج جمعیت *R. sanctus* نگین‌شهر، *R. caesius* گز غربی ۱۰۰ متری و *R. hyrcanus* کبودوال ۱۶۰ متری، شیرآباد ۱۶۱ متری و کبودوال ۱۸۰ متری در گروه مجزایی قرار گرفته‌اند و *R. sanctus* وادیات سادات و شیرآباد نیز در یک خوشه قرار گرفته‌اند. در گروه دوم، دو گونه



شکل ۳- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های بررسی‌شده بر اساس نشانگرهای AFLP

رویشی، قاعده برگچه جانبی و انتهایی، نوع کرک، شکل خار و نوع کرک دمبرگ، حضور دمبرگچه جانبی، شکل کاسبرگ، شکل گلبرگ و تعداد برگچه ارتباط دارند. بیشتر آلل‌ها ارتباط معناداری با تمام صفت‌ها دارند، به‌جز آلل M160-E120-32 در صفت شکل رویشی و تعداد برگچه، آلل M160-E100-36 در صفت شیوه رشد ساقه، آلل M150-E120-48 در صفت حالت شاخه گل‌دهنده و آلل M160-E100-71 در صفت شکل کاسبرگ که ارتباط معناداری را نشان نمی‌دهند.

تجزیه و تحلیل ارتباط نشانگرهای AFLP با صفت‌های ریخت‌شناختی مطالعه‌شده

نتایج تجزیه و تحلیل ارتباط بین نشانگرها و صفت‌های ریخت‌شناختی در جدول (۶) ارائه شده‌اند. بر اساس این نتایج، آلل‌های M160-E100-71، M160-E120-32 و M140-E100-31 با بیشترین تعداد صفت‌ها ارتباط دارند. بیشترین تعداد نشانگرها با صفت‌های طول دمبرگ، طول برگچه انتهایی، طول برگچه جانبی، طول گل‌آذین، عرض برگچه جانبی و طول دمگل و کمترین تعداد نشانگرها با صفت‌های غده گل‌آذین، غده کاسبرگ، غده گوشوارک، شکل

جدول ۶- میانگین مربعات و ضریب تبیین و رگرسیون نشانگرهای AFLP مرتبط با صفت‌های ریخت‌شناختی

صفت	نشانگر آگاهی‌بخش	ضریب رگرسیون	انحراف معیار	R^2 تجمعی	F	میانگین مربعات
شکل رویشی	M160-E120-32	-۰/۹۲۹	۰/۱۸۸	۰/۳۲۵	۷/۷۰۴*	۱/۱۷۴
	M150-E110-9	-۰/۹۲۹	۰/۱۸۸	۰/۷۴۳	۲۱/۶۶۷**	۱/۳۴۱
شیوه رشد ساقه	M160-E100-36	-۲/۰۰۰	۰/۱۵۸	۰/۳۳۳	۸/۰۰۰*	۴/۰۰۰
	M140-E100-31	-۲/۰۰۰	۰/۲۱۴	۰/۵۳۳	۸/۵۷۱**	۳/۲۰۰
	M160-E120-32	-۱/۰۰۰	۰/۱۵۸	۰/۷۶۶	۱۵/۲۷۹**	۳/۰۶۴
	M140-E110-15	-۱/۰۰۰	۰/۱۵۸	۰/۸۸۳	۲۴/۴۲۷**	۲/۶۴۸
	M160-E110-63	-۱/۰۰۰	۰/۲۱۴	۰/۹۵۸	۵۵/۲۰۰**	۲/۳۰۰
	M150-E120-48	-۱/۸۳۳	۰/۲۷۳	۰/۲۸۶	۶/۴۰۰*	۴/۰۰۰
حالت شاخه گل‌دهنده	M160-E100-19	-۱/۸۳۳	۰/۲۷۳	۰/۴۶۹	۶/۶۲۱**	۳/۲۸۲
	M150-E110-55	-۱/۸۳۳	۰/۳۷۳	۰/۶۹۰	۱۰/۴۱۰**	۳/۲۲۲
	M160-E110-19	۲/۰۰۰	۰/۴۳۹	۰/۸۸۱	۲۴/۰۵۰**	۳/۰۸۳
	M150-E110-46	۳/۴۰۰	۰/۲۲۲	۰/۵۲۶	۱۷/۷۷۸**	۱۱/۱۱۱
شکل خار شاخه گل‌دهنده	M160-E100-71	-۱/۶۰۰	۰/۱۵۵	۰/۷۲۴	۱۹/۶۵۹**	۷/۶۴۱
	M140-E100-31	-۲/۰۰۰	۰/۲۵۹	۰/۸۷۶	۳۲/۹۲۶**	۶/۱۶۳
	M160-E100-51	-۱/۲۰۰	۰/۲۲۱	۰/۹۶۲	۸۲/۵۱۴**	۵/۰۷۸
نوع کرک	M150-E120-27	-۰/۸۰۰	۰/۱۲۳	۰/۵۷۱	۲۱/۳۳۳**	۱/۷۷۸
	M140-E110-42	۰/۸۰۰	۰/۲۵۳	۰/۷۴۳	۲۱/۶۶۷**	۱/۱۵۶
شکل برگچه جانبی	M150-E110-58	۳/۸۶۴	۰/۱۸۵	۰/۵۱۳	۱۶/۸۶۳**	۵۲/۵۶۸
	M160-E100-66	۴/۴۷۱	۰/۲۴۷	۰/۹۰۴	۷۰/۵۳۹**	۴۶/۲۹۹
	M140-E120-30	-۱/۹۱۳	۰/۲۵۶	۰/۹۳۵	۶۶/۸۰۶**	۳۱/۹۱۹
	M150-E110-55	-۲/۰۲۹	۰/۳۳۱	۰/۹۷۴	۱۲۱/۲۱۵**	۲۴/۹۴۲
	M150-E120-38	۰/۷۶۷	۰/۱۹۴	۰/۹۸۹	۲۰۹/۵۱۹**	۲۰/۲۵۷
نوک برگچه جانبی	M150-E100-64	-۱/۰۰۰	۰/۱۳۳	۰/۴۶۰	۱۳/۶۱۱**	۴/۱۸۸
	M150-E100-36	-۱/۰۰۰	۰/۱۸۲	۰/۷۶۱	۲۳/۸۱۹**	۳/۴۶۵
	M150-E120-47	۰/۶۶۷	۰/۱۵۶	۰/۸۳۱	۲۲/۹۱۳**	۲/۵۲۳
	M140-E100-31	۱/۰۰۰	۰/۲۴۲	۰/۹۲۷	۴۱/۱۶۷**	۲/۱۱۱
نوک برگچه انتهایی	M150-E100-64	-۱/۰۰۰	۰/۱۳۳	۰/۴۶۰	۱۳/۶۱۱**	۴/۱۸۸
	M150-E100-36	-۱/۰۰۰	۰/۱۸۲	۰/۷۶۱	۲۳/۸۱۹**	۳/۴۶۵
	M150-E120-47	۰/۶۶۷	۰/۱۵۶	۰/۸۳۱	۲۲/۹۱۳**	۲/۵۲۳
	M140-E100-31	۱/۰۰۰	۰/۲۴۲	۰/۹۲۷	۴۱/۱۶۷**	۲/۱۱۱
قاعده برگچه جانبی	M160-E100-71	-۱/۰۰۰	۰/۱۲۳	۰/۵۷۱	۲۱/۳۳۳**	۲/۲۸۶
	M160-E100-22	-۰/۶۶۷	۰/۱۳۷	۰/۸۳۳	۳۷/۵۰۰**	۱/۶۶۷

میانگین مربعات	F	R ² تجمعی	انحراف معیار	ضریب رگرسیون	نشانهگر آگاهی بخش	صفت
۱/۶۶۷	۳۷/۵۰**	۰/۸۳۳	۰/۱۳۷	-۰/۶۶۷	M160-E100-22	قاعده برگچه
۲/۲۸۶	۲۱/۳۳۳**	۰/۵۷۱	۰/۱۲۳	-۱/۰۰۰	M160-E100-71	انتهایی
۴/۹۷۱	۲۲/۵۳۳**	۰/۵۸۵	۰/۳۱۴	۳/۰۰۰	M140-E110-25	رنگ سطح
۳/۰۵۰	۱۹/۰۶۳**	۰/۷۱۸	۰/۱۹۵	-۰/۹۲۳	M140-E120-5	زیری برگچه
۲/۵۲۶	۳۸/۳۰۶**	۰/۸۹۱	۰/۱۹۵	-۰/۹۲۳	M160-E120-32	
۵/۸۷۸	۱۶/۴۰۳**	۰/۵۰۶	۰/۱۴۶	-۲/۰۲۹	M150-E110-18	
۴/۳۴۷	۲۲/۳۵۷**	۰/۷۴۹	۰/۱۴۵	-۱/۱۴۷	M140-E120-5	رنگ سطح
۳/۳۴۸	۲۹/۹۲۰**	۰/۸۶۵	۰/۱۷۱	-۱/۰۲۹	M150-E120-47	بالایی برگچه
۲/۷۴۸	۵۷/۸۴۷**	۰/۹۴۷	۰/۱۴۵	-۰/۶۴۷	M140-E120-31	
۳/۲۱۱	۱۶/۷۵۴**	۰/۵۱۲	۰/۱۳۷	-۱/۱۴۱	M140-E120-5	پوشش سطح
۲/۳۴۴	۲۲/۱۱۷**	۰/۷۴۷	۰/۱۶۱	-۱/۰۲۲	M150-E120-47	زیری
۱/۸۸۶	۴۲/۶۱۹**	۰/۹۰۱	۰/۱۳۷	-۰/۶۴۱	M140-E120-31	
۸/۳۹۷	۱۰/۱۶۷**	۰/۳۸۹	۰/۱۸۰	۷/۶۴۷	M150-E100-37	
۶/۱۹۹	۱۰/۰۹۵**	۰/۵۷۴	۰/۱۹۲	-۲/۶۶۷	M160-E100-19	نوع کرک
۵/۶۹۶	۱۷/۶۲۷**	۰/۷۹۱	۰/۱۶۷	-۲/۰۰۰	M160-E120-48	سطح بالایی
۵/۰۲۲	۴۲/۸۴۲**	۰/۹۲۹	۰/۲۷۲	-۲/۰۰۰	M160-E110-41	
۴/۱۸۹	۷۵/۴۰۰**	۰/۹۶۹	۰/۲۵۵	۱/۰۰۰	M150-E100-69	
۱۸/۰۶۲	۱۱۸/۵۶۴**	۰/۸۸۱	۰/۲۲۹	۳/۴۵۸	M150-E110-46	شکل خار
۹/۶۱۸	۱۱۴/۱۴۸**	۰/۹۳۸	۰/۱۹۴	-۰/۷۲۲	M140-E120-5	دمبرگ
۱/۷۷۸	۲۱/۳۳۳**	۰/۵۷۱	۰/۱۲۳	۰/۸۰۰	M150-E120-27	نوع کرک
۱/۱۵۶	۲۱/۶۶۷**	۰/۷۴۳	۰/۲۵۳	-۰/۸۰۰	M140-E110-42	دمبرگ
۵/۸۷۸	۳۹/۱۸۵**	۰/۷۱۰	۰/۱۵۱	۱/۱۸۸	M160-E120-29	حضور
۳/۷۷۷	۷۸/۱۷۵**	۰/۹۱۲	۰/۱۲۶	۰/۷۳۹	M150-E110-58	دمبرگچه جانبی
۸/۷۱۱	۱۹/۷۲۳**	۰/۵۵۲	۰/۱۱۷	۲/۱۸۵	M150-E100-35	
۵/۷۶۴	۲۰/۳۴۳**	۰/۷۳۱	۰/۱۲۹	۱/۷۶۰	M150-E100-11	
۴/۲۸۷	۲۰/۵۷۸**	۰/۸۱۵	۰/۱۴۹	-۱/۴۳۲	M150-E100-33	نوع گل آذین
۳/۵۱۲	۲۶/۳۷۰**	۰/۸۹۰	۰/۱۰۴	-۰/۸۶۳	M160-E100-25	
۲/۹۳۶	۳۲/۱۳۸**	۰/۹۳۱	۰/۱۷۲	-۰/۹۵۹	M150-E110-55	
۲/۵۸۲	۹۸/۷۱۹**	۰/۹۸۲	۰/۱۷۲	-۰/۹۵۹	M160-E100-20	
۱/۵۶۳	۲۶/۶۶۷**	۰/۷۹۱	۰/۱۸۲	-۰/۹۳۸	M160-E120-21	غده گل آذین
۷/۶۸۳	۱۳/۰۳۷*	۰/۴۴۹	۰/۲۸۵	-۱/۸۳۳	M160-E100-71	شکل کاسبرگ
۶/۷۲۲	۲۷/۵۰۰**	۰/۷۸۶	۰/۳۷۸	-۱/۸۳۳	M160-E100-51	
۶/۳۴۹	۱۰/۷۷۴**	۰/۴۰۲	۰/۲۰۰	۱/۸۱۸	M160-E100-71	نوک کاسبرگ

میانگین مربعات	F	R ² تجمعی	انحراف معیار	ضریب رگرسیون	نشانگر آگاهی بخش	صفت
۵/۵۵۶	۱۷/۸۵۷**	۰/۷۰۴	۰/۲۶۳	۱/۸۱۸	M160-E100-51	
۴۰/۳۲۹	۴۰/۳۲۹**	۰/۸۹۶	۰/۳۵۷	۱/۸۱۸	M140-E100-31	
۱/۵۶۳	۲۶/۶۶۷**	۰/۶۲۵	۰/۱۸۲	-۰/۹۳۸	M160-E120-21	غده کاسبرگ
۱۰/۰۲۸	۷۱/۳۰۹**	۰/۸۱۷	۰/۱۳۸	۲/۵۰۰	M140-E120-28	شکل گلبرگ
۵/۸۸۹	۱۷۶/۶۶۷**	۰/۹۵۹	۰/۱۳۸	۱/۰۰۰	M160-E110-67	
۲/۵۶۲	۱۰/۵۵۹**	۰/۳۹۸	۰/۲۲۹	۲/۰۰۰	M150-E100-27	رنگ گلبرگ
۲/۳۷۶	۲۱/۰۶۱**	۰/۷۳۷	۰/۱۲۹	۱/۰۰۰	M160-E100-71	
۱/۹۲۶	۴۰/۴۴۴**	۰/۸۹۷	۰/۱۴۴	۰/۶۶۷	M160-E100-19	
۱/۷۳۱	۱۰/۰۰۰**	۰/۳۸۵	۰/۱۳۹	۰/۹۰۰	M160-E100-9	رنگ میله
۱/۴۳۲	۱۳/۱۲۵**	۰/۶۳۶	۰/۱۹۶	۰/۹۰۰	M150-E110-46	
۱/۲۰۰	۱۸/۶۶۷**	۰/۸۰۰	۰/۲۶۶	۰/۹۰۰	M160-E100-20	
۱/۵۸۷	۸/۸۸۹**	۰/۳۵۷	۰/۱۳۱	-۱/۰۰۰	M160-E100-71	کرک بساک
۱/۳۸۹	۱۲/۵۰۰**	۰/۶۲۵	۰/۱۷۱	-۱/۰۰۰	M150-E120-43	
۱/۲۵۹	۲۶/۴۴۴**	۰/۸۵۰	۰/۱۴۵	-۰/۶۶۷	M140-E120-14	
۵/۰۶۲	۱۰/۸۹۱**	۰/۴۰۵	۰/۱۹۵	۱/۹۲۳	M160-E120-32	شکل
۴/۴۵۵	۱۸/۶۱۶**	۰/۷۱۳	۰/۱۹۵	۱/۹۲۳	M160-E100-19	گوشوارک
۳/۸۵۹	۵۸/۵۲۸**	۰/۹۲۶	۰/۳۱۴	-۲/۰۰۰	M160-E110-19	
۱/۳۴۴	۱۳/۴۴۴**	۰/۴۵۷	۰/۲۰۰	-۰/۷۳۳	M140-E120-5	غده گوشوارک
۴۷/۰۰۲	۲۹/۵۶۲**	۰/۶۴۹	۰/۰۶۳	۴/۳۰۳	M150-E110-59	
۳۰/۴۶۴	۳۹/۶۸۵**	۰/۸۴۱	۰/۰۵۴	۲/۹۵۸	M150-E120-18	
۲۲/۵۵۰	۶۵/۸۷۰**	۰/۹۳۴	۰/۰۵۵	۲/۰۰۱	M150-E110-12	
۱۷/۲۹۱	۶۸/۵۳۳**	۰/۹۵۵	۰/۰۶۶	۱/۶۵۵	M160-E120-32	طول دمبرگ
۱۴/۱۸۰	۱۱۰/۲۵۷**	۰/۹۷۹	۰/۰۷۸	۱/۶۵۸	M140-E100-31	
۱۱/۹۸۹	۲۶۰/۵۱۸**	۰/۹۹۳	۰/۰۴۹	۰/۶۱۰	M150-E120-53	
۱۰/۳۲۱	۵۲۶/۳۳۵**	۰/۹۹۷	۰/۰۴۴	-۰/۲۹۹	M150-E120-16	
۹/۰۴۶	۱۰۶۳/۹۹۴**	۰/۹۹۹	۰/۰۶۲	-۰/۳۴۷	M150-E100-23	
۸/۰۴۵	۲۶۰/۵۱۸**	۰/۹۹۹	۰/۰۵۶	۰/۱۵۲	M160-E110-28	
۴/۶۹۴	۷/۷۰۴*	۰/۳۲۵	۰/۳۷۶	-۱/۸۵۷	M160-E120-32	تعداد برگچه
۵/۳۶۵	۲۱/۶۶۷**	۰/۷۴۳	۰/۳۷۶	-۱/۸۵۷	M150-E110-9	
۸۶/۶۶۱	۳۱/۵۴۱**	۰/۶۶۳	۰/۱۳۵	۷/۳۹۴	M150-E110-59	طول برگچه
۵۵/۱۲۰	۴۰/۵۶۶**	۰/۸۴۴	۰/۱۳۹	۴/۳۶۷	M160-E110-68	انتهایی
۴۱/۱۶۱	۸۰/۷۲۹**	۰/۹۴۵	۰/۰۹۵	۱/۴۸۶	M150-E110-12	
۳۱/۸۵۳	۱۲۸/۹۵۱**	۰/۹۷۵	۰/۱۰۵	۱/۳۱۶	M140-E120-16	

میانگین مربعات	F	R ² تجمعی	انحراف معیار	ضریب رگرسیون	نشانهگر آگاهی بخش	صفت
۲۵/۷۶۱	۱۷۰/۲۳۰**	۰/۹۸۶	۰/۱۱۷	۱/۱۳۸	M140-E120-30	
۲۱/۵۸۸	۲۱۷/۶۳۱**	۰/۹۹۲	۰/۱۱۶	۰/۸۱۶	M150-E120-47	
۱۸/۵۸۳	۳۴۲/۶۴۵**	۰/۹۹۶	۰/۱۴۹	۰/۶۸۷	M150-E110-52	
۱۶/۲۸۶	۴۴۱/۰۰۶**	۰/۹۹۷	۰/۱۵۲	۰/۴۶۱	M140-E110-23	
۱۴/۴۹۶	۷۲۳/۹۶۶**	۰/۹۹۹	۰/۱۰۱	-۰/۲۹۶	M160-E110-29	
۸۰/۲۸۲	۳۲/۱۷۸**	۰/۶۶۸	۰/۱۱۶	۶/۹۱۶	M150-E110-59	طول برگچه جانبی
۵۰/۴۹۵	۳۹/۴۲۹**	۰/۸۴۰	۰/۰۷۷	۴/۰۰۸	M140-E120-3	
۳۶/۹۰۰	۵۴/۳۸۳**	۰/۹۲۱	۰/۰۹۰	۳/۶۵۷	M150-E100-30	
۲۸/۷۵۶	۷۲/۲۲۰**	۰/۹۵۷	۰/۰۶۱	-۰/۹۱۲	M160-E110-58	
۲۳/۵۷۳	۱۲۱/۰۳۵**	۰/۹۸۱	۰/۰۹۴	۱/۲۴۴	M160-E110-40	
۱۹/۸۵۱	۱۹۹/۷۷۶**	۰/۹۹۱	۰/۰۸۶	-۰/۸۰۵	M160-E100-44	
۱۷/۱۰۱	۳۴۶/۶۸۰**	۰/۹۹۶	۰/۰۸۶	۰/۵۳۸	M140-E110-19	
۱۵/۰۰۳	۷۷۶/۶۱۷**	۰/۹۹۹	۰/۰۵۹	-۰/۳۸۰	M160-E100-31	
۱۳/۳۴۸	۱۵۱۶/۷۱۸**	۰/۹۹۹	۰/۰۷۴	۰/۲۵۳	M160-E110-15	
۲۷/۷۲۹	۲۴/۱۷۶**	۰/۶۰۲	۰/۵۰۵	۱/۵۰۰	M150-E110-59	عرض برگچه انتهایی
۱۸/۳۷۶	۲۹/۵۴۷**	۰/۷۹۸	۰/۲۸۲	۲/۴۴۹	M150-E120-18	
۱۴/۰۹۰	۵۱/۷۷۳**	۰/۹۱۷	۰/۴۵۵	۱/۴۴۹	M160-E110-40	
۱۰/۸۹۸	۵۶/۹۶۵**	۰/۹۴۶	۰/۷۹۹	۲/۱۰۰	M140-E110-25	
۱۶/۸۵۸	۱۹/۶۸۸**	۰/۵۵۲	۰/۰۷۴	۳/۷۰۶	M150-E110-59	عرض برگچه جانبی
۱۲/۳۳۸	۳۱/۴۶۱**	۰/۸۰۸	۰/۰۷۵	۲/۷۹۳	M140-E100-24	
۹/۲۸۷	۴۸/۲۳۵**	۰/۹۱۲	۰/۰۶۷	۰/۹۶۸	M140-E120-16	
۷/۲۹۱	۶۸/۰۲۴**	۰/۹۵۴	۰/۰۵۵	۰/۶۳۴	M150-E110-12	
۵/۹۴۶	۸۵/۹۷۴**	۰/۹۷۳	۰/۰۷۷	۰/۵۳۳	M150-E120-47	
۵/۰۳۶	۱۶۱/۱۹۶**	۰/۹۸۹	۰/۰۷۴	۰/۶۰۷	M140-E120-30	
۴/۳۵۴	۵۲۳/۵۰۱**	۰/۹۹۷	۰/۰۶۹	۰/۳۸۵	M150-E110-22	
۴۴/۴۱۱	۲۰/۱۱۲**	۰/۵۵۷	۰/۱۱۶	۴/۸۰۸	M150-E110-59	طول دمبرگچه جانبی
۳۵/۱۳۲	۵۵/۶۰۰**	۰/۸۸۱	۰/۱۵۲	۳/۲۷۷	M160-E110-68	
۲۶/۰۲۳	۲۱۷/۷۲۳**	۰/۹۷۹	۰/۰۹۸	۱/۸۷۷	M160-E110-14	
۱۹/۸۶۶	۹۲۶/۰۷۴**	۰/۹۹۷	۰/۲۰۷	۱/۶۷۰	M140-E110-43	طول دمبرگچه جانبی
۷۹۳/۵۴۹	۴۲/۰۰۳**	۰/۷۲۴	۰/۲۳۷	۱۹/۸۶۸	M150-E110-59	طول دمبرگچه انتهایی
۴۶۸/۵۹۸	۴۴/۳۰۹**	۰/۸۵۵	۰/۲۳۶	۱۰/۱۷۶	M140-E100-24	
۳۴۵/۸۶۹	۸۳/۱۶۵**	۰/۹۴۷	۰/۳۲۵	۸/۹۴۳	M150-E120-43	

صفت	نشانگر آگاهی بخش	ضریب رگرسیون	انحراف معیار	R^2 تجمعی	F	میانگین مربعات
طول کاسبرگ	M160-E110-58	-۲/۸۲۲	۰/۱۸۴	۰/۹۷۲	۱۱۳/۹۰۵**	۲۶۶/۳۵۸
	M150-E100-57	-۳/۰۹۷	۰/۲۱۱	۰/۹۸۴	۱۵۰/۴۰۷**	۲۱۵/۷۲۴
	M150-E110-39	۲/۱۰۲	۰/۱۷۱	۰/۹۹۲	۲۱۵/۷۰۲**	۱۸۱/۰۹۹
	M160-E100-44	۱/۸۸۴	۰/۲۰۱	۰/۹۹۶	۳۳۸/۹۰۹**	۱۵۵/۸۹۰
	M160-E110-33	-۱/۵۰۲	۰/۲۸۴	۰/۹۹۹	۸۲۸/۱۷۹**	۱۳۶/۷۹۳
	M150-E120-40	۰/۸۸۷	۰/۱۳۵	۰/۴۵۰	۱۳/۰۹۶**	۸/۷۱۹
نسبت طول به عرض کاسبرگ	M160-E110-13	-۰/۹۵۳	۰/۱۵۵	۰/۶۲۹	۱۲/۷۳۵**	۶/۰۹۶
	M160-E110-66	۱/۲۸۶	۰/۱۲۹	۰/۷۵۳	۱۴/۲۱۲**	۴/۸۶۱
	M160-E110-57	-۰/۹۵۲	۰/۰۹۸	۰/۸۴۵	۱۷/۶۶۳**	۴/۰۹۰
	M150-E120-7	-۰/۹۸۶	۰/۱۵۸	۰/۹۱۸	۲۶/۹۴۵**	۳/۵۵۷
	M150-E110-52	۱/۱۰۳	۰/۱۸۸	۰/۹۸۰	۹۰/۶۸۸**	۳/۱۶۵
	M150-E110-59	۰/۶۴۵	۰/۰۳۴	۰/۶۵۳	۳۰/۱۳۲**	۱/۵۲۳
تعداد برچه	M160-E110-10	-۰/۵۰۲	۰/۰۲۶	۰/۷۵۳	۲۲/۸۵۹**	۰/۸۷۸
	M160-E100-53	-۰/۳۵۵	۰/۰۲۱	۰/۸۳۶	۲۳/۷۲۱**	۰/۶۵۰
	M160-E120-9	-۰/۲۹۶	۰/۰۱۸	۰/۹۳۱	۴۳/۶۴۷**	۰/۵۴۳
	M150-E120-35	۰/۱۸۱	۰/۰۳۴	۰/۹۷۲	۸۳/۴۳۹**	۰/۴۵۳
	M160-E110-63	۰/۲۲۵	۰/۰۳۲	۰/۹۹۰	۱۸۴/۱۷۸**	۰/۳۸۵
	M160-E120-29	۰/۱۱۳	۰/۰۲۹	۰/۹۹۶	۳۷۰/۴۰۸**	۰/۳۳۲
تعداد گل	M150-E110-59	۱/۹۲۵	۰/۱۹۵	۰/۴۷۶	۱۴/۵۱۶**	۵/۸۴۰
	M150-E110-29	۱/۹۵۰	۰/۲۱۵	۰/۷۹۶	۲۹/۳۳۳**	۲۹/۳۳۳
	M160-E120-12	-۱/۰۵۰	۰/۲۱۵	۰/۹۲۵	۵۷/۲۷۵**	۵۷/۲۷۵
	M150-E100-35	۲۲/۵۸۱	۰/۲۷۷	۰/۶۰۷	۲۴/۷۳۴**	۷۸۴/۶۴۲
	M150-E120-18	۱۱/۸۷۴	۰/۲۴۶	۰/۷۳۰	۲۰/۳۰۵**	۴۷۱/۸۲۸
	M160-E110-53	۸/۶۸۹	۰/۲۴۵	۰/۸۷۲	۳۱/۸۷۵**	۳۷۵/۷۲۷
تعداد گل آذین	M150-E100-31	۶/۶۰۴	۰/۲۴۴	۰/۹۳۰	۴۳/۱۱۸**	۳۰۰/۴۰۹
	M160-E100-31	۴/۸۱۴	۰/۲۳۶	۰/۹۶۶	۶۷/۹۹۹**	۲۴۹/۶۳۱
	M150-E120-17	۳/۲۴۸	۰/۲۷۰	۰/۹۸۷	۱۴۱/۹۰۷**	۲۱۲/۶۲۱
	M140-E100-39	۲/۴۳۳	۰/۲۱۷	۰/۹۹۶	۳۸۰/۸۱۳**	۱۸۳/۹۱۱
	M160-E110-33	۱/۷۶۴	۰/۳۶۴	۰/۹۹۹	۷۵۲/۴۷۷**	۱۶۱/۲۸۵
	M160-E100-44	۰/۸۶۴	۰/۲۵۵	۰/۹۹۹	۱۴۵۱/۸۶۵**	۱۴۳/۴۹۱
طول گل آذین	M150-E120-15	۱۰/۸۹۱	۰/۲۳۶	۰/۳۸۳	۹/۹۲۲**	۱۳۴/۲۶۲
	M160-E120-56	۵/۲۳۷	۰/۱۹۵	۰/۷۱۴	۱۸/۷۱۴**	۱۳۵/۲۰۷
	M150-E110-29	-۷/۹۰۹	۰/۳۵۶	۰/۸۷۳	۳۲/۱۹۴**	۱۰۲/۱۲۲

میانگین مربعات	F	R ² تجمعی	انحراف معیار	ضریب رگرسیون	نشانه‌گر آگاهی‌بخش	صفت
۸۱/۲۵۸	۴۱/۰۳۹**	۰/۹۲۷	۰/۳۱۵	-۴/۷۰۸	M150-E110-55	طول دمگل
۶۷/۷۹۶	۶۸/۹۷۰**	۰/۹۶۶	۰/۲۸۳	۲/۸۸۲	M160-E100-62	
۵۷/۴۶۸	۱۰۵/۹۲۵**	۰/۹۸۳	۰/۲۰۹	۱/۲۶۲	M160-E100-28	
۴۹/۸۲۳	۲۴۷/۹۴۷**	۰/۹۹۴	۰/۳۱۵	-۲/۳۷۸	M140-E100-31	
۴۳/۷۵۴	۵۲۸/۹۹۲**	۰/۹۹۸	۰/۱۹۵	-۰/۷۶۳	M150-E100-23	
۷۳۳/۱۹۱	۱۳/۶۸۶**	۰/۴۶۱	۰/۵۱۸	۲۵/۸۷۷	M150-E110-46	
۶۶۶/۶۲۳	۳۸/۸۹۱**	۰/۸۳۸	۰/۴۳۵	۱۹/۴۶۳	M140-E120-31	
۴۸۴/۰۶۰	۴۹/۰۴۵**	۰/۹۱۳	۰/۳۹۰	-۷/۴۱۳	M160-E100-71	
۳۸۰/۶۹۵	۷۳/۲۳۵**	۰/۹۵۸	۰/۳۷۰	-۴/۱۴۰	M160-E100-42	
۳۱۲/۹۷۷	۱۴۷/۴۴۱**	۰/۹۸۴	۰/۵۳۰	-۶/۴۸۱	M160-E120-10	
۲۶۳/۳۱۷	۲۷۷/۰۴۴**	۰/۹۹۳	۰/۴۹۰	-۲/۴۸۸	M150-E100-33	
۲۲۶/۶۸۲	۶۳۳/۱۶۴**	۰/۹۹۸	۰/۴۱۶	۱/۸۲۳	M160-E100-61	

بحث

نظر به اینکه نشانگر AFLP، نشانگری بارز است و به‌ازای هر ترکیب نشانگر، تعداد قطعه‌های بیشتری از DNA تکثیر می‌شوند، محتوای اطلاعات بسیار زیاد و برای بررسی روابط درون‌گونه‌ای مناسب است. با توجه به اینکه تاکنون گزارشی درباره بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه‌های مختلف تمشک با نشانگر AFLP ارائه نشده است، پژوهش حاضر با این هدف و با استفاده از ۹ ترکیب آغازگری AFLP انجام شد. تعداد ۲۷۷ مکان از ۵۰۵ مکانی که با آغازگرهای استفاده‌شده برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف تمشک شناسایی شدند، چندشکلی نشان دادند. آغازگرهای M140-E110 و M160-E110 به ترتیب بیشترین و کمترین میزان تنوع ژنتیکی را نشان دادند که گویای مناسب بودن آغازگر اول و نامناسب بودن آغازگر دوم برای مطالعه تنوع ژنتیکی جنس تمشک است. پژوهش حاضر نشان داد نشانگر AFLP، نشانگر

مناسبی برای جدا کردن گونه‌های مختلف جنس *Rubus* است. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی یکی از روش‌های چندمتغیره برای گروه‌بندی بر پایه ضریب تشابه یا واریانس و کواریانس بین داده‌هاست که اطلاعات مفیدتری درباره تمایز گروه‌های اصلی ارائه می‌کند (Bottini et al., 2002). تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای نمایش دوبعدی پراکنش افراد استفاده می‌شود. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی آن افراد است. در پژوهش حاضر، ۱۰ مؤلفه اول، ۶۹/۲۴ درصد از تغییرات را توجیه می‌کنند و جمعیت‌های 2 Pop (*R. discolor* زرین‌گل)، 7 Pop (*R. caesius* بندرگز)، 10 Pop (*R. hyrcanus* خان‌بین به شیرآباد)، 11 Pop (*R. sanctus* دلند) و 19 Pop (*R. hyrcanus* شیرآباد) جزو جمعیت‌های بحرانی‌اند و نقش مهمی را در گروه‌بندی جمعیت‌ها ایفا می‌کنند. Kollman و همکاران (۲۰۰۰) معتقدند شیوه تولیدمثل، عامل مهمی در ایجاد تنوع ژنتیکی تمشک است.

دگرگشتی در گونه‌های پلی‌پلوئیدی تمشک سیاه، عامل مهم و درخور توجهی است. تولیدمثل غیرجنسی و هیبریداسیون بین گونه‌های این جنس، عامل اصلی تنوع ژنتیکی زیاد است. Marulanda و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه گونه‌های وحشی و زراعی تمشک با استفاده از نشانگرهای AFLP و SSR، سطوح پلوئیدی مختلف و تنوع ژنتیکی زیاد این جنس را تأیید کردند. Ataei-e Jaliseh و همکاران (۲۰۱۴) در زمینه تنوع ژنتیکی ۷ گونه جنس *Rubus* با ۶۰ ژنوتیپ در شمال (گیلان و مازندران) ایران با استفاده از نشانگر SSR نشان دادند تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها بسیار زیاد و تفکیک ژنتیکی بین جمعیت‌ها بسیار کم است. از ۱۰ آغازگر SSR، ۶ آغازگر چندشکل بودند و در مجموع، ۳۲ آلل مشاهده شد. میانگین تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در هر لوکوس و PIC به ترتیب ۲/۸ و ۰/۵۹۳ بود. میانگین هتروزیگوتی بین جمعیت‌ها، ۰/۱۲۱ بود که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی کم بین جمعیت‌هاست. اغلب هیبریداسیون در گونه‌های نزدیک به هم و گاهی بین زیرجنس‌های تمشک انجام می‌شود (Gustafsson, 1942; Jennings, 1988; Weber, 1995; Alice and Campbell, 1999) که عامل مهمی در ایجاد تنوع ژنتیکی است. در مطالعه‌های کروموزومی، سطوح پلی‌پلوئیدی مختلفی (۱۴x-۲x) در جمعیت‌های گونه‌های تمشک (Nyblom, 1980; Jennings, 1988; Thompson, 1995, 1997) گزارش شده است که یکی از عوامل ایجاد و حفظ تنوع ژنتیکی است. در بررسی نمودار که جمعیت‌ها به دو گروه تقسیم‌بندی شده‌اند، نقش رویشگاه در ایجاد تنوع ژنتیکی مشاهده می‌شود؛ به‌طوری‌که اغلب جمعیت‌های گونه‌های متعلق به ناحیه خزری و ایرانی -

تورانی از جمله *R. sanctus* و *R. caesius* در یک گروه و بیشتر جمعیت‌هایی که تنها به ناحیه خزری تعلق دارند، مانند *R. hyrcanus*، *R. persicus* و *R. dolichocarpus* در گروه مجزایی قرار گرفته‌اند. تأثیر منطقه رویش گونه‌های مختلف تمشک روی شکل، اندازه و تریانات اگزین دانه‌های گرده بررسی و تأیید شده است (Kasalkheh et al., 2017). Ataei-e Jaliseh و همکاران (۲۰۱۵) جدایی جغرافیایی، موانع طبیعی، انتقال گرده به وسیله حشرات، هیبریداسیون و پلی‌پلوئیدی را جزو عوامل مهم ایجاد و حفظ تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها گزارش کرده‌اند. نتایج ما طبق بررسی‌های ریخت‌شناختی و سلول‌شناسی که تنوع ریختی و سطوح پلی‌پلوئیدی را نشان دادند، با گزارش‌های یادشده همخوانی دارند. Ercisli و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی روابط ژنتیکی تمشک‌های وحشی و زراعی بر پایه نشانگر AFLP در ترکیه نتیجه گرفتند نشانگر AFLP، رویکرد امیدوارکننده‌ای در راستای کمک به توسعه برنامه‌های تلقیح تمشک در ارقام کشاورزی است و سبب حفظ تنوع زیستی در سطح بالا می‌شود. با توجه به ویژگی‌های دارویی و تنوع سیوتژنتیکی گیاه تمشک، شناخت ژرم‌پلاس آن اهمیت دارد. نشانگر AFLP با ویژگی‌هایی مانند دقت زیاد، تکرارپذیری و قدرت تفکیک بسیار زیاد در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی از جمله تمشک پرکاربرد و مفید است. در مجموع، پژوهش حاضر نشان می‌دهد استان گلستان یکی از محل‌های مناسب برای رشد و سکونت جمعیت‌های گسترده‌ای از گونه‌های مختلف تمشک با تنوع ریخت‌شناختی و ژنتیکی زیاد است و با مطالعه‌های گسترده و هدف‌دار می‌توان از این ژرم‌پلاس متنوع و پرکاربرد بهره‌برداری کرد.

منابع

- Aalders, L. E. and Hall, I. V. (1966) A cytotaonomic survey of the native blackberries of Nova Scotia. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 8: 528-532.
- Alice, L. A. and Campbell, C. S. (1999) Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany* 86(1): 81-97.
- Amsellem, L., Noyer, J. L., Le Bourgeois, T. and Hossaert-Mckey, M. (2000) Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology* 9: 443-455.
- Ataei-e Jaliseh, S., Mehregan, I., Tarang, A. and Nejdassattari, T. (2014) Intra-specific variation of *Rubus* sp. (Rosaceae) in Northern Iran: morphometric analysis and microsatellite markers. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)* 5(1): 189-198.
- Ataei-e Jaliseh, S., Mehregan, I., Tarang, A. and Nejdassattari, T. (2015) Genetic diversity of *Rubus* L. (Rosaceae) in the Northern Iran. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences* 9(1): 387-394.
- Ballington, J. R., Luteyn, M. M., Thompson, K., Romoleroux, K. and Castillo, R. (1993) *Rubus* and Vacciniaceous germplasm resources in the Andes of Ecuador. *Plant Genetic Resources Newsletter* 93: 9-15.
- Bottini, M. J., Bustos, A., Jouve, N. and Poggio, L. (2002) AFLP characterization of natural population of *Berberis* in Patagonia, Argentina. *Journal of Plant Systematic and Evolution* 231: 133-142.
- Dossett, M., Bassil, N. V., Lewers, K. S. and Finn, C. E. (2012) Genetic diversity in wild and cultivated black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) evaluated by simple sequence repeat markers. *Genetic Resource Crop Evolution* 59(8): 1849-1865.
- Ercisli, S., Badjakov, I., Kondakova, V., Atanassov, A. and Todorovska, E. (2015) AFLP-Based Genetic Relationships in Wild and Cultivated Red Raspberry Genotypes (*Rubus Idaeus* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 907-910.
- Focke, W. O. (1910) Species Ruborum monographiae generic. *Rubi Prodrum.* Bibliotheca Botanica 17: 1-120.
- Focke, W. O. (1911) Species Ruborum monographiae generic. *Rubi Prodrum.* Bibliotheca Botanica 17: 121-223.
- Focke, W. O. (1914) Species Ruborum monographiae generic. *Rubi Prodrum.* Bibliotheca Botanica 17: 1-274.
- Gilli, A. (1969) *Rubus*. In: *Flora Iranica* (Ed. Rechinger, K. H.) 66: 67-75. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.
- Gu, Y., Jin, W., Zhao, C. M. and He, S. A. (1993) *Rubus* resources in Fujian and Hunan provinces. *Acta Horticulturae* 345: 117-125.
- Gustafsson, A. (1942) The origin and properties of the European blackberry flora. *Hereditas* 28: 249-277.
- Hummer, K. E. (1996) *Rubus* diversity. *Horticultural Science* 31: 182-183.
- IPNI, The International Plant Names Index. Retrieved from <http://www.ipni.org>. On: 20 July 2019.

- Jennings, D. L. (1988) Raspberries and blackberries: Their breeding, diseases, and growth. Academic Press, New York.
- Kasalkheh, R., Jorjani, E., Sabouri, H., Habibi, M. and Sattarian, A. (2017) Pollen morphology of the genus *Rubus* L. subgenus *Rubus* L. (Rosaceae) in Iran. *Nova Biologica Reperta* 4: 9-18.
- Khatamsaz, M. (1992) Flora of Iran. vol. 6. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran (in Persian).
- Kollman, J., Steinger, T. and Roy, B. A. (2000) Evidence of sexuality in European *Rubus* (Rosaceae) species based on AFLP and allozyme analysis. *American Journal of Botany* 87(11): 1592-1598.
- Lee, G. A., Yong Song, J., Choi, H. R., Chung, J. W., Jeon, Y. A., Lee, J. R., Ma, K. H. and Lee, M. Ch. (2015) Novel microsatellite markers acquired from *Rubus coreans* Miq. and Cross-Amplification in other *Rubus* species. *Journal Molecules* 20: 6432-6442.
- Lu, L. T. (1983) A study on the genus *Rubus* of china. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 21: 13-25.
- Marulanda, M. L., López, A. M. and Aguilar, S. B. (2007) Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7: 243-253.
- Marulanda, M. L. and López, A. M. (2009) Characterization of thornless *Rubus glaucus* in Colombia. *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences* 3(2): 927-937.
- Marulanda, M. L., López, A. M. and Uribe, M. (2011) Molecular characterization of *Rubus* spp. using SSR markers. *Genetic Molecular Research (GMR) Brasil* (in press).
- Nybom, H. (1980) Germination in Swedish blackberries (*Rubus* L. subgen. *Rubus*). *Botaniska Notiser* 133: 619-631.
- Richards, A. J., Kirschner, J., Stepanek, J. and Marhold, K. (1996) Apomixis and taxonomy: An introduction. *Folia Geobotanica Phytotaxonomica* 281-282.
- Robertson, K. R. (1974) The genera of Rosaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 55: 352-360.
- Roldain-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T. J., Coll, R., van Eijk, M. J. T. and De Loose, M. (2000) Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties, 2. AFLP characterization. *Molecular Breeding* 6: 593-602.
- Saghai Maroof, M. A., Biyashev, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q. and Allard, R. W. (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley species diversity, chromosomal location, and population dynamics. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 91: 5466-5570.
- Sedighi, E. and Rahimmalek, M. (2015) Evaluation of genetic diversity of *Rubus hyrcanus* using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and morphological markers. *Biologia* 70: 339-348.
- Shannon, C. E. and Weaver, W. (1963) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.
- Thompson, M. M. (1995) Chromosome number of *Rubus* species at the National Clonal Germplasm Repository. *Horticultural Science* 30: 1447-1452.
- Thompson, M. M. (1997) Survey of chromosome numbers in *Rubus* (Rosaceae: Rosoidese). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84(1): 128-164.
- Weber, H. E. (1995) *Rubus* L. In: *Illustrierte flora von mitteleuropa* (Ed. Hegi, G.) 4(2) 284-595. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.

Yeh, F. C., Yang, R-C., Boyle, T. J. B., Ye, Z-H. and Mao, J. X. (1997) POP GENE, The userfriendly shareware for population genetic analysis. Edmonton, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta Press, Canada, Alberta.