Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 49, No 3, Autumn 2018 (791-799)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.230244.1220

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۹، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۷ (ص ۷۹۹-۷۹۱)

بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره (SSR)

فردوس دارابی[۱]، عبداله احتشام‌نیا[۲*]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۳] و زینب روئین[٤]
۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
۳. دانشیار، گروه اصلاح نباتات و زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
٤. استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۱/۱٦ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۸/۱٦)

چکیده

آگاهی از تنوع ژنتیکی، پیش‌شرط اصلی و اولین گام در اصلاح گیاهان می‌باشد. در همین راستا، این پژوهش به بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) با استفاده از نشانگر مولکولی SSR پرداخته است. نشانگرهای مورد استفاده، در مجموع توانستند ۷۳۱ باند با اندازه ۱۲۸ تا ٤۰٤ جفت باز ایجاد کنند. تعداد باند در آغازگرهای مختلف، دامنه‌ای از ۲۲ تا ۹٦ عدد باند در ارقام مورد بررسی بود. میانگین تعداد آلل مؤثر برای ۱۲ ترکیب آغازگری، ۱/۲۵ آلل بود که بیشترین تعداد آلل مؤثر در پنج آغازگر JH09، JH52، JH72، JH30 و JH47 با تعداد ۲ آلل مشاهده شد. درصد چندشکلی باندها در ارقام، بالا (۱۰۰ درصد) بود. PIC در ارقام مورد بررسی، از ۰/۲٦ تا۰/۵۰ متغیر و به‌ترتیب مربوط به آغازگر JH42 و JH31 بود. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ارقام در فاصله ۰/٦۱ ضریب تشابه، ارقام را در هفت خوشه اصلی قرار داد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که شش مؤلفه اول در مجموع بیش از ٦۰ درصد از کل تغییرات را توجیه کردند. در مجموع، شش آغازگر JH09،JH11، JH52، JH72، JH30 و JH47 می‌توانند به‌عنوان آغازگرهای مفید و مطلوب برای تفکیک ژنوتیپ‌ها و ارقام گل داوودی معرفی شوند.

واژه‌های کلیدی: شاخص نشانگری، گل داوودی، محتوای اطلاعات چندشکل، نشانگر ریزماهواره.

Investigation of genetic diversity of 20 cultivars of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) using SSR molecular markers

Ferdos Darabi[1], Abdollah Ehtesham-Nia[2*], Farhad Nazarian-Firouzabadi[3] and Zeynab Roein[4]
1, 2. Former M.Sc. Student, Department of Horticulture Science, and Assiatant Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran
3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran
4. Assistant Professor, Department of Horticulture Science, Ilam University, Ilam, Iran
(Received: Apr. 5, 2017 - Accepted: Nov. 7, 2017)

ABSTRACT

Awareness of genetic diversity is a prerequisite and the first step in plant breeding. In this regard, the present study investigates the genetic diversity of 20 cultivars of Chrysanthemum (Chrysanthemum morifolium. Ramat) using SSR molecular markers. The markers used in total were able to create 731 bands with sizes from 128 to 404 bp. The number of bands in different primers were range from 22 to 96 bands in the cultivars studied. The average number of effective alleles for 12 primers was 1.25 alleles with the highest number of effective alleles in five primers JH09, JH52, JH72, JH30 and JH47 with 2 alleles. The polymorphism of the bands in the cultivars were high (100%). The PIC in the cultivars under study were from 0.26 to 0.50, respectively, and related to the JH42 and JH31 primers. The dendrogram obtained from the cluster analysis of cultivars in a similarity coefficient of 0.61 placed the cultivars in the seven main clusters. The analysis of the main components showed that the first six components justify more than 60% of the total variation. Overall, six primers JH09, JH11, JH52, JH72, JH30 and JH47 can be introduced as useful and desirable for separation of genotypes and cultivars of Chrysanthemum.

Keywords: Chrysanthemum, Markers Index, Polymorphic Information Content, SSR Molecular Markers.

* Corresponding author E-mail: ab.ehteshamnia@gmail.com

مقدمه

گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) گیاهی روز کوتاه و متعلق به خانواده Asteraceae با منشأ شرق آسیا به‌ویژه کشور چین می‌باشد (Dole & Wilkins, 1999). گل داوودی در دهه هفتاد میلادی، در صدر تولید گل جهان قرار داشت و در دهه نود میلادی در ردیف دومین گل‌های شاخه بریده پس از گل رز قرار گرفت (Peyvandi *et al*., 2010). کولتیوارهای داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) پلی‌پلوئیدهایی هستند که به گونه هگزاپلوئید تعلق دارند. میانگین تعداد کروموزوم‌ها در این گونه‌ها، ۵۴ کروموزوم است که مانند سایر گونه‌های Asteraceae، دارای سیستم خودناسازگاری شدید هستند (Langton, 1989). پیشرفت‌های اخیر در ژنتیک سلولی و مولکولی و ابداع نشانگرهای مولکولی، امیدهای تازه‌ای را برای بهنژادگران به‌وجود آورده است. در طول دو دهه اخیر، پیشرفت‌های چشم‌گیری در زمینه اصلاح نباتات مولکولی مخصوصاً فناوری نشانگرهای DNA، ابزارهای جدیدی را برای بالا بردن کارایی روش‌های اصلاحی فراهم نموده‌اند. یکی از مهم‌ترین کاربردهای این نشانگرها، ارزیابی تنوع ژنتیکی و پتانسیل ذخایر توارثی است. از سوی دیگر، پیچیدگی صفات کمی، استفاده از روش‌های مولکولی به‌صورت تلفیق با روش‌های بیومتری را در اصلاح آنها اجتناب‌ناپذیر می‌نماید. از جمله روش‌های مولکولی، تجزیه صفات کمی با استفاده از نشانگرهای DNA، با تکیه بر عدم تعادل پیوستگی، به مطالعه روابط بین تنوع فنوتیپی و چندشکلی ژنتیکی می‌پردازد (Breseghello & Sorrells, 2006). کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی میان افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر در برنامه‌های اصلاحی، امکان سازمان‌دهی ژرم‌پلاسم و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد. نشانگرهای مولکولی دارای فراوانی نسبی زیادی هستند و کمتر تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند؛ از این رو، مناسب‌ترین نوع نشانگرها در پژوهش‌های نوین محسوب می‌شوند (Hokanson *et al*., 1998). ریزماهواره‌ها (میکروستلایت‌ها) یا توالی‌های تکراری ساده[1] (SSR)، در ژنوم تمام یوکاریوت‌ها وجود دارد. این نشانگرها به‌دلیل فراوانی زیاد، برای مکان‌یابی ژنتیکی و مطالعه جمعیت‌ها، نشانگرهای ایده‌آلی می‌باشند. SSRها توالی تکراری از یک، دو، سه و چهار نوکلئوتید با طول‌های مختلفی از بخش‌های تکراری می‌باشند، به‌عنوان مثال A، T، AT، GA، ACG، AAAC و غیره (Farsi & Bagheri, 2009). این تکنیک بسیار ساده بوده و استفاده از آن آسان و آزمایش مبتنی بر PCR است؛ برای مشاهده نتایج کافی است که فقط محصولات تکثیر را توسط الکتروفورز تفکیک نمود، بدین‌ترتیب زمان مورد نیاز برای دسترسی به نتایج قابل قیاس و روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. می‌توان از به‌کارگیری رادیوایزوتوپ‌ها اجتناب ورزید؛ زیرا اندازه چندشکلی بین آلل‌ها برای مشاهده در ژل‌های آگارز، غالباً به‌قدر کافی بزرگ است. ریزماهواره‌ها به‌صورت نشانگرهای هم‌بارز، تفرق می‌یابند، چندشکلی ایجادشده قابل اعتماد است (Farsi & Bagheri, 2009). در پژوهشی با استفاده از بیست آغازگر ISSR، ارقام جدید گل داوودی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان پلی‌مورفیسم، تفاوت معنی‌داری در ارقام مختلف دارد و نشانگر ISSR می‌تواند یک تکنیک مفید،سریع و آسان برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان گونه‌های مختلف باشد (Palai & Rout, 2011). در پژوهشی که در راستای ارزیابی مولکولی ۵۸ رقم گل داوودی با استفاده از ۱۹ نشانگر SRAP انجام شد، نتایج نشان داد که این ارقام داوودی با استفاده از تجزیه ساختار جمعیت به پنج زیر مجموعه، قابل تقسیم‌بندی هستند. در پژوهش آنها، ژنوتیپ‌ها بر اساس نوع گلچه، به زیرگروه‌هایی با گلچه پهن، لوله‌ای، آنمونی، نامتعارف و ژاپنی تقسیم شدند (Li *et al*., 1998). در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۱ جمعیت از گل داوودی در چین، از صفات مورفولوژیک و از دو نشانگر مولکولی SRAP و ISSR استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه نشانگرهای مولکولی، نمونه‌ها را بر اساس منشأ جغرافیایی تقسیم کرد و در دو گروه جداگانه شمال و جنوب چین قرار داد (Shao *et al*., 2010). در پژوهشی

1. Simple Sequence Repeat (SSR)

سطح تنوع ژنتیکی ۷۴ ژنوتیپ داوودی، با استفاده از ۱۹ ترکیب آغازگری AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه پژوهش ایجاد ۴۲۵ نوار چندشکل بود که میانگین میزان چندشکلی را ۷۱/۵ درصد گزارش نمودند. از طرف دیگر، دامنه ضریب شباهت جاکارد بین ۰/۶۴ تا ۰/۸۹، یکی دیگر از دلایل بیان وجود تنوع بالای ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تحقیق ایشان بود (Chen *et al.*, 1993). در پژوهشی با استفاده از ۲۵ ترکیب آغازگری AFLP، به بررسی تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ گل داوودی در ایران پرداخته شد. نتایج این تحقیق، در مجموع ۱۴ ترکیب آغازگری با میزان بالای درصد چندشکلی (۹۸/۹ درصد)، محتوای اطلاعات چندشکل (۰/۴۹) و شاخص نشانگری (۴۵/۱۷)، به‌عنوان قدرتمندترین ترکیبات آغازگری جهت تمایز و تفکیک ژنوتیپ‌های داوودی شناسایی شدند. بر اساس نتایج این مطالعه، میزان چندشکلی حدود ۹۹ درصد بود. این موضوع نشان‌دهنده تنوع بالای ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این مطالعه بود (Roein *et al.*, 2014). با توجه به اینکه در کشور ما، شناخت کافی از پتانسیل ژنتیکی گل داوودی وجود ندارد، بنابراین، بررسی تنوع در ژنوتیپ‌های داوودی، ضروری به‌نظر می‌رسد؛ در همین راستا در این تحقیق، ۲۰ رقم گل داوودی، با استفاده از نشانگرهای اختصاصی ریزماهواره (SSR) که از کارایی بسیار بالایی نسبت نشانگرهای مشابه برخوردار می‌باشند، مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۲۰ رقم اصلاحی گل داوودی (جدول۱)، به‌صورت قلمه ریشه‌دار شده از پژوهشکده ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات تهیه و اواسط اردیبهشت ماه در گلخانه آموزشی- تحقیقاتی باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، در گلدان‌های پلاستیکی با ابعاد ۱۸×۱۸ سانتی‌متر کشت شدند. پس از کاشت، گلدان‌ها در هفته اول هر روز و در هفته‌های بعد، هر دو روز یک‌بار آبیاری شدند.

استخراج DNA

بعد از استقرار گیاه در مرحله هشت‌برگی، برگ‌های تازه گیاه جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، جهت استخراج DNA منتقل شدند. برای استخراج DNA از روش CTAB (Murray & Thompson, 1980) استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دو روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز (۰/۸ درصد) تعیین شد.

جدول ۱. اسامی ارقام گل داوودی مورد بررسی با نشانگر ریزماهواره

Table 1. *Chrysanthemum* cultivars evaluated with SSR markers

Number	Cultivar	Number	Cultivar
1	Afshan	11	Tanaz
2	Fariba2	12	Taban3
3	Elika	13	Farahnaz
4	Golgis	14	Oran
5	Shahin	15	Nazgol
6	Farid	16	Yasamin
7	Bolur	17	Nastaran
8	Ramtin	18	Nadia2
9	Noruz3	19	Avadis
10	Kimiya3	20	Anushe2

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

دوازده جفت آغازگر SSR بر اساس چندشکلی و تکرارپذیری آن‌ها، برای ارزیابی ارقام گل داوودی به‌کار گرفته شدند (جدول ۲). واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad و چرخه PCR با شرایط یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۹-۵۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و مرحله بسط به‌مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به‌مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از اتمام چرخه‌ها، نمونه‌ها تا قبل از الکتروفورز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تجزیه و تحلیل قطعات حاصل از تکثیر برروی ژل آکریل‌آمید

محصول تکثیری با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز شش درصد، تفکیک شد و رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از روش نیترات‌نقره (An *et al.*, 2009) صورت گرفت. اجزای واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتری در جدول ۳ ذکر شده است.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده

Table 2. SSR Markers characteristics applied in this study

Primer	Bands (bp)	Tm (˚C)	Sequence 5' → 3'
JH04	344–332	58	F:TCTCCACTCCCTCATTTTCACTC R:CAACTCGTACACCAATACCACGA
JH09	281–265	55	F: TTCGCCCTCTGCTGCTCTTGTAA R: CCATTTTCTTGGCTTCTTGTGCT
JH11	396–366	55	F: TATACTGCTGAATATCGTCCCTC R: AAGCGTTATCAAATATCCCCTCC
JH20	241–213	58	F:CACTTTCTTCTACAACCATCTTTACA R: CATGTGCGAGTGAATGTGAGTAGT
JH30	248–240	53	F: GGTGAGGTGCAGAACAAGGATA R: ACCAGATTGGAATGAAACGAAA
JH31	190–176	58	F: CTCTTTTGGCTGCTCTAACATATC R: CAAGTTTGACACTGTCACGGAC
JH33	262–252	52	F: GCCCCACTTAACTGCCTCAAT R: AAAGTAAACCAAATCTACACGACCAC
JH42	391–313	51	F: AACACTGTAGGACCACTACGAATATC R: CTATAAATACCCCTCAAAGTCTCATT
JH47	404–393	55	F: CTTCTTATCTCCTAACATTCCCA R: ATGTGATATGGAGGAGCCTTT
JH51	392–286	56	F: GAATTATGTTAGTTCTGAATCGCAGTTA R: AAACTAACCTAAAACTATTTCCAACCC
JH52	200–128	58	F: GTTTAACCCCTTACCTCAACGTC R: TTTATGAAACTTGAAAACACCCACT
JH72	310–298	57	F: ATCAGAAGTTGAGGCGTGTTGG R: AAAGAAAGAAAAGAAAGGAAAGAGGG

جدول ۳. اجزای واکنش PCR

Table 3. PCR reaction properties

Materials	Stock concentration	Amount in 25 µl
DNA	10 ng	3
Buffer PCR	10×	2.5
MgCl2	50 mM	0.7
Primer F	10 Pm	1
Primer R	10 Pm	1
dNTP	10 mM	0.5
Taq DNA Polymerase	5 U	0.2
Distillated water	--	16.1
Total volume	--	25

ارزیابی‌های مولکولی

از جمله معیارهای تعیین میزان چندشکلی، شاخص شانون (I) و تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) می‌باشند (جدول ۴). تعداد آلل‌های تشخیص داده شده در هر جایگاه برای ارقام مورد بررسی، یک شاخص مناسب از تنوع ژنتیکی می‌باشد (Nevo, 1978). برای بررسی اطلاعات چندشکلی آغازگرها، شاخص‌های مولکولی ذیل محاسبه گردید: ۱- درصد چندشکلی: برای محاسبه این شاخص، تعداد نوار چندشکل بر تعداد کل نوارها تقسیم شد، ۲- شاخص محتوای چندشکل PIC: این شاخص با استفاده از رابطه PIC=1-Σpi2 محاسبه شد (Powell *et al.*, 1996). در اینجا p_i فراوانی آلل iام و n تعداد آلل‌هاست، ۳- شاخص نشانگر (MI): تعداد نوارهای چندشکل ضرب در شاخص محتوای چندشکلی از رابطه MI = PIC × EMR محاسبه شد، ۴- شاخص EMR: این نسبت بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل در یک ژرم‌پلاسم می‌باشد که بر حسب فرمول $EMR = n_p \times ß$ محاسبه شد (Powell *et al.*, 1996). همچنین پارامترهای ژنتیک جمعیت مانند تعداد آلل‌های مؤثر Ne (Kimura & Crow, 1973) شاخص تنوع ژنی (Nei, 1973) و شاخص اطلاعاتی شانون (I Lowontin, 1927) با استفاده از نرم‌افزار POPGEN 1.31 محاسبه شد (Yeh *et al*., 1997).

نتایج و بحث

شاخص‌های تنوع مربوط به ۱۲ نشانگر SSR

بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم گل داوودی با استفاده از ۱۲ آغازگر SSR، در مجموع تعداد ۷۳۱ باند واضح و قابل امتیازدهی ایجاد نمود که اندازه آن‌ها در محدوده ۱۲۸ تا ۴۰۴ جفت باز متغیر بود. تعداد باند در آغازگرهای مختلف، متفاوت بود، به‌طوری‌که میانگین تعداد باند به‌ازای هرجفت آغازگر ۶۰/۹۱ عدد بود که دامنه‌ای از ۲۲ تا ۹۶ عدد باند بود (جدول ۴). از طرف دیگر، در بین تمام ارقام، تمام باندها چندشکل بود، که نشان‌دهنده بالا بودن درصد چندشکلی (۱۰۰ درصد) بود. بیشترین تعداد باند چندشکل شامل۹۶ باند در ترکیب آغازگری JH72 مشاهده شد و کمترین تعداد آن مربوط به ترکیب آغازگری JH04 با ۲۲ عدد باند

بود. استفاده از تعداد زیاد ترکیب آغازگری، در افزایش دقت گروه‌بندی ارقام مؤثر (Osmani & Si-o-Se Mordeh, 2009). میانگین تعداد نشانگرهای مشاهده‌شده در هر ترکیب آغازگری، مناسب‌بودن مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (Hassany *et al.*, 2011). بر اساس داده‌های به‌دست‌آمده از ۱۲ ترکیب آغازگری، مقدار PIC در ژنوتیپ‌های مورد بررسی از ۰/۲۶ تا ۰/۵۰ متفاوت بود (جدول ۴). کمترین مقدار PIC مربوط به آغازگر JH42 بود که مقدار PIC آن معادل ۰/۲۶ بود. از طرف دیگر، بیشترین مقدار PIC به‌میزان ۰/۵۰ بود که در آغازگر JH31 مشاهده شد. بر همین اساس، آغازگر SSR بهتر از سایر آغازگرها می‌تواند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های داوودی را مشخص کنند و ظرفیت بالایی در تفکیک و تمایز افراد دارند. در مجموع، میانگین PIC معادل ۰/۴۴ بود. در پژوهشی براساس داده‌های به‌دست‌آمده از ۲۵ ترکیب آغازگری AFLP، مقدار PIC در ژنوتیپ‌های مورد بررسی از ۰/۲۵ تا ۰/۵۰ متفاوت بود، کمترین مقدار PIC مربوط به دو ترکیب آغازگری M-CAG/E-AAC و M-CAC/E-AGA بود که مقادیر PIC آن‌ها به‌ترتیب معادل ۰/۲۵ و ۰/۲۶ بود. از طرف دیگر، بیشترین مقدار PIC به‌میزان ۰/۵ بود که در ترکیبات آغازگری M-CTG-/E-ACA، M-CTG/E-AAG، M-CTG/E-AGA، M-CTG/E-ACC، M-CTG/E-ACG، M-CTG/E-AA مشاهده شد (Roein *et al.*, 2014). در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۴۰ ژنوتیپ لاله واژگون با استفاده از نشانگر AFLP نشان داد که میانگین PIC برای ۵ ترکیب آغازگری مورد استفاده ۰/۴۵بوده است (Badfar-Chaleshtori *et al.*, 2012). میزان PIC، برای تعیین قدرت تفکیک نشانگر به‌کار می‌رود که نه تنها به تعداد آلل در هر جایگاه، بلکه تعداد فراوانی نسبی هر آلل نیز وابسته است (Sorkheh *et al.*, 2007). به‌عبارت دیگر، میزان PIC نشان‌دهنده میزان چندشکلی یک نشانگر می‌باشد که برای نشانگر غالب که دارای دو جایگاه آللی هستند، می‌تواند از صفر تا ۰/۵ متغیر باشد (Mateescu *et al.*, 2005). هرچه این عدد بزرگ‌تر باشد، بیانگر وجود تعداد آلل‌های زیاد و میزان چندشکلی بالا و همچنین توزیع مناسب آلل‌های آن مکان در جمعیت مورد مطالعه است (Roldàn-Ruiz *et al.*, 2000). مقدار شاخص اطلاعاتی شانون، به‌عنوان یکی از متغیرهای تنوع محسوب می‌شود. این مقدار در بین آغازگرها متفاوت بود، به‌طوری‌که میانگین آن ۰/۳۰ محاسبه شد و از ۰/۱۴ تا ۰/۳۷ متغیر بود. آغازگر JH42 کمترین مقدار شاخص اطلاعاتی شانون، که معادل ۰/۱۴ بود را به خود اختصاص داد. در حالی‌که بیشترین مقدار این شاخص برای آغازگر JH11 معادل ۰/۳۷ بود. در پژوهش Roein *et al.* (2014) این مقدار در بین ترکیب آغازگرها، متفاوت بود، به‌طوری‌که میانگین آن ۰/۴۵ محاسبه شد و از ۰/۲۴ تا ۰/۵۹ متغیر بود. ترکیب آغازگری M-CAG/E-AAC کمترین مقدار شاخص اطلاعاتی شانون که معادل ۰/۲۴ بود را به خود اختصاص داد، درحالی‌که بیشترین مقدار این شاخص، برای ترکیب آغازگری M-CTG/E-AAG معادل ۰/۵۹ بود. تفاوت این شاخص در مطالعه حاضر با پژوهش Roein *et al.* (2014)، به‌دلیل تفاوت نشانگر به‌کار برده شده در هر دو مطالعه و همچنین تفاوت ارقام می‌باشد. در پژوهش Badfar-Chaleshtori *et al.* (2012) میزان شاخص شانون برای جمعیت‌های لاله واژگون در ایران ۰/۶۱ گزارش شد. محاسبه شاخص نشانگر برای هر کدام از آغازگرهای مورد استفاده نشان داد که کمترین میزان شاخص نشانگری، مربوط به آغازگر JH04 با میزان ۷/۴۸ و بیشترین شاخص نشانگری مربوط به آغازگر JH72 با میزان ۴۱/۲۸ بود که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگر در مقایسه با سایر آغازگرهاست (جدول ۴). در مطالعه Roein *et al.* (2014) با نشانگر AFLP، کمترین میزان شاخص نشانگری مربوط به آغازگر M-CAG/E-AAC با میزان ۸/۱۹ و بیشترین شاخص نشانگری مربوط به آغازگر M-CTG/E-AGA با میزان ۶۰/۰ بود. در مجموع، میانگین شاخص نشانگری ۲۷/۷۲ محاسبه شد که در مقایسه با میانگن شاخص نشانگری به‌دست آمده در مطالعات قبلی (Roein *et al.*, 2014) روی گیاه داوودی (۶۰/۰)، کمتر و نسبت به گیاه لاله واژگون (۱۶/۷۸)، عدد بزرگ‌تری بود.

یکی دیگر از پارامترها در بررسی تنوع ژنتیکی، تنوع ژنی است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میانگین تنوع ژنی در بین ارقام داوودی ۰/۳۸ بود. این مقدار در آغازگر JH47 برابر با ۰/۴۸ بود که بیشتر از سایر ترکیب آغازگرهای مورد استفاده بود. کمترین مقدار تنوع ژنی، مربوط به ترکیب آغازگری JH11 به‌میزان ۰/۳۱ بود. این مقدار در پژوهش Roein *et al.* (2014) در ترکیب آغازگرهای M-CTG/E-AAG، M-CTG/E-ACC و M-CTG/E-ACG برابر با ۰/۴۰ بود که بیشتر از سایر ترکیب آغازگرهای مورد استفاده بود. کمترین مقدار تنوع ژنی مربوط به ترکیب آغازگری M-CAG/E-AAC به‌میزان ۰/۱۳ و میانگین تنوع ژنی برابر با ۰/۲۹ بود. این، در حالی است که میانگین تنوع ژنی برای نشانگر AFLP در تحقیق Badfar-Chaleshtori *et al.* (2012) معادل ۰/۴۲ بود، میانگین تنوع ژنی در مطالعه حاضر، از میانگین نتایج Roein *et al.* (2014) بیشتر و نسبت به نتایج Badfar-Chaleshtori *et al.* (2012) کمتر می‌باشد. شاید دلیل تفاوت در نتایج این مطالعه در مقایسه با مطالعه‌ی Roein *et al.* (2014) استفاده از نشانگرها و ارقام متفاوت نسبت به یکدیگر باشد. تعداد آلل‌های مؤثر، بیانگر تعداد آلل‌هایی است که به‌طور مؤثر در ایجاد تنوع بین جمعیت‌ها دخالت دارند. در این بررسی، میانگین تعداد آلل مشاهده‌شده در بین ۲۰ رقم، معادل ۲ بود که به‌وسیله ۱۲ آغازگر مشخص شد. تعداد آلل مشاهده‌شده در همه آغازگرها، دو آلل بود. از طرف دیگر، میانگین تعداد آلل مؤثر برای ۱۲ ترکیب آغازگری، ۱/۲۵ آلل بود که بیشترین تعداد آلل مؤثر، در پنج آغازگر JH09 JH52 JH72 JH30 و JH47 مشاهده شد. آغازگر JH04 با تعداد ۱/۲۳ آلل، کمترین تعداد آلل مؤثر را به خود اختصاص داد.

تجزیه خوشه‌ای

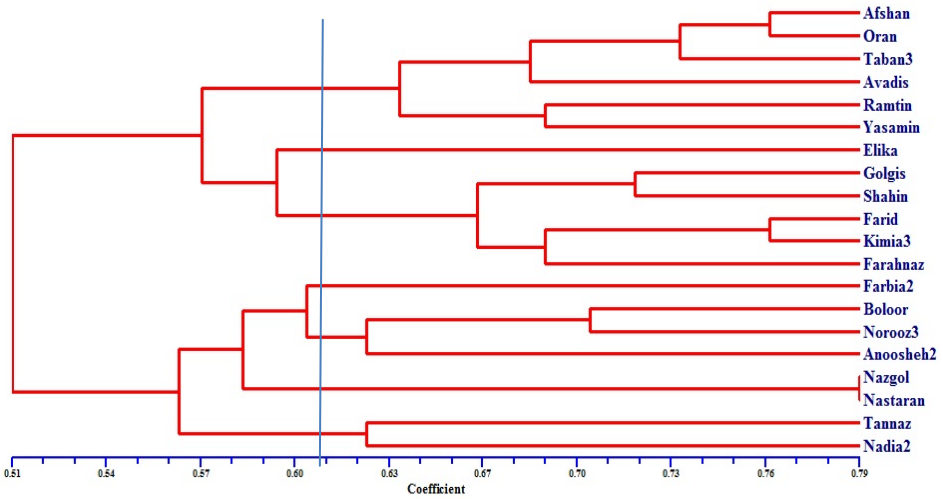
بر اساس نتایج حاصل از دندروگرام به‌دست آمده از تجریه خوشه‌ای داده‌های مولکولی ۲۰ رقم گل داوودی مطابق با نتایج حاصل از ماتریس فاصله مبتنی بر ضریب تشابه جاکارد، میزان ضریب همبستگی ۰/۷۹ برآورد گردید، که دامنه ضریب تشابه در این مطالعه، از ۰/۵۱ تا ۰/۷۹ به‌دست آمد. با قطع دندروگرام در نقطه ۰/۶۱ (به‌عبارتی با احتمال ۰/۶۱) هفت گروه اصلی ایجاد شد (شکل ۱). دندروگرام در ضریب تشابه ۰/۶۱ برش قطع گردید و ارقام داوودی مورد مطالعه را به ۷ گروه اصلی تقسیم شدند.

گروه اول در ضریب تشابه ۰/۶۳ به دو زیر گروه تقسیم شد که شامل ۶ رقم بود. زیر گروه اول شامل ارقام Afshan، Oran، Taban3 و Avadis بود که ارقام Afshan و Oran بیشترین شباهت ژنتیکی با ضریب تشابه ۰/۷۶ و کمترین تشابه ژنتیکی را با رقم Nadia2 با ضریب تشابه ۰/۶۲ را داشت. زیرگروه دوم شامل دو رقم Ramtin و Yasamin می‌باشند که بیشترین شباهت ژنتیکی را با هم در ضریب تشابه ۰/۶۸ داشت. گروه دوم فقط شامل رقم Elika با ضریب تشابه ۰/۵۹ بود. گروه سوم دارای دو زیرگروه بود که در زیرگروه اول ارقام Golgis و Shahin با ضریب تشابه ۰/۷۲ قرار گرفتند که کمترین تشابه را با ارقام Nastaran و Nazgol با ضریب تشابه ۰/۵۸ داشتند. زیر گروه دوم دارای سه رقم Farid، Kimia3 و Farahnaz بود که ارقام Farid و Kimia 3 بیشترین تشابه با ضریب تشابه ۰/۷۷ داشتند. گروه چهارم فقط شامل رقم Fariba 2 بود. گروه پنجم شامل دو زیر گروه که زیر گروه اول شامل Boloor و Norooz3 دارای ضریب تشابه ۰/۷۱ است. زیر گروه دوم شامل رقم Anoosheh2 با ضریب تشابه ۰/۶۳ بود. گروه ششم شامل دو رقم Nazgol و Nastaran بودند. گروه هفتم دارای ارقام Tannaz و Nadia2 با ضریب تشابه ۰/۶۲ بودند. نتایج مشابهی توسط Chen *et al.* (1993) برای داوودی گزارش شده است؛ به‌طوری‌که دامنه ضریب تشابه جاکارد بین ۰/۶۴ تا ۰/۸۹ بود. کمترین میزان شباهت، نشانه این است که این ژنوتیپ‌ها، دارای اختلاف ژنتیکی زیادی می‌باشند، لذا می‌توان از آنها در صورت داشتن صفات مطلوب، به‌عنوان والد در برنامه‌های دورگ‌گیری و اصلاح داوودی از طریق تولید هیبرید و به‌دست آوردن حداکثر هتروزیس استفاده کرد (Roein *et al.*, 2014). نتایج تحقیقات قبلی نشان داد که ضریب تشابه جاکارد برای بررسی نشانگرهای غالب مناسب‌تر است؛ هر چند این امر بستگی به تنوع موجود در جمعیت نیز دارد (Sesli & Yegenoglu, 2009; Meyer *et al.*, 2004).

جدول ۴. شاخص‌های تنوع مربوط به ۱۲ نشانگر SSR در ۲۰ رقم گل داوودی

Table 4. diversity indexes related with 12 SSR markers of 20 Chrysanthemum cultivars

Markers index	Nei genetic diversity	Effective alleles	Shanon index	PIC	Polymorphism (%)	Polymorphic bands	Markers
34.56	0.35	1.56	0.31	0.48	100	72	JH20
28.32	0.42	1.73	0.31	0.48	100	59	JH09
8.84	0.42	1.76	0.14	0.26	100	34	JH42
40.8	0.44	1.82	0.30	0.48	100	85	JH52
39.69	0.41	1.75	0.32	0.49	100	81	JH33
41.28	0.47	1.93	0.26	0.43	100	96	JH72
19.78	0.31	1.46	0.37	0.46	100	43	JH11
34.78	0.40	1.71	0.30	0.47	100	74	JH30
7.48	0.20	1.25	0.33	0.34	100	22	JH04
16.56	0.31	1.47	0.37	0.46	100	36	JH15
23.65	0.48	1.96	0.26	0.43	100	55	JH47
37	0.42	1.74	0.34	0.50	100	74	JH31
-	-	-	-	-	-	731	Total
27.72	0.38	1.67	0.30	0.44	100	60.91	Mean



شکل ۱. تجزیه خوشه‌ای ۲۰ رقم گل داوودی با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

Figure 1. Cluster analysis of 20 *Chrysanthemum* cultivars with UPGMA method and Jacard similarity coefficient

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

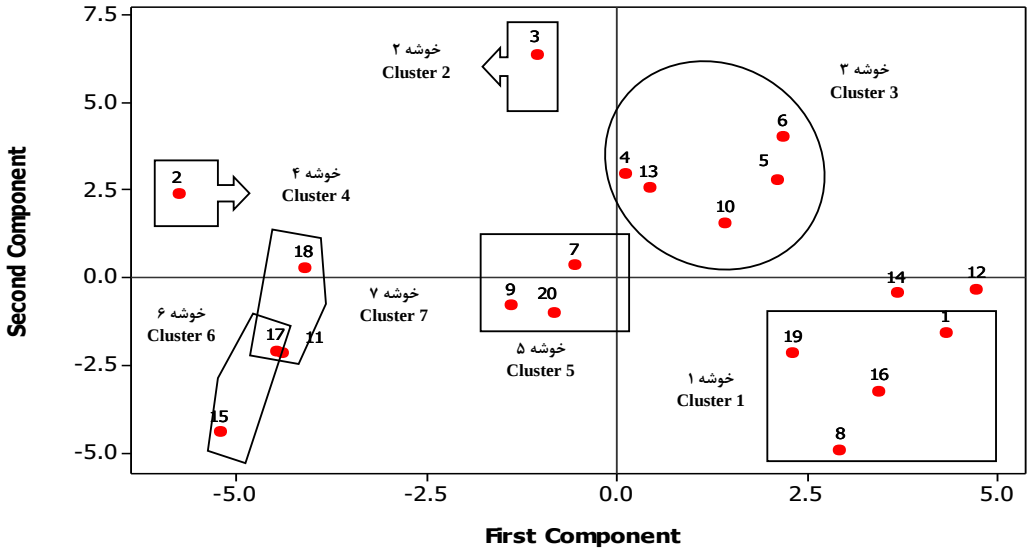
در تجزیه به عامل‌ها، هر عامل یا فاکتور، شامل مهم‌ترین صفات دارای بیشترین ضریب عاملی می‌باشد. در این بررسی، چرخش عامل‌ها با استفاده از روش واریماکس، که تغییرات را میان عامل‌ها به‌شکل یکنواخت توزیع می‌کند، انجام شد. میزان واریانس نسبی هر عامل (درصد واریانس)، نشان‌دهنده اهمیت آن عامل در واریانس کل صفات مورد بررسی است و به‌صورت درصد بیان می‌شود. در این تجزیه، شش عامل اصلی توانستند در مجموع ۶۰/۷۰ درصد از واریانس کل را توجیه نمایند (جدول ۵).

با توجه به تجزیه عامل‌ها، بیشترین تفاوت ژنوتیپ‌ها را عوامل اول، دوم و سوم، به‌ترتیب با واریانس‌های ۱۶/۷۰، ۱۲/۶۰ و ۱۰/۰۰ درصد بین ژنوتیپ‌ها ایجاد نمود. سپس مؤلفه چهارم ۸/۰۰ درصد، مؤلفه پنجم ۷/۳۰ درصد و مؤلفه ششم ۶/۱۰ درصد از کل تغییرات را توجیه نمودند (جدول ۵). این موضوع نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه محدود به منطقه خاص از ژنوم نیست و در سراسر ژنوم پراکنده است. در نهایت، از دو مؤلفه اصلی اول، برای نمایش گرافیکی پراکنش ارقام استفاده شد (شکل ۲). دیاگرام پراکنش ۲۰ رقم گل داوودی، بر اساس دو مؤلفه اصلی اول و دوم (شکل ۲)، نشان داد که دیاگرام پراکنش، بر اساس دو مؤلفه اصلی اول و دوم، منطبق با خوشه‌بندی تجزیه کلاستر بود. در دیاگرام پراکنش، بر اساس دو مؤلفه اصلی اول و دوم، ارقام مطابق با تجزیه خوشه‌ای در هفت خوشه مختلف قرار گرفتند.

جدول ۵. مقادیر ویژه و درصد تجمعی واریانس‌ها برای مؤلفه‌های اول تا ششم

Table 5. Eigen value and cumulative percent of variances for first and sixth factors

Cumulative percent of variances	Eigen value as percent of variances	Eigen value	Factors
16.70	16.70	11.20	PCA 1
29.30	12.60	8.43	PCA 2
39.30	10.00	6.68	PCA 3
47.30	8.00	5.37	PCA 4
54.60	7.30	4.86	PCA 5
60.70	6.10	4.06	PCA 6



شکل ۲. دیاگرام پراکنش دو بعدی ارقام داوودی بر اساس دو مؤلفه اصلی

Figure 2. Distribution diagram of Chrysanthemum cultivars based on two main components

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر اولین پژوهش در ایران است که به مقایسه ارقام داوودی از لحاظ مولکولی و با نشانگر SSR پرداخته است. نتایج کلی این پژوهش، بر توانایی نشانگر SSR در تفکیک ژنوتیپ‌های داوودی تأکید دارد. بالا بودن میزان شاخص‌های مربوط به تنوع، از جمله محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص نشانگری و تنوع ژنی که به‌ترتیب معادل ۰/۴۱، ۲/۵۳ و ۰/۳۸ بود؛ نشان‌دهنده میزان تنوع ژنتیکی، بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. در مجموع شش آغازگر (JH09، JH11، JH52، JH72، JH30 و JH47)، با میزان بالای درصد چندشکلی (۱۰۰ درصد)، محتوای اطلاعات چندشکل (۰/۴۸) و شاخص نشانگری (۳/۴۹)، به‌عنوان قدرتمندترین آغازگرهای ریزماهواره جهت تمایز و تفکیک ارقام داوودی در این مطالعه شناسایی شدند. به‌طوری‌که می‌توان انتظار داشت در پژوهش‌های بعدی با استفاده از آن‌ها بتوان به اطلاعات بیشتری دست یافت.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم ایستگاه ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات، به‌خاطر تأمین مواد گیاهی مورد نیاز این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. An, Z., Xie, L., Cheng, H., Zhou, Y., Zhang, Q., He, X. & Huang, H. (2009). A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Analytical Biochemistry*, 391, 77-79.
2. Badfar-Chaleshtori, S., Shiran, B., Kohgard, M., Mommeni, H., Hafizi, A., Khodambashi, M., Mirakhorli, N. & Sorkheh, K. (2012). Assessment of genetic diversity and structure of Imperial Crown (*Fritillaria imperialis* L.) populations in the Zagros region of Iran using AFLP, ISSR and RAPD markers and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 42, 35-48.

3. Breseghello, F. & Sorrells, M. E. (2006). Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science*, 46, 1323-1330.
4. Chen, D.-X. & Lieth, J. H. (1993). A two-dimensional, dynamic model for root growth distribution of potted plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 181-187.
5. Dole, J. M. & Wilkins, H. F. (1999). *Floriculture: principles and species*, Prentice-Hall inc.
6. Farsi, M. & Bagheri, A. (2009). *Principals of plant breeding*. Press of Jahad Daneshgahi og Mashhad. Pp. 368. (in Farsi)
7. Hassany, M. H., Torabi, S., Omidi, M., Etminan, A. & Dastmalchi, T. (2011). Evaluation od genetic diversity of *Foeniculum* grmplasm by AFLP markers. *Journal of Agronomic Plant Sciences of Iran*, 42 (3), 597-604. (in Farsi)
8. Hokanson, S. C., McFadden, A. K., Lamboy, W. F. & McFerson, J. R. (1998). Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* borkh. Core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics Journal*, 97, 671-683.
9. Lewontin, R. C. (1972). The apportionment of human diversity. *Evolution of Biology*, 6, 381-398.
10. Meloni, M., Perini, D., Filigheddu, R. & Binelli, G. (2006). Genetic variation in five Mediterranean populations of Juniperus phoenicea as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Annals of Botany*, 97(2), 299-304.
11. Longton, F. A. (1989). Inheritance in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Heredity*, 62, 419-423.
12. Li, R. W., Wang, C., Dai, S.-L., Luo, X.-Y., Li, B.-Q., ZHU, J., LU, J. & LIU, Q.-Q. (2012). The association analysis of phenotypic traits with SRAP markers in chrysanthemum. *Sci Agricultural Sciences*, 45, 1355-1364.
13. Mateescu, R., Zhang, Z., Tsai, K., Phavaphutanon, J., Burton-Wurster, N., Lust, G., Quaas, R., Murphy, K., Acland, G. & Todhunter, R. (2005). Analysis of allele fidelity, polymorphic information content, and density of microsatellites in a genome-wide screening for hip dysplasia in a crossbreed pedigree. *Journal of Heredity*, 96, 847-853.
14. Meyer, A. D. S., Garcia, A. A. F., Souza, A. P. D. & Souza Jr, C. L. D. (2004). Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.). *Genetics and Molecular Biology*, 27, 83-91.
15. Murray, M. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8, 4321-4326.
16. Osmani, ZH. & Si-o-Se Mordeh, A. (2009). Evaluation od genetic diversity of *Triticum* grmplasm by AFLP markers and agronomic traits. *Journal of Natural resources and Agricultural Technique and Sciences*, 47, 301-319. (in Farsi)
17. Nevo, E. (1978). Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical Population Biology*, *13*(1), 121-177.
18. Palai, S. & Rout, G. R. (2011). Characterization of new variety of Chrysanthemum by using ISSR markers. *Horticultura Brasileira*, 29, 613-617.
19. Powell, W., Machray, G. C. & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1, 215-222.
20. Peyvandi, M., Morad Tehrani, M. & Majd, A. (2010). Callus Induction and organogenesis of *Chrysanthemum*. *Biology Sciences of Azad University*, 3(2), 53-59. (in Farsi)
21. Powell, W., Machray, G. C. & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1, 215-222.
22. Roein, Z., Asil, M. H., Sabouri, A. & Dadras, A. R. (2014). Genetic structure of *Chrysanthemum* genotypes from Iran assessed by AFLP markers and phenotypic traits. *Plant Systematics and Evolution*, 300, 493-503.
23. Roldàn-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A. & De Loose, M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6, 125-134.
24. Sesli, M. & Yegenoglu, E. (2009). Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis based on RAPD markers in wild olives. *Genetics and Molecular Research, GMR*, 9, 2248-2253.
25. Shao, Q.-S., Guo, Q.-S., Deng, Y.-M. & Guo, H.-P. (2010). A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematic and Ecology*, 38, 1160-1169.
26. Sorkheh, K., Shiran, B., Gradziel, T. M., Epperson, B., Martínez-Gómez, P. & Asadi, E. (2007). Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica*, 156, 327-344.