Journal of Vegetables Sciences
Vol 3, No 6, Autumn & Winter 2020, Pages (15-29)
DOI: 10.22034/iuvs.2020.118394.1080

دو فصلنامه علمی- پژوهشی علوم سبزی‌ها
سال ۳- شماره ۶- پاییز و زمستان ۱۳۹۸- صفحات (۲۹-۱۵)

ارزیابی نتاج حاصل از تلاقی بین و درون‌گونه‌ای مارچوبه‌های ایرانی و اروپایی (*Asparagus* spp.)

محمد ابراهیم رنجبر[۱]، زهرا قهرمانی[۲*]، سید جواد موسوی‌زاده[۳]، طاهر برزگر[۴] و خوان خیل[۵]

۱- دانشجوی دکتری علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۴- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۵- استاد گروه ژنتیک، دانشکده ژنتیک، دانشگاه کوردوبا، کوردوبا، اسپانیا
* نویسنده مسئول: z.ghahremani@znu.ac.ir
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۹- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۳)

چکیده

تلاقی بین و درون‌گونه‌ای تکنیکی پر کاربرد جهت انتقال صفات از گیاهان خودرو به ارقام تجاری مارچوبه است. در پژوهش حاضر اقدام به انجام تلاقی بین مارچوبه‌های خودرو ایرانی و مارچوبه‌های تجاری اروپایی در دانشگاه کوردوبا (اسپانیا) طی سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۴ گردید. سپس، به کمک نشانگرهای مولکولی برای هر یک از گونه‌ها و توده‌های والدینی آلل اختصاصی تشخیص داده شد و به کمک ردیابی آلل‌های اختصاصی والدین در نتاج، اصالت ژنتیکی گیاهان هیبرید تأیید شد و پس از آن برخی از مهم‌ترین صفات مورفولوژیکی در جمعیت گیاهان والدینی و نتاج مورد ارزیابی قرار گرفت. تلاقی موفق بین‌گونه‌ای بین *Asparagus breslerianus* و *A. officinalis* صورت پذیرفت. آلل اختصاصی (به طول ۱۰۸۶ bp) در گونه *A. persicus* توسط نشانگر TC6 شناسایی شد. بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد که بیشترین میزان ضریب تنوع مربوط به صفات تعداد ساقه خوارکی، قطر ساقه اصلی، طول شاخه جانبی اولیه و ثانویه و تعداد کلادود بود. هیبرید حاصل از تلاقی *A. persicus*× *A. officinalis* از نظر تعداد ساقه خوارکی و شاخه جانبی ثانویه میزان بیشتری را نسبت به گیاهان والدینی از خود نشان داد. قطر و ارتفاع ساقه اصلی، تعداد شاخه جانبی اولیه، قطر و طول شاخه جانبی اولیه و ثانویه، طول و عرض فلس، قطر برگ و طول میانگره شاخه جانبی اولیه و ثانویه نقش مهمی را در ایجاد تنوع مورفولوژیکی در جمعیت گیاهان والدینی و هیبرید ایفا کردند.

واژه‌های کلیدی: تلاقی‌پذیری، صفات مورفولوژیکی، مارچوبه ایرانی، هیبرید بین‌گونه‌ای.

مقدمه

مارچوبه یک سبزی دو پایه، علفی و ریزوم‌دار است که بومی اروپا، آسیا و آفریقا می‌باشد. مهم‌ترین گونه تجاری مارچوبه *Asparagus officinalis* L. بوده که به بسیاری از تنش‌های زیستی و غیرزیستی حساس است، در عین‌حال گونه‌های خودرو متعددی از مارچوبه شناسایی شده است که دارای صفات مقاومت به انواع تنش‌های رایج در کشت و پرورش ارقام تجاری هستند (Ito *et al*., 2011).

تلاقی بین و درون‌گونه‌ای تکنیکی پر کاربرد به‌منظور انتقال صفات مهم از گیاهان خودرو به ارقام زراعی است (Nathnagel *et al*., 2012).

انجام تلاقی بین‌گونه‌ای به‌منظور انتقال صفات مرتبط با مقاومت به ارقام تجاری، در بسیاری از پژوهش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است، برای مثال گزارشی از تلاقی موفق بین گونه *A. officinalis* و خویشاوند خودرو آن *A. kiosianus* منتشر شد (Ito *et al*., 2011). همچنین تلاقی موفق بین سطوح دیپلوئید و تتراپلوئید گونه *A. officinalis* با سطح تتراپلوئید گونه *A. maritimus* در سال ۲۰۱۲ میلادی گزارش شد (Falavingna *et al*., 2012). در پژوهشی دیگر کاربرد موفق گونه *A. maritimus* در تلاقی پل (استفاده از گونه‌ای سازگار به‌منظور غلبه بر عدم تلاقی‌پذیری دو گونه ناسازگار) به‌منظور غلبه بر ناسازگاری تلاقی بین گونه‌های *A. officinalis* و *A. acutifolius* گزارش گردید (Valente *et al*., 2009).

نشانگرهای مورفولوژیکی در کنار نشانگرهای مولکولی ابزاری مناسب جهت برآورد سطح تنوع ژنتیکی و میزان چندشکلی موجود در بین جمعیت‌ها هستند (Mousavizadeh *et al*., 2016). در بررسی مورفولوژیکی توده‌های خودرو مارچوبه در ایران گزارش شد که در تجزیه خوشه‌ای، توده‌های مورد بررسی در پنج گروه مختلف قرار گرفتند که گروه سوم که همگی جنسیت نر داشتند از لحاظ میانگین صفات اندازه‌گیری شده، بالاتر از میانگین کل قرار داشتند (Sarabi *et al*., 2010). بر اساس مطالعه‌های صورت پذیرفته در داخل کشور، تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی در گونه‌های مارچوبه ایران گزارش شده است (Mousavizadeh *et al*., 2015; 2016; 2017). در پژوهش انجام شده توسط Mousavizadeh و همکاران (۲۰۱۵ و ۲۰۱۶)، مارچوبه‌های بومی ایران دارای صفات مرتبط با مقاومت مانند مقاومت به خشکی، شوری و شرایط قلیایی خاک و برخی از بیماری‌های قارچی مارچوبه بودند که فقدان این صفات در ارقام تجاری مارچوبه گزارش شده است. بنابراین فرصت مناسبی جهت انتقال این صفات به ارقام تجاری از طریق تلاقی‌های بین و درون‌گونه‌ای در مارچوبه وجود دارد.

هدف از پژوهش حاضر، بررسی امکان انجام تلاقی بین و درون برخی از گونه‌های مهم مارچوبه ایرانی (دارای صفات مرتبط با مقاومت) با مارچوبه‌های تجاری اروپایی (دارای صفات زراعی مطلوب)، بررسی امکان به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی در جهت تعیین ماهیت ژنتیکی نتاج و بررسی مورفولوژیکی آنهاست. نتایج حاصل از این پژوهش به‌عنوان اطلاعات اولیه و پایه در برنامه اصلاحی بلندمدت مارچوبه به‌منظور تولید هیبریدهای مقاوم به برخی از مهم‌ترین تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

الف) در این پژوهش، قبل از انجام تلاقی‌های بین و درون‌گونه‌ای اقدام به تشخیص آلل اختصاصی در تمامی توده‌ها و گونه‌های مورد ارزیابی گردید تا پس از انجام تلاقی به کمک ردیابی آلل‌های اختصاصی والدین در نتاج، هیبریدهای واقعی شناسایی شوند. بدین منظور از ۲۱ توده و گونه مختلف مارچوبه (کشت‌شده در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه کوردوبا اسپانیا- گونه‌های ایرانی در سال ۱۳۹۴ از رویشگاه‌های طبیعی‌شان در نقاط مختلف کشور جمع‌آوری و در طی همان سال در دانشگاه کوردوبا اسپانیا در کنار سایر توده‌ها و گونه‌ها کشت شدند) استفاده شد. اطلاعات مربوط به مواد گیاهی مورد استفاده در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱- گونه‌ها و توده‌های مختلف مارچوبه مورد استفاده همراه با بیان سطح پلوئیدی و منشأ آنها

گونه	کد	سطح پلوئیدی	نوع	منشأ	منطقه و شرایط آب و هوایی
A. officinalis	WR	2x	رقم تجاری	روسیه	ولگا، یوشکار اولا- سرد و مرطوب (Volga, Yoshkar-Ola)
A. verticillatus	AV1	2x	توده خودرو	ایران	اردبیل، خلخال، شال- سرد و نیمه‌خشک
A. verticillatus	AV2	2x	توده خودرو	ایران	سمنان، شاهرود، دشت شاد- مدیترانه‌ای
A. verticillatus	AV3	2x	توده خودرو	ایران	گیلان، لاهیجان، کلارود- سرد و مرطوب
A. officinalis	Ao4-1	2x	توده خودرو	ایران	کرمان، جیرفت- بیابانی
A. officinalis	AOD 1	2x	توده بومی شده	ایران	البرز- مدیترانه‌ای سرد
A. persicus	APe2	2x	گونه خودرو	ایران	گیلان، منجیل- مدیترانه‌ای
A. officinalis	AU	2x	رقم تجاری	آمریکا	رقم تجاری مری واشنگتن
A. prostrates	APB	4x	گونه خودرو	اسپانیا	گالیسیا، لاکرونیا، بارس- مدیترانه‌ای معتدل (Galicia, La Coruna, Bars)
A. officinalis	AO2	4x	توده خودرو	ایران	مازندران، محمودآباد- گرم و مرطوب
A. officinalis	Ao1-1	4x	توده خودرو	ایران	البرز، طالقان- مدیترانه‌ای سرد
A. acutifolius	AC	4x	گونه خودرو	اسپانیا	آندالوسیا، کوردوبا- مدیترانه‌ای گرم (Andalusia, Cordoba)
A. officinalis cv. Morado de Huetor	Ht815	2x	رقم تجاری	اسپانیا	آندالوسیا، گرانادا- مدیترانه‌ای گرم (Andalusia, Granada)
A. officinalis cv. Morado de Huetor	Ht262	4x	رقم تجاری	اسپانیا	آندالوسیا، گرانادا- مدیترانه‌ای گرم (Andalusia, Granada)
A. officinalis cv. Morado de Huetor	Ht167	8x	رقم تجاری	اسپانیا	آندالوسیا، گرانادا- مدیترانه‌ای گرم (Andalusia, Granada)
A. brachyphyllus	AB	6x	گونه خودرو	روسیه	ولگا، یوشکار اولا- سرد و مرطوب (Volga, Yoshkar-Ola)
A. pseudoscaber	APS	6x	گونه خودرو	چک	موراویا، برنو- اقیانوسی مرطوب (Moravia, Brno)
A. maritimus	MA	6x	گونه خودرو	آلبانی	ولوره- معتدل و مرطوب (Vlore)
A. officinalis	AO3	8x	توده خودرو	ایران	مازندران، نور، بلده- سرد و مرطوب
A. officinalis	AO7	8x	توده خودرو	ایران	مازندران، آمل، گزنک- مدیترانه‌ای نیمه‌مرطوب
A. breslerianus	Abr-1	8x	گونه خودرو	ایران	سمنان، شاهرود، یزدو- گرم و خشک
A. officinalis	AO5	10x	توده خودرو	ایران	کردستان، بیجار، بیانلو- سرد و خشک
A. macrorrhizus	MC	12x	گونه خودرو	اسپانیا	مورسیا، کارتاگنا، کارتاگنا- گرم مدیترانه‌ای (Murcia, Cartagena, Cartagena)

(Mousavizadeh *et al*., 2015; 2016; 2017; Moreno *et al*., 2010)

ب) در تمامی تلاقی‌های بین و درون‌گونه‌ای از یک والد خودروی ایرانی به‌عنوان والد گرده دهنده و یک رقم تجاری مارچوبه به‌عنوان والد پذیرنده گرده استفاده شد. توده‌های خودرو ایرانی دارای صفات مرتبط با مقاومت بودند اما از صفات زراعی مناسبی برخوردار نبودند. در مقابل، ارقام تجاری دارای صفات زراعی مطلوب بوده و از صفات مرتبط با مقاومت موجود در توده‌های خودرو ایرانی برخوردار نبودند. توده اهلی شده گونه *A. officinalis* (AOD 1) و سطوح دیپلوئید، تتراپلوئید و

اُکتاپلوئید رقم موراِدو دهتور (Ht815، Ht262 و Ht167) که یک رقم پر کشت و کار در کشورهای اروپایی همچون اسپانیا و ایتالیا است (Moreno *et al*., 2010) به‌عنوان والدین پذیرنده گرده و دارای صفات زراعی مطلوب (اما حساس به تنش) و گونه‌های ایرانی *A. persicus* (APe2) و *A. breslerianus* (Abr-1) همراه با دو توده خودرو گونه *A. officinalis* در سطوح دیپلوئید و تتراپلوئید (Ao4-1 و Ao1-1) به‌عنوان والدین گرده دهنده و دارای صفات مرتبط با مقاومت (Mousavizadeh *et al*., 2015) به‌کار گرفته شدند (جدول ۲). گیاهان مادری با کشت بذور در گلدان‌های پلاستیکی در شرایط گلخانه پرورش داده شدند تا به سن و بلوغ مناسب جهت انجام تلاقی‌های بین‌گونه‌ای برسند. تلاقی‌های بین و درون‌گونه‌ای در سطوح پلوئیدی یکسان و به‌صورت دستی در شرایط کنترل شده صورت پذیرفت. میوه‌های تشکیل شده جمع‌آوری و بذور به‌خوبی با محلول پنج درصد هیپوکلرید سدیم ضدعفونی شدند. سپس اقدام به کشت آنها در پتری‌دیش‌های پوشیده شده با کاغذ صافی گردید. با قرار دادن پتری‌دیش‌های حاوی بذر در اتاقک جوانه‌زنی، شرایط محیطی بر روی دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و تاریکی کامل تنظیم شد. با بررسی هر روزه بذرها اقدام به کشت بذور جوانه‌زده در بستر مخلوط پیت ماسه و پرلیت در اتاقک رشد گردید. پس از رشد گیاهچه‌ها، نتاج به محل کشت و نگهداری گیاهان والدینی انتقال یافتند و در شرایطی مشابه با گیاهان والدینی تا زمان اندازه‌گیری‌های مورفولوژیکی (به‌مدت سه سال) نگهداری شدند.

جدول ۲- گونه‌های مارچوبه مورد استفاده و برنامه تلاقی بین و درون‌گونه‌ای

مواد گیاهی	کد	سطح پلوئیدی	نوع	صفات اصلاحی	برنامه تلاقی	کد
A. officinalis 1	AOD 1	2n=2x	توده بومی شده	صفات زراعی مطلوب ۱. مقاومت به خاک شور	APe2× AOD 1	Ao-Ap
A. officinalis 2	Ao4-1	2n=2x	توده خودرو	۲. مقاومت به خاک قلیایی ۳. مقاومت به خشکی خاک ۴. مقاومت به دمای بالا	Ao4-1× Ht815	Ht-Ao84
A. officinalis 3	Ao1-1	2n=4x	توده خودرو	۱. مقاومت به خاک شور ۲. مقاومت به خاک قلیایی	Ao1-1× Ht262	Ht-Ao21
A. officinalis cv. Morado de Huetor 1	Ht815	2n=2x	رقم تجاری	صفات زراعی مطلوب	Abr-1× Ht167	Ht-Ao84
A. officinalis cv. Morado de Huetor 2	Ht262	2n=4x	رقم تجاری	صفات زراعی مطلوب		
A. officinalis cv. Morado de Huetor 3	Ht167	2n=8x	رقم تجاری	صفات زراعی مطلوب		
A. persicus	APe2	2n=2x	گونه خودرو	۱. مقاومت به خاک قلیایی ۲. مقاومت به بیماری قارچی فوزاریومی		
A. breslerianus	Abr-1	2n=8x	گونه خودرو	۱. مقاومت به خاک شور ۲. مقاومت به خشکی خاک ۳. مقاومت به دمای بالا		

(Mousavizadeh *et al*., 2015; Moreno *et al*., 2010)

استخراج DNA و آنالیز توالی‌های ساده تکراری SSR

DNA نتاج از یک گرم از انتهای برگ‌های جوان با استفاده از روش تغییریافته Doyle و Doyle (۱۹۹۰) استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA به‌وسیله نانودراپ اسپکتوفتومتری (مدل ND 1000 -Thermo Scientific، ساخت ایالات متحده امریکا) تعیین شد. از ۲۰ جفت نشانگر EST-SSR طراحی‌شده برای گونه تجاری مارچوبه (Caruso *et al*., 2008) و ۱۶ جفت نشانگر SSR طراحی‌شده برای گونه تجاری مارچوبه (Mercati *et al*., 2013) به‌منظور تشخیص آلل اختصاصی و تعیین اصالت ژنتیکی نتاج هیبرید استفاده شد (جداول ۳ و ۴). علت انتخاب نشانگرهای ذکر شده این بود که در پژوهش‌های گذشته میزان چند شکلی بالایی را در توده‌های مورد بررسی نشان داده بودند (Castro *et al*., 2013; Mousavizadeh *et al*., 2017).

جدول ۳- اسامی و توالی نشانگرهای EST-SSR مورد استفاده به‌منظور تعیین ماهیت ژنتیکی نتاج

نام نشانگر	توالی نشانگر برگشت (’3- ’5)	توالی نشانگر رفت (’3- ’5)
TC1	AGGTGGAGAACAAATGGCTG	CGAGCTCAATTGAAATCCATAA
TC2	GGCAGGATTAGGGTTTCG	TCTCGCTCACCTTCTCATCC
TC3	CACCATTTCAAATCCCCACT	GAGGCTAGAGCTCCGCTCAT
TC4	AGAGAGGAAGTTGTCGCTCG	TGGGAAAATGGAAGAACCAA
TC5	CCCGATCCAAACCCATCC	GAAAATTCGATCGGAACCCT
TC6	CATGCCCTAAAATCTCCAAGA	GCCAGAGGCTGAAATAAACTG
TC7	CGCCCCGAATCAACTAATAA	TACTGCGGAGGTATGTGGGT
TC8	GGCTAGCCGAAAGAATCTCC	TCTTCCTCCTCCTCCTCCTC
TC9	GTGATTCAAGGGGGAAAGGT	TACACCAAAACCAGAAGGGC
AGA1	CCGGTGCTTTGATTACTGCT	GATCATCATCTTGCGCATTG
AAT1	CTTTTGCTTCTGAACGCTCC	TTGAAGGAGCCGTAAACTGG
AG2	CCTCCTCGGCAATTTAATCA	CAGCTGCATCACGTTCTTGT
AG3	TCCACCCCACAAAAAGAAAG	AGAAGTTGACGCCGTTGTCT
AG5	GATTAATAAAGCGCCGCTGA	ACATAAGCCCATACTTGCGG
AG6	TCATCTGAAATGGCATCAGC	CGAGGCCTAGTGTGTGTTGA
AG7	TTTTGCTCCGATCATTTTCA	CCTCTTCGTCTTCATCAGCC
AG8	GATTGGGACCAACACAAACA	AGCAATGACTTGATCCCCAG
AG10	CGCCCTTGTTCTTCTTCTTG	CAGTTGTCTGCCGTCTTCAA
AG11	AGGGGTCCGGATTAATTCAC	GTCCTTGGCCATTAGAGCTG
AG12	GACTAGCGCCATGAGAAAGG	TTTTAGGGCATTTTAAACGCAT

جدول ۴- اسامی و توالی نشانگرهای SSR مورد استفاده به‌منظور تعیین ماهیت ژنتیکی نتاج

نام نشانگر	توالی نشانگر برگشت (’3- ’5)	توالی نشانگر رفت (’3- ’5)
asp_c12534	CGACCAGAGAAGGAAGGAG	CAACCACGCTCATAAGAAC
asp_c10809	ATGATCCCTGAAGTTGTTG	GTTCCTCTACCAGCCAAG
asp_c13301	CTCTACTCAACACTCTCC	TCTCTCCCGCTCTCTATC
asp_c1401	TAAGCAACTCACTCACTATG	TGATGTGTGAAGGAGGAGG
asp_c14231	GAGAACATAATCCAGAGAAC	GACACTCGCACAACCTT
asp_c17381	CTCTCCAACAGCCTTCTCC	CGCAAGATTAGTGGTGGAAG
asp_c17476	TGTTGGTTGTTGGTGTGAG	AGTGGTTGTTGTGGAGAG
asp_c22357	TACTGACTTCCTTGTGCTTG	TCCCTCACAGAACTTACG
asp_c2370	TATGTTCCTTGCTTCCATG	CGGTAGAAGTGATTGTGTAT
asp_c4789	GCATATTTCTACTACGCCTCC	CAAACTAACCCTCAATCACTCG
asp_c6290	CGCATGGGAAGAGAGCTAAAGT	CTGTGGAGTTGAAGGTGAAGAT
asp_c6470	TTGATACCATCTTGCTGCT	ACCCTCCTCAACAATCGCAG
asp_c7389	CTTGATGGAGCTGGTCTTGT	TTCTCCACCCTCAATCTCAATAC
asp_c753	AAGGAGACGAGGAGGATGTG	TGTGATGCAGAGACGTATTAG
asp_c8280	GCTGCTAAGGGATATAGTGCCA	TATGGTTGCAGAGGATAGGT
asp_c923	TTAAGTCAGGTGGTGCTCTC	CTGGATTAGTGGTTGATGATG

انجام PCR

هر مخلوط واکنش PCR شامل دو میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر، دو میکرولیتر از بافر با غلظت 2X، ۰/۸ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$) با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۸ میکرولیتر نوکلئوتید dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۱۲۵ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۲۰ میکرومولار و ۰/۰۵ میکرولیتر DNA پلی‌مراز Taq بود که در نهایت با اضافه کردن آب مقطر دو بار تقطیر استریل به‌مقدار ۴/۱ میکرولیتر، حجم مخلوط واکنش به ۱۰ میکرولیتر رسانیده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با واسرشت‌سازی اولیه DNA ژنومی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه آغاز و با ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه برای واسرشت‌سازی، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه برای اتصال نشانگر به DNA الگو صورت گرفت، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه دنبال شد (Caruso *et al.*, 2008).

محصول PCR با کاربرد یک توالی‌سنج مویین اُتوماتیک (ABI 3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems/Hitachi, Madrid, Spain) در بخش ژنومیکس دانشگاه کوردوبا (اسپانیا) جداسازی گردید. اندازه باندهای تشکیل شده بر اساس DNA استاندارد با نرم‌افزار GeneScan محاسبه شده و نتایج به‌وسیله نرم‌افزار Genotyper ترجمه گردید.

الکتروفورز محصول PCR

الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد در بافر TBE صورت پذیرفت و به‌وسیله محلول رد سیف (Red Safe nucleic acid staining solution 20000x) باندهای تولید شده مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت. الگوهای چندشکلی تولید شده به کمک اشعه فرابنفش و روش عکس‌برداری قابل مشاهده و ارزیابی شدند.

بررسی صفات مورفولوژیکی و بررسی‌های آماری

در این بخش ۱۹ صفت مهم مورفولوژیکی بر اساس پژوهش Moreno و همکاران (۲۰۱۰) و Mousavizadeh و همکاران (۲۰۱۵)، در گیاهان سه ساله در قالب طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای با پنج تکرار و سه نمونه (مشاهده) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. برای هر گونه والدینی و نتاج هیبرید، تعداد پنج گیاه (تکرار) شامل سه گیاه نر و دو گیاه ماده بررسی گردید (لازم به ذکر است که با توجه به انجام تلاقی به‌صورت بین‌گونه‌ای و میزان بالای تلاقی‌های ناموفق و محدودیت در تعداد هیبریدهای حاصل شده، بررسی تعداد بیشتر گیاه میسر نبود). صفات مورد بررسی شامل ارتفاع بوته، ارتفاع بوته تا اولین شاخه جانبی، تعداد ساقه خوارکی (Spear)، قطر و ارتفاع ساقه اصلی، تعداد شاخه جانبی اولیه و ثانویه، طول میانگره شاخه جانبی اولیه و ثانویه، قطر شاخه جانبی اولیه و ثانویه، طول شاخه جانبی اولیه و ثانویه، تعداد فلس تا اولین شاخه جانبی اولیه، طول و عرض فلس، تعداد کلادود (Cladode)، طول و قطر برگ بود.

تجزیه واریانس و مقایسات میانگین با نرم‌افزار Minitab16 انجام شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و رسم نمودار پراکندگی نقطه‌ای بر اساس دو مؤلفه اصلی اول به‌وسیله نرم‌افزار SPSS 16 صورت پذیرفت. تجزیه خوشه‌ای به روش Ward و فاصله اقلیدوسی انجام شد. دندروگرام مربوطه با نرم‌افزار SPSS 16 ترسیم شد.

نتایج و بحث

تعیین ماهیت ژنتیکی نتاج

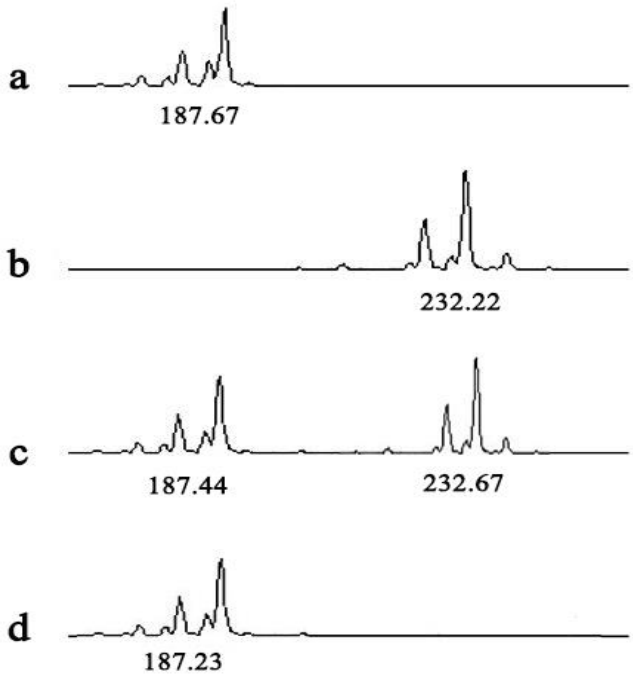
نتایج حاصل از بررسی الگوهای چندشکلی حاصل از به‌کارگیری نشانگرهای EST-SSR و SSR در توده‌های مورد بررسی و توالی‌یابی آلل‌های تشخیص داده شده نشان داد که نشانگر AG8 توانایی تشخیص آلل اختصاصی به طول ۲۳۲ bp را در گونه *A. persicus* و آلل اختصاصی به طول ۱۸۷ bp را در توده‌های خودرو گونه *A. officinalis* داراست. همچنین این نشانگر توانایی تشخیص آلل اختصاصی به طول ۱۲۳ bp را در توده بومی شده گونه *A. officinalis* (علاوه بر آلل ۱۸۷ bp) را داراست. علاوه بر نشانگر AG8، نشانگرهای TC6 و AGA1 نیز توانایی تشخیص آلل اختصاصی در گونه *A. persicus* را دارا بودند. نشانگرهای AG7 و TC1 به‌ترتیب آلل‌های اختصاصی به طول ۷۴۰ و ۱۱۲۴ bp را در گونه‌های *A. breslerianus* و *A. officinalis* رقم مورادو دهتور شناسایی کردند. سایر نتایج به‌دست آمده در جدول ۵ قابل مشاهده است.

جدول ۵- نتایج مربوط به تشخیص آلل‌های اختصاصی توسط نشانگرهای مورد استفاده مختلف مارچوبه

مواد گیاهی	کد	نشانگر	طول آلل اختصاصی (bp)
A. persicus	APe2	AG8	۲۳۲
A. persicus	APe2	AGA1	۷۸۰
A. persicus	APe2	TC6	۱۰۸۶
A. officinalis	Ao4-1 AO2 Ao1-1 AO5 AO7 AO3	AG8	۱۸۷
A. officinalis	AOD 1	AG8	۱۸۷ و ۱۲۳
A. officinalis cv. Morado de Huetor	Ht167 Ht262 Ht815	TC1	۱۱۲۴
A. breslerianus	Abr-1	AG7	۷۴۰
A.acutifolius L.	AC	AG5	۶۹۰
A.acutifolius L.	AC	asp_c10809	۱۳۴
A.acutifolius L.	AC	asp_c22357	۹۶
A.acutifolius L.	AC	asp_c1401	۱۱۲
A.acutifolius L.	AC	asp_c17476	۲۷۰
A. verticillatus L.	AV1 AV2 AV3	asp_c12534	۱۶۶
A. pseudoscaber	APS	AG8	۱۵۰
A. macrorrhizus	MC	asp_c2370	۲۶۳
A. prostratus	APB	asp_c1401	۲۸۵

به‌کارگیری نشانگرهای EST-SSR در نتاج حاصل از تلاقی دستی موجب یافتن آلل‌های اختصاصی والدین در آنها شد که این موضوع ماهیت هیبریدی نتاج را اثبات کرد. برای مثال همان‌طور که ذکر شد نشانگر AG8 توانایی شناسایی آلل‌های اختصاصی با اندازه ۲۳۲ bp در گونه *A. persicus* و ۱۸۷ bp در گونه *A. officinalis* را داشت. به‌منظور تأیید ماهیت ژنتیکی نتاج حاصل از تلاقی این دو گونه، باید هر دو آلل در نتاج توسط نشانگر شناسایی شود تا نشان از واقعیت هیبرید بودن نتاج داشته باشد (شکل ۱). در پژوهشی مشابه، پنج ریزماهواره AG2، AG3، AG7، AG10 و TC1

برای بررسی نتاج تلاقی دو گونه دیپلوئید *A. officinalis* به‌کار برده شد که نتایج نشان از کارآمد بودن آنها داشت (Ozaki *et al*., 2014). در پژوهشی دیگر اقدام به ایجاد تلاقی بین گونه‌های *A. officinalis* و *A. verticillatus* و همچنین گونه‌های *A. amarus* و *A. verticillatus* (همگی در سطح تتراپلوئید) شد. پس از انجام تلاقی و کشت نتاج اقدام به بررسی فاصله ژنتیکی والدین و نتاج هیبرید تولید شده به‌وسیله نشانگرهای RAPD گردید (Nothnagel *et al*., 2012). از جمله اشکالاتی که به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان وارد دانست این‌که پس از انجام تلاقی و شکل‌گیری نتاج اقدامی در جهت بررسی اصالت ژنتیکی نتاج صورت نپذیرفت. با توجه به احتمال شکل‌گیری جنین‌های سوماتیکی در مارچوبه، احتمال بروز خطا در گرده‌افشانی دستی، احتمال گرده‌افشانی شدن پایه ماده با گرده‌افشان‌های طبیعی و در نهایت تأثیرپذیری زیاد نشانگرهای مورفولوژیکی از شرایط محیطی (Kanno & Yokoyama, 2011)، تعیین ماهیت ژنتیکی نتاج به کمک نشانگرهای مولکولی مناسب در این پژوهش الزامی به‌نظر می‌رسید و عدم انجام این مرحله را می‌توان از نواقص جدی در ارائه نتایج چنین پژوهش‌هایی دانست.



شکل ۱- نتایج توالی‌یابی مربوط به کاربرد مارکر AG8 برای تلاقی AOD1× Ape2

a) والد ماده (AOD1) b) والد نر (Ape2) c) تأیید ماهیت هیبرید گیاه F1 حاوی هر دو آلل والدینی d) ماهیت غیرهیبریدی گیاه F1 فقط حاوی آلل والد ماده

بررسی‌های مورفولوژیکی

دامنه تغییرات

صفات تعداد ساقه خوارکی، قطر ساقه اصلی، طول شاخه جانبی اولیه و ثانویه و تعداد کلادود بیشترین میزان ضریب تغییرات را از خود نشان دادند (جدول ۶). نتایج مقایسه میانگین (جدول ۷) نشان داد که در نتاج هیبرید Ao-Ap تعداد ساقه خوارکی، تعداد شاخه جانبی ثانویه و تعداد کلادود به‌طور معنی‌داری از گیاهان والدینی‌اش بیشتر بود. هیبرید Ht-Ao21 مقادیر بالایی از صفات ارتفاع بوته تا

اولین شاخه جانبی، تعداد شاخه جانبی ثانویه و طول میانگره شاخه جانبی اولیه و ثانویه را از خود نشان داد (به‌ترتیب ۳۳/۳۳ سانتی‌متر، ۱۰/۸۸ عدد، ۳/۹۴ و ۲/۵۰ سانتی‌متر). بیشترین میزان قطر ساقه اصلی در بین تمامی مواد گیاهی مربوط به گونه والدینی AOD1 بود که بیشتر بودن قطر ساقه در هیبرید Ao-Ap نسبت به گونه والدینی غیرزراعی‌اش APe2 می‌تواند انتقال این صفت از والد AOD1 را تأیید کند. همچنین گونه والدینی AOD1 بیشترین میزان تعداد، عرض و طول فلس را از خود نشان داد. فلس‌های شکل گرفته بر روی جوانه‌های ساقه اصلی در مارچوبه می‌تواند از جوانه‌ها در برابر اتلاف بیش از حد آب، آسیب پرندگان، حشرات و عوامل قارچی محافظت کند (Kanno & Yokoyama, 2011). طبقه‌بندی و مقایسات مورفولوژیکی می‌تواند کمک قابل‌توجهی در جهت شناسایی روابط خویشاوندی بین مواد گیاهی، بهبود ارزیابی کلی اصلاحگر از برنامه‌های اصلاحی و مدیریت بهتر بانک‌های ژنی باشد (Mousavizadeh *et al*., 2016). یافته‌های این پژوهش از نظر تشخیص تنوع به نسبت بالا در ارزیابی صفات مورفولوژیکی مارچوبه با یافته‌های Sarabi و همکاران (۲۰۱۰)، در یک راستا قرار داشت. آنها گزارش دادند که تنوع مورفولوژیکی بالای موجود بین گونه‌های مارچوبه می‌تواند ناشی از دوپایگی و دگرگشنی در گیاه مارچوبه باشد. همچنین گزارشی از تنوع مورفولوژیکی بالا در بین گونه‌های ایرانی مارچوبه که به‌صورت خودرو در نقاط مختلف کشور پراکنش یافته‌اند منتشر شد. در این پژوهش گونه‌های ایرانی مارچوبه تنوع بالایی را از نظر صفات ارتفاع بوته، طول و تعداد فلس، تعداد شاخه جانبی اولیه، طول و تعداد شاخه جانبی ثانویه، حداقل و حداکثر تعداد فلس، حداقل و حداکثر و میانگین طول کلادود، وزن تر ساقه خوارکی، طول گل و تعداد بذر در هر میوه از خود نشان دادند (Mousavizadeh *et al*., 2015).

جدول ۶- دامنه تغییرات در صفات مورفولوژیکی مورد ارزیابی

ویژگی مورفولوژیکی	واحد	میانگین	حداقل	حداکثر	انحراف معیار	ضریب تغییرات (درصد)
ارتفاع بوته	سانتی‌متر	۱۳۵/۱۶	۴۰/۰۰	۲۰۵/۰۰	۴۵/۷۷	۳۳/۸۶
ارتفاع بوته تا اولین شاخه فرعی	سانتی‌متر	۲۷/۵۵	۳/۰۰	۷۸/۰۰	۱۴/۲۸	۵۱/۸۲
تعداد ساقه خوارکی	-	۱۷/۴۹	۳/۰۰	۴۹/۰۰	۱۲/۳۳	۷۰/۴۷
قطر ساقه اصلی	میلی‌متر	۴/۸۷	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۳/۶۰	۷۳/۹۴
ارتفاع ساقه اصلی	سانتی‌متر	۱۱۳/۶۲	۳۸/۰۰	۲۰۰/۰۰	۴۷/۶۸	۴۱/۹۷
تعداد شاخه جانبی اولیه	-	۲۶/۸۴	۸/۰۰	۵۲/۰۰	۱۰/۵۹	۳۹/۴۵
تعداد شاخه جانبی ثانویه	-	۷/۵۰	۲/۰۰	۱۶/۰۰	۳/۹۹	۵۳/۱۹
طول میانگره شاخه جانبی اولیه	سانتی‌متر	۳/۴۳	۰/۸۰	۷/۰۰	۱/۲۰	۳۵/۱۷
طول میانگره شاخه جانبی ثانویه	سانتی‌متر	۱/۷۹	۰/۳۰	۴/۰۰	۰/۷۹	۴۳/۹۷
قطر شاخه جانبی اولیه	میلی‌متر	۱/۴۴	۰/۵۰	۳/۵۰	۰/۶۰	۴۱/۹۰
قطر شاخه جانبی ثانویه	میلی‌متر	۰/۶۷	۰/۱۰	۱/۲۰	۰/۲۴	۳۶/۴۹
طول شاخه جانبی ثانویه	سانتی‌متر	۷/۶۶	۱/۸۰	۲۷/۰۰	۴/۹۹	۶۵/۱۵
طول شاخه جانبی اولیه	سانتی‌متر	۲۷/۱۲	۸/۰۰	۷۰/۰۰	۱۵/۰۱	۵۵/۳۴
تعداد فلس تا اولین شاخه جانبی	-	۷/۷۱	۲/۰۰	۲۰/۰۰	۳/۹۹	۵۱/۷۷
عرض فلس ساقه خوارکی	میلی‌متر	۴/۰۵	۱/۰۰	۱۴/۰۰	۲/۴۲	۵۹/۸۴
طول فلس ساقه خوارکی	میلی‌متر	۵/۸۱	۲/۰۰	۱۶/۰۰	۳/۱۴	۵۴/۱۱
تعداد کلادود	-	۸/۷۲	۲/۰۰	۳۲/۰۰	۵/۴۹	۶۳/۰۳
قطر برگ	میلی‌متر	۰/۴۷	۰/۱۰	۱/۲۰	۰/۲۴	۵۲/۵۸
طول برگ	سانتی‌متر	۱/۳۸	۰/۴۰	۳/۰۰	۰/۵۹	۴۳/۰۵

جدول ۷- مقایسات میانگین برای صفات مورفولوژیکی مورد ارزیابی در گیاهان والدینی و نتاج هیبرید

صفات	AOD1	APe2	AOD1× APe2	Ht262	Ao1-1	Ht262× Ao1-1	Ht815	Ao4-1	Ht815× Ao4-1	Ht167	Abr-1	Ht167× Abr-1
قطر برگ (میلی‌متر)	۰/۴۶^{bc}	۰/۲۱^{e}	۰/۴۲$^{b-e}$	۰/۴۳$^{b-d}$	۰/۳۷$^{c-e}$	۰/۲۳^{de}	۰/۴۶^{bc}	۰/۶۰^{b}	۰/۴۰$^{b-e}$	۰/۵۷^{bc}	۱/۰۱^{a}	۰/۴۴$^{b-d}$
تعداد کلادود	۱۶/۸۸^{a}	۳/۲۲^{a}	۹/۷۷^{bc}	۱۰/۳۳^{b}	۹/۷۷^{bc}	۸/۳۳$^{b-d}$	۱۹/۰۰^{a}	۴/۰۰^{de}	۷/۵۵$^{b-e}$	۵/۷۷$^{c-e}$	۴/۸۸^{de}	۵/۱۱^{de}
طول فلس ساقه خوارکی (میلی‌متر)	۱۱/۵۵^{a}	۲/۷۱^{f}	۲/۵۶^{cd}	۷/۸۶^{b}	۵/۵۵^{cd}	۵/۰۰^{de}	۱۰/۲۷^{a}	۳/۱۴^{ef}	۲/۰۳^{f}	۷/۵۰^{bc}	۳/۷۷$^{d-f}$	۴/۸۳^{de}
عرض فلس ساقه خوارکی (میلی‌متر)	۸/۶۶^{a}	۱/۸۲^{fg}	۲/۷۳$^{d-g}$	۶/۳۸^{b}	۴/۲۵^{cd}	۳/۶۶^{de}	۶/۱۱^{b}	۲/۱۱$^{e-g}$	۱/۱۰^{g}	۵/۸۳^{bc}	۲/۶۵$^{d-g}$	۳/۳۳$^{d-f}$
تعداد فلس تا اولین شاخه جانبی	۸/۶۶^{bc}	۳/۲۲^{e}	۶/۸۸^{cd}	۱۱/۱۱^{ab}	۸/۵۵^{bc}	۴/۷۷^{de}	۱۳/۰۰^{a}	۷/۰۰^{cd}	۴/۸۸^{de}	۱۱/۶۶^{ab}	۵/۸۸$^{c-e}$	۶/۸۸^{cd}
طول شاخه جانبی ثانویه (سانتی‌متر)	۱۱/۶۶^{b}	۲/۷۲^{de}	۶/۲۴^{c}	۱۵/۲۲^{a}	۱۲/۵۵^{ab}	۶/۴۴^{c}	۱۲/۳۸^{ab}	۳/۵۵$^{c-e}$	۳/۴۴$^{c-e}$	۹/۷۲^{b}	۲/۵۰^{e}	۵/۵۵^{cd}
طول شاخه جانبی اولیه (سانتی‌متر)	۴۰/۸۸^{a}	۱۲/۷۲^{bc}	۱۷/۳۳^{bc}	۴۵/۱۱^{a}	۴۳/۴۴^{a}	۲۱/۵۵^{bc}	۳۹/۵۵a	۱۷/۷۷^{bc}	۱۳/۶۶^{bc}	۳۹/۵۵^{a}	۱۱/۶۱^{c}	۲۲/۲۲^{b}
قطر شاخه جانبی ثانویه (میلی‌متر)	۰/۹۸^{a}	۰/۳۸^{g}	۰/۳۶^{g}	۰/۸۵$^{a-c}$	۰/۹۴^{ab}	۰/۵۸^{ef}	۰/۷۷$^{b-d}$	۰/۶۷^{de}	۰/۵۰^{fg}	۰/۹۰^{ab}	۰/۷۱$^{c-e}$	۰/۴۳^{fg}
قطر شاخه جانبی اولیه (میلی‌متر)	۲/۱۶^{ab}	۰/۷۸^{e}	۱/۰۷^{de}	۲/۲۸^{a}	۱/۸۳^{c}	۱/۰۶^{de}	۱/۹۴^{bc}	۱/۰۴^{de}	۰/۹۱^{de}	۱/۹۴^{bc}	۱/۱۵^{d}	۱/۰۶^{de}
طول میانگره شاخه جانبی ثانویه (سانتی‌متر)	۲/۰۵^{bc}	۰/۶۵^{e}	۱/۱۳^{de}	۲/۶۸^{a}	۲/۳۸^{ab}	۲/۵۰^{ab}	۲/۲۲^{ab}	۱/۴۸^{cd}	۱/۳۸^{d}	۲/۵۱^{ab}	۱/۱۶^{de}	۱/۳۸^{d}
طول میانگره شاخه جانبی اولیه (سانتی‌متر)	۳/۲۷^{bc}	۱/۷۳^{e}	۳/۷۳$^{a-c}$	۴/۴۸^{a}	۳/۷۸$^{a-c}$	۳/۹۴^{ac}	۳/۶۱$^{a-c}$	۳/۰۸^{cd}	۳/۰۵^{cd}	۴/۱۱^{ab}	۲/۱۶^{de}	۴/۱۶^{ab}
تعداد شاخه جانبی ثانویه	۷/۴۴^{de}	۴/۱۱^{fg}	۱۰/۲۲^{bc}	۸/۳۳$^{c-e}$	۱۲/۶۶^{a}	۱۰/۸۸^{ab}	۹/۳۳$^{b-d}$	۶/۳۳^{ef}	۳/۶۶^{g}	۹/۴۴$^{b-d}$	۳/۳۳^{g}	۴/۳۳^{fg}
تعداد شاخه جانبی اولیه	۴۲/۸۸^{a}	۲۰/۱۱^{c}	۱۷/۰۰^{cd}	۳۶/۵۵^{ab}	۳۲/۱۱^{b}	۱۹/۵۵^{c}	۳۱/۲۲^{b}	۳۰/۳۳^{b}	۱۸/۴۴^{c}	۳۳/۴۴^{b}	۳۰/۴۴^{b}	۱۰/۰۰^{d}
ارتفاع ساقه اصلی (سانتی‌متر)	۱۵۲/۴۴^{ab}	۴۹/۱۱^{f}	۷۶/۶۶$^{d-f}$	۱۸/۳۳^{a}	۱۳۹/۱۱^{bc}	۹۱/۱۱^{de}	۱۳۷/۱۱^{bc}	۱۱۲/۷۲^{cd}	۶۷/۶۶^{ef}	۱۷۹/۲۲^{a}	۸۶/۶۶$^{a-f}$	۹۱/۲۲^{de}
قطر ساقه اصلی (میلی‌متر)	۱۰/۷۲^{a}	۱/۵۴^{d}	۲/۰۵^{d}	۹/۳۸^{ab}	۵/۷۲^{c}	۹/۴۲^{d}	۸/۹۴^{ab}	۲/۰۷^{d}	۱/۷۷^{d}	۷/۷۷^{b}	۲/۷۱^{d}	۲/۸۰^{d}
تعداد ساقه خوارکی	۱۵/۳۳^{e}	۱۰/۶۶^{g}	۱۷/۶۶^{d}	۱۶/۰۰^{e}	۱۷/۰۰^{d}	۱۱/۸۸^{f}	۳۱/۰۰^{c}	۳/۳۳^{i}	۶/۶۶^{h}	۳۲/۳۳^{b}	۳۶/۰۰^{a}	۱۲/۰۰^{f}
ارتفاع بوته تا اولین شاخه جانبی (سانتی‌متر)	۳۰/۴۴^{bc}	۷/۰۰^{f}	۲۰/۸۸$^{c-e}$	۴۳/۱۶^{a}	۲۷/۷۷$^{b-d}$	۳۳/۳۳^{ab}	۳۷/۸۸^{ab}	۲۰/۵۵$^{c-e}$	۱۸/۲۲^{de}	۴۳/۲۲^{a}	۱۳/۶۶^{ef}	۳۴/۴۴^{ab}
ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	۱۷۰/۳۳^{c}	۵۲/۰۰^{l}	۸۹/۰۰^{k}	۲۰۰/۶۶^{a}	۱۵۴/۶۶^{f}	۱۳/۴۴^{g}	۱۵۹/۰۰^{e}	۱۶۱/۷۶^{d}	۱۰۲/۰۰^{i}	۱۸۷/۶۶^{b}	۹۶/۳۳^{j}	۱۱۶/۰۰^{h}
طول برگ (سانتی‌متر)	۱/۴۳^{bc}	۱/۰۶$^{c-e}$	۰/۸۸^{de}	۱/۲۷^{cd}	۰/۶۵^{e}	۱/۳۰^{cd}	۱/۱۴$^{c-e}$	۱/۳۲$^{b-d}$	۲/۱۲^{a}	۱/۴۳^{bc}	۲/۱۸^{a}	۱/۸۳^{ab}

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون توکی می‌باشد.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

بیش از ۸۴/۲ درصد از تنوع مشاهده شده به‌وسیله سه مؤلفه اصلی اول توجیه می‌شود، این موضوع در حالی است که سهم دو مؤلفه اول به‌تنهایی ۷۶/۹ درصد می‌باشد (جدول ۸). مؤلفه اول دارای ضرایب بزرگ و مثبت برای صفات قطر ساقه اصلی، ارتفاع ساقه اصلی، تعداد شاخه جانبی اولیه، قطر شاخه جانبی اولیه و ثانویه، طول شاخه جانبی اولیه و ثانویه، طول و عرض فلس و قطر برگ بود (ضریب بارگذاری >۰/۷۰). مؤلفه دوم دارای ضرایب بزرگ و مثبت برای صفات ارتفاع بوته، ارتفاع بوته تا اولین شاخه جانبی، طول میانگره شاخه جانبی اولیه و ثانویه بود (ضریب بارگذاری >۰/۷۳). یکی از مزایای اصلی تجزیه صفات به مؤلفه‌های اصلی کاهش تعداد صفات به اندازه تعداد مؤثرترین صفات در شکل‌گیری تنوع موجود می‌باشد. همچنین با بهره‌بردن از این روش و دسته‌بندی صفات می‌توان به بررسی روابط بین آنها نیز بهتر پرداخت (Sarabi *et al.*, 2010). Hasandokht و همکاران (۲۰۱۷)، در تجزیه مورفولوژیکی برخی از توده‌های مارچوبه در شمال ایران به نُه فاکتور اصلی دست یافتند. آنها گزارش نمودند که صفات قطر ساقه خوارکی و عرض فلس از جمله مهم‌ترین و مؤثرترین صفات در توجیه تنوع مورفولوژیکی مشاهده شده بودند.

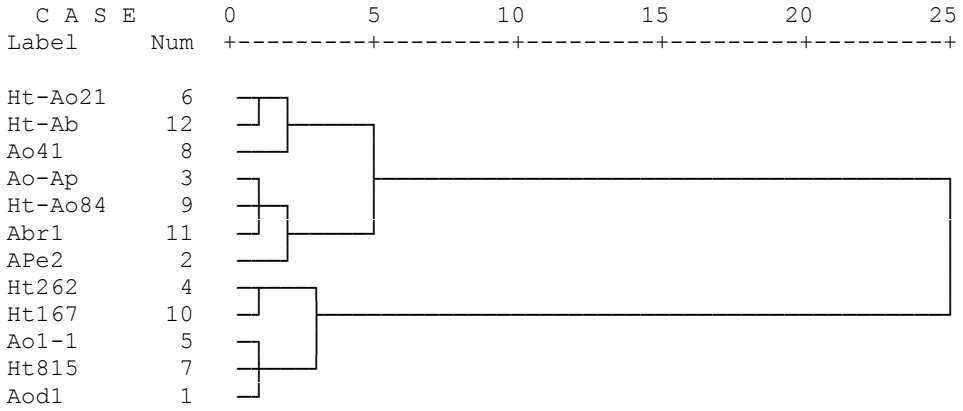
جدول ۸- مقادیر ویژه برای سه مؤلفه اصلی اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

صفات	مؤلفه‌های اصلی		
	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم
ارتفاع بوته	۰/۵۷۷	۰/۷۳۸	۰/۰۳۵
ارتفاع بوته تا اولین شاخه جانبی	۰/۳۵۳	۰/۹۰۴	-۰/۰۶۰
تعداد ساقه خوارکی	۰/۵۱۸	۰/۰۶۴	۰/۴۵۰
قطر ساقه اصلی	۰/۸۷۶	۰/۴۲۶	-۰/۰۷۱
ارتفاع ساقه اصلی	.۰/۷۰۸	۰/۶۶۰	۰/۰۴۷
تعداد شاخه جانبی اولیه	۰/۹۰۴	۰/۰۸۳	۰/۱۱۹
تعداد شاخه جانبی ثانویه	۰/۳۱۵	۰/۴۷۹	-۰/۶۱۳
طول میانگره شاخه جانبی اولیه	۰/۰۵۱	۰/۹۴۵	-۰/۲۲۲
طول میانگره شاخه جانبی ثانویه	۰/۴۸۵	۰/۷۷۵	-۰/۱۷۲
قطر شاخه جانبی اولیه	۰/۸۵۳	۰/۴۸۸	-۰/۰۶۷
قطر شاخه جانبی ثانویه	۰/۸۳۳	۰/۳۵۲	۰/۱۲۰
طول شاخه جانبی اولیه	۰/۷۳۹	۰/۵۸۲	-۰/۲۶۲
طول شاخه جانبی ثانویه	۰/۷۰۸	۰/۵۶۷	-۰/۳۴۲
تعداد فلس تا اولین شاخه جانبی	۰/۶۸۱	۰/۵۹۴	۰/۰۴۰
عرض فلس	۰/۸۳۹	۰/۴۰۱	-۰/۱۱۰
طول فلس	۰/۸۵۲	۰/۳۴۸	-۰/۰۷۷
تعداد کلادود	۰/۷۱۰	۰/۱۳۸	-۰/۳۳۳
قطر برگ	۰/۲۲۴	-۰/۰۹۹	۰/۸۷۷
طول برگ	-۰/۲۴۲	-۰/۰۵۱	۰/۸۳۷
مقدار ویژه	۸/۱۲	۵/۲۵	۱/۲۷
واریانس (درصد)	۴۶/۶۸	۳۰/۲۲	۷/۳۲
واریانس تجمعی (درصد)	۴۶/۶۸	۷۶/۹۰	۸۴/۲۴

تجزیه خوشه‌ای

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای از دو خوشه اصلی تشکیل شد (شکل ۲). خوشه اول به‌طور عمده شامل گیاهان هیبرید و خوشه دوم شامل گیاهان والدینی بود. مواد گیاهی خوشه اول خود به دو گروه کوچکتر تقسیم شدند که در گروه اول هیبرید Ht-Ao21 نزدیک به هیبرید Ht-Ab قرار گرفت و هر دوی آنها در نزدیکی گونه والدینی Ao41 واقع شدند و در گروه دوم هیبریدهای Ao-Ap و Ht-Ao84 و گیاهان والدینی APe2 و Abr1 قرار گرفتند. در این گروه هیبرید Ao-Ap نزدیک به هیبرید Ht-Ao84 و هر دوی آنها در نزدیکی گونه والدینیAbr1 واقع شدند. از طرف دیـگر خـوشه اصلی دوم نیز به دو گروه کلی تقسیم شد. گروه اول شامل گیاهان والدینی Ht262 و Ht167 و گروه دوم شامل گیاهان والدینی Aod1، Ht815 و Ao1-1 بود (شکل ۲).

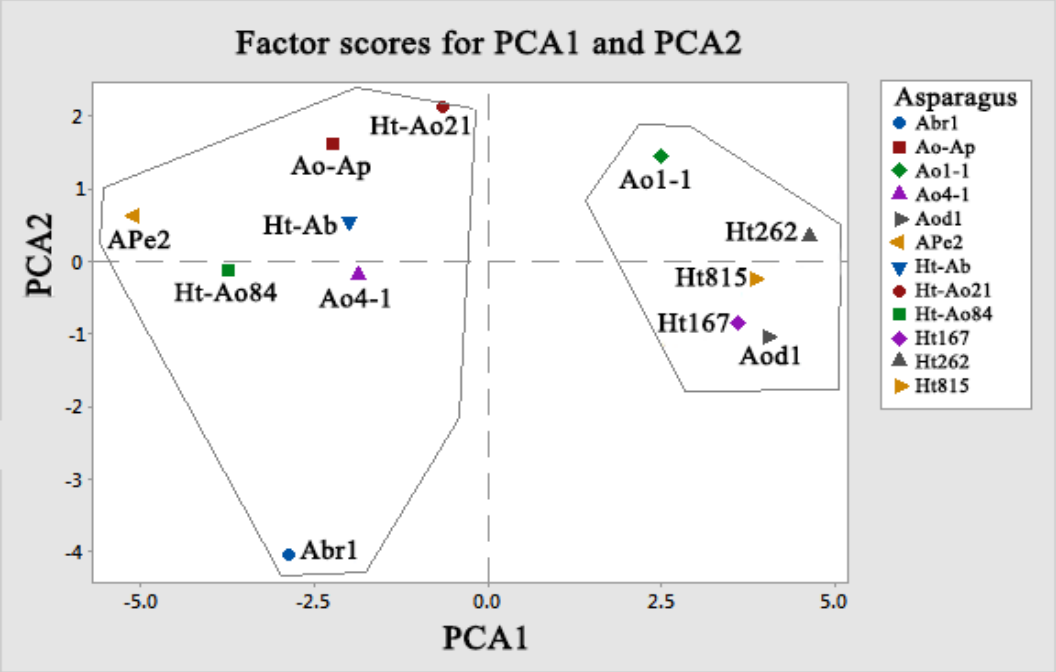
در تحقیقی ۱۲ توده از گونه‌های مختلف خودرو مارچوبه در ایران از نظر برخی از مهم‌ترین صفات مورفولوژیکی مورد تجزیه خوشه‌ای قرار گرفت. نتایج پژوهش نشان داد که تمامی توده‌ها در دو زیر خوشه اصلی قرار گرفتند. گروه اول از زیر خوشه اصلی اول شامل توده‌های مختلف گونه *A. officinalis* بود. گروه دوم از زیر خوشه اصلی اول و همچنین زیر خوشه اصلی دوم شامل توده‌های مختلف گونه‌های *A. breslerianus*، *A. persicus* و *A. verticillatus* بود (Mousavizadeh *et al.*, 2015).



شکل ۲- دندروگرام مربوط به تجزیه خوشه‌ای مارچوبه‌های والدینی و هیبرید بر اساس روش وارد و فاصله اقلیدوسی

پراکندگی نقطه‌ای مواد گیاهی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای آنها را تأیید نمود (شکل ۳). پراکندگی مواد گیاهی مورد ارزیابی، در دو گروه کلی در دو طرف نمودار قابل مشاهده است. گونه‌های والدینی و هیبرید خوشه اصلی اول که شامل Abr-1، Ht-Ao84، Ao-Ap، Ao4-1، Ht-Ab، Ape2 و Ht-Ao21 می‌شدند در سمت چپ نمودار و گونه‌های والدینی خوشه اصلی دوم که شامل Ao1-1، Aod1، Ht262، Ht815 و Ht167 می‌شدند در سمت راست نمودار قرار گرفتند. از بخش مثبت به منفی مؤلفه اصلی اول (راست به چپ)، مواد گیاهی افزایش تدریجی در میزان قطر ساقه اصلی، ارتفاع ساقه اصلی، تعداد شاخه جانبی اولیه، طول و قطر شاخه جانبی اولیه و ثانویه، طول و عرض فلس و قطر برگ از خود نشان دادند. همچنین از بخش منفی به مثبت مؤلفه اصلی

دوم (از پایین به بالا)، ارتفاع بوته، ارتفاع بوته تا اولین شاخه جانبی، طول میانگره شاخه جانبی اولیه و ثانویه صفاتی تعیین کننده بودند (شکل ۳). استفاده از گونه‌ها و توده‌های خودرو مارچوبه در برنامه‌های اصلاحی این محصول به‌منظور افزایش خزانه ژنی واریته‌های مارچوبه الزامی به‌نظر می‌رسد (Ozaki *et al.*, 2014). در پژوهشی Moreno و همکاران (۲۰۱۰)، بیان داشتند که با توجه به این‌که توده موادو دهتور در سطوح پلوئیدی مختلف کشت و کار می‌شود، این توده را می‌توان رابطی به‌منظور انتقال صفات از گونه‌های پلی‌پلوئید به ارقام تجاری دانست.



شکل ۳- پراکندگی نقطه‌ای بر اساس دو مؤلفه اصلی اول برای مارچوبه‌های والدینی و بین‌گونه‌ای

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد: الف) امکان انجام تلاقی‌های موفق درون‌گونه‌ای در: (رقم دیپلوئید موراد دهتور) *A. officinalis* × *A. officinalis* (توده خودرو دیپلوئید)، (رقم تتراپلوئید موراد دهتور) *A. officinalis* × *A. officinalis* (توده خودرو تتراپلوئید) و همچنین تلاقی‌های بین‌گونه‌ای در: (رقم اُکتاپلوئید موراد دهتور) *A. breslerianus* ×*officinalis* (توده خودرو اُکتاپلوئید)، (توده دیپلوئید بومی شده) *A. persicus* ×*officinalis* (توده خودرو دیپلوئید) به‌منظور انتقال صفات مرتبط با مقاومت از گونه‌های خودرو به ارقام تجاری وجود دارد. ب) نشانگرهای TC1، AG7 و AG8 توانایی تشخیص آلل اختصاصی در گیاهان والدینی و در نتیجه تعیین ماهیت ژنتیکی نتاج حاصل از تلاقی دستی را داشتند. ج) در نتاج هیبرید Ao-Ap تعداد ساقه خوارکی و تعداد شاخه جانبی ثانویه به‌طور معنی‌داری از گیاهان والدینی‌اش بیشتر بود. هیبرید Ht-Ao21 مقادیر بالایی از صفات ارتفاع بوته تا اولین شاخه جانبی، تعداد شاخه جانبی ثانویه و طول میانگره شاخه جانبی اولیه و ثانویه را از خود نشان داد. د) حدود ۷۶/۹ درصد از تنوع مورفولوژیکی مشاهده شده به‌وسیله صفات قطر

ساقه اصلی، ارتفاع ساقه اصلی، تعداد و قطر شاخه جانبی اولیه، قطر شاخه جانبی ثانویه، طول شاخه جانبی اولیه و ثانویه، طول و عرض فلس، قطر برگ و طول میانگره شاخه جانبی اولیه و ثانویه توجیه می‌شود و به همین علت صفات مذکور نقش مهمی را در شکل‌گیری تنوع مورفولوژیکی در بین گونه‌های والدینی و گیاهان هیبرید ایفا می‌کنند. لازم به ذکر است که معرفی نهایی هیبریدهای برتر پس از بررسی صفات مرتبط با مقاومت در نتاج و گیاهان والدینی و با در نظر گرفتن نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی میسر خواهد شد و هیبریدهای دارای صفات مطلوب مورفولوژیکی و مرتبط با مقاومت در ادامه روند اصلاحی و تلاقی برگشتی با والد زراعی قرار خواهند گرفت.

References

- Caruso, M., Federici, C. T. & Roose, M. L. (2008). EST–SSR markers for asparagus genetic diversity evaluation and cultivar identification. *Molecular Breeding*, 21(2), 195-204.
- Castro, P., Gil, J., Cabrera, A. & Moreno, R. (2013). Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationships in asparagus species related to *Asparagus officinalis*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(4), 1275-1288.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Falavigna, A., Alberti, P., Casali, P. E., Toppino, L., Huaisong, W. & Mennella, G. (2012). Interspecific hybridization for asparagus breeding in Italy. *Acta Horticulture*, 776, 291-298.
- Hasandokht, M. R., Ahi, M. & Ghelichnia, H. (2017). Evaluation of genetic diversity of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) accessions from Mazandaran province using morphological traits and RAPD molecular marker. *Plant Production Technology*, 17(1), 179-193. (In Farsi)
- Ito, T., Konno, I., Kubota, S., Ochiai, T., Sonoda, T., Hayashi, Y., Yokoyama, J., Nakayama, H., Kameya, T. & Kanno, A. (2011). Production and characterization of interspecific hybrids between *Asparagus kiusianus* Makino and *A. officinalis* L. *Euphytica*, 182, 285-294.
- Kanno, A. & Yokoyama, J. (2011). *Asparagus* spp. In: C. Kole (Ed.), *Wild crop relatives. Genomic and Breeding Resources*. (pp. 23-42). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mercati, F., Riccardi, P., Leebens-Mack, J., Abenavoli, M. R., Falavigna, A. & Sunseri, F. (2013). Single nucleotide polymorphism isolated from a novel EST dataset in garden asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Science*, 203, 115-123.
- Moreno, R., Espejo, J. A. & Gil, J. (2010). Development of triploid hybrids in asparagus breeding employing a tetraploid landrace. *Euphytica*, 173(3), 369-375.
- Mousavizadeh, S. J., Hassandokht, M. R. & Kashi, A. (2015). Multivariate analysis of edible asparagus species in Iran by morphological characters. *Euphytica*, 206(2), 445-457.
- Mousavizadeh, S. J., Hassandokht, M. R., Kashi, A., Gil, J., Cabrera, A. & Moreno, R. (2016). Physical mapping of 5S and 45S-rDNA genes and ploidy levels of Iranian asparagus species. *Scientia Horticulturae*, 211, 269-276.
- Mousavizadeh, S. J., Hassandokht, M. R., Gil, J., Millan, T. & Moreno, R. (2017). Assessment of genetic diversity in Iranian *Asparagus* spp. related to garden

asparagus. In: B. Bruckner, C. Feller. & J. Graefe (Eds.), *XIV International Asparagus symposium 1223*. (pp. 39-44). ISHS Acta Horticulturae.

- Nothnagel, T., Kramer, R., Budahn, H., Schrader, O., Ulrich, D. & Schreyer, L. (2012). Interspecific hybridization of asparagus for the enlargement of the genetic basis concerning resistance to biotic and abiotic stress. *Acta Horticulturae*, (960), 139-146.
- Ozaki, Y., Takeuchi, Y., Iwato, M., Sakazono, S. & Okubo, H. (2014). Occurrence of a spontaneous triploid progeny from crosses between diploid asparagus (*Asparagus officinalis* L.) plants and its origin determined by SSR markers. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 83(4), 290-294.
- Sarabi, B., Hassandokht, M. R., Hassani, M. E., Masoumi, T. R. & Rich, T. (2010). Evaluation of genetic diversity among some Iranian wild asparagus populations using morphological characteristics and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 126(1), 1-7.
- Valente, M. T., Sabatini, E., Casali, P. E., Ferrari, L. & Falavigna, A. (2009). Molecular marker-assisted introgression of wild asparagus species genome into the cultivated *Asparagus officinalis* L. In: B. Bruckner, C. Feller & J. Graefe (Eds.), *XIV International asparagus symposium 1223*. (pp. 181-186). ISHS Acta Horticulturae.