

## «مقاله پژوهشی»

## بررسی ارتباط ارزیابی تنوع مورفولوژیک و مولکولی در ژنوتیپ‌های گلرنگ

محمد صالح شاهوردی<sup>۱</sup>، محمد محسن زاده گلفزانی<sup>۲\*</sup>، حبیب ا... سمیع زاده لاهیجی<sup>۳</sup>

۱. کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳. استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۷)

## Investigating the relationship between morphological and molecular diversity in safflower genotypes

Mohammad Saleh Shahvardi<sup>1</sup>, Mohammad Mohsenzadeh Golfazani<sup>2\*</sup>, Habibollah Samizadeh<sup>3</sup>

1. M.Sc., Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

(Received: May 27, 2022 - Accepted: Sep. 17, 2022)

## Abstract

This experiment was conducted in order to assess genetic variation and determination of the best genetic structure and the grouping of safflower genotypes using ISSR and retrotransposon markers and different agricultural traits. In this study, 28 safflower genotypes were evaluated using 7 ISSR markers, 3 retrotransposon markers and 12 combined ISSR and retrotransposon markers, as well as eight different morphological traits with different statistical methods. From 22 primers, 117 polymorphic bands were created. The primers, primer-of UBC-827 and TOS-1 with 13 band maximum number of bands, and primer UBC-811 and UBC-822 in combination with 5-band TOS-1 with the lowest band for ISSR primers and Retrotransposons. The average percent polymorphism obtained in this study for markers ISSR, Retrotransposons and primer combinations was from 38.46 to 88.88 percent ISSR and Retrotransposons is variable and the mean percentage of polymorphic for this is equal to 62. High standards of straw gene diversity, Shannon index, the PIC and the number of effective allele primer UBC-810, UBC-811 and primer combination TOS-2 + HB-12, TOS-1 + HB12 and TOS-1+ UBC822 show performance Primers on the assessment of genetic diversity in this article. The morphological traits of 28 genotypes by UPGMA and Euclidean distance criteria were divided into 4 groups. Grouping results of cluster analysis by linear discriminant analysis using Fisher's focal 82.1 percent for morphological traits were confirmed. Principal component analysis showed that the main vectors of the first and second respectively are 8.22 and 6.84 and the 10 first components validated 63.47 percent of total variance. Mantel test the relationship between molecular and morphological data matrix equivalent 0.214 that show little correlation between the two data. Overall, the results showed that there is a considerable genetic variation in safflower germplasm that can be used to select parents and desirable genotypes in safflower breeding programs.

**Keywords:** Cluster analysis, ISSR, Principal component, Retrotransposons.

## چکیده

این آزمایش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گلرنگ با استفاده از نشانگرهای ISSR و رتروترانسپوزون و صفات زراعی در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گیلان و موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام شد. تعداد ۲۸ ژنوتیپ گلرنگ با استفاده از ۷ نشانگر ISSR، سه نشانگر رتروترانسپوزون و ۱۲ نشانگر ترکیبی ISSR و رتروترانسپوزون، و همچنین تعداد هشت صفت مختلف مورفولوژی با روش‌های مختلف آماری ارزیابی شد. از ۲۲ آغازگر ۱۱۷ نوار چند شکل ایجاد شد. از بین آغازگرها، آغازگرهای UBC827 و TOS1 با تعداد ۱۳ نوار بیش‌ترین تعداد نوار و آغازگرهای UBC811 و UBC822 ترکیبی با TOS1 با تعداد پنج نوار کمترین تعداد نوار را برای آغازگرهای ISSR و رتروترانسپوزون نشان داد. درصد چندشکلی به دست آمده برای نشانگرهای ISSR، رتروترانسپوزون و آغازگرهای ترکیبی ISSR و رتروترانسپوزون از ۳۷/۴۶ تا ۸۸/۸۸ درصد متغیر بود و میانگین درصد چندشکلی برابر با ۶۲ درصد بدست آمد. بالا بودن معیارهای تنوع ژنی نی، شاخص شانون، میزان PIC و تعداد آلل مؤثر برای آغازگرهای UBC810، UBC811 و آغازگرهای ترکیبی TOS-2+HB-12، TOS-1+HB12 و TOS-1+UBC822 نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی در این تحقیق می‌باشد. در بررسی ژنوتیپ‌ها براساس صفات مورفولوژی به روش UPGMA و معیار فاصله اقلیدسی ۸۲/۱ ژنوتیپ در چهار گروه قرار گرفتند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تجزیه تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر با ۸۲/۱ درصد برای صفات مورفولوژی تأیید شد. تجزیه به مختصات اصلی در بررسی مولکولی نیز نشان داد که ۱۲ بردار اول در مجموع ۶۳/۴۷ درصد تنوع کل را توجیه کردند. آزمون متل ارتباط بین دو ماتریس داده مولکولی و مورفولوژی را ۰/۲۱۴ نشان داد که نشان‌دهنده‌ی ارتباط کم بین دو داده است. در مجموع نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای وجود دارد که می‌تواند جهت گزینش ژنوتیپ‌هایی مطلوب در برنامه‌های به نژادی گلرنگ مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تجزیه خوشه‌ای، رتروترانسپوزون، ISSR.

## مقدمه

گلرنگ با اسم علمی *Carthamus tinctorios* گیاهی دانه روغنی است که احتمالاً از نواحی ایران، ترکیه و هندوستان منشأ گرفته است، به طوری که کشور ما از لحاظ ذخایر ژنتیکی این گیاه، یکی از غنی‌ترین مناطق جهان به‌شمار می‌رود (Akbarzade (Lelekami et al., 2017; Zeinali, 1999) و با توجه به ویژگی‌های زراعی می‌توان به عنوان یک گیاه امیدوارکننده در مناطق خشک کشت شود (Janmohammadi et al., 2017). سطح زیر کشت گلرنگ در ایران بر اساس آخرین آمار در سال ۲۰۲۱ حدود ۳۷۰۳ هکتار و میزان تولید آن بیش از ۴۸۸۹ تن می‌باشد (FAO, 2021). دو گونه اکسیاکانتا و لاناتوس به‌طور وسیعی در ایران پراکنده شده‌اند و به صورت خودرو رشد می‌کنند، به همین خاطر با شرایط آب و هوایی کشور سازگار شده و به عنوان گیاهان بومی محسوب شده و برای اصلاح و بهبود برخی خصوصیات گونه زراعی از اهمیت بالایی برخوردارند (Akbarzade Lelekami et al., 2017). تنوع ژنتیکی عامل اصلی تکامل گونه‌ها به‌شمار می‌رود. درک و آگاهی از تنوع و شباهت ژنتیکی در درون افراد یا جمعیتها، برای استفاده مؤثر از منابع ژنتیکی در یک برنامه اصلاحی ضروری است (Safavi et al., 2010). بهبود ژنتیکی هر موجود وابسته به وجود و وسعت تنوع ژنتیکی آن است. تنوع ژنتیکی نقش بسیار مهمی را در اصلاح نباتات ایفا می‌کند، زیرا دورگ‌های حاصل از لاین‌های دارای تنوع ژنتیکی بیشتر، هتروزیس بیشتری را نسبت به نژادهای نزدیک به هم نشان می‌دهند (Patel, 1990). در روش‌های به‌نژادی کلاسیک، گزینش والدین برای تلاقی بر اساس صفات مورفولوژیکی ممکن است از کارایی زیادی برخوردار نباشد، چنانچه بتوان انتخاب ژنوتیپ‌ها را از طریق نشانگرهای DNA انجام داد، کارایی گزینش والدین افزایش قابل ملاحظه‌ای خواهد داشت (Ghorbanzadeh

(Neghab & Afzal, 2015). نشانگر مولکولی ISSR از سال ۱۹۹۴ موردتوجه قرار گرفت. آغازگرهای این نشانگر نیمه اختیاری بوده و تکثیر آن به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حضور یک آغازگر مکمل با یک توالی ریزماهواره در ژنوم تکثیر می‌شود (Bornet & Branchard, 2001). نشانگر ISSR به DNA الگوی کمی نیاز دارد و به دلیل طول زیاد آغازگر، سرعت و سادگی فنی و رفتار مندلی ابزاری با ارزش برای بررسی تنوع ژنتیکی محسوب می‌گردد (Ammiraju et al., 2001). رتروترانسپوزن‌ها یا به عبارتی ترانسپوزن‌هایی که توسط RNA حد واسط منتقل می‌شوند شامل دسته‌ای از عناصر متحرک می‌باشند که ابتدا از روی توالی DNA آن‌ها RNA ساخته می‌شود و سپس به کمک آنزیم رونوشت بردار معکوس از روی RNA، DNA قابل انتقال به مکان جدید تولید می‌شود. این عناصر ژنتیکی متحرک به مقدار فراوانی در ژنوم گیاهان وجود دارند و نقش مهمی را در تکامل ژنوم گیاهان ایفا می‌کنند (Rashidi Monfard et al., 2009). Mahasi et al. (2009) به بررسی میزان چندشکلی ژنتیکی در بین ۳۶ گلرنگ از کشورهای مختلف، با استفاده از ۱۴ آغازگر RAPD پرداختند و ۶۱ نوار تشکیل شد که توسط تجزیه و تحلیل انجام شده نمونه‌های گیاهی به ۸ گروه تقسیم شدند. Roopa (2007) برای بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گلرنگ از ۲۱ نشانگر RAPD استفاده کردند که همه‌ی آن‌ها نوارهای چندشکل تولید کرده و میزان بالایی از چندشکلی را بین ژنوتیپ‌های زراعی و گونه‌های وحشی نشان داد. در مطالعه‌ای که Safavi et al. (2010) در ۲۰ نمونه گلرنگ با استفاده از نشانگر RAPD و نشانگر ISSR به ارزیابی ژنتیکی انجام دادند، گزارش کردند با توجه به درصد چندشکلی به‌دست‌آمده از نشانگرهای RAPD و ISSR، نشانگرهای ISSR سطوح بالاتری از چندشکلی را در مقایسه با نشانگرهای

برای ارزیابی‌های مورفولوژیک، ۲۸ ژنوتیپ گلرنگ در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۱۳۹۴ در مزرعه موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج کشت شدند. صفات مورد مطالعه در بررسی تنوع مورفولوژیکی شامل عملکرد در هکتار، وزن هزاردانه، تعداد قوزه در بوته، تعداد دانه در قوزه، وزن قوزه، تعداد روز تا شاخه‌دهی، تعداد شاخه فرعی و ارتفاع بوته بود. برای اندازه‌گیری عملکرد دانه، بوته‌های برداشت شده کاملاً خرد و دانه‌ها جدا شدند، سپس دانه‌های جدا شده و تمیز شده با ترازو توزین گردیدند. برای محاسبه اجزاء مختلف عملکرد شامل تعداد قوزه در بوته، تعداد دانه و همچنین صفات دیگر مانند تعداد شاخه فرعی، ارتفاع بوته از هر کرت بوته‌ها به‌طور تصادفی از سطح خاک جدا شد و سپس این بوته‌ها به آزمایشگاه بخش دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج منتقل شد و صفات ذکر شده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. برای محاسبه وزن هزاردانه از بذور بدست آمده، از بوته‌هایی که برای عملکرد برداشت شدند استفاده شد، بدین ترتیب که ابتدا مقداری بذر انتخاب شد، سپس بذور کاملاً تمیز شده و هزار عدد بذر توسط دستگاه بذرشمار شمارش گردید. سپس وزن هزاردانه توسط ترازو اندازه‌گیری شد.

به منظور تجزیه واریانس داده‌ها از نرم‌افزار SAS استفاده شد. به منظور محاسبه همبستگی بین صفات مورد مطالعه، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد. برای ژنوتیپ‌گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مشابه از نظر تمامی صفات اندازه‌گیری شده از روش تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. برای انجام تجزیه خوشه‌ای ابتدا داده‌ها استاندارد شده، سپس فاصله‌ی بین افراد با استفاده از روش فاصله‌ی اقلیدسی محاسبه شد. روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای شامل ادغام بر مبنای متوسط فاصله‌ی بین گروه‌ها (UPGMA)، ادغام بر اساس نزدیکترین همسایه‌ها (SL)، دورترین

RAPD نشان دادند. با توجه به اهمیت شناسایی و گروه‌بندی ژرم پلاسماها، در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۲۸ ژنوتیپ گلرنگ با استفاده از هفت آغازگر ISSR، ۳ آغازگر رتروترانسپوزن و ۱۲ آغازگر ترکیبی ISSR و رتروترانسپوزن مورد بررسی قرار گرفت که هدف از این بررسی گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گلرنگ و بررسی تنوع ژنتیکی گیاه گلرنگ با استفاده از نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیکی و از طرفی آغازگرهای که کارایی بالای در تمایز ژنوتیپ‌های گلرنگ مورد مطالعه در این تحقیق را داشتند جهت استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گلرنگ معرفی می‌گردد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه بذر ۲۸ ژنوتیپ گلرنگ از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد که پنج گروه متفاوت از ژنوتیپ‌های گلرنگ را در بر می‌گرفت و شامل هفت ژنوتیپ معرفی شده ایرانی، دو ژنوتیپ مکزیکی و سه توده محلی، سه ژنوتیپ حاصل از دورگ‌گیری و ۱۳ ژنوتیپ حاصل از جهش زایی بود (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات ژنوتیپ‌های گلرنگ مطالعه شده در این تحقیق

ردیف	ژنوتیپ	منشا	ردیف	ژنوتیپ	منشا
1	گل دشت	ایران	15	K.W.7	دورگ‌گیری
2	گل سفید	ایران	16	K.M.P.6	موتاسیون
3	گلمهر	ایران	17	K.M.P.69	موتاسیون
4	پدیده	ایران	18	K.M.P.22	موتاسیون
5	صفه	ایران	19	K.M.P.32	موتاسیون
6	Mec 14	مکزیکی	20	K.M.P.9	موتاسیون
7	Mec 284	مکزیکی	21	K.M.P.51	موتاسیون
8	اصفهان	توده محلی	22	K.M.P.20	موتاسیون
9	زرقان	توده محلی	23	K.M.P.4	موتاسیون
10	آذربایجان	توده محلی	24	K.M.S.2	موتاسیون
11	فرمان	ایران	25	K.M.S.36	موتاسیون
12	سینا	ایران	26	K.M.S.37	موتاسیون
13	K.W.5	دورگ‌گیری	27	K.M.S.13	موتاسیون
14	K.W.6	دورگ‌گیری	28	K.M.S.81	موتاسیون

تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری ریخته و در فریزر ۸۰- درجه سیلسیوس نگهداری شدند. برای استخراج DNA با استفاده از CTAB به روش Saghai Maroof (1994) انجام شد. برای تعیین کیفیت DNA از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. بدین منظور پنج میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. سپس عکس‌برداری نوارها با دستگاه ژل داگ (Bio Rad) انجام شد. برای تعیین دقیق غلظت DNA هر نمونه، از دستگاه اسپکتروفوتومتری (مدل Biophotometra, Plus Eppendorff) استفاده شد و غلظت DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر ارزیابی شد و مقدار جذب (OD) در طول موج‌های ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. هم‌چنین از نسبت OD 260/280 برای برآورد خلوص یا کیفیت DNA استفاده شد. به این ترتیب که کم بودن این نسبت نشان‌دهنده کیفیت نامناسب DNA و وجود آلودگی زیاد به ویژه پروتئین‌ها بوده و زیاد بودن نسبت فوق نشان‌دهنده کیفیت مناسب DNA استخراج شده می‌باشد. از آنجایی که نمونه‌های DNA ژنومی استخراج شده غلظت‌های متفاوتی داشتند، تمامی نمونه‌ها تا غلظت یکسانی رقیق شدند. رقیق سازی با توجه به نتایج اسپکتروفوتومتری تا غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق شدند تا تکثیر DNA نمونه‌های مختلف با توجه به مقادیر سایر مواد واکنش در مقادیر بهینه شده‌ای صورت گیرد. در این تحقیق از ۷ آغازگر ISSR و ۳ آغازگر رتروترانسپوزن، هم‌چنین ۱۲ آغازگر ترکیبی استفاده گردید (جدول ۲). واکنش PCR در حجم ۱۰ مایکرولیتر شامل ۳۰ تا ۴۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۱ میلی‌مول dNTP، ۰/۳ میلی‌مول آغازگر، ۱/۵ میلی‌مول MgCl<sub>2</sub>، بافر PCR 1X و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biometra انجام شد (Mohsenzadeh Golfazani et al., 2012b). چرخه حرارتی به صورت Touch down شامل

همسایه (CL) و حداقل واریانس وارد (Ward) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد. در نهایت از مقایسه‌ی کلیه روش‌ها، روش دورترین همسایه، با داده‌های استاندارد شده به علت عدم وجود حالت پله پله انتخاب گردید. برای آزمون صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای و برآورد میزان انتساب اشتباه ژنوتیپ‌ها به گروه‌ها از تجزیه تابع تشخیص استفاده شد. به این ترتیب که گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای و ژنوتیپ‌های موجود در هر گروه به عنوان گروه‌بندی اولیه در نظر گرفته شد و با استفاده از تجزیه تابع تشخیص به روش خطی فیشر، صحت گروه‌بندی اولیه مورد آزمون قرار گرفت. تجزیه تابع تشخیص با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد.

برای تحلیل و تفسیر ضرایب همبستگی بین صفات و شناسایی عامل‌های مشترک مؤثر بر صفات مورد مطالعه، تجزیه به عامل‌ها به روش مؤلفه‌های اصلی و چرخش وریماکس با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گردید. نام‌گذاری عامل‌ها با توجه به صفاتی که بیشترین ضریب عاملی را از نظر قدرمطلق دارا بودند، صورت گرفت. هم‌چنین با رسم نمودارهای پراکنش دوگانه<sup>۱</sup> براساس جفت عامل‌های به‌دست‌آمده، ژنوتیپ‌های‌های مورد مطالعه گروه‌بندی و ژنوتیپ‌های مناسب بر مبنای موقعیت قرارگیری آن‌ها در نمودار تعیین شدند.

برای ارزیابی مولکولی ژنوتیپ‌ها بذر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در گلخانه دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان در داخل لیوان‌های کاغذی کشت شد. برای تهیه نمونه‌های برگ و استخراج DNA از گیاهچه‌های جوان که به مرحله سه تا چهار برگگی حدود ۲۰-۳۰ روز پس از کاشت رسیده بودند استفاده شد و بعد از خرد شدن با ازت مایع و هاون چینی در

Mohsen zade *et al.*, 2012; Mohsenzadeh )  
Golfazani *et al.*, 2016; Samizade lahiji *et*  
*al.*, 2013). به منظور بررسی و تشخیص ارتباط بین  
دو دندروگرام تجزیه خوشه‌ای صفات مورفولوژیک و  
مولکولی از آزمون Mantel (1967) استفاده شد. در  
واقع آزمون منتل، همبستگی بین دو ماتریس  
تشابه‌ای را بررسی می‌کند که در رسم دندروگرام  
تجزیه خوشه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. این آزمون  
با نرم‌افزار Genstat نسخه ۱۲ انجام گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس براساس طرح بلوک  
کاملاً تصادفی نشان داد تفاوت معنی‌دار در سطح  
احتمال یک درصد در بین ۸ صفت اندازه‌گیری شده  
برای ۲۸ می‌باشد، که خود دلیلی بر تنوع بالای بین  
ژنوتیپ‌ها و انتخاب ژنوتیپ مناسب می‌باشد.

حداقل، حداکثر و دامنه تغییرات صفات مورد  
مطالعه در جدول ۳ ارائه شده است. به‌عنوان نمونه  
صفت عملکرد دارای حداقل ۱۲ و حداکثر ۳۴، دامنه  
تغییرات ۲۲، صفت ارتفاع دارای حداقل ۱۴۲/۱ و  
حداکثر ۱۹۹/۶ و دامنه تغییرات ۵۷/۵ بود. دامنه  
تغییرات تنها تفاوت بین حداقل و حداکثر داده‌ها را  
نشان می‌دهد و مقدار عددی سایر مشاهدات و یا  
فراوانی داده‌ها را مدنظر قرار نمی‌دهد و نمی‌تواند به  
عنوان یکی از معیارهای مهم تنوع و پراکندگی  
داده‌ها به شمار آید، اما به دلیل اینکه هدف از مطالعه  
جمعیت‌های ژنتیکی مقایسه ژنوتیپ‌ها از نظر میزان  
تفاوت‌های موجود می‌باشد، به این ترتیب می‌توان از  
دامنه تغییرات داده‌ها برای مقایسه اولیه بین  
ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه استفاده نمود و یک دید کلی  
از میزان تفاوت‌های موجود پیدا کرد.

بررسی ضرایب تغییرات فنوتیپی صفات نشان  
داد که صفت تعداد غوزه (۳۱/۳۴)، عملکرد  
(۲۵/۴۴) و تعداد شاخه فرعی (۲۵/۴۲) بالاترین

بخش اول ۲ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در  $94^{\circ}\text{C}$ .  
بخش دوم ۱۰ سیکل بصورت ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی  
در  $94^{\circ}\text{C}$ ، ۴۵ ثانیه مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵  
درجه بالاتر از  $T_m$  (بسته به آغازگر متفاوت بود)، که  
طی ۱۰ سیکل در هر سیکل نیم درجه کمتر می‌شود،  
۲ دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد  
بخش سوم ۲۶ سیکل بصورت ۳۰ ثانیه  
واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه  
مرحله اتصال آغازگر در دمای  $T_m$ ، ۲ دقیقه مرحله  
بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه بسط  
انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، سپس  
نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود.  
فرآورده‌های حاصل از نشانگرهای ISSR و رترو  
ترانسپوزان روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند  
و از یکدیگر تفکیک شدند و برای رنگ آمیزی نیز از  
ماده سیف استین استفاده شد. الکتروفورز با جریان  
برق ۹۵ ولت و بسته به نوع و خصوصیات آغازگرهای  
مورد مطالعه به مدت ۶۰ تا ۱۲۰ دقیقه انجام شد و  
پس از رنگ آمیزی در زیر نور UV از DNA  
ژنومی عکس‌برداری شد. الگوی نواری بر اساس  
وجود یا عدم وجود نوارها به ترتیب با یک و صفر  
نمره‌دهی شدند. داده‌های حاصل به صورت یک  
ماتریس  $28 \times 117$  وارد نرم افزار Excel شد که در  
آن ۲۸ تعداد ژنوتیپ گلرنگ و ۱۱۷ تعداد نوار  
مشاهده شده بود. میزان چندشکلی نشانگر ۱ (PIC)،  
با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (Powell *et*  
*al.*, 1996)، در این فرمول،  $P_i$  فراوانی آلل یا نوار  
 $i$ ام و  $n$  تعداد آلل می‌باشد.

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 \quad (\text{رابطه ۱})$$

شاخص‌های تنوع شامل تعداد آلل مؤثر، شاخص  
شانون و تنوع ژنی نی با استفاده از نرم‌افزار  
POPGENE32 نسخه ۱/۳۱ محاسبه شد

دلیل این که این معیار تحت تأثیر واحد اندازه‌گیری صفت و یا دامنه تغییرات آن قرار نمی‌گیرد و از این نظر از معیارهای دیگر تنوع نظیر دامنه تغییرات اهمیت بیشتری دارد و می‌توان با اعتماد بیشتری گزینش‌های مطلوب را برای اصلاح صفاتی که ضریب تغییرات بالاتری دارند، انجام داد.

ضریب تغییرات فنوتیپی را دارا بود. بنابراین می‌توان از این ژنوتیپ‌ها در به نژادی استفاده نمود و گزینش‌های مؤثری در بین ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه جهت بهبود و اصلاح این صفات انجام داد. پارامتر ضریب تغییرات یکی از مهمترین و با ارزش‌ترین شاخص‌های برآورد تنوع در جمعیت‌ها بوده و به

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

ردیف	نام	دمای اتصال	تعداد نوار	تعداد نوار چند شکل	پلی‌مورفیسم %	توالی	
1	UBC 8736	43	8	5	62.5	(AC) <sub>8</sub> A	
2	UBC 827	50	13	10	76.9	(AC) <sub>8</sub> G	
3	UBC 834	48/5	9	4	44.4	(AC) <sub>8</sub> C	
ISSR	4	UBC 811	43	5	40	(GA) <sub>8</sub> C	
	5	UBC 810	41/5	6	50	(GA) <sub>8</sub> T	
	6	UBC822	43	8	4	(TC) <sub>8</sub> A	
	7	HB-12	40	8	4	(CAC) <sub>3</sub> GC	
8	TOS 1	60	13	5	38.46	TGTTGGGAATAGTCCCACA	
رتروترنسپوزن	9	TOS 2	45	9	88.88	TGTTGAATAGTCCACATT	
	10	TOS 3	40	10	70	TGTTAGAAGTATAATATGT	
11	UBC-8736+ UBC-834	43	9	8	88.88	(AC) <sub>8</sub> A+ (AC) <sub>8</sub> C	
12	UBC-8736+ UBC-808	45	12	9	75	(AC) <sub>8</sub> A+ (AG) <sub>8</sub> GC	
13	UBC-8736+ UBC-811	43	8	5	62.5	(AC) <sub>8</sub> A+ (GA) <sub>8</sub> C	
14	UBC-811+ UBC-834	45	8	4	50	(GA) <sub>8</sub> C+ (AC) <sub>8</sub> C	
15	UBC-811+ TOS-1	50	8	5	62.5	(GA) <sub>8</sub> C+ TGTTGGGAATAGTCCCACA	
ترکیبی	16	UBC-834+ TOS-1	55	10	6	60	(AC) <sub>8</sub> C+ TGTTGGGAATAGTCCCACA
	17	UBC-810+ TOS-1	50	6	5	83.33	(GA) <sub>8</sub> T+ TGTTGGGAATAGTCCCACA
	18	UBC-822+ TOS-1	48	5	3	60	(TC) <sub>8</sub> A+ TGTTGGGAATAGTCCCACA
	19	UBC-822+ TOS-3	40	7	4	57.14	(TC) <sub>8</sub> A+ TGTTAGAAGTATAATATGT
20	HB-12+ TOS-1	45	13	10	76.9	(CAC) <sub>3</sub> GC+ TGTTGGGAATAGTCCCACA	
21	HB-12+ TOS-2	40	6	3	50	(CAC) <sub>3</sub> GC+ TGTTGGGAATAGTCCCACA	
22	HB-12+ TOS-3	40	6	4	66.66	(CAC) <sub>3</sub> GC+ TGTTGGGAATAGTCCCACA	

جدول ۳. نتایج آمار توصیفی صفات اندازه‌گیری شده در ۲۸ ژنوتیپ گلرنگ مورد مطالعه

ردیف	صفت	دامنه تغییرات	حداقل	حداکثر	میانگین حسابی	انحراف معیار	ضریب تغییرات فنوتیپی (%)
۱	عملکرد (kg)	۲۲	۱۲	۳۴	۲۵/۲۷	۶/۴۳	۲۵/۴۴
۲	وزن ۱۰۰۰ دانه (g)	۱۷	۲۴	۴۱	۳۲/۰۷	۴/۱۳	۱۲/۸۷
۳	تعداد غوزه	۱۶/۵	۳/۵	۲۰	۱۱/۹۳	۳/۷۴	۳۱/۳۴
۴	تعداد دانه در غوزه	۲۲/۵	۱۷/۳	۳۹/۸	۳۰/۴۸	۵/۵۴	۱۷/۸۸
۵	وزن غوزه (g)	۱۹/۲	۱۲	۳۱/۲	۲۱/۴۷	۴/۵۸	۲۱/۳۳
۶	تعداد روز تا شاخه‌دهی	۳۹/۶	۲۱/۳	۶۰/۹	۴۰/۸۱	۷/۸۴	۱۹/۲۱
۷	تعداد شاخه فرعی	۹/۷	۴	۱۳/۷	۸۰/۹۳	۲/۲۷	۲۵/۴۲
۸	ارتفاع بوته (cm)	۵۷/۵	۱۴۲/۱	۱۹۹/۶	۱۶۹/۵۱	۱۵/۸۸	۹/۳۷

مختلف و شرایط محیطی متفاوت در ایجاد این جمعیت باشد. Singh *et al.* (1993) هشت والد و ۱۵ نتاج F1 خود را مورد مطالعه قرار داد و گزارش نمود که عملکرد دانه در بوته همبستگی مثبت و معنی داری با تعداد روز تا رسیدگی و ارتفاع بوته دارد. بنابراین، عملکرد هر بوته می‌تواند با انتخاب غیر مستقیم برای ارتفاع بوته، موقعیت شاخه و تاریخ گلدهی افزایش یابد. در این پژوهش نیز بین عملکرد و ارتفاع بوته همبستگی مثبت و معنی داری مشاهده شد و ممکن است این بدین معنی باشد که گیاهان با ارتفاع بالا عملکرد بیشتری نیز داشته‌اند. در ۱۸ ژنوتیپ مورد مطالعه توسط Khidir (1974) ارتباط منفی تعداد دانه در غوزه با وزن هزاردانه و ارتفاع بوته، که از نقطه نظر عملکرد دانه مهم هستند گزارش شده است.

بر اساس نتایج تجزیه عاملی، تعداد سه عامل اصلی و مستقل با مقادیر ویژه بیش از یک استخراج شدند (جدول ۵). این مؤلفه‌ها پس از چرخش وریماکس توانستند ۸۳/۹۳ درصد از تنوع کل داده‌ها را توجیه نمایند. میزان اشتراک یا واریانس مشترک عامل‌ها، بار عامل‌های دوران یافته، واریانس توجیهی هر عامل، واریانس تجمعی توجیه شده و ریشه مشخصه حاصل از تجزیه به عامل‌ها در جدول ۵ نشان داده شده است.

در برنامه‌های اصلاح نباتات، انتخاب بر اساس تعداد زیادی صفت زراعی صورت می‌گیرد که ممکن است بین آنها همبستگی مثبت یا منفی وجود داشته باشد. لذا روش‌های تجزیه و تحلیلی که بدون از بین بردن مقدار زیادی از اطلاعات مفید، تعداد صفات مؤثر بر عملکرد را کاهش دهد، برای پژوهشگران با ارزش می‌باشد.

وجود همبستگی بین زوج صفات، در کارهای اصلاحی بخصوص در امر گزینش براساس تعدادی از صفات بسیار ضروری می‌باشد. ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات عملکرد، وزن هزاردانه، تعداد غوزه، تعداد دانه در غوزه، وزن غوزه، تعداد روز تا شاخه‌دهی، تعداد شاخه فرعی، ارتفاع بوته، در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان داد که صفت عملکرد با صفات تعداد غوزه (۰/۸۵۲)، ارتفاع (۰/۸۴۳) و تعداد شاخه فرعی (۰/۸۴۱) دارای ضریب همبستگی مثبت و معنی‌دار است. نکته جالب پایین بودن همبستگی عملکرد با وزن هزاردانه (۰/۱۲۲) است، که با توجه به همبستگی مثبت و بالای بین وزن غوزه و تعداد دانه در غوزه (۰/۷۳۶) مشخص می‌شود که دانه‌ها در یک غوزه زیاد بوده ولی اندازه خیلی ریزی داشته‌اند.

Mallesappa *et al.* (2003) گزارش کردند که وزن هزاردانه اثر مثبت بر عملکرد دانه دارد و حجم و شاخه فرعی اثر منفی بر روی عملکرد دانه در گلرنگ دارد. با این حال در مطالعه حاضر بالعکس آن است. این ممکن است به دلیل دخالت گونه‌های

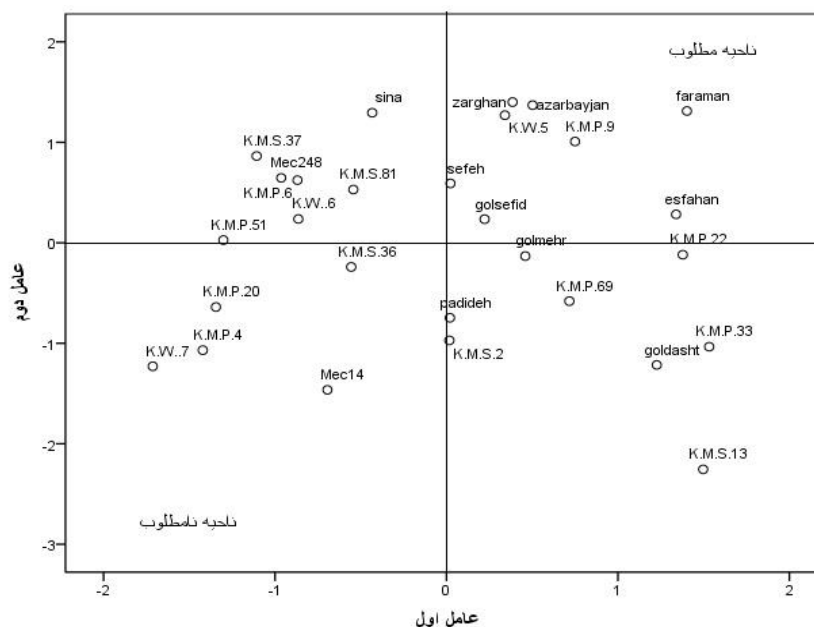
جدول ۴. ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مختلف در ژنوتیپ‌های گلرنگ مورد مطالعه

صفات	عملکرد	وزن هزاردانه	تعداد غوزه	تعداد دانه در غوزه	وزن غوزه	تعداد روز تا شاخه‌دهی	تعداد شاخه فرعی
وزن هزاردانه	۰/۱۲۲ <sup>ns</sup>	۱					
تعداد غوزه	۰/۸۵۲ <sup>**</sup>	۰/۱۱۷ <sup>ns</sup>	۱				
تعداد دانه در غوزه	۰/۱۴ <sup>ns</sup>	-۰/۵۳۰ <sup>**</sup>	۰/۲۴۰	۱			
وزن غوزه	۰/۰۰۹ <sup>ns</sup>	-۰/۲۷۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۹۹ <sup>ns</sup>	۰/۷۳۶ <sup>**</sup>	۱		
تعداد روز تا شاخه‌دهی	-۰/۳۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۹۰ <sup>ns</sup>	-۰/۳۸۲ <sup>*</sup>	۰/۱۳۵ <sup>ns</sup>	۰/۲۰۹ <sup>ns</sup>	۱	
تعداد شاخه فرعی	۰/۸۴۱ <sup>**</sup>	۰/۱۴۷ <sup>ns</sup>	۰/۷۳۳ <sup>**</sup>	۰/۱۴۲ <sup>ns</sup>	-۰/۴۲۶ <sup>*</sup>	۰/۴۲۶ <sup>*</sup>	۱
ارتفاع بوته	۰/۸۴۳ <sup>**</sup>	۰/۰۹۱ <sup>ns</sup>	۰/۷۱۸ <sup>**</sup>	۰/۰۸۲ <sup>ns</sup>	-۰/۰۷۲ <sup>ns</sup>	-۰/۳۸ <sup>*</sup>	۰/۷۳۳ <sup>**</sup>

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی‌داری.

جدول ۵. نتایج تجزیه به عامل‌ها برای کلیه صفات در ژنوتیپ‌های گلرنگ

ردیف	صفات اندازه‌گیری شده	عامل اول	عامل دوم	عامل سوم	میزان اشتراک
۱	عملکرد	۰/۹۵۶	۰/۰۴۳	۰/۰۱۰	۰/۹۱۶
۲	وزن هزاردانه	۰/۲۲۰	-۰/۵۴۱	۰/۷۱۴	۰/۸۵۱
۳	تعداد غوزه	۰/۹۰۴	۰/۱۲۲	-۰/۰۳۶	۰/۸۳۴
۴	دانه در غوزه	۰/۱۳۸	۰/۹۳۳	-۰/۱۳۱	۰/۹۰۷
۵	وزن غوزه	۰/۰۰۷	۰/۸۸۲	۰/۱۳۷	۰/۷۹۷
۶	تعداد روز تا شاخه‌دهی	-۰/۴۱۳	-۰/۳۱۴	۰/۷۲۵	۰/۷۹۵
۷	تعداد شاخه فرعی	۰/۹۰۱	-۰/۰۱۹	-۰/۰۸۷	۰/۸۲۰
۸	ارتفاع بوته	۰/۸۸۴	-۰/۰۴۳	-۰/۰۱۰	۰/۷۹۴
	درصد واریانس	۴۴/۵۴۲	۲۵/۷۴۷	۱۳/۶۳۷	
	درصد واریانس تجمعی	۴۴/۵۴۲	۷۰/۲۸۹	۸۳/۹۳۵	
	ریشه مشخصه	۳/۶۱۲	۲/۰۸۴	۱/۰۱۸	



شکل ۱. پراکنش ژنوتیپ‌های گلرنگ مورد مطالعه بر اساس عامل‌های اول (صفات عملکرد، تعداد غوزه، تعداد شاخه فرعی، ارتفاع بوته) و دوم (دانه در غوزه و وزن غوزه)

استخراج شده دارا بودند. به‌طور کلی در این ارزیابی، صفات با بالاترین ضرایب عاملی به عنوان ضرایب معنی‌دار و مؤثر در مدل در نظر گرفته شده‌اند. در عامل اول (عامل عملکرد و اجزای عملکرد) صفات عملکرد، تعداد غوزه، تعداد شاخه فرعی، ارتفاع بوته، ضرایب مثبت و بالایی را به خود اختصاص داده‌اند. ضرایب بالای صفات مذکور نشان می‌دهد که این صفات در این عامل دارای بالاترین میزان تنوع بوده و سایر

همانطور که مشاهده می‌شود که میزان اشتراک اکثر صفات بالاست که این امر نشان‌دهنده انتخاب مناسب تعداد عامل‌ها می‌باشد، زیرا میزان اشتراک در حقیقت قسمتی از واریانس یک متغیر است که به عامل‌های مشترک مرتبط می‌باشد و بالا بودن آن، دقت بالایی برآورد واریانس متغیر را نمایش می‌دهد.

صفات وزن غوزه و عملکرد صفاتی هستند که به ترتیب کمترین و بیشترین سهم را در عامل‌های

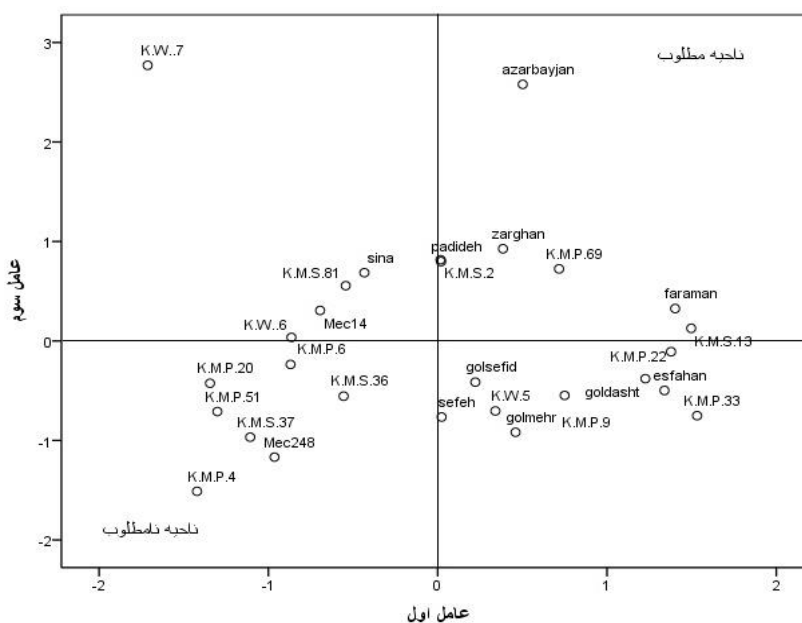


توجیه حدود ۵۸ درصد از تنوع کل در شکل ۲ نشان داده شده است. در این دیاگرام عامل سوم شامل صفات وزن هزاردانه و تعداد روز تا شاخه‌دهی که درجهت افزایش عملکرد هستند می‌باشد، در نتیجه در این دیاگرام نیز ناحیه اول ناحیه مطلوب می‌باشد و ناحیه نامطلوب ناحیه چهارم است. ملاحظه می‌گردد که در آن ژنوتیپ‌های فرامان و K.M.S13، از نظر عامل اول بیشترین مقدار را داراست، اما از نظر عامل سوم زیاد مطلوب نمی‌باشد. پس از آن ژنوتیپ‌های زرقان و K.M.P69 نظر عامل اول و عامل سوم مقدار مثبتی را دارند. ژنوتیپ K.W7 با اینکه از لحاظ عامل سوم از بالاترین میزان برخوردار است، اما در ناحیه دوم از لحاظ عامل اول مقدار منفی را به خود اختصاص داد. از آنجایی که در تجزیه عامل‌ها، عوامل پنهانی مستقل از یکدیگرند، بنابراین می‌توان صفات مختلفی را که تحت تأثیر عوامل مختلف قرار دارند به‌طور هم‌زمان بهبود بخشید و در بهبود عملکرد قدمی مؤثر برداشت. بر اساس نتایج این پژوهش با انتخاب ژنوتیپ‌های ناحیه مطلوب و تلاقی آنها می‌توان به ژنوتیپ‌های ایده‌آل جهت رسیدن به ژنوتیپ با عملکرد مناسب نزدیک شد، ولی نتایج تجزیه به عامل‌ها در این تحقیق تنها ایده‌آی کلی را می‌دهد و نیاز به آزمایش‌های بیشتری هست (Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2012a).

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها به روش متوسط فاصله بین کلاستر (UPGMA) با معیار فاصله اقلیدوسی بهترین نتیجه را در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه ارائه داد، لذا تنها نتایج این روش گزارش گردید (شکل ۳). با برش دندروگرام در ناحیه ۱۵، چهارگروه ایجاد گردید که به ترتیب ۸، ۷، ۱۲ و ۱ ژنوتیپ را شامل می‌شد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها تا حدی با منشأ جغرافیای آن‌ها هم‌خوانی داشت. به‌نحوی که ژنوتیپ‌ها Mec14 و Mec248 که منشأ مکزیک دارند در گروه سوم قرار گرفتند، همچنین اکثر ژنوتیپ‌ها حاصل از جهش در گروه سوم قرار گرفتند.

صفات دارای تنوع کمتری هستند. بنابراین انتخاب جهت بهبود یا افزایش این صفات در این عامل کارآیی دارد. عامل دوم (عامل غوزه) با ضرایب مثبت و معنی‌دار صفات دانه در غوزه و وزن غوزه، را به خود اختصاص داد. در این عامل صفات مذکور دارای بالاترین میزان تنوع بوده و گزینش ژنوتیپ‌ها براساس آن‌ها می‌تواند مفید واقع شود. باید توجه داشت که هر گونه اقدام در جهت افزایش این عامل به دلیل همبستگی صفات دخیل در آن با عملکرد منجر به تأثیر بر عملکرد خواهد شد. در عامل سوم (عامل وزن دانه و تعداد روز تا شاخه‌دهی) صفات وزن هزاردانه و تعداد روز تا شاخه‌دهی دارای ضرایب مثبت و معنی‌دار بودند. تجزیه به عامل‌ها، علاوه بر تفسیر ضرایب همبستگی و گروه‌بندی صفات در قالب عامل‌های مشترک، به‌منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گلرنگ‌های مورد بررسی استفاده گردید، به این ترتیب که ابتدا مقادیر عددی هر یک از مؤلفه‌های اصلی حاصل از روش تجزیه به عامل‌ها در هر یک از ۲۸ ژنوتیپ گلرنگ مورد بررسی، برآورد گردید و سپس با رسم نمودار پراکنش بر مبنای دو به دو این مؤلفه‌ها، موقعیت هر ژنوتیپ در محور مختصات دو بعدی به دست آمد. شکل ۱ پراکنش دوگانه بر اساس عامل‌های اول و دوم را نشان می‌دهد که ۷۰ درصد از تنوع کل را توجیه می‌کند. در این دیاگرام پراکنش ناحیه اول، ناحیه مطلوب تشخیص داده شد، چون در ناحیه اول هر دو عامل اول و دوم مثبت هستند و باعث افزایش عملکرد می‌شوند. ژنوتیپ فرامان که یک ژنوتیپ مناسب شرایط دیم است از نظر هر دو عامل دارای بیشترین مقدار نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بود، بعد از آن ژنوتیپ‌های اصفهان و K.M.P22 از لحاظ عامل اول و ژنوتیپ‌های آذربایجان و زرقان از لحاظ عامل دوم بیشترین مقدار مثبت را به خود اختصاص دادند و همچنین در ناحیه مطلوب قرار گرفتند.

نتایج دیاگرام پراکنش عامل اول و عامل سوم با



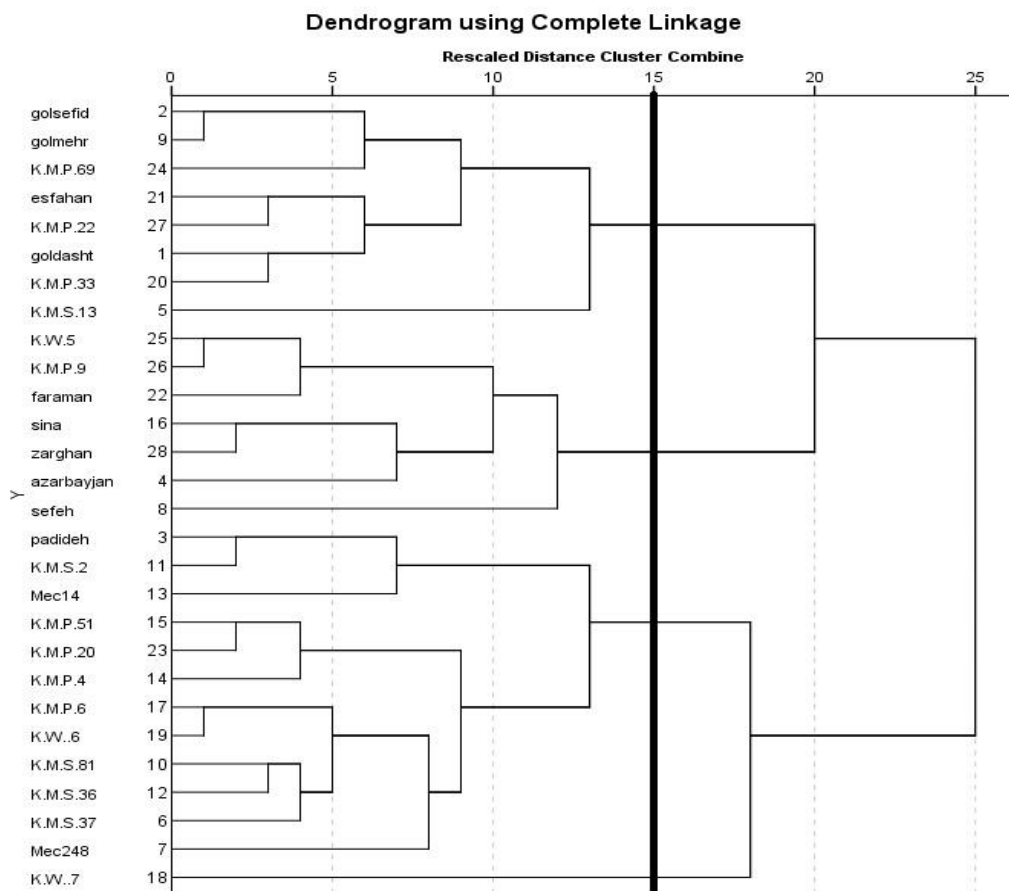
شکل ۲. پراکنش ژنوتیپ‌های گلرنگ مورد مطالعه بر اساس عامل‌های اول (صفات عملکرد، تعداد غوزه، تعداد شاخه فرعی، ارتفاع بوته) و سوم (صفات صفات وزن هزاردانه و تعداد روز تا شاخه‌دهی)

جدول ۶. میانگین و انحراف میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای از میانگین کل صفات در گیاه گلرنگ

گروه	عملکرد	وزن هزاردانه	تعداد غوزه	تعداد دانه در غوزه	وزن غوزه	تعداد روز تا شاخه‌دهی	تعداد شاخه فرعی	ارتفاع بوته
۱	۳۱۴/۲	۳۳/۳	۱۵/۹	۲۸/۶۲	۱۸/۸۵	۳۴/۸۳	۱۰/۴۹	۱۸۵/۰۷
انحراف از میانگین گروه	۱۹۳/۳	۳	۱/۹	۴/۴۵	۲/۸	۵/۹۴	۱/۶۵	۷/۵
۲	۲۸۴۹	۳۰/۷	۱۳/۲	۳۵/۹۸	۲۶/۱۱	۴۴/۲	۹/۸۷	۱۷۵/۶
انحراف از میانگین گروه	۳۴۹/۶	۳/۷	۱/۷	۱/۰۴	۴/۶۹	۶/۶۸	۱/۰۸	۱۰/۸۱
۳	۲۰۸۴	۳۰/۸	۸/۹	۲۹/۱۶	۲۰/۶۵	۴۱/۵	۷/۹۱	۱۵۹/۷
انحراف از میانگین گروه	۳۹۱/۴	۳/۶	۱/۵	۴/۰۴	۲/۸۲	۴/۰۲	۱/۲۶	۱۲/۳۵
۴	۱۲۶۷/۵	۴۰/۷	۷	۲۲/۴	۱۷/۶	۵۸/۱	۵/۱۱	۱۴۹/۶
انحراف از میانگین گروه	۱۷۰/۶۱	۹/۰۴	۴۰/۹	۲۱/۴	۳۰/۷۴	۱۱/۹۵	۳۱/۹	۲۴۴۸/۴
میانگین								

به‌عنوان والدین تلاقی جهت اصلاح اجزای عملکرد، همچنین تعداد غوزه از طریق تلاقی در گروه‌های دیگر و تولید هیبرید مناسب اقدام نمود. درخوشه دوم بیشترین تعداد دانه در غوزه و وزن غوزه و کم‌ترین وزن هزاردانه مربوط به ژنوتیپ این گروه بود. همه صفات به جز وزن هزاردانه در این گروه در سطح بالاتر از میانگین کل ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه قرار داشتند. در خوشه سوم، به غیر از صفت تعداد روز تا شاخه‌دهی همه صفات در سطح پایین‌تر از میانگین کل ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه قرار داشتند.

بررسی گروه‌های حاصل نشان داد که ژنوتیپ‌های گروه اول بیشترین عملکرد، تعداد غوزه، ارتفاع بوته و تعداد شاخه فرعی و کمترین شاخص تعداد روز تا شاخه‌دهی را دارا بودند (جدول ۶). صفات تعداد دانه در غوزه، وزن غوزه و تعداد روز تا شاخه‌دهی، در سطح پایین‌تر از میانگین کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و از لحاظ سایر صفات، دارای ارزش‌های بالاتر بودند. ژنوتیپ‌های گروه اول در حقیقت جز مطلوب‌ترین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه محسوب می‌گردد. به طوری که بعضی از ژنوتیپ‌ها این گروه را می‌توان



شکل ۳. دندروگرام ترسیم شده براساس روش UPGMA و فاصله اقلیدوسی برای ۲۸ ژنوتیپ گلرنگ مورد مطالعه

دورگ‌گیری به‌شمار رود و صفات مطرح شده برای گروه‌ها به منظور تصمیم‌گیری در انتخاب والدین مفید می‌باشد. به این ترتیب برای اصلاح جمعیت می‌توان بعضی از ژنوتیپ‌های گروه اول، دوم و سوم را با یکی از ژنوتیپ‌های گروه چهارم تلاقی داد و دورگ‌های مورد نظر را ایجاد نمود. ضمن اینکه با تلاقی ژنوتیپ‌های گروه اول و سوم می‌توان به‌منظور بهبود و اصلاح صفات عملکرد، تعداد غوزه، وزن غوزه و تعداد دانه در غوزه در ژنوتیپ گروه چهارم اقدام نمود. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۸۲/۱ درصد بود (جدول ۷). برای این که نتیجه مورد آزمون قرار گیرد، از دو تابع کانونی اول و دوم استفاده شد و با رسم با دیاگرام پراکنش مجدداً ژنوتیپ‌های گروه‌بندی شدند.

در خوشه چهارم، بیشترین وزن هزاردانه و تعداد روز تا شاخه‌دهی و کم‌ترین عملکرد، تعداد غوزه، وزن غوزه، تعداد دانه در غوزه، تعداد شاخه فرعی و ارتفاع مربوط به ژنوتیپ‌های این گروه بود. صفات تعداد شاخه فرعی و وزن هزاردانه در سطح بالاتری از میانگین کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه قرار داشتند، اما از لحاظ سایر صفات مورد مطالعه دارای ارزش‌های پایین‌تری از میانگین کل ژنوتیپ‌ها بودند، بنابراین این گروه از لحاظ عملکرد و اجزای آن جزو ژنوتیپ‌ها ضعیف در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به‌شمار می‌آیند، اما از نظر وزن هزاردانه، ژنوتیپ‌های این گروه بیشترین مقدار را دارا بودند و لذا می‌توان برای اصلاح وزن دانه از آن‌ها استفاده نمود. این تحقیقات می‌تواند پیش‌نیازی برای برنامه‌های

جدول ۷. نسبت موفقیت افراد درون گروه‌ها با تابع تشخیص

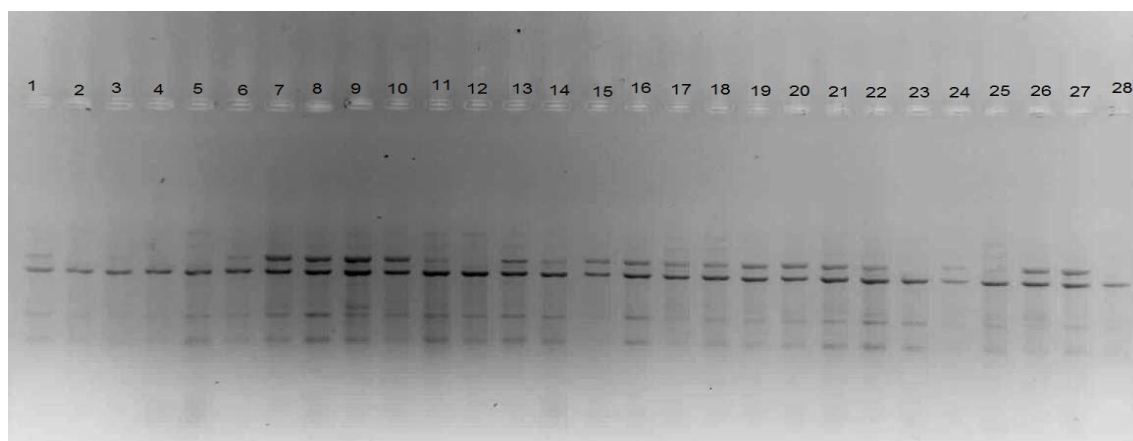
گروه‌ها و میزان صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در هر گروه با تجزیه تشخیص					
گروه	تعداد ژنوتیپ	۱	۲	۳	۴
۱	۸	۷	۱		
		%۸۷/۵	%۱۲/۵		
۲	۷	۱	۵	۱	
		%۱۴/۳	%۷۱/۴	%۱۴/۳	
۳	۱۲		۱	۱۱	
			%۸/۳	%۹۱/۷	
۴	۱				۱
					%۱۰۰
		صحت گروه‌بندی بندی			
		% ۸۲/۱			

کنیم، تجزیه خوشه‌ای توانایی گروه‌بندی افراد دارد (Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2016).

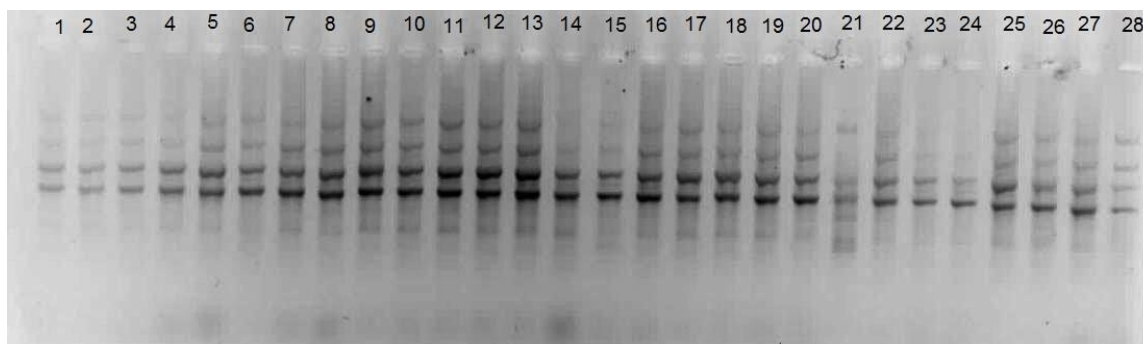
در این پژوهش از ۱۲ نشانگر ISSR و ۳ نشانگر رتروترانسپوزون استفاده شد، از مجموع نشانگرهای استفاده شده در بین ۲۸ ژنوتیپ ۱۸۶ نوار تشکیل شد که از بین آنها ۱۱۷ نوار چندشکل بودند (شکل‌های ۴ و ۵). میانگین تعداد نوارهای چندشکل به ازای هر نشانگر معادل ۵/۳ نوار بود (جدول ۲).

از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای UBC827 و TOS1 با تعداد ۱۳ نوار بیشترین تعداد نوار و آغازگرهای UBC811 و UBC822 ترکیبی با TOS1 با تعداد پنج نوار کمترین تعداد را داشتند (جدول ۲). با توجه به اینکه اکثریت نشانگرها چندشکل بودند، توانستند به خوبی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را نشان دهند و قادر به تفکیک ژنوتیپ‌ها از هم بودند. ارزیابی ژنتیکی و روابط درون گونه گلرنگ زراعی براساس نواحی بین توالی‌های تکراری ساده (ISSR) توسط یانگ و همکاران تجزیه و تحلیل شد. در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی میان ۴۸ نمونه گلرنگ جمع‌آوری شده از ۳۲ کشور مختلف با استفاده از ۳۰ آغازگر ISSR، تعداد ۲۲ آغازگر چندشکلی نشان دادند (Yang *et al.*, 2007).

بررسی و مقایسه ژنوتیپ‌های موجود در گروه‌های تجزیه خوشه‌ای و ژنوتیپ‌های که در دیگرام پراکنش تجزیه به عامل‌ها طبقه‌بندی شدند، این گروه‌بندی را تأیید می‌نماید. ژنوتیپ‌های K.M.P9، K.W5، فرامان، زرقان، آذربایجان و صفه موجود در ناحیه مطلوب (ناحیه اول) دیگرام پراکنش دوگانه بر اساس عامل‌های اول و دوم که ژنوتیپ‌های مطلوبی از نظر عملکرد و صفات اقتصادی می‌باشند. ژنوتیپ‌های گل سفید، گل مهر، گل دشت، اصفهان، K.M.P22، K.M.P33، K.M.P69 و K.M.S13 در گروه اول تجزیه خوشه‌ای قرار گرفتند ولی در دو ناحیه اول و چهارم دیگرام پراکنش دوگانه، پخش شدند. می‌توان گفت در تجزیه عاملی چون گروه‌بندی فقط بر اساس دو مؤلفه که برخی صفات را دارا می‌باشد و در تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی با همه صفات انجام می‌گردد این دو گروه ژنوتیپ‌ها در تجزیه به عامل‌ها، در تجزیه خوشه‌ای در کنار هم قرار گرفته‌اند اما در تجزیه به عامل‌ها در گروه جداگانه قرار گرفتند. اگر هدف گروه‌بندی افراد بر اساس صفات مورد نظر باشد، می‌توان از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده نمود؛ اما اگر بخواهیم تنوع بین افراد را با در نظر گرفتن کلیه صفات بررسی



شکل ۴. الگوی نواری ایجاد شده در ژنوتیپ‌های گلرنگ با استفاده از نشانگر TOS-3



شکل ۵. الگوی نواری ایجاد شده در ژنوتیپ‌های گلرنگ با استفاده از نشانگر UBC822

۱/۸۲ بدست آمد و از ۱/۶۲ تا ۱/۹۸ متغیر بود (جدول ۷). بیشترین تعداد آلل مؤثر به ترتیب مربوط به نشانگر UBC811 و ترکیبی HB12 با TOS2 در بین کل ژنوتیپ‌ها بود. از آنجایی که یکی از معیارهای مهم در انتخاب نشانگرهای مناسب و سودمند، تعداد آلل‌های مؤثر است (Zhu *et al.*, 1998)، می‌توان از این نشانگرها برای مطالعات بعدی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گلرنگ استفاده کرد. یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی می‌باشد (Nei, 1972). برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی از ۰/۳۸۱۵ تا ۰/۴۹۵۵ در بین ژنوتیپ‌ها متغیر بود (جدول ۸). نشانگرهای UBC811 و ترکیبی HB12 با TOS2 به ترتیب بیشترین تنوع ژنی را نشان دادند و نشانگر UBC810 کمترین

میزان اطلاعات چند شکل (PIC) معادل تنوع ژنتیکی بوده و قدرت تفکیک یک نشانگر را به واسطه تعداد آلل‌های چند شکل و فراوانی نسبی این آلل‌ها در جمعیت تحت مطالعه نشان می‌دهد (Senior *et al.*, 1998). محتوای اطلاعات چندشکل به تفکیک برای هر یک از نشانگرهای مورد مطالعه محاسبه و نتایج مربوطه در جدول ۷ ارائه شد. محتوای اطلاعات چندشکل در این تحقیق برای نشانگرهای مورد استفاده در بین ژنوتیپ‌ها از ۰/۳۱۷ تا ۰/۴۸۴ و میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۴۱ بود. بالاترین میزان PIC در آغازگر UBC810 و UBC827 به میزان ۰/۴۸ تعیین شد که نشان‌دهنده کارایی بالای این نشانگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق بود. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر در بین ژنوتیپ‌ها

جنوبی به ترتیب با تنوع کمتر از ۲۲ و ۳۲ درصد بر اساس شاخص تنوع ژنتیکی شانون قرار گرفتند. فاصله ژنتیکی بین دو موجود به منزله تفاوت قابل توجهی بین آن دو موجود با استفاده از تنوع آلی است. به عبارت دیگر، فاصله ژنتیکی بیانگر میزان تفاوت‌های ژنی بین جمعیت‌ها یا گونه‌هاست که با استفاده از برخی کمیت‌های عددی قابل اندازه‌گیری می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر از همین نویسندگان گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس رتبه‌دهی صفر و یک انجام شد و گزارش شد میزان تشابه بین ژنوتیپ‌ها براساس ضریب تطابق ساده بین ۳۷ درصد تا ۷۴ درصد متغیر بود و ضریب کوفتیک ۸۰ درصد به دست آمد و اعلام شد، بیش‌ترین شباهت بین ژنوتیپ‌های K.M.S 13 و صفه (۰/۷۴)، K.M.S 2 و K.M.S 36 (۰/۷۱) بود و پس از آن‌ها ژنوتیپ‌های MEC 14 و K.M.P 4 (۰/۷)، بیش‌ترین تشابه را داشتند. همچنین ژنوتیپ‌های K.W 7 و گل سفید (۰/۳۷)، K.M.S 2 و K.M.P 69 (۰/۴۲)، صفه و K.M.P 69 (۰/۴۳)، K.M.P 20 و K.W 7 (۰/۴۳)، کمترین شباهت را داشتند (Shahverdei et al., 2022).

میزان تنوع ژنی را نشان داد. میانگین تنوع ژنی در بین ژنوتیپ‌ها ۰/۴۴ بود. شاخص شانون بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌هاست (Shannon, 1948). در این تحقیق میانگین ضریب شانون در بین ژنوتیپ‌ها ۰/۶۳ بود که نشان‌دهنده تنوع تقریباً متوسط در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است (جدول ۷). آغازگر UBC811 دارای بیشترین شاخص شانون بود، که نشان‌دهنده این است که آغازگر فوق می‌تواند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کند و آغازگر TOS3 دارای کمترین شاخص شانون می‌باشد (جدول ۸).

نشانگرهای UBC811 و ترکیب نشانگری HB-12+ TOS-2 دارای بالاترین میزان برای تعداد آل مؤثر، تنوع ژنی، شاخص شانون در بین ژنوتیپ‌ها بودند. Ash et al. (2003) به بررسی تنوع ژنتیکی گلرنگ وحشی استرالیا با استفاده از نشانگر ISSR پرداختند. آنها در این مطالعه ۲۹ نمونه گلرنگ وحشی را توسط ۱۰۰ نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار دادند که ۷۰ آغازگر تنوع ژنتیکی نشان داد. ژنوتیپ‌های گلرنگ وحشی مورد مطالعه در دو گروه شمالی و

جدول ۸. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، تعداد آل مؤثر، شاخص شانون و تنوع ژنی در جایگاه ISSR و رتروترانسپوزن در ژنوتیپ‌های گلرنگ مورد مطالعه

ردیف	نام	تعداد آل مؤثر	نی	شانون	PIC
1	UBC 8736	1.95	0.48	0.68	0.34
2	UBC 827	1.71	0.41	0.6	0.48
3	UBC 834	1.89	0.47	0.66	0.43
4	UBC 811	1.98	0.49	0.69	0.4
5	UBC 810	1.63	0.38	0.57	0.48
6	UBC822	1.8	0.44	0.63	0.39
7	HB-12	1.87	0.46	0.66	0.37
8	TOS 1	1.87	0.46	0.66	0.44
9	TOS 2	1.83	0.45	0.65	0.38
10	TOS 3	1.68	0.38	0.56	0.32
11	UBC-8736+ UBC-834	1.86	0.46	0.65	0.38
12	UBC-8736+ UBC-808	1.77	0.42	0.61	0.45
13	UBC-8736+ UBC-811	1.87	0.42	0.61	0.43
14	UBC-811+ UBC-834	1.79	0.43	0.62	0.45
15	UBC-811+ TOS-1	1.89	0.47	0.66	0.43
16	UBC-834+ TOS-1	1.91	0.47	0.67	0.42
17	UBC-810+ TOS-1	1.8	0.44	0.63	0.43
18	UBC-822+ TOS-1	1.86	0.46	0.63	0.38
19	UBC-822+ TOS-3	1.89	0.47	0.66	0.46
20	HB-12+ TOS-1	1.84	0.45	0.64	0.45
21	HB-12+ TOS-2	1.96	0.49	0.68	0.33
22	HB-12+ TOS-3	1.79	0.44	0.63	0.37
	میانگین	1.82	0.44	0.63	0.41

در داده‌های مولکولی، در صورتی که دو یا سه بردار اول حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد از تغییرات مربوط به نشانگرها را توجیه نمایند، اگرچه از نظر آماری ممکن است برای نمایش گرافیکی مناسب نباشد، ولی از نظر ژنتیکی نشان‌دهنده نمونه‌برداری مطلوب نشانگرها از کل ژنوم می‌باشد. به عبارت دیگر، زمانی که تعداد صفات یا نوارها به تعداد کمی بردار کاهش یابد، نشانگرهای مورد استفاده به طور صحیح انتخاب نشده و تعداد محدودی از کروموزوم‌ها را تحت پوشش قرار می‌دهند و در نتیجه نمی‌توانند افراد را از همدیگر به خوبی جدا نمایند. اما اگر تعداد بردارها زیاد باشد، نشانگرهای مورد استفاده، کروموزوم‌های بیشتری را تحت پوشش قرار داده و نشانگر به خوبی تنوع ژنتیکی افراد را تعیین می‌نماید (Siahsar *et al.*, 2010). بنابراین در این پژوهش از آنجائیکه تعداد نوارها به تعداد زیادی مؤلفه کاهش یافته و ۱۲ مؤلفه اول توانستند ۶۳/۴۷ درصد از تنوع را توجیه کنند انتخاب آغازگرها به خوبی انجام گرفته است و این موضوع نشان داد که نشانگرهای ISSR و رتروترانسپوزون مورد مطالعه در قسمت‌های مختلف ژنوم گلرنگ پراکنده هستند و این بهترین حالت در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی است، به دلیل اینکه نشانگرهای مولکولی از کروموزوم‌های مختلف انتخاب شده و توزیع مناسب و یکنواخت در ژنوم گلرنگ دارد.

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش از ۱۴ ژنوتیپ که در گروه اول تجزیه خوشه‌ای حاصل از نشانگر مولکولی در کنار هم قرار گرفتند، شش وارسته در تجزیه خوشه‌ای حاصل از صفات مورفولوژیک در گروه سوم قرار گرفتند، همچنین از نه وارسته‌ای که در گروه دوم تجزیه خوشه‌ای در کنار هم قرار گرفتند، چهار وارسته در تجزیه خوشه‌ای حاصل از صفات مورفولوژیک در گروه سوم قرار گرفتند که می‌توان گفت گروه‌بندی

در بیان و تفسیر تنوع ژنتیکی بر اساس صفات کیفی، تجزیه به مختصات اصلی بسیار مورد استفاده بوده و با به کارگیری آن می‌توان الگوهای تنوع را به صورت چند بعدی نشان داد. همچنین این امکان را فراهم می‌کند تا بتوانیم ارتباط بین افراد را بیش‌تر و بهتر تفسیر نماییم (Khayam Nekouei *et al.*, 2010). در تجزیه به مختصات اصلی چنانچه تغییرات کمتری توسط مؤلفه‌های اصلی توجیه گردد، نشانگرها توزیع مناسب‌تری را در سطح ژنوم نشان خواهند داد. لذا جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی مناسب‌تر می‌باشند. پس این نتایج در راستای مطالعات ژنتیکی می‌توانند بیانگر نمونه‌برداری مطلوب‌تر آغازگرها از کل ژنوم باشند (Khouhani *et al.*, 2011). میزان واریانس نسبی هر بردار نشان‌دهنده اهمیت آن مؤلفه در واریانس کل می‌باشد و به صورت درصد بیان می‌گردد. در این پژوهش سه بردار اول توانستند مجموعاً ۲۱/۵۶ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. دو بردار اول مجموعاً ۱۵/۰۶ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند که سهم بردار اول ۸/۲۲ درصد و سهم بردار دوم ۶/۸۴ درصد بود (جدول ۹).

جدول ۹. مقدار ویژه، درصد واریانس و درصد تجمعی بردارهای اصلی ژنوتیپ‌های گلرنگ مورد مطالعه

مقادیر ویژه	درصد واریانس	درصد تجمعی واریانس	
۱/۱۳۷۹	۸/۲۲	۸/۲۲	۱
۰/۹۴۵۹	۶/۸۴	۱۵/۰۶	۲
۰/۸۹۹۶	۶/۵۰	۲۱/۵۶	۳
۰/۷۶۸۸	۵/۵۶	۲۷/۱۲	۴
۰/۷۶۱۱	۵/۵۰	۳۲/۶۲	۵
۰/۷۱۰۲	۵/۱۳	۳۷/۷۵	۶
۰/۶۷۱۲	۴/۸۵	۴۲/۶	۷
۰/۶۵۷۰	۴/۷۵	۴۷/۳۵	۸
۰/۶۱۹۲	۴/۴۸	۵۱/۸۳	۹
۰/۵۶۱۳	۴/۰۶	۵۵/۸۹	۱۰
۰/۵۳۸۷	۳/۸۹	۵۹/۷۸	۱۱
۰/۵۱۰۵	۳/۶۹	۶۳/۴۷	۱۲

توالی DNA گروه‌بندی می‌کند و این اختلاف به شرایط محیطی وابسته نیست و اختلاف ژنتیکی براساس نشانگر مورد استفاده است. از طرف دیگر تمامی ژنوم گیاه نیز تحت پوشش قرار نگرفته است تا اطلاعات مولکولی بسیار دقیقی استحصال گردد، لذا اینکه دو گروه‌بندی در تطابق با یکدیگر نباشند دور از انتظار نمی‌تواند باشد. بالاترین میزان PIC در آغازگر UBC810 و UBC827 و همچنین بالا بودن معیارهای تنوع ژنی نی، شاخص شانون و تعداد الل مؤثر برای آغازگرهای UBC811 و ترکیب نشانگری TOS-2+ HB-12 نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های گلرنگ در این تحقیق بود و می‌توان از این آغازگرها در بررسی تنوع ژنتیکی گلرنگ استفاده نمود. در انتها پیشنهاد می‌شود جهت افزایش اطمینان از نتایج به‌دست آمده و اظهار نظر جامع در رابطه با تنوع و فاصله ژنتیکی بین ارقام، علاوه بر نشانگر ISSR و رتروترانسپوزون توسط نشانگرهای مولکولی دیگر از جمله AFLP و SSR نیز انجام گیرد. همچنین لازم است تا تحقیقاتی وسیع‌تر در محیط‌های مختلف (چند سال و چند مکان) انجام شود تا اطمینان کامل از وجود، دقت و پایداری تنوع ژنتیکی مشاهده شده حاصل گردد.

حاصل از داده‌های مورفولوژی با گروه‌بندی حاصل داده‌های مولکولی هم‌خوانی چندانی ندارد. آزمون مثل نیز ارتباط بین دو ماتریس داده مولکولی و مورفولوژی را ۰/۲۱۴ نشان داد که نشان‌دهنده ارتباط کم بین دو داده است و این اختلاف دیده شده در واریته‌ها طبیعی می‌باشد که به‌طور کامل همدیگر را تأیید نکنند زیرا داده‌های مورفولوژی وابسته به محیط و شرایط اجرایی دارد و در شرایط مختلف محیطی ممکن است نتایج متفاوت نشان دهد که در مطالعات دیگر نیز به پایین بودن این ارتباط اشاره شده است (Amini *et al.*, 2008; Ghorbanzadeh & Neghab & Afzal, 2015; Khan *et al.*, 2009; Rahimi & Sharifnabi, 2017; Safavi *et al.*, 2010). گروه‌بندی بر اساس داده‌های مورفولوژی براساس پتانسیل‌های واریته می‌باشد و نشان می‌دهد در شرایط محیطی مشابه کدام واریته‌ها می‌تواند به‌طور مشابه خصوصیات مشابه از خود نشان دهد و در تحقیق حاضر نیز بررسی فقط در یک سال زراعی صورت گرفته و از طرف دیگر تمامی صفات موجود در گیاه نیز در این تحقیق در مطالعه استفاده شده‌اند، ولی نشانگرهای مولکولی اختلاف در ژنوم را نشان می‌دهد و اگر محقق تنوع ژنتیکی واریته‌ها را براساس نشانگر مولکولی انجام دهد آنها را براساس

## REFERENCES

- Akbarzade Lelekami, M., Pahlevani, M. H., Navabpour, S., & Zaynalinejad, K. (2017). Evaluation of Genetic Relationship and Identification of Specific Markers for Safflower and its Wild Relatives Existing in Iran. *Journal of Crop Breeding*, 8, 145-152. (In Farsi)
- Amini, F., Saeidi, G., & Arzani, A. (2008). Study of genetic diversity in safflower genotypes using agromorphological traits and RAPD markers. *Euphytica*, 163, 21-30.
- Ammiraju, J.S.S., Dholakia, B.B., Santra, D.K., Singh, H., Lagu, M.D., Tamhankar, S.A., Dhaliwal, H.S., Rao, V.S., Gupta, V.S., & Ranjekar, P.K. (2001). Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 726-732.
- Ash, G.J., Raman, R., & Crump, N. S. (2003). An investigation of genetic variation in *Carthamus lanatus* in New South Wales, Australia, using intersimple sequence repeats (ISSR) analysis. *Weed Research*, 43, 208-213.



- Bornet, B., & Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers, reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 209-215.
- FAO. (2021). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- Ghorbanzadeh Neghab, M., & Afzal, R. (2015). Evaluation of Genetic diversity of Iranian populations and foreign cultivars of safflower (*Carthamus tinctorios* L.) Using morphological traits and RAPD molecular markers. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 28, 94-106. (In Farsi)
- Janmohammadi, M., Mohamadi, N., Shekari, F., Abbasi, A., & Esmailpour, M. (2017). The effects of silicon and titanium on safflower (*Carthamus tinctorius* L.) growth under moisture deficit condition. *Acta Agriculturae Slovenica*, 109, 443-455.
- Khan, M.A., Sabine, V., Witzke-Ehbrecht, B. & Becker, H., (2009). Relationships among different geographical groups, agromorphology, fatty acid composition and RAPD marker diversity in safflower (*Carthamus tinctorius*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, 19-30.
- Khayam Nekouei, M., Jahantighi, R., Solouki, M., Mohammadi, R., & Emamjomeh, A. A. (2010). Study on genetic diversity of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) genotypes using AFLP marker. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 16, 351-360. (In Farsi)
- Khidir, M. O. (1974). Genetic variability and inter-relationship of some quantitative characters in safflower. *The Journal of Agricultural Science*, 83, 197-202.
- Khounani, Z., Naghavi, M.R., Omid, M., Sabokdast, M., & Talebi Kohyakh, E. (2011). Assessment of Genetic Diversity in the Landraces of *Ferula gummosa* from Iran Using AFLP Marker. *Journal of Medicinal Plants*, 10, 117-126.
- Mahasi, M.J., Wachira, F.N., Pathak, R.S., & Riungu, T.C. (2009). Genetic polymorphism in exotic safflower (*Carthamus tinctorios* L.) using RAPD markers. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1, 008-012.
- Malleshappa, SM, I Hiremath & Ravikumar, R. I. (2003). Negative associations between important quantitative traits in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Sesame and Safflower Newsletter*, 80-84.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, 209-220.
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Alami, A., Samizade lahiji, S., Shoayi deylami, M., & Talesh Sasani, S. (2012a). Grouping of flue-cured tobacco genotypes based on multivariate statistical analysis. *Iranian Society of Crops and Plant Breeding Sciences*, 14, 250-263. (In Farsi)
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Samizade lahiji, H., Alami, A., Shoayi deylami, M., & Talesh Sasani, S. (2012b). Study of Genetic Diversity of Flue-Cured Tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.) Genotypes using ISSR and Retrotransposon Markers. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 43, 371-380. (In Farsi)
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Mohammad, F., Hasani Kumleh, H., & Samizadeh Lahiji, H. (2016). Grouping of some canola genotypes in various drought stress treatment in Germination Stages based on multivariate statistical methods. *Iranian Journal of Seed Sciences and Research*, 3, 53-65.

- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106, 283-292.
- Patel, D. P. (1990). Genetic divergence in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, 3, 13-20.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
- Rahimi, P., & Sharifnabi, B. (2017). Searching for resistance to Fusarium root rot in safflower genotypes using pathogenicity test and AFLP molecular markers. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 53, 197-210. (In Farsi)
- Rashidi Monfard, S., Hosseinzadeh, A. H., Naghavi, M. R., & Ebrahimi, A., (2009). Plant Retrotransposons. *Modern Genetics Journal*, 4, 5-15. (In Farsi)
- Roopa, V. K. (2007). Molecular and morphological diversity analysis in different *Carthamus* species, UAS, Dharwad.
- Safavi, A., Pourdard, S., Taeb, M., & Khosroshahli, M. (2010). Assessment of genetic variation among safflower (*Carthamus tinctorius* L.) accessions using agro-morphological traits and molecular markers. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8, 616-625.
- Saghai Maroof, M.A. (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley, species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 5466-5470.
- Samizadeh lahiji, H., Mohsenzadeh Golfazani, M., Edrisi Maryan, K., Shoaie Deilami, M., & Alami, A. (2013). Assessing the genetic diversity of 89 flue-cured tobacco varieties using morphological traits and inter-simple sequence repeat markers. *Crop Breeding Journal*, 3(2), 79-85.
- Senior, M.L., Murphy, J.P., Goodman, M.M., & Stuber, C.W. (1998). Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Science*, 38, 1088-1098.
- Shahverdei, M. S., Mohsenzadeh Golfazani, M. & Samizadeh Lahiji, H. (2022). Evaluation of the genetic diversity of some safflower (*Carthamus tinctorius*) cultivars by morphological characteristics. *Modern Genetics Journal*, 17, 359-363. (In Farsi)
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal*, 27, 379-423.
- Siahsar, B. A., Allah Doo, M., & Shamsavand Hasani, H. (2010). Evaluation of Genetic Diversity of *Triticum*, *Triticale* and *Wheat* Lines through RAPD and ISJ Markers. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 41, 555-568. (In Farsi)
- Singh, V., Dhembare, A. J., Deshpande, M. B., & Nimbkar, N. (1993). Variability and character association studies in safflower. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities*, 18, 483-483.
- Yang, Y. X., Wu, W., Zheng, Y. L., Chen, L., Liu, R. J., & Huang, C. Y. (2007). Genetic diversity and relationships among safflower (*Carthamus tinctorius* L.) analyzed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 1043-1051.
- Zeinali, E. (1999). Safflower (characteristics, production and utilization). *Gorgan University Press, Iran*, 137 pp. (In Farsi)
- Zhu, J., Gale, M.D., Quarrie, S., Jackson, M.T., & Bryan, G. J. (1998). AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 602-611.