



## Association Analysis for Morphological Traits in Iranian Basil Accessions Using ISSR Marker

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original Research

#### Authors

Aghaali Z.<sup>1</sup> MSc,  
Darvishzadeh R.\* Ph.D,  
Aghaei M.<sup>2</sup> MSc

#### How to cite this article

Aghaali Z, Darvishzadeh R, Aghaei M. Association Analysis for Morphological Traits in Iranian Basil Accessions Using ISSR Marker. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):93-102.

\*Plant Breeding & Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>1</sup>Plant Breeding & Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup>Horticulture Department, Agriculture Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

#### Correspondence

Address: Plant Breeding & Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Urmia University, 11 Kilometer Sero Road, Daneshgah Boulevard, Urmia, Iran. Postal Code: 5756151818

Phone: +98 (44) 31942785

Fax: +98 (44) 32779558

r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

#### Article History

Received: April 15, 2016

Accepted: February 5, 2017

ePublished: March 20, 2018

### ABSTRACT

**Aims** The aim of the present study was to map the morphological traits in Iranian Basil accessions (*Oscillum Oscillo*s) by Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs) markers.

**Materials & Methods** In this experimental study, 50 Iranian basil accessions from different geographical regions were used and the experiment was based on a completely randomized design. Extracting DNA and PCR was performed with 12 ISSR primers for Basil accessions. Components of variance, general heritability, and genetic and phenotypic variation coefficients were calculated by formula. Bayesian method, linear mixed model as well as Minitab 17, DARwin 5, Structure 2.3.3, Tassel 3, and SPSS 20 software were used.

**Findings** There was a positive correlation between the majority of traits for basil accessions. The highest coefficient of genetic variation was observed in stem diameter and internode length and the lowest was observed in flower number. Heritability varied between 3.63% and 94.24%. Fourteen loci with 7 traits were recognized. The range of phenotypic changes varied from 3% to 29%. The highest number of locus was obtained for stem diameter traits and the lowest was obtained for lateral branch number. Six loci were specifically associated with only one trait and other loci were common in traits. The phenotypic variation varied between 17% and 29%.

**Conclusion** Traits have a wide variety in Basil accessions and there is a positive correlation between the majority of them. The heritability of the traits varies from 3.63% to 94.24% and the range of the phenotypic changes varies from 3% to 29%. The highest number is for stem diameter traits and lowest is for lateral branch number. Six loci are specifically associated with only one trait and other loci are common in traits. The phenotypic variation varies between 29% -17%.

**Keywords** Basil; Morphological Traits; Molecular Markers

### CITATION LINKS

[1] Differences in essential oil ... [2] Leafy ... [3] Study on phenotypic variation of total phenol and antioxidant ... [4] External flavones in sweet ... [5] An Assessment of genetic diversity among ... [6] Variation among and ... [7] Genetic diversity in main parents ... [8] Marker-assisted prediction of agronomic traits ... [9] Genetic structure of mulberry from different ecotypes ... [10] In silico mapping of quantitative trait loci in ... [11] A major QTL for resistance to soil-borne ... [12] Application of association ... [13] Association analysis of important ... [14] User manual for TASSEL, trait analysis by association, evolution ... [15] Mixed model association ... [16] A unified mixed-model method for association ... [17] Dwarf8 polymorphisms associate with ... [18] Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance and ... [19] Association mapping of kernel size ... [20] Genetic variation and identification ... [21] Single sequence repeat markers ... [22] Simple sequence repeat markers associated ... [23] Genetic characterization and linkage disequilibrium ... [24] Association mapping of quality ... [25] Association analysis using SSR markers to find QTL for ... [26] Assessment of agronomic, chemical ... [27] New research on the flower ... [28] Association mapping in structured ... [29] Genetic diversity and structure of a ... [30] Use of ranks in one-criterion variance ... [31] Mapping of forage quality-related ... [32] Investigation of genetic diversity and ... [33] Schaum's outline of theory and problems of ... [34] Diversity analysis of garlic ... [35] Univariate and multivariate ... [36] Study on seed morphological diversity ... [37] Determination of drought ... [38] Genetic variation in Iranian chickpea ... [39] Genetic diversity among varieties and ... [40] Genetic diversity analysis of Mediterranean ... [41] Phylogenetic analysis in the ... [42] Identification of QTLs for pod ... [43] Rosmarinic acid content and RAPD ... [44] Genetic diversity of cultivated and ... [45] Identification of ISSR markers associated ... [46] Analysis of simple sequence repeats ... [47] Identification of informative ... [48] Relationship analysis of important ... [49] Association analysis for ...

## تجزیه ارتباطی صفات مورفولوژیک در توده‌های ایرانی ریحان با استفاده از نشانگر ISSR

زهرا آقاعلی MSc

گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

رضا درویش‌زاده PhD\*

گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

محمد آقایی MSc

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

### چکیده

**اهداف:** هدف تحقیق حاضر نقشه‌یابی ارتباطی صفات مورفولوژیک در توده‌های ایرانی ریحان (اوسیموم باسیلیکوم) به وسیله نشانگرهای نشانگر بین‌ریزماهوره‌ای (ISSR) بود.

**مواد و روش‌ها:** در تحقیق تجربی حاضر از ۵۰ توده بومی ریحان از مناطق مختلف جغرافیایی ایران استفاده شد و آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی بود. استخراج DNA و PCR با ۱۲ آغازگر ISSR برای توده‌های ریحان انجام شد. اجزای واریانس، وراثت‌پذیری عمومی، ضرایب تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی، با فرمول محاسبه شدند. روش بی‌زی، مدل خطی مخلوط و نرم‌افزارهای 17 Minitab، 5 DARwin، 3 Tassel و 20 SPSS به‌کار رفتند.

**یافته‌ها:** بین اکثریت صفات توده‌های ریحان همبستگی مثبت وجود داشت. بالاترین ضریب تغییرات ژنتیکی در قطر ساقه و طول میانگره و پایین‌ترین در تعداد گل مشاهده شد. وراثت‌پذیری بین ۳/۶۳٪ تا ۹۴/۲۴٪ متغیر بود. ۱۴ مکان پیوسته با ۷ صفت شناسایی شد. دامنه تغییرات فنوتیپی توجیه‌شده بین ۳ الی ۲۹٪ متغیر بود. بیشترین تعداد مکان برای صفات قطر ساقه و کمترین برای تعداد شاخه جانبی به‌دست آمد. شش مکان به‌طور اختصاصی فقط با یک صفت پیوسته و سایر مکان‌ها بین صفات مشترک بودند. میزان تنوع فنوتیپی بین ۲۹-۱۷٪ متغیر بود.

**نتیجه‌گیری:** صفات در توده‌های ریحان تنوع گسترده‌ای دارند و بین اکثریت آنها همبستگی مثبت وجود دارد. وراثت‌پذیری صفات بین ۳/۶۳٪ تا ۹۴/۲۴٪ و دامنه تغییرات فنوتیپی توجیه‌شده بین ۳ الی ۲۹٪ متغیر است. بیشترین تعداد برای صفات قطر ساقه و کمترین برای تعداد شاخه جانبی است. شش مکان فقط با یک صفت پیوسته و سایر مکان‌ها بین صفات مشترک هستند. تنوع فنوتیپی بین ۲۹-۱۷٪ متغیر است.

**کلیدواژه‌ها:** ریحان، صفات مورفولوژیک، نشانگرهای مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷

\*نویسنده مسئول: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

### مقدمه

ریحان با نام علمی *اوسیموم باسیلیکوم* (*Ocimum basilicum* L.) و سابقه کشت ۳۰۰۰ ساله یکی از گیاهان مهم تیره نعناع به شمار می‌آید که در تمام نقاط جهان کشت می‌شود<sup>[1]</sup>. گونه حاضر دیپلوئید ( $2n=2x=48$ ) بوده و مهمترین گونه از جنس اسمیوم است. ریحان سرشار از مواد معطر (اسانس)، عناصر معدنی، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضد میکروبی است به همین دلیل نقش مهمی در تهیه فرآورده‌های غذایی، دارویی، بهداشتی و صنعتی دارد. سهولت گرده‌افشانی در این جنس موجب ایجاد گونه‌ها و واریته‌های متعددی شده است<sup>[2]</sup>. تنوع مورفولوژیکی و شیمیایی بالایی در این جنس وجود دارد<sup>[1]</sup>، با این وجود در مورد اصلاح ریحان پیشرفت قابل ملاحظه‌ای صورت نگرفته و تعداد واریته‌های مفید آن بسیار کمتر از دیگر گیاهان اقتصادی مورد استفاده انسان است. با توجه به اهمیت این گیاه دارویی و اینکه ایران یکی از مراکز تنوع آن می‌باشد، انجام

برنامه‌های اصلاحی به‌منظور تولید واریته‌هایی با میزان فنول، آنتی‌اکسیدان و اسانس بیشتر ضروری به نظر می‌رسد. آقایی و همکاران<sup>[3]</sup> با بررسی تنوع فنوتیپی میزان فنول کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۵۰ توده ریحان بومی ایران، تنوع گسترده‌ای برای صفات فوق در جمعیت مورد مطالعه مشاهده کردند. در مطالعه گریر و همکاران<sup>[4]</sup> فلاونوئیدهای خارجی برگ در رقم‌های مختلف ریحان بررسی شد، آنها تنوع بسیار زیاد در ترکیب اسانس در این گیاه را تایید کردند. بررسی تنوع مورفولوژیک توده‌های جنس ریحان بومی ایران نشان داد که ریحان‌های ایران از نظر صفات بررسی‌شده از تنوع بالایی برخوردارند و ژنوتیپ‌های با ارزشی از نظر صفات باغبانی بین آنها وجود دارد که می‌توانند منابع ژنتیکی مناسبی برای انجام امور اصلاحی به‌منظور تولید ارقام باشد<sup>[5]</sup>.

امروزه برخی از برنامه‌های اصلاحی ریحان براساس گزینش مورفولوژیکی است. با توجه به محدودیت‌های نشانگرهای مورفولوژیک، کاربرد این گونه نشانگرها محدود است<sup>[6]</sup>. نشانگرهای مولکولی به‌ویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA با ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و با حذف اثرات ناشی از عوامل محیطی، توانسته‌اند بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیک را رفع کنند<sup>[7]</sup>. بنابراین شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات می‌تواند گامی موثر در پیشرفت برنامه‌های اصلاحی باشد. پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی، محتمل‌ترین توجیه برای وجود رابطه بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی است<sup>[8]</sup>. امروزه انواع متعددی از نشانگرهای مبتنی بر DNA از جمله ریزماهوره‌ها (SSR)، چندشکلی تکثیرشده تصادفی مبتنی بر DNA (RAPD)، چندشکلی طولی قطعات تکثیرشده (AFLP) معرفی شده‌اند که بین آنها، نشانگر بین‌ریزماهوره‌ای (ISSR) به دلیل چندشکلی بالا، عدم نیاز به توالی‌یابی DNA برای طراحی آغازگر، گستردگی و پوشش ژنومی بالا، توزیع تصادفی و سهولت استفاده، یکی از پرکاربردترین سیستم‌های نشانگری مورد استفاده در مطالعات انگشت‌نگاری ژنومی، تنوع ژنتیکی، نقشه‌یابی ژنومی و تجزیه‌های فیلوژنتیکی به شمار می‌آید<sup>[9]</sup>.

نقشه‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی معمولاً بر مبنای تجزیه پیوستگی انجام می‌شود، در این روش از جمعیت‌های در حال تفرق و مصنوعی مانند F<sub>2</sub>، دابلد هاپلوئید، لاین‌های خالص نوترکیب، لاین‌های تقریباً ایزوژنیک و جمعیت‌های حاصل از تلاقی برگشتی استفاده می‌شود<sup>[10]</sup>، <sup>[11]</sup>. به دلیل معایب این روش (تعداد کم والدین، فاصله زیاد بین نشانگر و صفت، تعداد نوترکیبی کم) امروزه پیشنهاد می‌شود که از روش تجزیه ارتباط مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی به کار رود، در این روش از جمعیت‌های طبیعی برای بررسی ارتباط بین نشانگر و صفت استفاده می‌شود، چون در این جمعیت‌ها نوترکیبی تثبیت شده است، فاصله و در نتیجه ارتباط بین نشانگر و صفت دقیق و قابل اطمینان خواهد بود<sup>[10]</sup>، <sup>[12]</sup>. همچنین از آن جایی که ساختار جمعیت (Q)، اندازه نمونه و فراوانی آلل‌های خاص می‌توانند موجب ارتباط دروغین مثبت بین نشانگر و صفت شوند<sup>[13]</sup>، مدل‌های مبتنی بر ماتریس‌های ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی (K) بهتر از بقیه می‌توانند ارتباطات واقعی بین نشانگر-صفت را نشان دهند و منجر به کاهش معنی‌دار نتایج مثبت دروغین شوند<sup>[14]</sup>، <sup>[16]</sup>. در مدل خطی عمومی (GLM) فقط ماتریس ساختار جمعیت و در مدل خطی مخلوط (MLM) علاوه بر ماتریس ساختار جمعیت، ماتریس روابط خویشاوندی افراد نیز در نظر گرفته می‌شود. تجزیه ارتباط در

تجزیه ارتباطی صفات مورفولوژیک در توده‌های ایرانی ریحان با استفاده از نشانگر ISSR ۹۵ سانتی‌متر) و وزن تر گیاه (FW؛ گرم) روی ۵ گیاه (نمونه) در هر تکرار اندازه‌گیری شدند و میانگین نمونه‌ها در هر تکرار در آنالیزهای آماری استفاده شد.

نمونه‌های مخلوط از برگ‌های ۱۵ گیاه از هر توده در مرحله ۴ برگی انتخاب و DNA آنها به روش سنتیل تری‌متیل آمونیوم بروماید (CTAB) [26] استخراج، کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۰/۸٪ بررسی شد. واکنش PCR با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR صورت گرفت. تکثیر قطعات DNA در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس، ۰/۴ میلی‌مولار نوکلئوتیدتری فسفات، ۳/۱۰ میلی‌مولار منیزیم کلراید، ۱۶۰ میلی‌مولار از ۰.۱% (v/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>، ۲۰۰ میلی‌مولار تریس-HCL با میزان pH برابر ۸/۵۵ (سینانژن؛ تهران؛ ایران)، یک میکرولیتر از آنزیم تک‌پلی‌مراز، یک میکرولیتر DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر آغازگر ISSR (جدول ۲) و آب دیونیزه مطابق چرخه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر مدل ۵۳۳۱ (اپندورف؛ هامبورگ؛ آلمان) انجام شد.

واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد سپس ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۸°C برای اتصال آغازگر و ۲ دقیقه در دمای ۷۲°C برای تکثیر و بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۶ دقیقه بود. محصولات تکثیرشده روی ژل آگارز ۱/۸٪ و بافر TBE نیم‌برابر الکتروفورز شدند. برای مشاهده باندها از اتیدیوم بروماید و اشعه UV استفاده شد.

ذرت [17]، جو [18]، گندم هگزاپلوئید [19]، آفتابگردان [20، 21]، نخود زراعی [22]، برنج [23]، سیب‌زمینی [24] و سویا [25] استفاده شده است ولی گزارشی در رابطه با استفاده از آن در ریحان منتشر نشده است. تحقیق حاضر با هدف نقشه‌یابی ارتباطی صفات مورفولوژیک در توده‌های ایرانی ریحان / اوسیموم باسیلیکوم (*Ocimum basilicum* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام شد.

## مواد و روش‌ها

در تحقیق تجربی حاضر از ۵۰ توده بومی ریحان جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی ایران استفاده شد (جدول ۱). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تا ۱۳ تکرار و هر تکرار شامل ۵ گیاه در گلخانه گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام شد. ریحان گیاهی دگرگشن است. در گیاهان دگرگشن سطح تنوع ژنتیکی بسیار بیشتر از گیاهان خودگشن و گیاهان با ازدیاد غیرجنسی است. بنابراین تعداد گیاه بیشتری در نظر گرفته شد تا ارزیابی‌های فنوتیپی قابل اطمینان‌تر باشد. علت اختلاف در تعداد تکرار توده‌ها، تفاوت در مقدار بذر در دسترس برای هر یک از توده‌ها بود. در طول دوره رشد، آبیاری هر ۳ روز یک‌بار و کوددهی هر ۱۰ روز یک‌بار انجام شد. پس از گلدهی صفات مختلف مورفولوژیکی مانند تعداد کل برگ (LN)، طول برگ (Ll؛ سانتی‌متر)، عرض برگ (LW؛ سانتی‌متر)، ارتفاع بوته (PH؛ سانتی‌متر)، قطر ساقه (SD؛ میلی‌متر)، تعداد شاخه جانبی (LBN)، تعداد میانگره (IN)، طول میانگره (ID؛ سانتی‌متر)، تعداد گل (FN)، اندازه خوشه (FCS)؛

جدول ۱) کد، مرکز جمع‌آوری، طول و عرض جغرافیایی توده‌های ریحان مورد مطالعه

کد توده	مرکز جمع‌آوری	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	کد توده	مرکز جمع‌آوری	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
۱	تبریز	۳۸/۰۶	۴۶/۲۶	۲۶	بابل I	۳۶/۳۳	۵۲/۴۲
۲	مشهد	۳۶/۱۹	۵۹/۳۷	۲۷	بابل II	۳۶/۳۳	۵۲/۴۲
۳	شهری I	۵۱/۴۰	۳۵/۷۰	۲۸	بابل III	۳۶/۳۳	۵۲/۴۲
۴	شهری II	۵۱/۴۰	۳۵/۷۰	۲۹	اهواز I	۳۱/۲۴	۴۸/۴۹
۵	اصفهان I	۳۲/۴۰	۵۱/۴۵	۳۰	اهواز II	۳۱/۲۴	۴۸/۴۹
۶	کردستان I	۳۵/۱۸	۴۷/۰۶	۳۱	یزد I	۳۲/۰۰	۵۴/۴۰
۷	کردستان II	۳۵/۱۸	۴۷/۰۶	۳۲	یزد II	۳۲/۰۰	۵۴/۴۰
۸	لرستان	۳۳/۲۶	۴۵/۱۷	۳۳	ارومیه	۳۷/۳۴	۴۴/۵۸
۹	کردستان III	۳۵/۱۸	۴۷/۰۶	۳۴	یزد III	۳۲/۰۰	۵۴/۴۰
۱۰	محلات	۳۳/۸۸	۵۰/۵۰	۳۵	ورامین	۳۵/۱۹	۵۱/۳۹
۱۱	کاشان	۳۳/۹۸	۵۱/۵۸	۳۶	اردبیل I	۳۸/۱۵	۴۸/۱۷
۱۲	هرمزگان	۲۷/۳۷	۵۵/۵۱	۳۷	اردبیل II	۳۸/۱۵	۴۸/۱۷
۱۳	کرمان I	۳۰/۳۰	۵۷/۱۰	۳۸	شیراز I	۲۹/۳۹	۵۲/۳۵
۱۴	کرمان II	۳۰/۳۰	۵۷/۱۰	۳۹	شیراز II	۲۹/۳۹	۵۲/۳۵
۱۵	کرمانشاه I	۳۴/۲۳	۴۷/۰۳	۴۰	شیراز III	۲۹/۳۹	۵۲/۳۵
۱۶	کرمانشاه II	۳۴/۲۳	۴۷/۰۳	۴۱	شیراز IIII	۲۹/۳۹	۵۲/۳۵
۱۷	بیرجند I	۵۹/۱۳	۳۲/۵۲	۴۲	اصفهان II	۳۲/۴۰	۵۱/۴۵
۱۸	بیرجند II	۵۹/۱۳	۳۲/۵۲	۴۳	اصفهان III	۳۲/۴۰	۵۱/۴۵
۱۹	دزفول I	۳۲/۲۳	۴۸/۲۷	۴۴	اصفهان IIII	۳۲/۴۰	۵۱/۴۵
۲۰	دزفول II	۳۲/۲۳	۴۸/۲۷	۴۵	اصفهان IV	۳۲/۴۰	۵۱/۴۵
۲۱	قزوین I	۳۶/۱۵	۵۰/۰۱	۴۶	مرآغه	۴۶/۱۶	۳۷/۲۳
۲۲	قزوین II	۳۶/۱۵	۵۰/۰۱	۴۷	گرگان I	۳۶/۵۰	۵۴/۲۵
۲۳	قم I	۳۴/۴۹	۵۰/۵۶	۴۸	گرگان II	۳۶/۵۰	۵۴/۲۵
۲۴	قم II	۳۴/۴۹	۵۰/۵۶	۴۹	تویسرکان I	۳۴/۴۰	۴۸/۲۰
۲۵	همدان	۳۶/۴۶	۴۸/۳۴	۵۰	تویسرکان II	۳۴/۴۰	۴۸/۲۰

جدول ۲) نام و توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در تجزیه تنوع مولکولی توده‌های ریحان مورد مطالعه

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')	نام آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')
A7	AGAGAGAGAGAGAGAGAGT	426	CACCACCACCACCACCCT
A12	GAGAGAGAGAGACC	11	CACACACACAAC
UBC818	CACACACACACAG	9	CAGCAGCAGCAGCAG
UBC825	ACACACACACACT	3	CTCCTCCTCCTC
UBC849	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCG	7	CAACAACAACAACA
۴۴۳	ACACACACACACACT	459	TGCTGCTGCTGCTGCTGCC

اجزای واریانس، وراثت پذیری عمومی، ضرایب تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی، با استفاده از فرمول محاسبه شدند (جدول ۳).

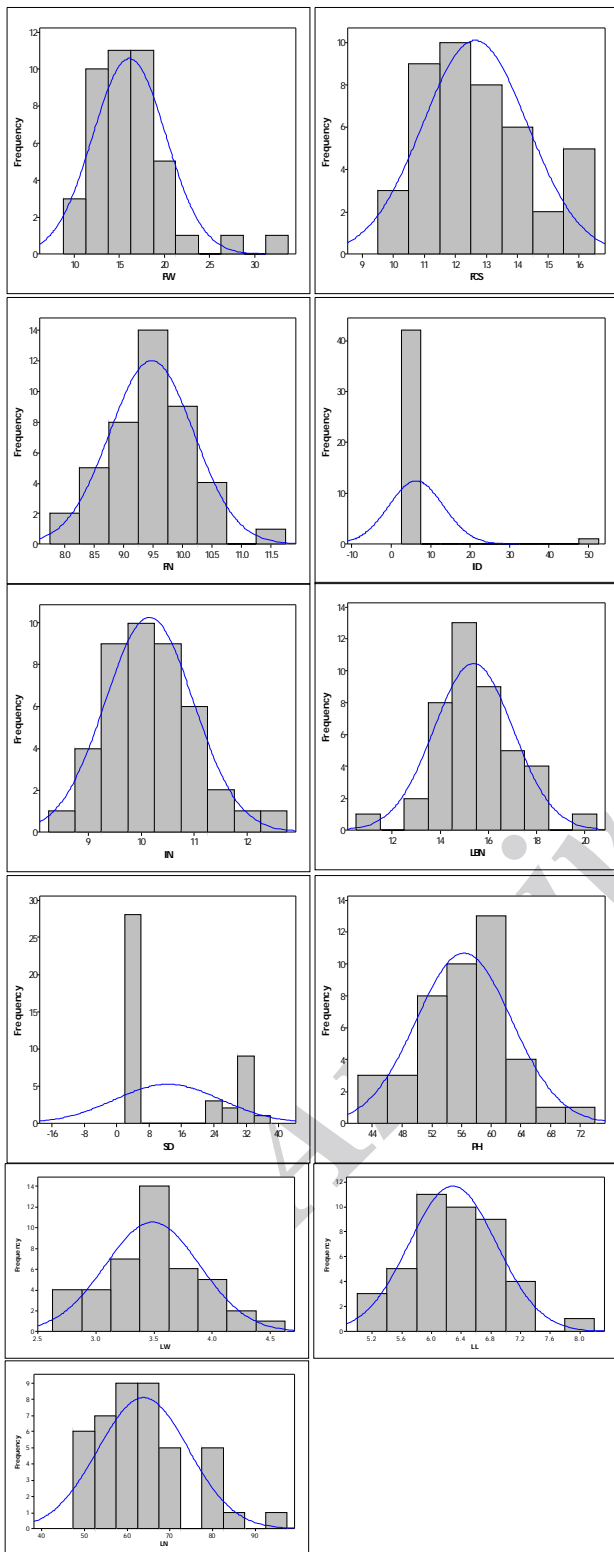
جدول ۳ فرمول‌های مورد استفاده برای محاسبه پارامترهای صفات مورفولوژیک در توده‌های بومی ریحان

پارامتر	فرمول
واریانس ژنتیکی	$V_G = \frac{MSG - MSe}{r}$
واریانس محیطی	$V_E = MSe$
واریانس فنوتیپی	$V_P = V_G + V_E$
وراثت پذیری عمومی	$H_b = \frac{V_G}{V_P}$
ضریب تغییرات ژنتیکی	$CV_G = \frac{\sqrt{V_G}}{\bar{X}} \times 100$
ضریب تغییرات فنوتیپی	$CV_P = \frac{\sqrt{V_P}}{\bar{X}} \times 100$

MSG=میانگین مربعات تیمار (ژنوتیپ)، MSe=میانگین مربعات اشتباه، r=تعداد تکرار،  $V_G$ =واریانس ژنتیکی،  $V_E$ =واریانس محیطی،  $H_b$ =وراثت‌پذیری عمومی،  $V_P$ =واریانس فنوتیپی،  $CV_G$ =ضریب تغییرات ژنتیکی،  $CV_P$ =ضریب تغییرات فنوتیپی

گروه‌بندی توده‌ها براساس صفات مورفولوژیک با استفاده از روش‌های تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مولفه‌های اصلی روی میانگین داده‌های اصلی صورت گرفت. تجزیه خوشه‌ای، پس از استاندارد کردن داده‌ها به روش وارد (Ward) و تجزیه به مولفه‌های اصلی از طریق ماتریس ضرایب همبستگی صفات در نرم‌افزار Minitab 17 انجام شد. در روش وارد کلاسترها طوری انتخاب می‌شوند که تشابه درون کلاستر حداکثر باشد. در این روش مجموع مربعات درون کلاستر به‌عنوان معیار تشابه مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین در روش وارد سعی می‌شود مجموع مربعات درون کلاستر (مجموع مربعات خطا) حداقل شود. در تجزیه به مولفه‌های اصلی صفات متعددی به‌طور همزمان بررسی می‌شوند و به‌طور معمول واحد اندازه‌گیری صفات یکسان نیست. واریانس هر متغیر با تغییر واحد اندازه‌گیری، تغییر می‌کند. برای از بین بردن اثر مقیاس، متغیرها استاندارد می‌شوند. ماتریس واریانس-کواریانس برای داده‌های استاندارد شده به ماتریس همبستگی تبدیل می‌شود. بنابراین می‌توان به‌جای استاندارد کردن داده‌ها و محاسبه ماتریس واریانس-کواریانس، به‌طور مستقیم ماتریس همبستگی از داده‌های خام محاسبه می‌شود. توزیع فنوتیپی توده‌ها برای هر یک از صفات مورد مطالعه در نرم‌افزار Minitab 17 رسم و الگوی باندی حاصل از انگشت‌نگاری ژنوتیپی براساس حضور (یک) و عدم حضور (صفر) نمره‌دهی شد. گروه‌بندی توده‌ها براساس داده‌های مولکولی با محاسبه تشابه ژنتیکی توده‌ها با روش جاکاردا [27] و الگوریتم روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی (UPGMA) در نرم‌افزار Darwin 5 صورت گرفت. به‌منظور تجزیه موثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیرجمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط، ارزیابی ساختار جمعیت با استفاده از روش بیزی در نرم‌افزار Structure 2.3.3 انجام شد [28]. هنگامی که ضریب تعلق یک فرد به گروهی خاص بیشتر از ۰/۷ باشد آن فرد به آن گروه اختصاص می‌یابد ولی اگر ضریب تعلق به زیرگروه‌ها کمتر از ۰/۷ باشد آن فرد به‌عنوان ژنوتیپ مخلوط (admixed) شناسایی می‌شود [29]. تعداد زیرجمعیت‌های احتمالی (K) از ۱ تا ۱۰ و تعداد تکرار برای هر کدام از آنها ۵ در نظر گرفته شد. بعد از رسم نموداری بر حسب K و Delta K و تعیین بهترین K، ماتریس Q که نشان‌دهنده میزان تعلق هر فرد به زیرجمعیتی خاصی است، محاسبه و ارتباط میان

نشانگرها و صفات از طریق روش MLM در نرم‌افزار Tassel 3 [14] بررسی شد. محاسبه مقادیر آماره‌های توصیفی، همبستگی و انجام تجزیه واریانس یک‌طرفه با استفاده از داده‌های فنوتیپی ۴۳ توده از ۵۰ توده بعد از بررسی نتایج آزمون نرمال توزیع اشتباهات آزمایشی در نرم‌افزار SPSS 20 صورت گرفت.



نمودار ۱) نمودارهای توزیع فراوانی صفات مورفولوژیک در توده‌های ریحان  
 LN=تعداد کل برگ، LL=طول برگ، LW=عرض برگ، PH=ارتفاع بوته، SD=قطر ساقه، LBN=تعداد شاخه جانبی، LN=تعداد میانگره، ID=طول میانگره، FN=تعداد گل، FCS=اندازه خوشه، FW=وزن تر گیاه

## یافته‌ها

برای اکثر صفات مورد مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ و تنوع گسترده‌ای برای صفات در توده‌های مورد مطالعه مشاهده شد.

برای صفات تعداد کل برگ، طول برگ، عرض برگ، قطر ساقه، طول میانگره، تعداد شاخه جانبی، اندازه خوشه و وزن تر گیاه کشیدگی به سمت مقادیر پایین صفات بود. برای صفات ارتفاع بوته، تعداد میانگره و تعداد گل کشیدگی به سمت مقادیر بالای صفات بود (نمودار ۱). بین اکثر صفات همبستگی مثبت مشاهده شد، بالاترین همبستگی مثبت و معنی‌دار بین دو صفت عرض برگ و

تجزیه ارتباطی صفات مورفولوژیک در توده‌های ایرانی ریحان با استفاده از نشانگر ISSR ۹۷ طول برگ (۰/۷۳۳) و بالاترین همبستگی منفی بین دو صفت عرض برگ و قطر ساقه (۰/۴۰۴-) مشاهده شد (جدول ۴). بالاترین ضریب تغییرات ژنتیکی در صفات قطر ساقه (۱۱۰/۷۶) و طول میانگره (۱۱۰/۵۳) و پایین‌ترین ضریب تغییرات در صفت تعداد گل (۳/۸۸) مشاهده شد. در تمامی ۱۱ صفت مورد مطالعه ضریب تنوع فنوتیپی از ضریب تنوع ژنتیکی بیشتر بود که نشان‌دهنده تاثیر عوامل محیطی بر صفات مورد بررسی بود (جدول ۵). وراثت پذیری صفات بین ۳/۶۳٪ برای صفت تعداد گل تا ۹۴/۲۴٪ برای صفت طول میانگره متغیر بود.

جدول ۴) ضرایب همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده در توده‌های بومی ریحان

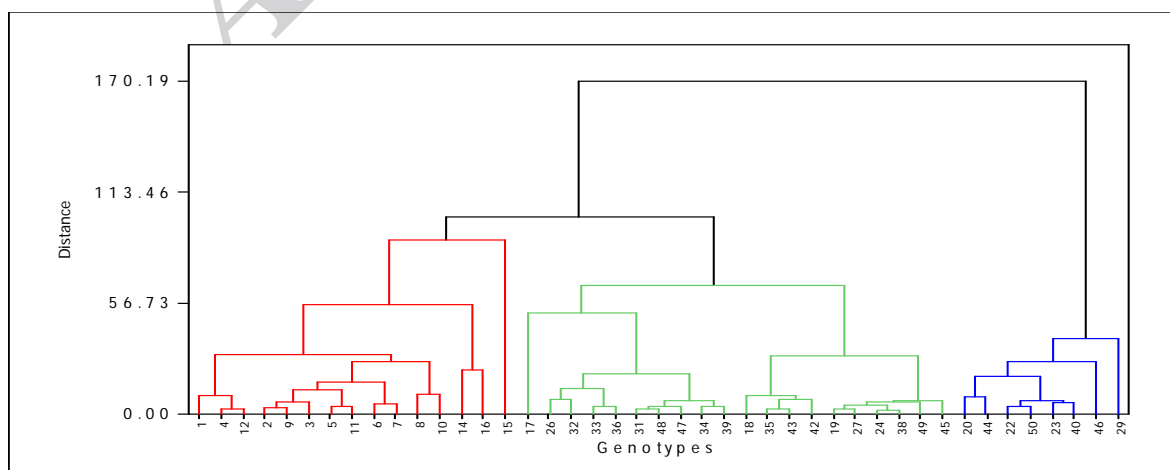
صفت	LN	LL	LW	PH	SD	LBN	IN	ID	FN	FCS	FW
LL	۰/۳۵۶*										
LW	۰/۱۰۶	۰/۷۳۳**									
PH	۰/۳۱۰*	۰/۳۷*	۰/۱۷۱								
SD	۰/۲۹۰	۰/۳۱۱*	۰/۴۰۴*	۰/۱۶۷-							
LBN	۰/۵۱۷**	۰/۰۸۹	۰/۲۲۳	۰/۱۲۳	۰/۳۹۳*						
IN	۰/۳۹۱*	۰/۱۴۴-	۰/۰۶۳-	۰/۰۴۸	۰/۱۶۱-	۰/۷۲۱**					
ID	۰/۰۶۶-	۰/۱۰	۰/۰۰۲	۰/۰۴۱	۰/۲۴۱	۰/۱۵۹-	۰/۱۶۰-				
FN	۰/۰۰۳-	۰/۱۴۳	۰/۰۱۲	۰/۲۶۹	۰/۱۱۸-	۰/۱۶۷-	۰/۳۶۳*	۰/۱۸۳-			
FCS	۰/۲۹۶	۰/۲۶۰	۰/۰۴۰	۰/۴۱۱*	۰/۱۹۷-	۰/۱۸۸	۰/۰۷۲	۰/۲۳۲-	۰/۴۴۹*		
FW	۰/۶۱۸**	۰/۷۰۷**	۰/۴۴۷*	۰/۳۹۰*	۰/۰۵۸-	۰/۲۲۸	۰/۰۰۶-	۰/۰۹۶	۰/۱۳۳	۰/۲۵۵	

LN=تعداد کل برگ، LL=طول برگ، LW=عرض برگ، PH=ارتفاع بوته، SD=قطر ساقه، LBN=تعداد شاخه جانبی، IN=تعداد میانگره، ID=طول میانگره، FN=تعداد گل، FCS=اندازه خوشه، FW=وزن تر؛ \* $p < 0.05$ ، \*\* $p < 0.01$

جدول ۵) مقادیر آماره‌های توصیفی، اجزای واریانس، وراثت‌پذیری عمومی، ضریب تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی صفات مورد مطالعه در توده‌های بومی ریحان

صفت	میانگین	حداقل	حداکثر	واریانس ژنتیکی	واریانس محیطی	واریانس فنوتیپی	وراثت‌پذیری عمومی	ضریب تغییرات ژنتیکی	ضریب تغییرات فنوتیپی
LN	۶۳/۸۴±۱/۶۱	۴۹/۰۰	۹۲/۷۰	۶۷/۱۸	۲۹۱/۰۳	۳۵۸/۲۲	۱۸/۷۵	۱۲/۸۴	۲۹/۶۵
LL	۶/۲۹±۰/۰۹	۵/۱۰	۸/۰۵	۰/۱۷	۱/۰۹	۱/۲۷	۱۳/۶۳	۶/۶۰	۱۷/۸۹
LW	۳/۴۹±۰/۰۶	۲/۶۳	۴/۴۵	۰/۱۱	۰/۴۲	۰/۵۳	۲۰/۹۵	۹/۵۸	۲۰/۹۳
PH	۵۶/۳۳±۰/۹۸	۴۳/۱۱	۷۲/۹۰	۳۰/۱۹۵	۱۲۷/۲۵	۱۵۸/۲۰	۱۹/۵۷	۹/۸۸	۲۲/۳۳
SD	۱۲/۶۲±۲/۰۰	۲/۷۸	۳۴/۲۷	۱۹۵/۳۹	۱۶/۰۹	۲۱۱/۴۸	۹۲/۳۹	۱۱۰/۷۶	۱۱۵/۲۳
LBN	۱۵/۳۸±۰/۲۵	۱۰/۷۰	۲۰/۲۲	۲/۰۹	۷/۷۸	۹/۸۸	۲۱/۱۸	۹/۴۰	۲۰/۴۳
IN	۱۰/۱۵±۰/۱۳	۸/۷۰	۱۲/۵۶	۰/۵۶	۱/۹۷	۲/۵۳	۲۱/۹۹	۷/۳۴	۱۵/۶۶
ID	۶/۲۹±۱/۰۶	۳/۴۸	۵۰/۳۸	۴۸/۳۴	۲/۹۵	۵۱/۲۹	۹۴/۲۴	۱۱۰/۵۳	۱۱۳/۸۶
FN	۹/۴۸±۰/۱۱	۷/۸۹	۱۱/۶۴	۰/۱۴	۳/۵۹	۳/۷۳	۳/۶۳	۳/۸۸	۲۰/۳۷
FCS	۱۲/۶۴±۰/۲۶	۹/۸۸	۱۶/۴۳	۱/۶۸	۱۱/۳۷	۱۳/۰۵	۱۲/۸۵	۱۰/۲۵	۲۸/۵۸
FW	۱۶/۰۹±۰/۶۲	۹/۵۹	۳۱/۵۸	۴/۸۴	۵۸/۳۰	۶۳/۱۴	۷/۶۷	۱۳/۶۸	۴۹/۳۹

LN=تعداد کل برگ، LL=طول برگ، LW=عرض برگ، PH=ارتفاع بوته، SD=قطر ساقه، LBN=تعداد شاخه جانبی، IN=تعداد میانگره، ID=طول میانگره، FN=تعداد گل، FCS=اندازه خوشه، FW=وزن تر گیاه،  $V_E$ = واریانس محیطی،  $V_G$ = واریانس ژنتیکی،  $V_P$ = واریانس فنوتیپی،  $H_B$ = وراثت‌پذیری عمومی،  $CV_G$ = ضریب تغییرات ژنتیکی،  $CV_P$ = ضریب تغییرات فنوتیپی



نمودار ۲) دندروگرام حاصل از گروه‌بندی توده‌های ریحان براساس صفات مورد مطالعه با استفاده از روش وارد

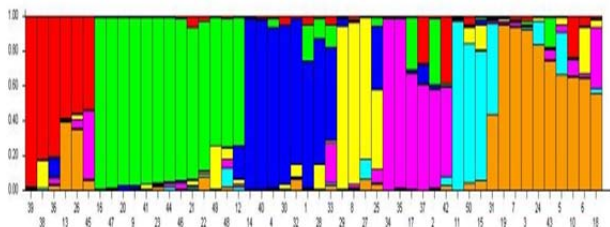
تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی به روش UPGMA و ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد، توده‌های مورد مطالعه را مجدداً در ۳ گروه مجزا قرار داد، در این دندروگرام نیز همانند دندروگرام حاصل از داده‌های مورفولوژیک، توده‌هایی با منشأ جغرافیایی مشابه در کنار هم قرار نگرفتند که می‌تواند ناشی از یک‌بودن منشأ بذری توده‌های مختلف باشد که در اثر مهاجرت به مناطق مختلف صورت گرفته است. بنابراین اکتفای صرف به گوناگونی مناطق جغرافیایی در انتخاب والدین برای پروژه‌های اصلاحی کافی نبوده بلکه این مهم با توجه به ظرفیت‌های ویژه هر جمعیت صورت می‌گیرد (نمودار ۴).

ضریب همبستگی کوفنتیک ۰/۶۳ بود که نشان‌دهنده مطابقت خوب بین ماتریس تشابه حاصل از دندروگرام و ماتریس تشابه اولیه است.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس صفات مورفولوژیک در تطابق کامل با گروه‌بندی براساس داده‌های مولکولی نبود. علت اصلی عدم تطابق بین گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس صفات مورفولوژیک و مولکولی به این دلیل می‌تواند باشد که بیشتر صفات کمی به وسیله تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند و به شدت تحت تاثیر محیط قرار می‌گیرند.

علاوه بر این نشانگرهای ISSR به‌طور تصادفی در سراسر ژنوم توزیع شده‌اند و در اکثریت موارد بیشتر مناطق ژنوم (تقریباً ۹۰٪) در فنوتیپ تاثیر ندارند. بنابراین یافتن تشابه بین گروه بندی مبتنی بر نشانگر ISSR و صفات کمی مشکل به نظر می‌رسد.

در گروه‌بندی توده‌ها براساس ماتریس Q و روش Bayesian ۵۰. توده مورد مطالعه به جز توده شماره ۳۱، به‌طور مشخص در ۷ گروه اصلی قرار گرفتند (نمودار ۵).

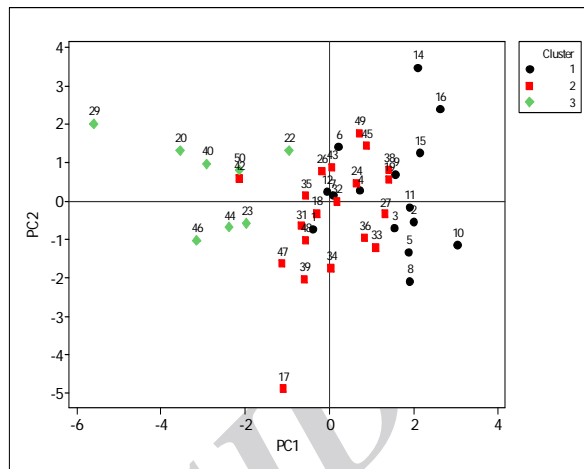


**نمودار ۵** گروه‌بندی ۵۰ توده ریحان براساس مکان‌های تکثیری حاصل از آغازگرهای ISSR مورد استفاده براساس مدل بی‌زی در نرم‌افزار Structure. محور Y نشان‌دهنده ضریب تعلق افراد به گروه‌های مربوطه و محور X نشان‌دهنده نام ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. افراد دارای رنگ مشابه به گروهی مشابه تعلق دارند.

هدف از انجام تجزیه ساختار جمعیت، حذف اثر آن و کاهش ارتباط دروغین نشانگر-صفت در مطالعات تجزیه ارتباط بود. گروه‌های دوم و ششم به‌ترتیب بیشترین (۱۳) و کمترین (۳) تعداد فرد را به خود اختصاص دادند.

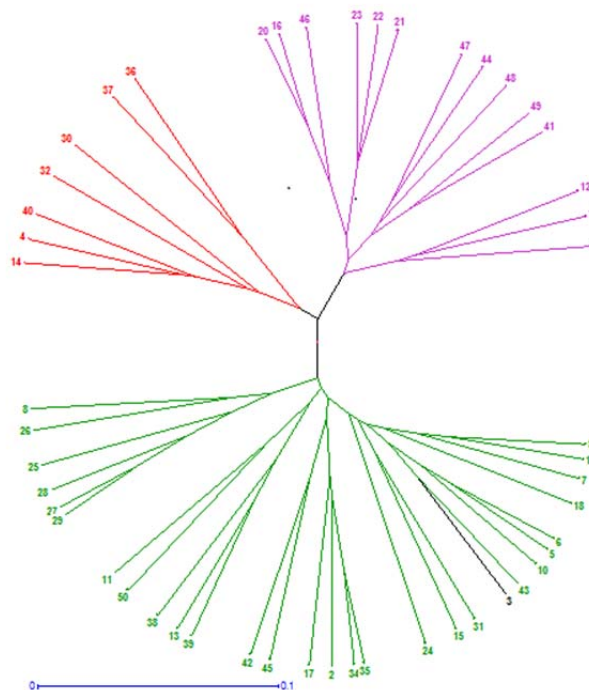
گروه‌بندی حاصل از روش Bayesian که براساس تعادل هاردی-واینبرگ در داخل هر زیرجمعیت است با گروه‌بندی حاصل از داده‌های مورفولوژیک و مولکولی متفاوت بود. علت این امر برآوردهای متفاوت سه سیستم از تنوع ژنتیکی بین توده‌ها بود. ۱۴ مکان پیوسته با ۷ صفت در سطح احتمال ۵٪ شناسایی شد (جدول ۶). دامنه تغییرات فنوتیپی توجیه‌شده ( $R^2$ ) توسط QTLها بین ۳ الی ۲۹٪ متغیر بود. بیشترین تعداد (۳ مکان) برای صفات قطر ساقه (SD) و کمترین تعداد مکان (۱ مکان) برای

تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مورفولوژیک به روش حداقل واریانس Ward، توده‌ها را در ۳ گروه متمایز گروه‌بندی کرد (نمودار ۲). از ۴۳ توده مورد بررسی ۱۵ توده در گروه اول (۳۴/۸۸٪)، ۲۰ توده در گروه دوم (۴۶/۵۱٪) و ۸ توده در گروه سوم (۱۸/۶۰٪) قرار گرفتند (نمودار ۳).



**نمودار ۳** گروه‌بندی توده‌های ریحان براساس مولفه اول و دوم حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی روی صفات مورد مطالعه

جمعیت‌های درون هر گروه از مناطق مختلف جغرافیایی بودند در نتیجه هیچ ارتباطی بین الگوی کلاستر بر اساس صفات مورفولوژیک و توزیع جغرافیایی توده‌ها وجود نداشت. فاصله بین کلاستر اول و دوم برابر ۲/۴۲، بین اول و سوم برابر ۴/۳۸ و بین دوم و سوم برابر ۳/۳۲ بود، بنابراین بیشترین هتروزیس مورد انتظار، می‌تواند از تلاقی بین ژنوتیپ‌های گروه اول با گروه سوم حاصل شود. دو مولفه اول ۲۱٪ از کل تغییرات داده‌ها را توجیه کرد.



**نمودار ۴** گروه‌بندی توده‌های مورد مطالعه ریحان براساس داده‌های حاصل از نشانگر ISSR

صفت موجب کاهش یا افزایش همزمان صفات همبسته می‌شود [31].

براساس نتایج حاصل از محاسبه اجزای واریانس و ضرایب تنوع ژنتیکی و فنوتیپی، بالاترین ضریب تغییرات ژنتیکی در صفات قطر ساقه و طول میانگره و پایین‌ترین ضریب تغییرات در صفت تعداد گل مشاهده شد. در تمامی ۱۱ صفت مورد مطالعه ضریب تنوع فنوتیپی از ضریب تنوع ژنتیکی بیشتر بود که نشان‌دهنده تاثیر عوامل محیطی بر صفات مورد بررسی است. هر چقدر اختلاف مقدار ضریب تغییرات ژنوتیپی از فنوتیپی کمتر باشد، نشان می‌دهد که اثر محیط روی ویژگی کم است، بنابراین انتخاب برای اصلاح چنین ویژگی کارایی بیشتری خواهد داشت [32]. وراثت‌پذیری صفات بین ۳۱/۶۳٪ برای صفت تعداد گل تا ۹۴/۲۴٪ برای صفت طول میانگره متغیر بود.

مطابق با نظریه استانسفیلد [33] چنانچه توارث‌پذیری صفتی بیشتر از ۰/۵ باشد، صفت دارای توارث پذیری بالا، چنانچه توارث‌پذیری عمومی صفتی بین ۰/۲ تا ۰/۵ باشد، صفت دارای توارث‌پذیری متوسط و چنانچه توارث‌پذیری صفت مورد نظر کمتر از ۰/۲ باشد، صفت دارای توارث‌پذیری پایین است. طبق این نظریه صفات قطر ساقه و طول میانگره دارای توارث پذیری بالا، صفات عرض برگ، ارتفاع بوته، تعداد شاخه جانبی و تعداد میانگره توارث‌پذیری متوسط و صفات تعداد برگ، طول برگ، تعداد گل، اندازه خوشه و وزن تر گیاه توارث پذیری پایین داشتند. آماره‌های توصیفی به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی در برخی از محصولات دیگر از جمله سیر [34] و خربزه [35] به کار برده شده است. صفات تعداد گل و برگ متغیرهای گسسته هستند. توصیه می‌شود تجزیه و تحلیل چنین صفاتی بر مبنای رگرسیون پواسون صورت گیرد. در این پروژه تحقیقی تجزیه داده‌ها با روش معمول تجزیه واریانس انجام گرفت و وراثت‌پذیری براساس امید ریاضی میانگین مربعات در جدول تجزیه واریانس محاسبه شد. بنابراین احتمالاً علت برآورد کم وراثت‌پذیری برای چنین صفاتی روش نامناسب تجزیه و تحلیل داده‌ها باشد. البته به‌منظور بررسی اختلاف بین توده‌ها تجزیه واریانس به روش ناپارامتریک هم انجام شد. آزمون‌های ناپارامتریک، که از آنها با عنوان آزمون‌های بدون پیش فرض نیز یاد می‌شود، به هیچ پیش فرض خاصی در رابطه با توزیع جامعه نیاز ندارند.

تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مورفولوژیک به روش حداقل واریانس وارد، توده‌ها را در ۳ گروه متمایز گروه‌بندی کرد. از ۴۳ توده مورد بررسی ۱۵ توده در گروه اول، ۲۰ توده در گروه دوم و ۸ توده در گروه سوم قرار گرفتند. جمعیت‌های درون هر گروه از مناطق مختلف جغرافیایی بودند که بیانگر این است که هیچ ارتباطی بین الگوی کلاستر براساس صفات مورفولوژیک و توزیع جغرافیایی توده‌ها وجود نداشت. فاصله بین کلاستر اول و دوم برابر ۲/۴۲، بین اول و سوم برابر ۴/۳۸ و بین دوم و سوم برابر ۳/۳۲ بود. این نتیجه نشان داد که بیشترین هتروزیس مورد انتظار، می‌تواند از تلاقی بین ژنوتیپ‌های گروه اول با گروه سوم حاصل شود. نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد که ۲ مولفه اول توانستند ۲۱٪ کل تغییرات داده‌ها را توجیه کنند.

برای نشان‌دادن قابلیت تجزیه به مولفه‌های اصلی در متمایز نمودن ژنوتیپ‌ها از یکدیگر، پلات دوبعدی براساس مولفه‌ها رسم شد که در آن ۳ گروه قابل تشخیص بود. در دیگر مطالعات انجام‌شده نیز پلات دوبعدی برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است [36, 37]. تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی به روش UPGMA و

صفات تعداد شاخه جانبی (LBN) شناسایی شد. از بین مکان‌های شناسایی‌شده، ۶ مکان (UBC849-1، UBC849-3، UBC849-5، 1-3، A12-8 و UBC825-7) به‌طور اختصاصی فقط با یک صفت پیوسته بودند. میزان تنوع فنوتیپی این صفات ( $R^2$ ) از ۱۷٪ تا ۲۹٪ متغیر بود. سایر مکان‌ها بین صفات مشترک بودند. مکان 1-11 بین ۴ صفت قطر ساقه (SD)، تعداد شاخه جانبی (LBN)، اندازه خوشه (FCS) و وزن تر گیاه (FW) مشترک بود.

جدول ۶) نتایج تجزیه ارتباط بین صفات مورفولوژیک و داده‌های حاصل از نشانگرهای ISSR با استفاده از مدل MLM

صفت	مکان	سطح معنی‌داری	ضریب $R^2$
LN	11-2	۰/۰۳۱	۰/۱۸
	UBC849-1	۰/۰۴۱	۰/۲۳
IN	9-2	۰/۰۲۹	۰/۲۳
	UBC849-3	۰/۰۲۵	۰/۲۵
SD	A12-8	۰/۰۱۵	۰/۱۹
	11-1	۰/۰۲۸	۰/۲۴
	UBC849-5	۰/۰۴۲	۰/۲۸
LBN	11-1	۰/۰۳۵	۰/۲۳
	9-2	۰/۰۱۵	۰/۲۹
FN	UBC825-7	۰/۰۱۵	۰/۲۹
	3-1	۰/۰۴۳	۰/۱۸
FCS	11-1	۰/۰۴۱	۰/۲۳
	11-1	۰/۰۰۶	۰/۰۳
FW	11-2	۰/۰۲۳	۰/۰۳

LN=تعداد کل برگ، IN=تعداد میانگره، SD=قطر ساقه، LBN=تعداد شاخه جانبی، FN=تعداد گل، FCS=اندازه خوشه و FW=وزن تر گیاه

## بحث

تحقیق حاضر با هدف نقشه‌یابی ارتباطی صفات مورفولوژیک در توده‌های ایرانی ریحان /وسیموم باسیلیکوم با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام شد.

در مطالعه حاضر بعد از انجام آزمون نرمال توزیع اشتباهات آزمایشی، تجزیه واریانس هم به روش ناپارامتریک [30] برای صفاتی که تبدیل داده در نرمال‌کردن توزیع اشتباهات آزمایشی موثر نبود و هم پارامتریک برای سایر صفات انجام شد. براساس هر ۲ روش بین توده‌ها برای اکثر صفات مورد مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد. وجود تنوع مهم‌ترین عامل در انجام برنامه‌های اصلاحی به شمار می‌آید. با بالارفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه، حدود انتخاب چه طبیعی و چه مصنوعی وسیع‌تر می‌شود. با توجه به رابطه مثبت بین کمیت تنوع ژنتیکی و مقدار تغییرات تکاملی، رابطه مشابهی نیز بین کارایی بهبود ژنتیکی یک جامعه و تنوع ژنتیکی برای صفت مورد علاقه موجود است. براساس نمودارهای توزیع فراوانی، تنوع گسترده‌ای برای صفات در توده‌های مورد مطالعه مشاهده شد. برای صفات تعداد کل برگ، طول برگ، عرض برگ، قطر ساقه، طول میانگره، تعداد شاخه جانبی، اندازه خوشه و وزن تر گیاه کشیدگی به سمت مقادیر پایین صفات بود. برای صفات ارتفاع بوته، تعداد میانگره و تعداد گل کشیدگی به سمت مقادیر بالای صفات بود. بین اکثر صفات همبستگی مثبت مشاهده شد. بالاترین همبستگی مثبت و معنی‌دار بین دو صفت عرض برگ و طول برگ (۰/۷۳۳) و بالاترین همبستگی منفی بین دو صفت عرض برگ و قطر ساقه (۰/۴۰۴-) مشاهده شد. معمولاً هم‌مکانی چند QTL موجب همبستگی بالای صفات می‌شود. هم‌مکانی QTLها به معنی پیوستگی نزدیک دو ژن یا اثر پلیوتروپی یک ژن است. در پاسخ‌های همبسته انتخاب برای یک

اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش هم‌زمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند. اسانس که از برگ‌ها و گل ریحان به دست می‌آید حاوی آنتی‌اکسیدانی مهم به نام اسیدرزماریک است که خاصیت درمانی فراوانی (ضدسرطان، ضدباکتری و ضدویروس) دارد [43]. بنابراین طی برنامه‌های اصلاحی ریحان با هدف افزایش اسانس به‌خصوص این آنتی‌اکسیدان در گیاه ریحان می‌توان از مکان‌های پیوسته با صفات تعداد کل برگ و تعداد گل به هنگام گزینش به کمک نشانگر استفاده کرد.

به‌دلیل اینکه در مدل MLM، ماتریس ساختار جمعیت و ارتباط خویشاوندی افراد در نظر گرفته می‌شود، بنابراین تعداد آغازگرهای پیوسته کمتری با صفات کمی شناسایی می‌شود و فقط پیوستگی‌های بسیار معنی‌دار باقی می‌ماند. بیکی و همکاران [44] از نشانگرهای ISSR برای بررسی تنوع وراثتی ارقام زراعی و گونه‌های خودروی جنس کروکوس استفاده و گزارش کردند که نشانگرهای ISSR سودمندی بالایی در گروه‌بندی گونه‌های کروکوس و تحلیل روابط ژنتیکی آنها دارند. عبدالهی‌مندولکانی و عزیز [45] برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورفولوژیک در جمعیت‌های یونجه زراعی از تجزیه ارتباط با استفاده از نشانگرهای ISSR استفاده نمودند. آنها کمترین تعداد نشانگر را برای صفات تعداد برگ و وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه گزارش نمودند و نشانگر UBC849، ۳۷٪ از تغییرات وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه را توجیه کردند. آی‌وندیک و همکاران [46] با استفاده از ۳۳ نشانگر SSR و روش تجزیه ارتباط، نشانگرهای مرتبط با زمان گلدهی تحت رژیم‌های مختلف رشدی را در جو شناسایی کردند. محمدی و همکاران [47] با استفاده از نشانگر SSR، ۱۷ نشانگر را در یونجه زراعی شناسایی نمودند که رابطه معنی‌داری با حداقل یکی از ۱۱ صفت مورفولوژیک مطالعه‌شده نشان می‌دادند. رشیدی‌منفرد و همکاران [48] با استفاده از نشانگرهای SSAP، ۳۲ نشانگر را در گندم دوروم شناسایی نمودند که حداقل با یکی از صفات زراعی مورد بررسی رابطه معنی‌داری داشت. عبدالهی‌مندولکانی و همکاران [49] برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک در بادام زمینی از تجزیه ارتباط با استفاده از نشانگرهای SSR استفاده و بیان کردند که این روش برای شناسایی مکان‌های آگاهی‌بخش مرتبط با صفات مورفولوژیک مفید و مطمئن بوده و نشانگرهای موثر حاصل از این مطالعات می‌تواند در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر و تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی استفاده شوند.

از جمله محدودیت‌های تحقیق حاضر تعداد و نوع نشانگر مورد استفاده بود، بر این اساس پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی از نشانگرهای عملکردی با تعداد بیشتر استفاده شود و نشانگرهای شناسایی‌شده در چنین مطالعاتی در جمعیت‌های بزرگ با تنوع ژنتیکی بالا نیز مورد بررسی قرار گیرند تا از ارتباط آنها با صفات مورد مطالعه اطمینان حاصل شود و بدین ترتیب کارایی کاربرد این نشانگرها در برنامه‌های مختلف اصلاحی افزایش یابد. بنابراین مناطق ژنومی پیوسته با عوامل کنترل‌کننده صفات مورد نظر بعد از اعتبارسنجی و نقشه‌یابی دقیق می‌توانند برای انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های مختلف اصلاح ریحان استفاده شوند و از این طریق منجر به تسریع و کارایی بیشتر روش‌های سنتی اصلاحی شوند. همچنین با توالی‌یابی آغازگرهای دارای  $R^2$  بالا می‌توان به یافتن ژن‌های کدکننده صفات زراعی امیدوار بود. منابع مالی کم نیز از محدودیت‌های اساسی تحقیق حاضر محسوب می‌شود.

ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد، توده‌های مورد مطالعه را مجدداً در ۳ گروه مجزا قرار داد. در این دندروگرام نیز همانند دندروگرام حاصل از داده‌های مورفولوژیک، توده‌هایی با منشا جغرافیایی مشابه در کنار هم قرار نگرفتند که می‌تواند ناشی از یکی‌بودن منشا بذری توده‌های مختلف باشد که در اثر مهاجرت به مناطق مختلف صورت گرفته است. بنابراین اکتفای صرف به گوناگونی مناطق جغرافیایی در انتخاب والدین برای پروژه‌های اصلاحی کافی نبوده بلکه این مهم با توجه به ظرفیت‌های ویژه هر جمعیت صورت می‌گیرد. ضریب همبستگی کوفنتیک  $0.63$  به‌دست آمد، که نشان‌دهنده مطابقت خوب بین ماتریس تشابه حاصل از دندروگرام و ماتریس تشابه اولیه بود.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس صفات مورفولوژیک در تطابق کامل با گروه‌بندی براساس داده‌های مولکولی نبود. علت اصلی عدم تطابق بین گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس صفات مورفولوژیک و مولکولی این بود که بیشتر صفات کمی به‌وسیله تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند و به‌شدت تحت تاثیر محیط قرار می‌گیرند. علاوه بر این نشانگرهای ISSR به‌طور تصادفی در سراسر ژنوم توزیع شده‌اند و در اکثریت موارد بیشتر مناطق ژنوم در فنوتیپ تاثیر ندارند. بنابراین یافتن تشابه بین گروه‌بندی مبتنی بر نشانگر ISSR و صفات کمی مشکل به نظر می‌رسد. نتایج حاصله مشابه نتایج فاضلی و همکاران [38] روی نخود زراعی، تاران و همکاران [39] در روی نخود فرنگی، بیلی و ترزوپولوس [40] روی باقلا، ایرولا و همکاران [41] روی نخود زراعی می‌باشد.

گروه‌بندی توده‌ها براساس ماتریس Q و روش Bayesian، ۵۰ توده مورد مطالعه به‌جز توده شماره ۳۱، به‌طور مشخص در ۷ گروه اصلی قرار گرفتند. هدف از انجام تجزیه ساختار جمعیت، حذف اثر آن و کاهش ارتباط دروغین نشانگر-صفت در مطالعات تجزیه ارتباط بود. گروه‌های دوم و ششم به‌ترتیب بیشترین و کمترین تعداد فرد را به خود اختصاص دادند.

تجزیه ساختار جمعیت نشان داد گروه‌بندی حاصل از روش Bayesian که براساس تعادل هاردی-واینبرگ در داخل هر زیرجمعیت است با گروه‌بندی حاصل از داده‌های مورفولوژیک و مولکولی متفاوت بود. علت این امر برآوردهای متفاوت سه سیستم از تنوع ژنتیکی بین توده‌ها بود.

در این مطالعه برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه و حذف پیوستگی دروغین نشانگر-صفت از مدل ارتباط‌یابی MLM استفاده شد. ۱۴ مکان پیوسته با ۷ صفت در سطح احتمال ۵٪ شناسایی شد. دامنه تغییرات فنوتیپی توجیه‌شده ( $R^2$ ) توسط QTL‌ها بین ۳ تا ۲۹٪ متغیر بود. بیشترین تعداد برای صفات قطر ساقه و کمترین تعداد مکان برای صفات تعداد شاخه جانبی شناسایی شد. از بین مکان‌های شناسایی‌شده، ۶ مکان (UBC849-1، UBC849-3، UBC849-5، 3-1، 12-8، 8-7) به‌طور اختصاصی فقط با یک صفت پیوسته بودند. میزان تنوع فنوتیپی این صفات از ۱۷ تا ۲۹٪ متغیر بود. سایر مکان‌ها بین صفات مشترک بودند. مکان 11-1 بین ۴ صفت قطر ساقه، تعداد شاخه جانبی، اندازه خوشه و وزن تر گیاه مشترک بود. سلواراج و همکاران [42] نیز QTL‌های مشترکی را برای طول دانه، طول غلاف و وزن ۱۰۰ دانه در بادام زمینی گزارش کردند.

شناسایی نشانگرهای مشترک می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد و



- GS, editor. Rice genetics III: Proceedings of the third international rice genetics symposium, Manila, Philippines, 16-20 October 1995. Los Baños: International Rice Research Institute; 1996. pp. 307-16.
- 9- Zhao W, Wang Y, Chen T, Jia G, Wang X, Qi J, et al. Genetic structure of mulberry from different ecotypes revealed by ISSRs in china: An implications for conservation of local mulberry varieties. *Sientia Horticulturae*. 2007;115(1):47-55.
- 10- Parrisseaux B, Bernardo R. In silico mapping of quantitative trait loci in maize. *Theor Appl Genet*. 2004;109(3):508-14.
- 11- Russo MA, Ficco DBM, Marone D, De Vita P, Vallega V, Rubies-Autonel C, et al. A major QTL for resistance to soil-borne cereal mosaic virus derived from an old Italian durum wheat cultivar. *J Plant Interact*. 2012;7(4):290-300.
- 12- Abdurakhmonov IY, Abdulkarimov A. Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. *Int J Plant Genomics*. 2008;2008:574927.
- 13- Zhang Q, Wu C, Ren F, Li Y, Zhang C. Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. *Aust J Crop Sci*. 2012;6(6):1131-8.
- 14- Buckler E, Casstevens T, Bradbury P, Zhang Z, Kroon D, Glaubitz J, et al. User manual for TASSEL, trait analysis by association, evolution and linkage [Internet]. New York: Cornell University; 2014 [cited 2016 May 17]. Available from: <https://confluence.cornell.edu/display/tassel/manual>
- 15- Ghavami F, Elias EM, Mamidi S, Ansari O, Sargolzaei M, Adhikari T, et al. Mixed model association mapping for Fusarium head blight resistance in Tunisian-derived durum wheat populations. *G3 (Bethesda)*. 2011;1(3):209-18.
- 16- Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh Bi I, Yamasaki M, Doebley JF, et al. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet*. 2006;38(2):203-8.
- 17- Thornsberry JM, Goodman MM, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D, Buckler ES. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nat Genet*. 2001;28(3):286-9.
- 18- Kraakman ATW, Martínez F, Mussiraliev B, Van Eeuwijk FA, Niks RE. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Mol Breed*. 2006;17(1):41-58.
- 19- Breseghello F, Sorrells M. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*. 2006;172(2):1165-77.
- 20- Darvishzadeh R, Poormohammad Kiani S, Huguet T, Sarrafi A. Genetic variation and identification of molecular marker associated with partial resistance to *Phoma macdonaldii* in gamma-irradiation-induced mutants of sunflower. *Can J Plant Pathol*. 2008;30(1):106-14.
- 21- Davar R, Darvishzadeh R, Rezaee Danesh Y, Kholghi M, Azizi M, Shah DA. Single sequence repeat markers associated with partial resistance in sunflower to *Phoma macdonaldii*. *Phytopathol Mediterr*. 2012;51(3):541-8.
- 22- Saeed A, Darvishzadeh R, Basirnia A. Simple sequence repeat markers associated with agromorphological traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Zemdirb (Agric)*. 2013;100(4):433-40.
- 23- Yan J, Shan T, Warburton ML, Buckler ES, McMullen MD, Crouch J. Genetic characterization and linkage

## نتیجه‌گیری

صفات در توده‌های ریحان تنوع گسترده‌ای دارند و بین اکثریت آنها همبستگی مثبت وجود دارد. وراثت‌پذیری صفات بین ۳/۶۳ تا ۹۴/۲۴٪ و دامنه تغییرات فنوتیپی توجیه‌شده بین ۳ الی ۲۹٪ متغیر است. بیشترین تعداد برای صفات قطر ساقه و کمترین برای تعداد شاخه جانبی می‌باشد. از بین مکان‌های شناسایی‌شده، شش مکان به‌طور اختصاصی فقط با یک صفت پیوسته و سایر مکان‌ها بین صفات مشترک هستند. میزان تنوع فنوتیپی از ۱۷٪ تا ۲۹٪ متغیر است.

**تشکر و قدردانی:** از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه به‌دلیل فراهم‌نمودن امکانات لازم برای انجام پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

**تأییدیه اخلاقی:** بدین وسیله نگارندگان مقاله تایید می‌نمایند در ایده، طراحی، اجرا، تجزیه و تحلیل و نگارش مقاله با یکدیگر همکاری داشته‌اند و اعلام می‌دارند مقاله حاضر برداشت مستقیم از نوشته‌های چاپ‌شده یا در حال چاپ تحقیقات دیگر نمی‌باشد.

**تعارض منافع:** هیچ گونه تعارض منافی بین نویسندگان مقاله وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** زهرا آقاعلی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری (۳۰٪)؛ رضا درویش‌زاده (نویسنده دوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ محمد آقایی (نویسنده سوم)، پژوهشگر اصلی (۳۰٪)

**منابع مالی:** منابع مالی پژوهش حاضر توسط دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تامین شده است.

## منابع

- 1- Marotti M, Piccaglia R, Giovanelli E. Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *J Agric Food Chem*. 1996;44(12):3926-9.
- 2- Prakash V. Leafy spices. Boca Raton: CRC Press; 1990.
- 3- Aghaei M, Hasani A, Darvishzadeh R. Study on phenotypic variation of total phenol and antioxidant capacity among Iranian basil (*Ocimum basilicum* L.) landraces. *Iran J Med Aromat Plants*. 2014;30(2):283-91. [Persian]
- 4- Grayer RJ, Bryan SE, Veitch NC, Gldstone FJ, Paton A, Wollenweber E. External flavones in sweet basil, *Ocimum basilicum*, and related taxa. *Phytochemistry*. 1996;43(5):1041-7.
- 5- Moghaddam M, Omidbeygi R, Salimi A, Naghavi MR. An Assessment of genetic diversity among Iranian populations of Basil (*Ocimum* spp.) using morphological traits. *Iran J Horticult Sci*. 2014;44(3):227-43. [Persian]
- 6- Zaccardelli M, Gnocchi S, Carelli M, Scotti C. Variation among and within Italian alfalfa ecotypes by means of bioagronomic characters and amplified fragment length polymorphism analyses. *Plant Breeding*. 2008;122(1):61-5.
- 7- Li Q, Liu QC, Zhai H, Ma DF, Wang X, Li XQ, et al. Genetic diversity in main parents of sweet potato in china as revealed by ISSR markers. *Acta Agron Sin*. 2008;34(6):972-7.
- 8- Virk PS, Ford-Lloyd BV, Jackson MT, Pooni HS, Clemeno TP, Newbury HJ. Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. In: Khush

- Determination of drought tolerant genotypes in Brassica napus L. based on drought tolerance indices. *Electron J Crop Prod.* 2011;3(4):107-24. [Persian]
- 38- Fazeli F, Cheghamirza K. Genetic variation in Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L. kabuli type) based on agronomic traits and RAPD marker. *Seed Plant Improv J.* 2011;27(4):555-79. [Persian]
- 39- Taran B, Zhang C, Warkentin T, Tullu A, Vandenberg A. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome.* 2005;48(2):257-72.
- 40- Terzopoulos PJ, Bebeli PJ. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Res.* 2008;108(1):39-44.
- 41- Iruela M, Rubio J, Cubero JI, Gil J, Millán T. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theor Appl Genet.* 2002;104(4):643-51.
- 42- Selvaraj MG, Narayana M, Schubert AM, Ayers JL, Baring MR, Burrow MD. Identification of QTLs for pod and kernel traits in cultivated peanut by bulked segregant analysis. *Electron J Biotechnol.* 2009;12(2):1-10.
- 43- Rady MR, Nazif NM. Rosmarinic acid content and RAPD analysis of in vitro regenerated basil (*Ocimum americanum*) plants. *Fitoterapia.* 2005;76(6):525-33.
- 44- Beiki AH, Abbaspour N, Mozafari J. Genetic diversity of cultivated and wild crocus genus in Iran with ISSR markers. *J Cell Mol Res (Iran J Biol).* 2013;26(2):164-73. [Persian]
- 45- Abdollahi Mandoulakani B, Azizi H. Identification of ISSR markers associated with morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations. *J Cell Mol Res (Iran J Biol).* 2014;27(2):260-8. [Persian]
- 46- Ivandic V, Hackett CA, Nevo E, Keith R, Thomas WT, Forster BP. Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: Associations with ecology, geography and flowering time. *Plant Mol Biol.* 2002;48(5-6):511-27.
- 47- Mohammadi R, Naghavi MR, Maali Amiri R, Rezaei M. Identification of informative markers of SSR in some of alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions from Iran. *Mod Genet.* 2010;5(2):57-66. [Persian]
- 48- Rashidi Monfared S, Mardi M, Hosein Zadeh AH, Naghavi MR. Relationship analysis of important agronomic traits and SSAP retrotransposon markers in durum wheat samples. *Mod Genet.* 2008;3(2):29-35. [Persian]
- 49- Abdollahi Mandoulakani B, Alami A, Esfahani M. Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. *Iran J Crop Sci.* 2011;12(4):510-9. [Persian]
- disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. *PLoS ONE.* 2009;4(12):e8451.
- 24- D'hoop BB, Paulo MJ, Mank RA, Van Eck HJ, Van Eeuwijk FA. Association mapping of quality traits in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica.* 2008;161(1-2):47-60.
- 25- Jun TH, Van K, Kim MY, Lee SH, Walker DR. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica.* 2008;162(2):179-91.
- 26- De Masi L, Siviero P, Esposito C, Castaldo D, Siano F, Laratta B. Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *Eur Food Res Technol.* 2006;223:273.
- 27- Jaccard P. *New research on the flower distribution.* Moulins: Imprimeries Réunies; 1908. [French]
- 28- Pritchard JK, Stephanes M, Rosenberg NA, Donnelly P. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet.* 2000;67(1):170-81.
- 29- Spataro G, Tiranti B, Arcaleni P, Bellucci E, Attene G, Papa R, et al. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor Appl Genet.* 2011;122(7):1281-91.
- 30- Kruskal WH, Allen Wallis W. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc.* 1952;47(260):583-621.
- 31- Siahshar BA, Taleei AR, Peighambari SA, Naghavi MR. Mapping of forage quality-related genomic locations of barley under drought stress condition. *Iran J Field Crop Sci.* 2010;40(4):35-45. [Persian]
- 32- Naroui Rad MR, Allah Do M, Ghasemi A, Fanaei HR. Investigation of genetic diversity and broad sense heritability in watermelon accessions of Sistan. *Iran J Hortic Sci.* 2010;40(4):95-103. [Persian]
- 33- Stansfield WD. *Schaum's outline of theory and problems of genetics.* 3<sup>rd</sup> Edition. New York: McGraw-Hill; 1991. p. 459.
- 34- Panthee DR, Kc RB, Regmi HN, Subedi PP, Bhattarai S, Dhakal J. Diversity analysis of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm available in Nepal based on morphological characters. *Genet Resour Crop Evol.* 2006;53(1):205-12.
- 35- Lotti C, Marcotrigiano AR, De Giovanni C, Resta P, Ricciardi A, Zonno V, et al. Univariate and multivariate analysis performed on bio-agronomical traits of *Cucumis melo* L. germplasm. *Genet Resour Crop Evol.* 2008;55(4):511-22.
- 36- Eyvaz Nezhad Hafez N, Darvishzadeh R, Bernousi I, Moghadam M. Study on seed morphological diversity in sunflower recombinant inbred lines using multivariate analysis. *Biotechnol Tarbiat Modares Univ.* 2014;5(2):21-8. [Persian]
- 37- Kakaee M, Zebarjadi AR, Mostafaei A, Rezaee Zad A.