

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

راضیه کسلخه<sup>۱</sup>، عیسی جرجانی<sup>۲\*</sup>، حسین صبوری<sup>۳</sup>، میثم حبیبی<sup>۴</sup>، علی ستاریان<sup>۵</sup>

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

### چکیده

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

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

مقدمه  
جنس تمشک (*Rubus L.*) به تیره Rosaceae و

زیرتیره Rosoideae تعلق دارد و شامل حدود ۷۵۰

\* eisa\_jorjani@yahoo.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه

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

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

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

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

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

جدول ۲- فهرست صفت‌های کیفی ریخت‌شناختی بررسی شده و کدگذاری حالت‌های صفتی

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

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

جدول ۳- فهرست و واحد اندازه‌گیری صفت‌های کمی استفاده‌شده در مطالعه ریخت‌شناختی

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

### استخراج DNA

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

DNA برگ‌ها به روش CTAB تغییر یافته (Saghai (Maroof *et al.*, 1994) استخراج شد؛ به این منظور، ابتدا برگ‌های نمونه برداری شده از هر نمونه به تفکیک و به کمک ازت مایع در هاون چینی به‌طور یکنواخت پودر شدند و سپس مقداری از پودر حاصل درون لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری (به میزان یک‌سوم حجم لوله) ریخته و تا زمان پودر شدن همه نمونه‌های برگگی در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مقدار

### تعیین کمیت و کیفیت DNA

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

### تجزیه و تحلیل‌های آماری

به منظور تجزیه و تحلیل آماری، نوارهای حاصل از تجزیه AFLP روی ژل به شکل داده‌های صفر و یک امتیازدهی شدند. محتوای اطلاعات ژنتیکی (PIC) از رابطه ۱ محاسبه شد. در این رابطه، PIC: PIC<sub>i</sub> نشانگر  $\lambda_m$ ،  $f_i$ : فراوانی قطعه نشانگر  $\lambda_m$  هنگام وجود داشتن نوار و  $(1-f_i)$ : فراوانی قطعه نشانگر  $\lambda_m$  در حالت وجود نداشتن نوار است (Roldain-Ruiz *et al.*, 2000).

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

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

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

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

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

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

### نتایج

### شناسایی نشانگرهای مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی

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

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

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

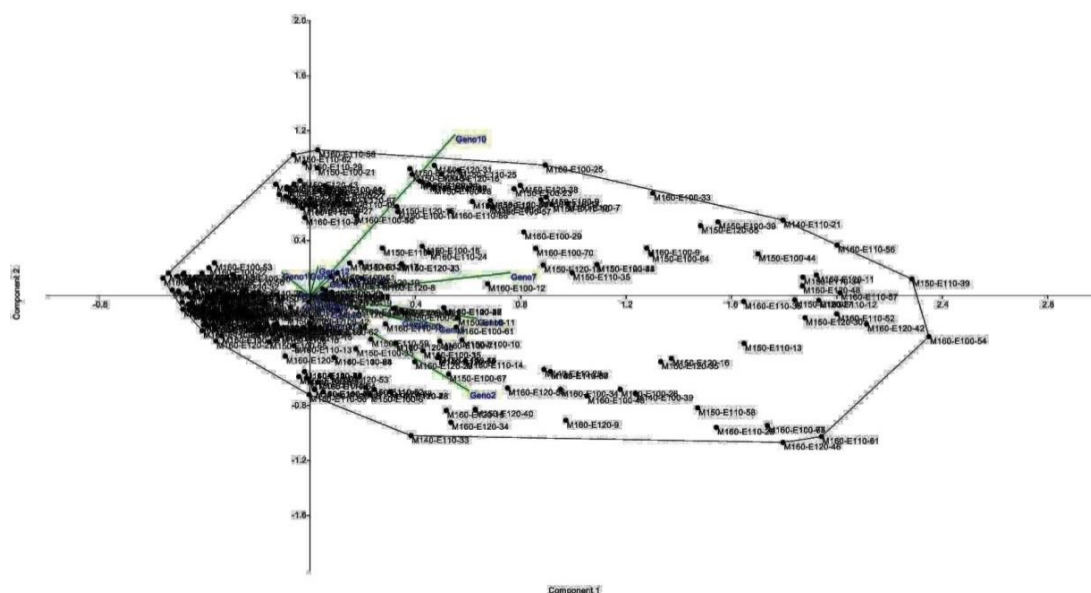
بیشترین میزان شاخص شانون و آغازگر M140-E110 با مقدار ۰/۱۶۰، کمترین میزان شاخص شانون را نشان داد. بیشترین میزان تنوع ژنتیکی با مقدار ۰/۲۰۳ در آغازگر M160-E110 و کمترین میزان تنوع ژنتیکی با

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



مقدار ۰/۰۷۶ در آغازگر M140-E110 مشاهده شد. بیشترین تعداد آلل مؤثر با مقدار ۱/۲۹۳ برای آغازگر M160-E110 و کمترین تعداد آلل مؤثر با مقدار ۱/۰۸۹ برای آغازگر M140-E110 به دست آمد. بیشترین میزان شاخص نشانگری با مقدار ۱۷/۰۴ در آغازگر M160-E110 مشاهده شد که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بیشتر این آغازگر نسبت به سایر آغازگراهاست و کمترین شاخص نشانگری با مقدار

۲/۳۹ به آغازگر M140-E100 مربوط بود (جدول ۴). شکل (۱)، نتایج تعیین آلل‌های تکثیر یافته تأثیرگذار و بحرانی را با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، نشانگرهای M140-E110، M150-E110، M160-E100، M160-E110 و M160-E120 جزو نشانگرهای بحرانی و تأثیرگذارند و نقش بسزایی در گروه‌بندی نشانگرها دارند.



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

### تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس جمعیت‌های مختلف

تجزیه بای پلات با استفاده از نتایج PCOA نشان داد جمعیت‌های 2 Pop (*R. discolor* زرین گل)، 7 Pop (*R. hyrcanus* خان‌بین بندرگز)، 10 Pop (*R. caesius* شیرآباد)، 11 Pop (*R. sanctus* دلند) و 19 Pop (*R. hyrcanus* شیرآباد) جزو جمعیت‌های بحرانی‌اند و نقش مهمی در گروه‌بندی جمعیت‌ها ایفا می‌کنند (شکل ۲).

### تجزیه به مختصات اصلی بر اساس نشانگرهای AFLP

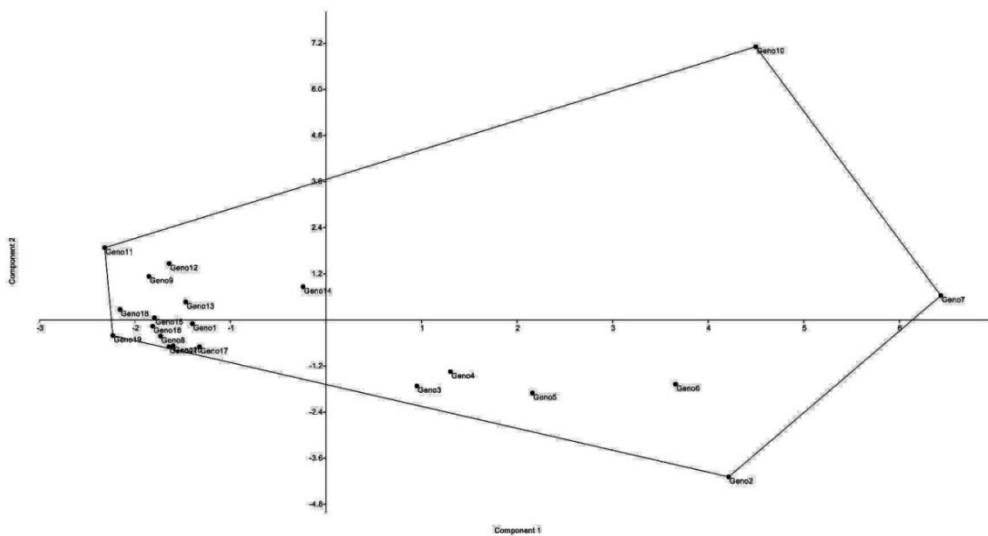
نتایج تجزیه به مختصات اصلی PCOA در جدول (۵) ارائه شده‌اند و نشان می‌دهند ۱۰ مؤلفه اول، ۶۹/۲۴ درصد از تغییرات را توجیه می‌کنند. مؤلفه اول، ۱۵/۹۵ درصد و مؤلفه دوم و سوم به ترتیب ۸/۲۴ و ۷/۱۵ درصد از تغییرات را توجیه می‌کنند.

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

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

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



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

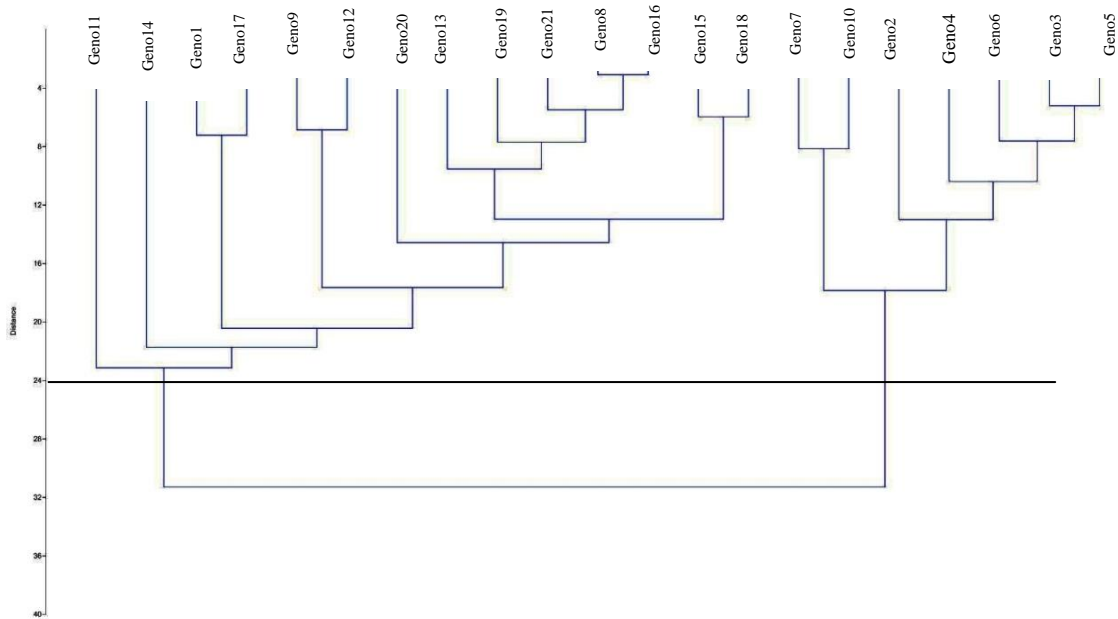
### تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها

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

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

بسیج در گروهی دیگر و پنج جمعیت *R. sanctus* ننگین شهر، *R. caesius* گز غربی ۱۰۰ متری و *R. hyrcanus* کبودوال ۱۶۰ متری، شیرآباد ۱۶۱ متری و کبودوال ۱۸۰ متری در گروه مجزایی قرار گرفته‌اند و *R. sanctus* وادیات سادات و شیرآباد نیز در یک خوشه قرار گرفته‌اند. در گروه دوم، دو گونه *R. caesius* ۹۵ متری و *R. hyrcanus* خان‌بین به شیرآباد در یک خوشه قرار گرفته‌اند و پنج جمعیت *R. discolor* زرین گل، *R. dolichocarpus* پارک ملی گلستان و *R. persicus* کردکوی و *R. caesius* زرین گل ۶۵۰ متری یک خوشه را تشکیل داده‌اند (شکل ۳).

شکل ۳- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های بررسی شده بر اساس نشانگرهای AFLP



شکل ۳- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های بررسی شده بر اساس نشانگرهای AFLP

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

### تجزیه و تحلیل ارتباط نشانگرهای AFLP با صفت‌های ریخت‌شناختی مطالعه شده

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



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

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

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

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

صفت	نشانهگر آگاهی بخش	ضریب رگرسیون	انحراف معیار	R <sup>2</sup> تجمعی	F	میانگین مربعات
	M140-E120-30	۱/۱۳۸	۰/۱۱۷	۰/۹۸۶	۱۷۰/۲۳۰**	۲۵/۷۶۱
	M150-E120-47	۰/۸۱۶	۰/۱۱۶	۰/۹۹۲	۲۱۷/۶۳۱**	۲۱/۵۸۸
	M150-E110-52	۰/۶۸۷	۰/۱۴۹	۰/۹۹۶	۳۴۲/۶۴۵**	۱۸/۵۸۳
	M140-E110-23	۰/۴۶۱	۰/۱۵۲	۰/۹۹۷	۴۴۱/۰۰۶**	۱۶/۲۸۶
	M160-E110-29	-۰/۲۹۶	۰/۱۰۱	۰/۹۹۹	۷۲۳/۹۶۶**	۱۴/۴۹۶
طول برگچه جانبی	M150-E110-59	۶/۹۱۶	۰/۱۱۶	۰/۶۶۸	۳۲/۱۷۸**	۸۰/۲۸۲
	M140-E120-3	۴/۰۰۸	۰/۰۷۷	۰/۸۴۰	۳۹/۴۲۹**	۵۰/۴۹۵
	M150-E100-30	۳/۶۵۷	۰/۰۹۰	۰/۹۲۱	۵۴/۳۸۳**	۳۶/۹۰۰
	M160-E110-58	-۰/۹۱۲	۰/۰۶۱	۰/۹۵۷	۷۲/۲۲۰**	۲۸/۷۵۶
	M160-E110-40	۱/۲۴۴	۰/۰۹۴	۰/۹۸۱	۱۲۱/۰۳۵**	۲۳/۵۷۳
	M160-E100-44	-۰/۸۰۵	۰/۰۸۶	۰/۹۹۱	۱۹۹/۷۷۶**	۱۹/۸۵۱
	M140-E110-19	۰/۵۳۸	۰/۰۸۶	۰/۹۹۶	۳۴۶/۶۸۰**	۱۷/۱۰۱
	M160-E100-31	-۰/۳۸۰	۰/۰۵۹	۰/۹۹۹	۷۷۶/۶۱۲**	۱۵/۰۰۳
	M160-E110-15	۰/۲۵۳	۰/۰۷۴	۰/۹۹۹	۱۵۱۶/۷۱۸**	۱۳/۳۴۸
عرض برگچه انتهایی	M150-E110-59	۱/۵۰۰	۰/۵۰۵	۰/۶۰۲	۲۴/۱۷۶**	۲۷/۷۲۹
	M150-E120-18	۲/۴۴۹	۰/۲۸۲	۰/۷۹۸	۲۹/۵۴۷**	۱۸/۳۷۶
	M160-E110-40	۱/۴۴۹	۰/۴۵۵	۰/۹۱۷	۵۱/۷۷۳**	۱۴/۰۹۰
	M140-E110-25	۲/۱۰۰	۰/۷۹۹	۰/۹۴۶	۵۶/۹۶۵**	۱۰/۸۹۸
عرض برگچه جانبی	M150-E110-59	۳/۷۰۶	۰/۰۷۴	۰/۵۵۲	۱۹/۶۸۸**	۱۶/۸۵۸
	M140-E100-24	۲/۷۹۳	۰/۰۷۵	۰/۸۰۸	۳۱/۴۶۱**	۱۲/۳۳۸
	M140-E120-16	۰/۹۶۸	۰/۰۶۷	۰/۹۱۲	۴۸/۲۳۵**	۹/۲۸۷
	M150-E110-12	۰/۶۳۴	۰/۰۵۵	۰/۹۵۴	۶۸/۰۲۴**	۷/۲۹۱
	M150-E120-47	۰/۵۳۳	۰/۰۷۷	۰/۹۷۳	۸۵/۹۷۴**	۵/۹۴۶
	M140-E120-30	۰/۶۰۷	۰/۰۷۴	۰/۹۸۹	۱۶۱/۱۹۶**	۵/۰۳۶
	M150-E110-22	۰/۳۸۵	۰/۰۶۹	۰/۹۹۷	۵۲۳/۵۰۱**	۴/۳۵۴
طول دمبرگچه جانبی	M150-E110-59	۴/۸۰۸	۰/۱۱۶	۰/۵۵۷	۲۰/۱۱۲**	۴۴/۴۱۱
	M160-E110-68	۳/۲۷۷	۰/۱۵۲	۰/۸۸۱	۵۵/۶۰۰**	۳۵/۱۳۲
	M160-E110-14	۱/۸۷۷	۰/۰۹۸	۰/۹۷۹	۲۱۷/۷۲۳**	۲۶/۰۲۳
طول دمبرگچه جانبی	M140-E110-43	۱/۶۷۰	۰/۲۰۷	۰/۹۹۷	۹۲۶/۰۷۴**	۱۹/۸۶۶
طول دمبرگچه انتهایی	M150-E110-59	۱۹/۸۶۸	۰/۲۳۷	۰/۷۲۴	۴۲/۰۰۳**	۷۹۳/۵۴۹
	M140-E100-24	۱۰/۱۷۶	۰/۲۳۶	۰/۸۵۵	۴۴/۳۰۹**	۴۶۸/۵۹۸
	M150-E120-43	۸/۹۴۳	۰/۳۲۵	۰/۹۴۷	۸۳/۱۶۵**	۳۴۵/۸۶۹



صفت	نشانهگر آگاهی بخش	ضریب رگرسیون	انحراف معیار	R <sup>2</sup> تجمعی	F	میانگین مربعات
	M160-E110-58	-۲/۸۲۲	۰/۱۸۴	۰/۹۷۲	۱۱۳/۹۰۵**	۲۶۶/۳۵۸
	M150-E100-57	-۳/۰۹۷	۰/۲۱۱	۰/۹۸۴	۱۵۰/۴۰۷**	۲۱۵/۷۲۴
	M150-E110-39	۲/۱۰۲	۰/۱۷۱	۰/۹۹۲	۲۱۵/۷۰۲**	۱۸۱/۰۹۹
	M160-E100-44	۱/۸۸۴	۰/۲۰۱	۰/۹۹۶	۳۳۸/۹۰۹**	۱۵۵/۸۹۰
	M160-E110-33	-۱/۵۰۲	۰/۲۸۴	۰/۹۹۹	۸۲۸/۱۷۹**	۱۳۶/۷۹۳
طول کاسبرگ	M150-E120-40	۰/۸۸۷	۰/۱۳۵	۰/۴۵۰	۱۳/۰۹۶**	۸/۷۱۹
	M160-E110-13	-۰/۹۵۳	۰/۱۵۵	۰/۶۲۹	۱۲/۷۳۵**	۶/۰۹۶
	M160-E110-66	۱/۲۸۶	۰/۱۲۹	۰/۷۵۳	۱۴/۲۱۲**	۴/۸۶۱
	M160-E110-57	-۰/۹۵۲	۰/۰۹۸	۰/۸۴۵	۱۷/۶۶۳**	۴/۰۹۰
	M150-E120-7	-۰/۹۸۶	۰/۱۵۸	۰/۹۱۸	۲۶/۹۴۵**	۳/۵۵۷
	M150-E110-52	۱/۱۰۳	۰/۱۸۸	۰/۹۸۰	۹۰/۶۸۸**	۳/۱۶۵
نسبت طول به عرض کاسبرگ	M150-E110-59	۰/۶۴۵	۰/۰۳۴	۰/۶۵۳	۳۰/۱۳۲**	۱/۵۲۳
	M160-E110-10	-۰/۵۰۲	۰/۰۲۶	۰/۷۵۳	۲۲/۸۵۹**	۰/۸۷۸
	M160-E100-53	-۰/۳۵۵	۰/۰۲۱	۰/۸۳۶	۲۳/۷۲۱**	۰/۶۵۰
	M160-E120-9	-۰/۲۹۶	۰/۰۱۸	۰/۹۳۱	۴۳/۶۶۷**	۰/۵۴۳
	M150-E120-35	۰/۱۸۱	۰/۰۳۴	۰/۹۷۲	۸۳/۴۳۹**	۰/۴۵۳
	M160-E110-63	۰/۲۲۵	۰/۰۳۲	۰/۹۹۰	۱۸۴/۱۷۸**	۰/۳۸۵
M160-E120-29	۰/۱۱۳	۰/۰۲۹	۰/۹۹۶	۳۷۰/۴۰۸**	۰/۳۳۲	
تعداد برچه	M150-E110-59	۱/۹۲۵	۰/۱۹۵	۰/۴۷۶	۱۴/۵۱۶**	۵/۸۴۰
	M150-E110-29	۱/۹۵۰	۰/۲۱۵	۰/۷۹۶	۲۹/۳۳۳**	۲۹/۳۳۳
	M160-E120-12	-۱/۰۵۰	۰/۲۱۵	۰/۹۲۵	۵۷/۲۷۵**	۵۷/۲۷۵
تعداد گل	M150-E100-35	۲۲/۵۸۱	۰/۲۷۷	۰/۶۰۷	۲۴/۷۳۴**	۷۸۴/۶۴۲
	M150-E120-18	۱۱/۸۷۴	۰/۲۴۶	۰/۷۳۰	۲۰/۳۰۵**	۴۷۱/۸۲۸
	M160-E110-53	۸/۶۸۹	۰/۲۴۵	۰/۸۷۲	۳۱/۸۷۵**	۳۷۵/۷۲۷
	M150-E100-31	۶/۶۰۴	۰/۲۴۴	۰/۹۳۰	۴۳/۱۱۸**	۳۰۰/۴۰۹
	M160-E100-31	۴/۸۱۴	۰/۲۳۶	۰/۹۶۶	۶۷/۹۹۹**	۲۴۹/۶۳۱
	M150-E120-17	۳/۲۴۸	۰/۲۷۰	۰/۹۸۷	۱۴۱/۹۰۷**	۲۱۲/۶۲۱
تعداد گل	M140-E100-39	۲/۴۳۳	۰/۲۱۷	۰/۹۹۶	۳۸۰/۸۱۳**	۱۸۳/۹۱۱
	M160-E110-33	۱/۷۶۴	۰/۳۶۴	۰/۹۹۹	۷۵۲/۴۷۷**	۱۶۱/۲۸۵
	M160-E100-44	۰/۸۶۴	۰/۲۵۵	۰/۹۹۹	۱۴۵۱/۸۶۵**	۱۴۳/۴۹۱
طول گل آذین	M150-E120-15	۱۰/۸۹۱	۰/۲۳۶	۰/۳۸۳	۹/۹۲۲**	۱۳۴/۲۶۲
	M160-E120-56	۵/۲۳۷	۰/۱۹۵	۰/۷۱۴	۱۸/۷۱۴**	۱۳۵/۲۰۷
	M150-E110-29	-۷/۹۰۹	۰/۳۵۶	۰/۸۷۳	۳۲/۱۹۴**	۱۰۲/۱۲۲

صفت	نشانه آگاهی بخش	ضریب رگرسیون	انحراف معیار	R <sup>2</sup> تجمعی	F	میانگین مربعات
	M150-E110-55	-۴/۷۰۸	۰/۳۱۵	۰/۹۲۷	۴۱/۰۳۹**	۸۱/۲۵۸
	M160-E100-62	۲/۸۸۲	۰/۲۸۳	۰/۹۶۶	۶۸/۹۷۰**	۶۷/۷۹۶
	M160-E100-28	۱/۲۶۲	۰/۲۰۹	۰/۹۸۳	۱۰۵/۹۲۵**	۵۷/۴۶۸
	M140-E100-31	-۲/۳۷۸	۰/۳۱۵	۰/۹۹۴	۲۴۷/۹۴۷**	۴۹/۸۲۳
	M150-E100-23	-۰/۷۶۳	۰/۱۹۵	۰/۹۹۸	۵۲۸/۹۹۲**	۴۳/۷۵۴
	M150-E110-46	۲۵/۸۷۷	۰/۵۱۸	۰/۴۶۱	۱۳/۶۸۶**	۷۳۳/۱۹۱
	M140-E120-31	۱۹/۴۶۳	۰/۴۳۵	۰/۸۳۸	۳۸/۸۹۱**	۶۶۶/۶۲۳
	M160-E100-71	-۷/۴۱۳	۰/۳۹۰	۰/۹۱۳	۴۹/۰۴۵**	۴۸۴/۰۶۰
طول دمگل	M160-E100-42	-۴/۱۴۰	۰/۳۷۰	۰/۹۵۸	۷۳/۲۳۵**	۳۸۰/۶۹۵
	M160-E120-10	-۶/۴۸۱	۰/۵۳۰	۰/۹۸۴	۱۴۷/۴۴۱**	۳۱۲/۹۷۷
	M150-E100-33	-۲/۴۸۸	۰/۴۹۰	۰/۹۹۳	۲۷۷/۰۴۴**	۲۶۳/۳۱۷
	M160-E100-61	۱/۸۲۳	۰/۴۱۶	۰/۹۹۸	۶۳۳/۱۶۳**	۲۲۶/۶۸۲

## بحث

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

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

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

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

## منابع

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

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

---

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