تبارشناسی برخی ارقام گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) به کمک ژن‌های کلروپلاستی و صفات مورفولوژیکی

سیده مریم صالحان[1] و فرهاد نظریان فیروزآبادی[2،*]

١- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد
٢- استاد، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

(تاریخ دریافت: ١٣٩٦/٠١/٢٢ – تاریخ پذیرش: ١٣٩٦/٠٥/٢٨)

چکیده

گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) یکی از مهمترین گیاهان شاخه بریده دنیاست. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام داوودی موجود در ایران برای موفقیت برنامه‌های به‌نژادی این گیاه ضروری است. از این‌رو، به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام گل داوودی موجود در ایران، ٣٠ رقم در قالب یک طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه کشت شدند. همزمان یک درخت تبارشناسی بر اساس توالی ژن *rpoC* برای تعدادی از ارقام داوودی ترسیم شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مورفولوژیکی نشان داد که بین ارقام از نظر تقریباً همه صفات اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طور کلی، ضریب تنوع فنوتیپی برای بیشتر صفات از ضریب تنوع ژنوتیپی بیشتر بود که نشان دهنده‌ی سهم بیشتر عوامل محیطی نسبت به عوامل ژنتیکی بود. صفات عرض برگ، طول دوره گلدهی، قطر نهنج، وزن خشک و وزن تر گل بیشترین وراثت‌پذیری را در بین صفات نشان دادند. بیشترین همبستگی ژنوتیپی مثبت و معنی‌داری مربوط به صفت عرض گلچه شعاعی با نسبت سطح برگ به عرض آن بود. بر اساس خوشه‌بندی وارد، ارقام داوودی به دو خوشه اصلی تقسیم‌بندی شدند که بیشترین تعداد در خوشه اول بودند. درخت تبارشناسی ارقام داوودی با استفاده از توالی ژن کلروپلاستی و با روش حداکثر درست نمایی (ML) نشان داد که ارقام داوودی ایرانی به گونه موریفولیوم تعلق دارند، این موضوع نشان می‌دهد که احتمالاً ارقام ایرانی از والدین یکسانی اصلاح شده‌اند. به‌علاوه، فاصله ژنتیکی بین ارقام داوودی از ٠/٤ تا ٢/٩ متغییر بود این موضوع نشان می‌دهد که به اندازه کافی تنوع ژنتیکی بین ارقام داوودی برای استفاده از ژرم‌پلاسم گل داوودی در برنامه‌های به‌نژادی این گیاه وجود دارد.

واژگان کلیدی: به‌نژادی، تنوع ژنتیکی، تیره آفتابگردان، کلروپلاست، گل داوودی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **nazarian.f@lu.ac.ir**

مقدمه

گل داوودی از نظر گیاه‌شناسی، گیاهی روز کوتاه از جنس *Chrysanthemum* متعلق به خانواده *Asteraceae* است. منشا گل داوودی شرق آسیا به ویژه کشور چین می‌باشد (Dole and Wilkins, 1999)، اما اکنون در همه‌ی جهان گسترش پیدا کرده است. از نظر اقتصادی و اهمیت، گل داوودی در صدر مهمترین گل‌های شاخه بریده جهان قرار دارد.

جنس گل داوودی دارای حدود ۷۵ گونه مختلف است که بر اساس آخرین مطالعات تبارشناسی از سه بخش *Chrysanthemum*، *Ajania* و *Arctantheum* تشکیل شده است (Ohashi and Yonekura, 2004). گل داوودی زینتی گیاهی دگرگشن با عدد پایه کروموزومی x=۹ (Kim *et al.*, 2009) است و به نظر می‌رسد که از طریق آمیزش‌های بین گونه‌ای اجداد وحشی موجود در چین تکامل پیدا کرده باشد (Shinoyama *et al.*, 2012). بیش از ۲۰۰۰۰ رقم گل داودی در جهان و حدود ۷۰۰۰ رقم آن در چین وجود دارد (Dole and Wilkins, 1999). برنامه‌های به‌نژادی گل داوودی روی ویژگی‌های مهم ازجمله ویژگی‌های تزئینی مثل رنگ گل، اندازه و شکل گل، کیفیت تولید و پاسخ به شرایط محیطی متمرکز شده است (Broertjes *et al.*, 1980).

تنوع ژنتیکی در گل داوودی در جریان هزاران سال رشد و نمو در طبیعت در این گیاه ایجاد شده است. برای بهره-برداری از این تنوع ژنتیکی، به‌نژادی سنتی مبتنی بر شناسای، انتخاب و آمیزش بین والدین مطلوب است. معرفی ارقام جدید فرآیندی طولانی و پیچیده است و کاملاً مبتنی بر وجود تنوع ژنتیکی جهت انتخاب والدین در برنامه‌های به‌نژادی است. از روش‌های متعددی برای آشکارسازی تنوع ژنتیکی در جوامع گیاهی استفاده می-شود. برای مثال، بررسی خصوصیات مورفولوژیک، فنولوژیک و زراعی از جمله اولین قدم‌ها برای بررسی اولیه ژرم‌پلاسم‌هاست و به عنوان اطلاعات پایه برای بهنژادگر در امر بررسی تنوع ژنتیکی دارای اهمیت ویژه‌ای است (نظریان فیروزآبادی، ۱۳۸۹). اگرچه استفاده از این صفات به دلیلی سادگی و هزینه کم اندازه گیری، از جمله اولین روش‌های بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌هاست، اما استفاده از این روش‌ها به دلیل زمان‌بر بودن اندازه‌گیری‌ها، تاثیرات معنی‌دار عوامل محیطی، اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط، اثرات اپیستازی و پلیوتروپی با چالش‌های متعددی مواجهه است (نظریان فیروزآبادی، ۱۳۸۹). در مقابل، نشانگرهای مولکولی به ویژه نشانگرهای DNA چنین مشکلاتی ندارند و به دلیل بررسی مستقیم ماده ژنتیکی از مزایایی بیشتری برخوردارند و قابل اعتمادتر هستند، زیرا اولین سطح بیان ژن را بررسی می‌کنند و دارای تنوع زیاد و پلی‌مورفیسم بالای می‌باشند. از نشانگرهای مولکولی DNA جهت تخمین تنوع ژنتیکی و نیز تشخیص ژرم‌پلاسم‌های جدید به منظور بهره‌مندی در برنامه‌های به‌نژادی گونه‌های گیاهی مختلف استفاده می‌شود (Panwar *et al.*, 2010) و از نظر هزینه، مقدار DNA مورد نیاز، سرعت آشکارسازی و درجه چند شکلی از تفاوت‌های منحصر به فردی برخوردار هستند (Garcia *et al.*, 2004). نشانگرهای کلروپلاستی از نشانگرهاDNA کارآمد و دقیق هستند. ترتیب حفظ شده‌ی ژن‌های کلروپلاستی، عدم وجود بیش از یک نوع ژنوم در اندامک‌های یک فرد، فقدان نوترکیبی در ژنوم کلروپلاستی و در اختیار بودن توالی بسیاری از ژن‌ها سبب شده است که از ژنوم کلروپلاست به طور گسترده برای مطالعات تبارشناسی استفاده شود (Provan *et al.*, 2001).

آنزیم RNA پلی‌مراز یا به اختصار RNAP، یک آنزیم چند زیرواحدی با منشاء باکتریایی در گیاهان است که شامل یک هسته *rpo* پیچیده‌ی دارای فعالیت آنزیمی کاتالیزوری به همراه یک عامل سیگما برای شناسایی پروموتر است (Ishihama, 2000). با این حال، در جریان همزیستی طی میلیون‌ها سال، همه ژن‌های فاکتور سیگما پروتئین کلروپلاستی به ژنوم هسته سلول منتقل شده‌اند، در حالی که ژن‌های کد کننده‌ی زیر واحدهای اصلی مرکزی یعنی؛

ژن‌های *rpoA*، *rpoB*، *rpoC1* و *rpoC2* توسط ژنوم کلروپلاست کد می‌شوند (Yagi and Shiina, 2014). نواحی کدکننده‌ی این ژن‌ها ارزش مولکولی بالایی جهت بررسی‌های تبارشناسی در گیاهان دارند، از این‌رو از آن‌ها می‌توان در مطالعات تبارشناسی تا سطح زیر خانواده‌ها استفاده کرد (Gielly and Taberlet, 1994). برای مثال، از توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژن‌های *rpo* مربوط به DNA کلروپلاستی به دلیل ثبات و حفظ شدگی بالا برای ترسیم درخت‌های تبار شناسی در گونه‌های مختلفی استفاده شده است (Kulcheski *et al.*, 2006; Xin and De Zhu, 2002; Yang and Pak, 2006). در تمام این موارد، به برتری این ژن‌ها در آشکارسازی روابط خویشاوندی گونه‌ها اشاره شده است.

در مطالعه‌ای ٤٠ رقم اصلاح شده‌ای گل داوودی با استفاده ١٦ آغازگر RAPD و ٤ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع تعداد ٢١٤ باند ایجاد شد که وجود سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی در ارقام مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که ژنتیک گل داوودی بسیار پیچیده است، اما نشانگرهای RAPD و ISSR ابزار قدرتمندی برای شناسایی تنوع ژنتیکی ارقام آن می‌باشند(Mukherjee *et al.*, 2013). همچنین در مطالعه دیگری، یک مجموعه گسترده متشکل از ٤٨٠ رقم گل داوودی چینی با استفاده از انگشت‌نگاری DNA توسط ٢٠ نشانگر SSR مورد مطالعه قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای داده‌ها بر اساس فاصله ژنتیکی نشان داد که ارقام انتخاب شده بر مبنای طبقه‌بندی باغبانی خود در کلادها قرار گرفته‌اند. در مجموع این نتایج نشان دادند که می‌توان به عنوان شروع، برای شناسایی و طبقه‌بندی گل‌های داوودی بر اساس پلی‌مورفیسم از نشانگرهای ریزماهواره استفاده نمود (Zhang *et al.*, 2014).

بالیان و همکاران (٢٠١٤) در پژوهشی با استفاده از ٩ صفت کمی (مورفو–زراعی)، ٥ صفت کیفی و ١٠ نشانگر ISSR تنوع ژنتیکی ٢٤ ژنوتیپ گل داوودی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها تفاوت قابل توجهی را در بین ژنوتیپ‌ها برای تمامی صفات مورد مطالعه نشان داد. برخی از ژنوتیپ‌ها (SKC.83، Ratlam، Gaity و رقم ٦٩) از لحاظ مورفولوژیکی و مولکولی، تنوع بیشتری داشتند. لذا پیشنهاد شد که هم صفات مورفولوژیک و هم صفات مولکولی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و انتخاب والدین در گل داوودی بسیار مفید می‌باشند (Baliyan *et al.*, 2014). بررسی تنوع کلروپلاستی و روابط فیلوژنتیکی گونه‌های گیاه درمنه (*Artemisia abrotanum*) به عنوان یکی از خویشاوندان نزدیک گل داوودی، نشان داد که بین گونه‌های این گیاه فاصلهٔ ژنتیکی زیادی وجود دارد. نتیجه این بررسی نشان داد که ناحیه‌ی trnL-F موجود در DNA کلروپلاستی به تنهایی برای مطالعات تبارشناسی مفید است (احدی دولت سرا و همکاران، ١٣٩٣).

با توجه به اهمیت گل داوودی به عنوان یک گیاه زینتی و مهم از نظر اقتصادی، این تحقیق برای مطالعه تنوع ژنتیکی و فنوتیپی ٣٠ رقم گل داوودی بر اساس صفات مختلف مورفولوژیکی و نشانگرهای کلروپلاستی ژن *rpoC* صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌های مزرعه‌ای: در این مطالعه قلمه ریشه‌دار تعداد ٣٠ رقم اصلاح شده گل داوودی (جدول ١) از پژوهشکده ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی شهرستان محلات تهیه و در سال ١٣٩٥ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان در قالب یک طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار به صورت جوی پشته و با فاصله کرت ٥٠ سانتی‌متر و فاصله بلوک١٠٠سانتی‌متر و در هر کرت ٣ بوته با فاصله ٥٠ سانتی‌متر در مجموع ٢٧٠ عدد قلمه و از هر قلمه ٩ عدد کاشته شد. در این پژوهش، ٢٠ صفت کمی طبق دستورالعمل‌های تدوین شده موسسه تحقیقات، ثبت و گواهی بذر و نهال و منطبق بر دستورالعمل‌های جهانی UPOV[1] گل داوودی (جدول ٢)، یادداشت برداری و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

1- International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV)

جدول ۱- ارقام گل داوودی مورد مطالعه به همراه نام و شماره آن‌ها

Table 1. *Chrysantemum* cultivars and their corresponding codes

شماره code	نام name	شماره code	نام name	شماره code	نام name
1	Afshan	11	Tanaz	21	Fariborz
2	Fariba2	12	Taban3	22	Darya2
3	Elika	13	Farahnaz	23	Mani 2
4	Golgis	14	Oran	24	Ashraf
5	Shahin	15	Nazgol	25	Elmira
6	Farid	16	Yasamin	26	Dila
7	Bolur	17	Nastaran	27	Sana
8	Ramtin	18	Nadia2	28	Teihoo
9	Noruz3	19	Avadis	29	Shekrnaz
10	Kimiya3	20	Anushe2	30	Paridokht

تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و مقایسه میانگین به روش LSD و یا دانکن انجام گرفت. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای با استفاده از روش وارد صورت گرفت. همچنین تجزیه همبستگی ژنتیکی صفات، ضرایب تنوع ژنوتیپی و برآورد وراثت پذیری عمومی با استفاده از روش‌های امید ریاضی میانگین مربعات، واریانس فنوتیپی (σ_P^2)، واریانس ژنوتیپی (σ_G^2)، ضریب تغییرات ژنوتیپی (CV_G) و وراثت‌پذیری (h_b^2) با استفاده از رابطه‌های ٤-١ محاسبه گردید.

$$\delta^2 = \frac{MSG - \delta^2}{1}$$ رابطه (١)

$$CVP = \frac{\sqrt{\sigma^2 p}}{\bar{x}} \times 100$$ رابطه (٢)

$$CVG = \frac{\sqrt{\sigma^2 g}}{\bar{x}} \times 100$$ رابطه (٣)

$$h^2 b = \frac{Vg}{Vp}$$ رابطه (٤)

آزمایش‌های مولکولی

جداسازی DNA ژنومی: بعد از استقرار گیاه در مرحله هشت برگی، نمونه برگی از ارقام داوودی تهیه و به سرعت در ازت مایع منجمد و سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد، جهت جلوگیری از تخریب DNA نگهداری شدند. استخراج DNA به روش CTAB (Murray and Thompson, 1980) صورت گرفت.

کمیت و کیفیت DNA ژنومی با استفاده از دو روش اسپکتوفتومتری و روش الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد.

تکثیر ژن *rpoC*: در این پژوهش از یک جفت آغازگر کلروپلاستی

rpoCF:5'-GGCAAAGAGGGAAGATTTCG-3') و

(rpoC:5'-TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC-3'

برای تکثیر این ژن به طول ٤٥٠-٤٦٠bp استفاده شد. برای تکثیر این ژن از واکنش PCR به شکل؛ [95˚C(10')+35 cycle [(95˚C(30˝)+53 ˚C(30˝)+72 ˚C(80˝)]+72 ˚C(10')] استفاده شد. همچنین حجم واکنش PCR در 25 میکرولیتر انجام شد.

توالی‌یابی، همردیفی و ترسیم درخت تبارشناسی: پس از تکثیر ژن *rpoC*، محصول PCR به صورت دو طرفه توالی‌یابی شد. توالی‌ها به کمک نرم‌افزارهای MEGA7، BioEdit و GenDoc مورد ارزیابی قرار گرفتند و به صورت دستی اصلاح شدند. در نهایت یک فایل فاستا از دو توالی رفت و برگشت تهیه و از آنها برای جستجو با استفاده از الگوریتم BLASTN استفاده شد. سپس توالی‌های گل های داوودی این مطالعه با توالی‌های همولوگ پایگاه NCBI با استفاده از الگوریتم CLUSTALW همردیف شدند. همردیفی چندگانه حاصل پس از ویرایش دستی به کمک نرم افزارهای BioEdit و GenDoc مرتب و از آن برای ترسیم درخت تبارشناسی با استفاده از روش حداکثر درست نمایی استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس آماری داده‌های مربوط به صفات مختلف گل داوودی نشان داد که ارقام داوودی از نظر برخی از صفات مورد مطالعه درسطوح احتمال ١٪ یا ٥٪ تفاوت معنی‌دار با هم داشتند (جدول ٣)، به عبارت دیگر، بین ارقام داوودی از نظر این صفات تنوع وجود دارد. این نتیجه با نتایج حسن پور اصیل (٢٠١٤) از نظر برخی از

جدول ٢- صفات بررسی شده در ارقام گل داوودی مورد مطالعه

Table 2. *Chrysanthemum* traits, their corresponding abbreviations and units

شماره Row	صفت Trait	Characteristic	واحد Unit	اختصار Abbreviation
1	ارتفاع گیاه	Plant height	Cm	P.h
2	قطر ساقه	Stem diameter	mm	S.d
3	طول برگ	Leaf length	Cm	L.l
4	عرض برگ	Leaf width	Cm	Wl
5	طول دمبرگ	Petiole length	Cm	P.l
6	تعداد رگبرگ	number of veins	-	N.v
7	تعداد دندانه	Number of teeth	-	N.T
8	نسبت سطح برگ به عرض برگ	Leaf area / Leaf width	Cm	Lar/Lw
9	قطرگل	Flower Diameter	mm	F.d
10	قطر غنچه	Diameter of buds	mm	D.b
11	قطر دیسک	Disk diameter	mm	D.d
12	قطر نهنج	Receptacle Diameter	mm	R.D
13	طول گلچه شعاعی	Radial Flower Length	Cm	R.F.L
14	عرض گلچه شعاعی	Radius Flower Width	Cm	R.F.W
15	وزن تر گل	Fresh flower weight	gr	F.f.w
16	وزن خشک گل	Dry flower weight	gr	Dfw
17	طول دوره گلدهی	Flowering period	-	Fp
18	طول برگ قلمه	Cuttings leaf length	Cm	C.l.f
19	عرض برگ قلمه	Cuttings leaf width	Cm	Clw
20	نسبت طول گلچه به عرض گلچه	Fluctuation length to Flower width	Cm	F.l.r/F.w

صفات تقریبا مشابه بود، با این حال، در مورد برخی دیگر از صفات این دو مطالعه با هم متفاوت بودند. مقایسه میانگین صفات در بین جمعیت‌ها نشان داد که بین ارقام تفاوت معنی‌داری از نظر برخی از این صفات وجود دارد (جدول ٤). برای مثال، ارقام افشان، الیکا، گلگیس، فرید، بلور، نوروز٣، طناز، فرحناز، یاسمین، نسترن، آوادیس، انوشه، مانی٢، سنا، پریدخت نسبت به بقیه ارقام ارتفاع بیشتری داشتند و از لحاظ بازار پسندی برای مصرف گل‌های شاخه بریده مناسب می‌باشد. همچنین، ارقام فریبا٢، تابان٣، اوران، دیلا، تیهو و شکرناز ارتفاع کمتر و کوتاه تری داشتند و جهت مصرف گلدانی مناسب می‌باشند. صفت اندازه گل هم در بازار پسندی گل‌های شاخه بریده مهم می‌باشد، بر این اساس، ارقام گلگیس، بلور، نازگل و انوشه گل‌های درشت و ارقام نسترن، دریا٢، مانی٢، سنا، تیهو و پریدخت گل‌های کوچک داشتند و برای گل‌های گلدانی کاربرد دارند. ارقام گلگیس، یاسمین، نادیا٢، انوشه، تیهو و پریدخت طول دوره‌گلدهی بیشتری داشته و ارقامی دیرس محسوب می-شوند. به علاوه، ارقام الیکا، فریبا٢، شاهین، افشان، نسترن و المیرا ارقامی دارای قطر ساقه کم و ارقام گلگیس، نوروز٣، فرحناز، فریبرز، اشرف، سنا، تیهو و شکرناز قطر ساقه بیشتری بودند. چون قطر ساقه با استحکام بیشترهمبستگی دارد، از این‌رو ارقامی با قطر ساقه بیشتر احتمالاً ماندگاری بیشتری داشته باشند (جدول ٤).

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات کمی مورد بررسی در ارقام داوودی

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) of qualitative traits for *Chrysantemum cultivars*

SOV	df	L.l	W.l	P.l	N.t	D.b	N.v	P.h	S.d	Lar/Lw	C.l.l	C.l.w	F.p	F.d	D.d	R.D	R.F.L	R.F.W	F.f.w	D.f.w	F.l/F.w
بلوک (Replication)	2	4.4^{**}	0.4^{ns}	0.2^{ns}	23.2^{ns}	2.9^{**}	16.1^{ns}	190.0^{ns}	2.3^{ns}	0.1^{ns}	1.4^{ns}	0.1^{ns}	0.1^{ns}	2^{**}	0.001^{ns}	0.2^{ns}	0.3^{ns}	0.1^{**}	0.004^{ns}	0.001^{ns}	0.4^{ns}
رقم (Cultivar)	29	1.7^{ns}	1.1^{**}	0.2^{ns}	157.6^{**}	2.7^{**}	44.2^{**}	338.2^{**}	2.1^{ns}	0.2^{ns}	1.5^{ns}	1.1^{ns}	62.4^{**}	0.9^{ns}	0.1^{ns}	24.3^{**}	0.1^{ns}	0.04^{ns}	0.37^{**}	0.04^{**}	0.8^{ns}
خطا (Error)	58	0.6	0.3	0.2	47.5	0.7	12.6	97.6	1.61	0.2	1.3	0.5	1.0	0.3	0.1	0.8	0.2	0.02	0.02	0.004	0.6
(CV %)	-	15.1	17.7	30.7	20.7	13.1	23.2	14.5	26.4	27.8	27.4	29.1	4.1	14.3	28.4	6.9	23.5	28.8	22.1	35.7	22.5

** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، ns غیر معنی دار

ns: Non significant and significant at 1 and 5 percent of probability level, respectively

جدول ٤- مقایسه میانگین صفات مختلف ارقام داوودی به روشLSD و دانکن

Table 4. Mean comparison of different traits by Least square differences (LSD) and Duncan multiple range test

C	L.l$^{\psi}$	W.l	P.l$^{\psi}$	N.l	D.b	N.v	P.h	S.d$^{\psi}$	Lar/Lw$^{\psi}$	C.l.l$^{\psi}$	C.l.w$^{\psi}$	F.p	F.d$^{\psi}$	D.d$^{\psi}$	R.D	R.F.L$^{\psi}$	R.F.W*	F.f.w	D.f.w	F.l. F.w$^{\psi}$
1	5.06 b-g	3 e-l	1.5 a.c	31 d.k	5.58 i.k	12 f.i	68 b.h	5 b	2a.c	3.5c.e	2 bc	20 i	3.7 c.j	1.1a.d	15.4c.f	1.6b-d	0.43c	0.44i-m	0.5 a	3.7 a.d
2	4 f-g	2.7 h.l	1.3 a.c	34c.h	5.4 jk	19.6 a.d	43 i	5.1ab	1.5a.c	3.1c	2.2 bc	25 fg	3.9 a-j	0.8 b.d	16.1b.e	1.5 e	0.56 bc	0.5 g.m	0.3b	3 a.d
3	4.9 c-g	3.9 a.d	1.3 a.c	37.7a.f	5.4 jk	12 f.i	67 c.h	5.3ab	2a.c	4.4a.c	2.3 bc	29 c	3.93 a-j	1.2 a.d	9 op	1.6b-d	0.46bc	0.3 k.m	0.07 f.g	3.5 a.d
4	6 a-d	3.3 c.j	1.3 a.c	22 i.k	17.3 c.f	17.3 c.f	81a.c	7ab	2a.c	4.4a.c	2.6 bc	33 a	4.7 a.c	1a.d	17.4ab	2.4 a.c	0.6 bc	1 bc	0.26bc	3.7 a.d
5	4.3 e-g	3.5 b.i	1.3 a.c	45.3ab	6i.k	12 f.i	59.3 f.h	5.4ab	1.3 bc	5a.c	2.73 bc	15 k	4.5 a.e	1.1a.d	10.4l.n	1.96 a.e	0.43c	0.6 g.k	0.5 a	4.5 a
6	5.2 a-g	2.7 h.l	1.1 b.c	32 c.j	7c.j	12 f.i	83 ab	6.2 ab	2.3ab	5.4ab	2.6 bc	19 ij	4 a.i	1.1a.d	11.1j.n	2.5 ab	1a	0.7 e.i	0.15 d.g	2.7 cd
7	5 c-g	2.4 kl	1.2 b.c	22 i.k	6.4 d.j	18 b.e	56.3 hi	7ab	2.1a-c	5.1a.c	2.3 bc	25 fg	4.6 a.d	0.83a.d	11k.n	1.93 a.e	0.53 bc	0.6 g.k	0.18 cd	3.7 a.d
8	5.6 a-e	3.5 b.i	1.1 b.c	28 e.k	6.4 d.j	16.3 c.g	56.2 hi	6.5 ab	2a.c	5.1a.c	3.3ab	26 ef	3.1 h-j	1.2 a.d	10 no	1.7 c.e	0.43c	0.7 e.i	0.14 d.g	4.3 ab
9	5.6 a-e	3.7a.j	1.4 a.c	45.3ab	7.1c.h	13 e.i	66 c.h	7ab	2a.c	4.3a.c	2.7 bc	26 ef	3.6 c.j	1.03a.d	8 p	1.7 b.d	0.43bc	0.7 e.i	0.06fg	3.65 a-d
10	4.9 c-g	3 e.l	1.4 a.c	36 a.g	7.5a.e	12 f.i	85 a	6 ab	2a.c	3.57a.c	2.3 bc	25 fg	3.5d.j	1.3 a.d	13 hi	1.66 b.d	0.6 bc	0.8 d.g	0.07 f.g	2.86 b.d
11	6 a.c	3.9 a.d	1.7a.c	33c.i	6 h.k	15c.h	75.1a.f	6 ab	2a.e	4 a.c	2.3 bc	26ef	4.4a.f	1a.d	18a	1.8a.d	0.53bc	0.53g.k	0.17c.e	3.67a.d
12	5.6 a.e	2.8 g.l	1.4 a.c	33c.i	7.6a.d	16.3 c.g	57.3 g.i	7 ab	2a.c	5 a.c	1.8c	26ef	4.2a.g	1.1a.d	11.1j.n	2.4a.d	0.56bc	0.53g.k	0.07fg	3.9a.d
13	6.3 a.c	4.5 a	1.4 a.c	38.3a.e	7/1b.h	14d.i	71a.h	7/1ab	1.4a.c	5 a.c	3.5ab	25fg	4.1a.h	1.3a.d	15.4d.f	1.5dc	0.56bc	0.49 h.l	0.23b.d	3.78cd
14	6 a.d	4.3 ab	1.6 a.c	39.3a.d	7.9a.c	20.3a.c	59.2 f.h	6.4ab	2a.c	4.2 a.c	2.6bc	28cd	3.9a-j	1.53a	17.2a.c	1.9a.d	0.53bc	1.1b	0.166c.f	3.61a.d
15	6.6 a	3.3 c.k	2.1 a	34.7b.h	7 c.i	15.3c.h	68.1b.h	5.88ab	2.1a.c	3.2bc	1.5 c	29 c	4.8ab	1.5a	12.2g.i	1.9a.d	0.46bc	1.1b	0.166c.f	3.8a.d

ψ: برای این صفات آزمون دانکن در سطح ۱٪ و ۵٪ انجام شده است

ψ: For these traits, Duncan multiple range test at 1 and 5 percent of probability level was used

ادامه جدول ٤-

Continued table 4.

C	L.l$^{\psi}$	W.l	P.l$^{\psi}$	N.l	D.b	N.v	P.h	S.d$^{\psi}$	Lar/Lw$^{\psi}$	C.l.l$^{\psi}$	C.l.w$^{\psi}$	F.p	F.d$^{\psi}$	D.dψ	R.D	R.F.L$^{\psi}$	R.F.W*	F.f.w	D.f.w	F.l. F.w$^{\psi}$
16	6.6 ^{ab}	3.6 $^{a.h}$	1.6 $^{a.c}$	35.3$^{b.g}$	6.4$^{d.j}$	17.3 $^{c.f}$	74 $^{a.f}$	5.68^{ab}	2$^{a.c}$	4.1$^{a.c}$	2.4^{bc}	32^{ab}	4.2$^{a.g}$	1.3$^{a.d}$	15.1^{ef}	2.1$^{a.d}$	0.53^{bc}	0.9$^{b.e}$	0.14$^{d.g}$	3.89$^{a.d}$
17	5.6 $^{a.e}$	4.1 $^{a.c}$	1.7^{ab}	26.7$^{f.k}$	7$^{c.j}$	17.3 $^{c.f}$	78.7 $^{a.d}$	5.3^{ab}	1.4^{bc}	3.4^{bc}	2.42^{bc}	18 ^{j}	3.2^{g-j}	1.4^{ab}	17$^{a.d}$	1.9$^{a.d}$	0.56^{bc}	0.96 $^{b.d}$	0.166$^{c.f}$	3.51$^{a.d}$
18	5.1 $^{a.h}$	2.7 $^{h.l}$	1.6 $^{a.c}$	38 $^{a.e}$	6.2 $^{e.j}$	12.3$^{e.i}$	63.1$^{d.h}$	6.2 ^{ab}	2$^{a.c}$	3.4^{bc}	1.8^{c}	31^{b}	4^{a-j}	1$^{a.d}$	12$^{i.l}$	2$^{a.d}$	0.6^{bc}	0.23^{m}	0.06^{g}	3.43 $^{a.d}$
19	5.3 $^{b.g}$	2.5 $^{j.l}$	1.7^{ab}	35.3$^{b.g}$	8.5^{ab}	24 ^{a}	77 $^{a.d}$	6 ^{ab}	2.3 ^{a}	3.4^{bc}	1.8^{c}	27de	3.7 $^{d.j}$	0.66^{cd}	17$^{a.d}$	1.7$^{a.d}$	0.43^{bc}	0.5$^{h.l}$	0.07^{fg}	3.86$^{a.d}$
20	4.9 $^{c.g}$	2.9 $^{f.l}$	0.8 ^{c}	21.7$^{j.k}$	5 ^{k}	16.3 $^{c.g}$	76 $^{a.e}$	8.4^{a}	2$^{a.c}$	5.8^{a}	3.3^{ab}	31 ^{b}	4.2$^{a.g}$	0.63^{d}	9^{op}	1.7$^{a.d}$	0.76^{ab}	0.2^{a}	0.166$^{c.f}$	2.36^{d}
21	4.9$^{c.g}$	3.5$^{b.i}$	1.1 $^{b.c}$	46.7^{a}	6.1$^{d.i}$	20$^{a.c}$	76$^{a.f}$	7^{ab}	2$^{a.e}$	5$^{a.c}$	4.5^{a}	29^{c}	4.4^{a}	1.1$^{a.d}$	21$^{g.j}$	3^{a}	0.6^{bc}	0.7$^{a.d}$	0.28^{a-c}	4.1$^{a.c}$
22	5.1$^{b.h}$	2.9$^{d.i}$	1.3 $^{a-c}$	36$^{a.e}$	6.2$^{c.i}$	15$^{c.h}$	73.3$^{a.g}$	6^{ab}	2$^{a.c}$	4$^{a.c}$	2.3^{bc}	24^{gh}	4.2^{g-j}	1$^{a.d}$	11$^{i.k}$	2$^{a.d}$	0.43^{bc}	0.51$^{a.d}$	0.16^{bc}	4.31^{a-c}
23	5.3 $^{b.g}$	3.3$^{b.i}$	1.3 $^{a.c}$	37$^{a.e}$	7 $^{c.h}$	23.6^{ab}	79$^{a.d}$	6^{ab}	1.4$^{a.c}$	4.1$^{a.c}$	2.6^{bc}	26^{ef}	3^{ij}	1.1$^{a.d}$	11$^{i.k}$	1.56^{dc}	0.46^{bc}	0.43^{dc}	0.18^{a-c}	3.35$^{a.c}$
24	6.3$^{a.c}$	3$^{d.i}$	1.1 $^{b.c}$	36.7$^{a.e}$	8.6^{a}	12.3$^{e.h}$	69$^{a.g}$	7.4^{ab}	2$^{a.c}$	5$^{a.c}$	2.8^{bc}	20^{cd}	3.4$^{f.j}$	1.16$^{a.d}$	12$^{h.j}$	1.7$^{b.d}$	0.46^{bc}	0.67$^{a.d}$	0.28^{a-c}	3.4$^{a.e}$
25	4 $^{f-g}$	2.9$^{d.i}$	1.3 $^{a-c}$	30$^{c.h}$	7 $^{c.g}$	16.3$^{c.g}$	67$^{a.g}$	4.3^{b}	2.1$^{a.c}$	3.5$^{a.c}$	2.4^{bc}	20^{i}	3.9^{a-j}	1.3$^{a.d}$	10.04^{j-l}	2.1$^{a.d}$	0.53^{bc}	0.66$^{e.d}$	0.25$^{a.c}$	3.9$^{a.c}$
26	4.9$^{c.g}$	4.6$^{f.i}$	1$^{b.c}$	43$^{a.c}$	6$^{f.i}$	15$^{c.h}$	65$^{b.g}$	6^{ab}	2$^{a.c}$	5$^{a.c}$	3^{bc}	18 ^{j}	3.4^{e-j}	1.3$^{a.d}$	12$^{h.k}$	1.6$^{b.d}$	0.43^{bc}	0.45^{dc}	0.15^{c}	3.33$^{a.d}$
27	5.4$^{a.f}$	3.7$^{a.f}$	1.2 $^{b.c}$	33$^{a.g}$	7.3$^{a.f}$	19$^{a.e}$	76.2$^{a.e}$	7.3^{ab}	1.4^{bc}	5$^{a.c}$	2.7^{bc}	29 ^{c}	3^{j}	1.2$^{a.d}$	14^{fg}	1.5^{dc}	0.53^{bc}	0.58$^{a.d}$	0.23^{a-c}	2.83$^{b.d}$
28	5$^{c.g}$	2.7$^{f.i}$	1.7^{ab}	26 $^{d-g}$	6$^{d.i}$	10hi	60$^{d.h}$	7^{ab}	2$^{a.c}$	3^{c}	1.7^{c}	24^{gh}	3.2^{g-j}	1.13$^{a.d}$	10^{k-m}	1.46^{d}	0.46^{bc}	0.49$^{a.d}$	0.25^{a-c}	3.18^{a-d}
29	4.4$^{d.g}$	2.2^{i}	1.2 $^{b.c}$	24$^{e.g}$	7.6$^{a.d}$	9^{i}	42.2^{h}	7^{ab}	2.3 ^{a}	4.2$^{a.c}$	2^{bc}	23^{h}	3.4$^{f.j}$	1.03$^{a.d}$	10^{k-m}	1.53^{dc}	0.46^{bc}	0.37^{d}	0.19^{a-c}	3.09$^{a.d}$
30	3.8^{i}	2.5^{jl}	1.1^{bd}	20^{k}	6^{jk}	11^{hj}	75^{af}	6.2^{ac}	2^{ae}	2^{ce}	2.5^{ce}	32^{ab}	3.2^{ik}	1.03^{ae}	14.5^{fg}	1.6^{ce}	0.43^{c}	0.7^{dh}	0.166^{cf}	3.6^{ad}

ψ: For these traits, Duncan multiple range test at 1 and 5 percent of probability level was used

ψ: برای این صفات آزمون دانکن در سطح ۱٪ و ۵٪ انجام شده است

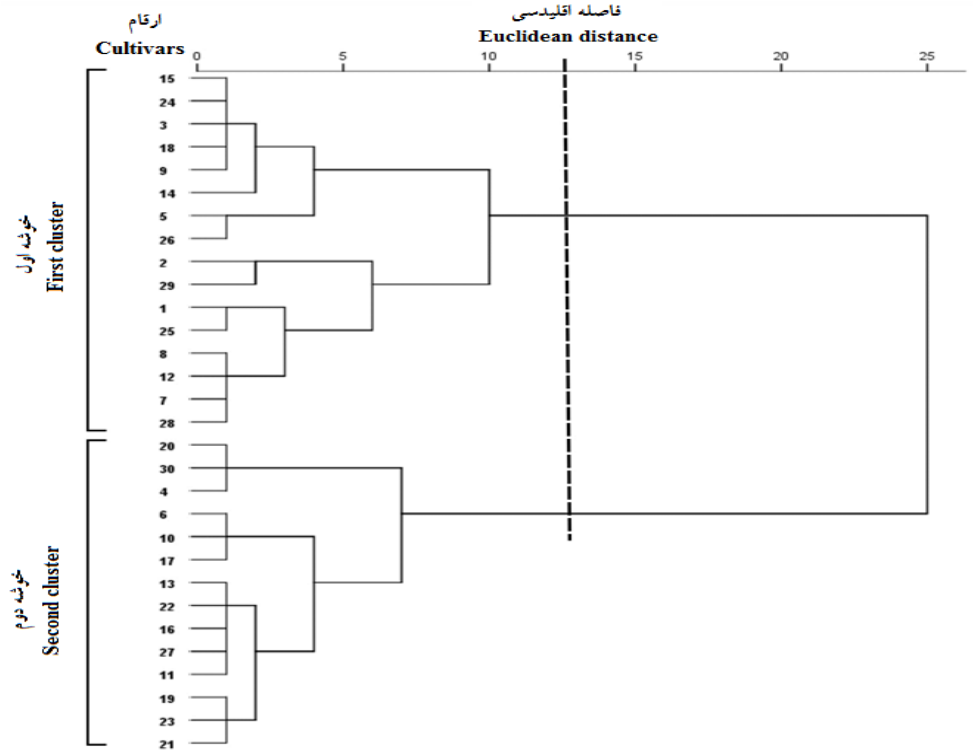
از آنجایی که به نظر می‌رسد که تکثیر مداوم به روش غیر جنسی ممکن است سبب کاهش تنوع ژنتیکی ارقام داوودی شود (Xu *et al.*, 2005)، لذا حفظ این تنوع ژنتیکی در خصوص صفات مورفولوژیکی و فنولوژیکی بسیار حائز اهمیت است. در این مطالعه ارقام از نظر صفات مهم زراعی و اقتصادی دارای تنوع مناسبی برای برنامه‌های به‌نژادی بودند. ضرایب تنوع ژنتیکی صفات در جدول ۵ بیان می‌کنند که صفات طول دمبرگ، طول برگ، عرض برگ، قطر نهنج، طول دوره گلدهی، عرض برگ قلمه، تعداد دندانه، تعداد رگبرگ در بین جمعیت‌ها از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردار می‌باشد. بنابراین از صفات مذکور می‌توان برای گزینش والدین مطلوب جهت برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد، ولی صفاتی همانند وزن خشک گل، قطر ساقه و نسبت طول گلچه شعاعی به عرض آن از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردار نیستند. تقریباً، همه‌ی ارقام وراثت پذیری بالایی را در مورد بسیاری از صفات نشان دادند که بیشترین آن‌ها مربوط به طول دوره گلدهی است. در تحقیق مشابهی ژانگ و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تنوع ژنتیکی برخی صفات گل داوودی، به نتایج تقریبا مشابهی در خصوص بسیاری از صفات دست یافتند.

تجزیه خوشه‌ای یکی از راه‌های انتخاب والدین برای تولید بهترین ارقام هیبرید در اصلاح نباتات است، به این خاطر هرچه فاصله ژنتیکی بین دو گیاه والد بیشتر باشد، احتمال هتروزیس در تلاقی آن‌ها بیشتر است (Farshadfar, 2010). به منظور تعیین فاصله ژنتیکی ارقام این مطالعه، تجزیه خوشه‌ای ۳۰ رقم داوودی بر اساس صفات مورفولوژیک به روش وارد صورت گرفت. نتایج تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش وارد نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس خط برش در فاصله ۱۲/۵ در ۲خوشه اصلی قرار گرفتند (شکل ۱). در خوشه اول بیشترین ارقام مورد بررسی یعنی ۱۶ رقم قرار گرفتند، این ارقام ارتفاع کوتاه با اندازه قطر گل متوسط داشتند. نتایج خوشه‌بندی نشان داد که گل‌های داوودی با مصرف گلدانی اغلب در خوشه ۱ جای گرفته‌اند. اغلب ارقام موجود در خوشه ۲ با توجه به ویژگی آن‌ها (ارتفاع بوته بلند، اندازه گل متوسط تا درشت) بیشتر به صورت شاخه بریده مصرف دارند. نتایج این مقایسه با نتایج آزمایش کیامحمدی و همکاران (۲۰۱۲) روی تنوع ژنتیکی برخی ارقام اصلاح شده گل داوودی، همچنین با نتایج کنکارج و همکاران (۲۰۰۸) روی تنوع ژنتیکی گل داوودی تا حدودی مطابقت داشت (Kengkarj *et al.*, 2008)

جدول ۵- برآورد اجزای واریانس و ضریب تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی

Table 5. Variance components, phenotypic and genotypic coefficients

صفات Trait	واریانس ژنوتیپی δ^2g	واریانس فنوتیپی δ2p	واریانس محیطی δ2e	ضریب تغییرات فنوتیپی (٪) CVP (%)	ضریب تغییرات ژنوتیپی (٪) CVG (%)	ضریب تنوع محیطی(٪) CVE (%)	وراثت پذیری عمومی (٪) h^2b (%)
L.l	0.34	0.55	0.21	14.14	11.11	8.72	61.82
Wl	0.343	0.35	0.01	18.55	15.46	10.39	98.00
P.l	0.01	0.07	0.06	19.34	7.32	17.87	14.29
N.t	36.72	52.56	15.84	21.74	18.18	11.93	69.86
D.b	0.65	0.89	0.24	14.28	12.18	7.42	73.03
N.v	10.55	14.74	4.19	25.07	21.21	14.45	71.57
P.h	80.22	112.76	32.54	15.61	13.15	8.37	71.14
S.d	0.15	0.33	0.18	9.37	6.31	15.21	45.45
Lar/Lw	0.003	0.077	0.07	15.93	3.32	15.20	3.90
C.l.l	0.07	0.51	0.44	17.04	6.34	15.72	13.73
C.l.w	0.187	0.36	0.17	24.28	17.48	16.69	51.94
F.p	20.54	20.79	0.25	17.79	17.64	2.72	98.80
F.d	0.21	0.31	0.10	14.56	11.98	8.27	67.74
D.d	0.01	0.043	0.03	18.71	8.98	15.60	23.26
R.D	7.87	8.13	0.26	22.58	22.23	3.96	96.80
R.F.L	0.02	0.033	0.01	9.92	7.68	13.31	66.67
R.F.W	0.01	0.02	0.01	10.69	18.52	15.49	50
F.f.w	0.12	0.13	0.01	23.13	13.35	18.69	92.30
D.f.w	0.01	0.011	0.001	16.48	40.38	17.88	90.90
F.l /F.w	0.05	0.26	0.21	14.55	6.55	12.98	19.23



شکل ١- تجزیه خوشه ای ٣٠ رقم گل داوودی به روش Ward. شماره‌ها کد مربوط به ارقام با توجه به جدول ١ هستند.

Figure 1. Ward cluster analysis of 30 *Chrysantemum morifolium* cultivars. Numbers are cultivar codes based on table 1.

لذا با توجه به هدف، برای دست یابی به هتروزیس بیشتر می‌توان والدین مناسب را از خوشه‌ها انتخاب و در برنامه-های به‌نژادی به کار برد. با توجه به تنوع بالای موجود در بین ژنوتیپ‌های ارزیابی شده، انتظار می‌رود با گزینش در بین این ژنوتیپ‌ها، بتوان صفات ارزشمندی از گل داوودی را با آمیزش والدین مناسب و گزینش با روش-های بهنژادی سنتی اصلاح کرد. همان‌طوری که از شکل ١ مشخص است، ٣ رقم فریبا٢، افشان و شاهین مستقل از بقیه قرار گرفته‌اند. جدا قرار گرفتن این سه رقم می‌تواند به دلیل برخورداری آن‌ها از یک زمینه ژنتیکی یکسان باشد.

در برنامه‌های به‌نژادی همبستگی‌های ژنتیکی از اهمیت بالایی برخوردار هستند، زیرا انتخاب یک صفت و چگونگی تاثیر آن صفت بر سایر صفات از اهمیت فراوانی در برنامه‌های به‌نژادی برخوردار است. بین صفات مورد مطالعه، صفات طول برگ قلمه با عرض گلچه شعاعی، طول برگ قلمه با طول گلچه شعاعی، قطر دیسک با طول دمبرگ، عرض گلچه شعاعی با نسبت سطح برگ با عرض آن بیشترین همبستگی ژنوتیپی مثبت و معنی‌دار و صفاتی مانند وزن خشک گل با نسبت سطح برگ به عرض آن، نسبت طول گلچه شعاعی به عرض گلچه شعاعی، نسبت سطح برگ به عرض آن و نسبت سطح برگ به عرض آن با وزن خشک گل بیشترین همبستگی منفی معنی‌داری داشتند (جدول ٦). نتایج این بخش از مطالعه با نتایج کیامحمدی و همکاران (٢٠١٢) در مورد برخی از صفات هماهنگی داشت، اما در مورد ضریب همبستگی ژنوتیپی برخی از صفات تفاوت‌هایی وجود داشت که این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل تاثیر عوامل محیطی یا استفاده از ارقام با ساختار ژنتیکی متفاوت باشد (Kiamohammadi et al., 2012). به علاوه نتایج ضرایب همبستگی ژنوتیپی بین صفات این مطالعه در مورد صفات مورفولوژیکی با نتایج دیگران روی ارقام مشابه تاحدودی یکسان بود (Taghipour and Ehteshamnia, 2017). حداکثر تنوع در صفت وزن خشک گل با (٤٠/٣٨) و

جدول ٦- همبستگی ژنوتیپی برخی صفات مورفولوژیکی ارقام گل داوودی بر اساس روش REML$^{\Psi}$

Table 6. Genotypic correlation coefficient for some *Chrysantemum* traits based on Restricted Maximum Likelihood (REML)$^{\Psi}$

F.l. /F.w	D.f.w	F.f.w	R.F.W	R.F.L	R.D	D.d	F.d	F.p	C.l.w	C.l.l	Lar/Lw	P.h	N.v	D.b	N.t	P.l	Wl	L.l	صفت
																		1	L.l
																	1	0.55**	Wl
																1	0.53	0.57	P.l
															1	0.25	0.38**	0.09	N.t
														1	0.08	0.30	−0.07	0.47**	D.b
													1	0.23	0.08	0.11	0.21	0.08	N.v
												1	0.33**	0.01	−0.01	0.12	0.29**	0.38**	P.h
											1	0.20	−1	0.97	−1	−1	−0.88	−0.98**	Lar/Lw
										1	0.99	0.15	−0.33	−0.43	−0.17	−0.98**	0.07	0.06	C.l.l
									1	0.97**	−0.65	0.23	0.35**	−0.28	0.34**	−0.69**	0.42**	0.17	C.l.w
								1	0.12	0.12	0.76	0.21	0.27**	0.18	−0.64**	0.01	0.11	0.33**	F.p
							1	0.15	−0.04	−0.72	−1	0.05	−0.29	−0.78	0.08	1	0.52	0.46**	F.d
						1	0.49	0.34	−0.21	−1	−0.95	0.27	−0.42	0.38	0.61**	0.98**	0.99**	1	D.d
					1	0.17	0.78**	0.15	−0.08	−0.94	−1	0.31**	0.46**	0.21	−0.13	0.97**	0.38**	0.34**	R.D
				1	0.14	0.23	0.39	0.09	1	0.98	−0.88	0.87**	0.41	0.03	0.32	−1	−0.21	0.13	R.F.L
			1	0.84**	−0.04	−0.32	0.21	0.09	0.58**	0.99	1	0.58**	0.05	−0.13	−0.16	−1	−0.34	0.14	R.F.W
		1	0.46**	0.11	0.12	−0.12	0.22	0.46**	0.55**	1	−0.28	−0.02	0.13	−0.13	−0.32**	−0.59	0.24**	0.38**	F.f.w
	1	0.17	0.40	1	0.32**	−0.19	0.04	−0.21	0.68**	0.30	−1	−0.34**	−0.05	−0.19	0.15	0.66	0.13	-0.27	D.f.w
1	0.69**	−0.56**	−0.81**	−0.24	0.02	0.69**	0.42	−0.30	0.23	−0.85	−0.96	− 0.34	0.28	−0.01	0.61**	0.88	0.09	−0.26	F.l.r/F.w

$^{\Psi}$ حدود اطمینان همبستگی‌های ژنتیکی بر اساس $2\times Se_{rg}$ (Se:خطای معیار) محاسبه گردید. اگر حدود اطمینان هم علامت باشند، همستگی معنی دار ، در غیر این صورت غیر معنی‌دار می‌باشند.

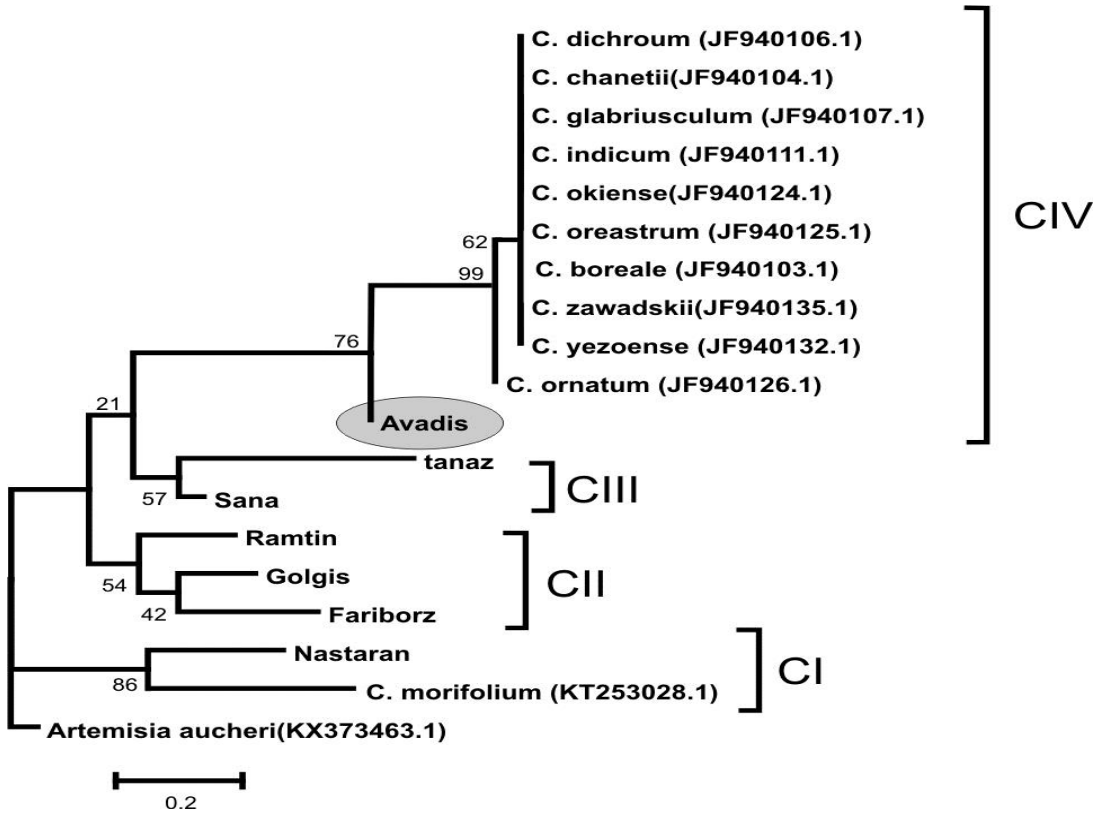
$^{\Psi}$ Confidence range of genotypic correlation was calculated based on $2\times Se_{rg}$ ($2\times Se_{rg}$: standard error). If confidence have same sign, correlations are significant; otherwise they are not significant.

کمترین مربوط به صفت نسبت سطح برگ به عرض آن با (٣/٣٢) وجود داشت. ضمن اینکه بیشترین وراثت‌پذیری عمومی به صفت وزن خشک گل و کمترین آن به نسبت طول گلچه شعاعی به عرض آن تعلق داشت. همبستگی ژنوتیپی بین صفات طول برگ و قطر گل، عرض برگ و قطر گل، طول دمبرگ و نسبت سطح برگ به عرض آن، طول دمبرگ با قطر گل، طول دمبرگ با قطر دیسک، قطر غنچه با نسبت سطح برگ به عرض آن همبستگی ژنوتیپی بسیار قوی و مثبت و معنی‌داری با هم داشتند. صفت نسبت سطح برگ با عرض آن با صفاتی از جمله: طول برگ، عرض برگ، طول دمبرگ، تعداد دندانه، تعداد رگبرگ، قطر گل، قطر نهنج، قطر دیسک و وزن خشک گل همبستگی منفی و معنی داری دارند. به دلیل مشکلات در توالی‌یابی، از بین ٣٠ رقم، تنها توالی ٧ رقم به اندازه کافی قابل اعتماد بودند تا از آنها برای ترسیم درخت تبارشناسی استفاده شود. بر این اساس، درخت تبارشناسی تعداد هفت رقم گل داوودی این مطالعه به همراه تعداد ١١ گونه داوودی با بیشترین قرابت از پایگاه NCBI، به روش حداکثر درست با ١٠٠٠ نمونه گیری بوت استرپ ترسیم شد (شکل ٢). این مطالعه برای اولین بار است که در ایران با استفاده از توالی ژن *rpo*C تنوع ژنتیکی تعدادی از ارقام گل داوودی موجود در ایران را بررسی می‌کند. همان طوری که مشاهده می‌شود، ارقام داوودی این مطالعه با گونه‌های انتخابی از پایگاه NCBI، چهار کلاد اساسی تشکیل داده‌اند. کلاد CI و CIII هر یک با دو عضو کمترین و کلاد CIV با یازده عضو بیشترین تعداد عضو را دارند. تمام ارقام این مطالعه بجز رقم Avadis در کلادی قرار دارند که گونه موریفولیوم خویشاوند نزدیک آنها محسوب می‌شود.

روش حداکثر درست نمایی با استفاده از توالی ژن *rpo*C توانسته است به خوبی از اطلاعات موجود در توالی نوکلئوتیدها استفاده و درخت تبارشناسی مناسبی از روابط خویشاوندی ارقام داوودی ترسیم کند. میزان بوت استرپ بالای گروه‌بندی نشان می‌دهد که توالی‌ها به اندازه کافی از اطلاعات برای ترسیم درخت برخوردار بوده‌اند. در تائید برخی مطالعات قبلی، نشانگرهای مولکولی دارای توانایی کافی برای گروه‌بندی گونه‌های داوودی بر اساس ردیف‌های DNA هستند (Liu *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010). نتیجه مطالعات قبلی نشان می‌دهند که جنس *Chrysantemum* تک نیایی نیست و *Ajania* نیز باید جزئی از جنس *Chrysantemum* محسوب شود (Liu *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2010).

فاصله ژنتیکی ارقام داوودی این مطالعه محاسبه و مشخص شد که این فاصله ژنتیکی بین ارقام داوودی بر اساس توالی ژن *rpoC* از ٠/٤ تا ٢/٩ متغیر بود (جدول ٧). کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به دو رقم *Tanaz* و *Sana* و بیشتر فاصله ژنتیکی به دو رقم *Nastran* و *Tanaz* اختصاص داشت. سطح پلوئیدی و اندازه ژنوم از اصلی ترین دلایل فواصل ژنتیکی بین گونه‌های مختلف گل داوودی است (Luo *et al.*, 2017). گل‌های داوودی مورد مطالعه، به ویژه گونه‌های که بومی چین هستند، دارای سطح پلوئیدی بالایی هستند و از این نظر می توانند فاصله ژنتیکی بیشتری با گونه های دیپلوئید داشته باشند.

از فواصل ژنتیکی این ارقام مشخص است که بسیاری از ارقام بسیار به هم نزدیک هستند و به نظر می‌رسد که تفاوت ژنتیکی زیادی با هم نداشته باشند. لذا به‌نژادگر برای انتخاب والدین و انجام دورگ‌گیری‌های احتمالی با موانعی مواجهه می‌شود. با توجه به قرار گیری رقم Avadis در کلاد جداگانه‌ای، انتظار می‌رفت که این رقم فاصله ژنتیکی بیشتری با بقیه داشته باشد. همان‌طوری که ملاحظه می‌شود، فاصله ژنتیکی این رقم با بقیه ارقام نزدیک به یک یا از یک بیشتر است. این موضوع نشان می‌دهد که می‌توان از این رقم به عنوان یکی از والدین برای کارهای به‌نژادی داوودی استفاده کرد.



شکل ۲- درخت تبارشناسی ارقام داوودی بر اساس روش حداکثر درست نمایی با استفاده از توالی ژن C*rpo* . میزان اعتبار درخت بر اساس روش Bootstrapping با ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی و اعداد مربوطه روی شاخه ها نمایش داده شدند.

Figure 2. Maximum likelihood (ML) phylogeny of the *Chrysanthemum* cultivars, using the *rpo*C gene sequence. Numbers next to nodes are bootstrap proportions (%) from the ML analysis.

جدول ۷- تخمین میزان تنوع تکاملی بین توالی‌ها. تعداد جابجایی بازها در یک جایگاه توسط روش Kimura-2Parameter method محاسبه شد. نسبت تنوع بین جایگاهها بر اساس توزیع گاما مدل گردید. تجزیه تحلیل شامل ۷ توالی بود. توالی‌های با کمتر از ۹۵ درصد مشابهت حذف شدند. در مجموع ۱۸۰ موقعیت برای محاسبه مورد استفاده قرار گرفتند. در مجموع ۲۴۹ جایگاه مورد بررسی قرار گرفت.

Table 7. Estimates of evolutionary divergence between sequences. The numberS of base substitutions per site from between sequences are shown. Analyses were conducted using the Kimura 2-parameter model. The rate variation among sites was modeled with a gamma distribution. The analysis involved 7 nucleotide sequences. All positions with less than 95% site coverage were eliminated. There were a total of 249 positions in the final dataset.

	Sana	Ramtin	Nastaran	Tanaz	Golgis	Fariborz
Sana	1					
Ramtin	0.8	1				
Nastaran	1.4	1.6	1			
Tanaz	0.4	1.1	2.9	1		
Golgis	0.8	0.6	1.4	1.1	1	
Fariborz	0.8	0.9	1.8	1.3	0.5	1
Avadis	0.9	1.2	1.9	1.5	1.3	1.2

مقایسه دندروگرام داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی عدم تطابق بین دندروگرام‌های داده‌های مورفولوژیک (شکل ١) و مولکولی (شکل ٢) نشان می‌دهد که ارقام داوودی مورد بررسی در دندروگرام مورفولوژی در دو خوشه قرار گرفته‌اند، اما در دندروگرام مولکولی، این ارقام در ٤ خوشه قرار گرفتند. این تفاوت در تعداد خوشه‌ها در هر دو دندروگرام نشان دهنده تمرکز و کارکرد بهتر نشانگرهای مولکولی می‌باشد. موضوع عدم تطابق در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (Scott *et al*., 1996; Roein *et al*., 2014) عدم تطابق این دو نوع از خوشه‌بندی می‌تواند به دلایلی چون؛ (١) استفاده از ژنوتیپ‌ها یا ارقام مختلف (٢) اندازه‌گیری صفات مختلف و (٣) ماهیت نشانگرها. با این حال، در برخی موارد گزارش‌های از همبستگی این نوع از تبارشناسی‌ها وجود دارد (Shao *et al*., 2010).

References

Ahadi dolat sara¸A., salami¸S.-A.-R., Shakpor. M., Naghavi¸M.-R. and Sorenie. A, .2014. Study of Diversity of Chloroplasty DNA and Phylogenetic Relations Between 82 Species in Iran. Iranian Horticultural Science. 45(4):401-415 (In persian).

Baliyan, D., Sirohi, A., Kumar, M., Kumar, V., Malik, S., Sharma, S. and Sharma, S. (2014). Comparative genetic diversity analysis in *chrysanthemum*: A pilot study based on morpho-agronomic traits and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, **167**: 164-168.

Broertjes, C., Koene, P. and Van Veen, J. (1980). A mutant of a mutant of a mutant of a...: Irradiation of progressive radiation-induced mutants in a mutation-breeding programme with *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Euphytica*, **29**: 525-530.

Dole, J. and Wilkins, H. (1999) Floriculture: principles and species. Prentice-Hall, Inc in, Simon and Schuster/A Viacom Company. New Jersey, 613p.

Farshadfar, E. (2010) Multivariate analysis: principles and methods, Tagh bostan, Kermanshah.Iran.(in persian).

Garcia, A.A., Benchimol, L.L ,.Barbosa, A.M., Geraldi, I.O., Souza J.C.L. and Souza, A.P.D. (2004). Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*, **27**: 579-588.

Gielly, L. and Taberlet, P. (1994). The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **11**: 769-777.

HassanpourAsil, M., Roein, Z. and Sabouri, A. (2014). Identification of superior chrysanthemum genotypes based on phenological traits and postproduction longevity. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*, **5**: 27-37 (In persian).

Ishihama, A. (2000). Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase. *Annual Reviews in Microbiology*, **54**: 499-518.

Kengkarj, P., Smitamana, P. and Fujime, Y. (2008). Assessment of somaclonal variation in Chrysan-themum (Dendranthema grandiflora Kitam.) using RAPD and morphological analysis. Plant tissue culture and Biotechnology, **18**: 139-149.

Kiamohammadi, F., Abdoust, V., Moradi, P., Mohamad Reza, S. and Arab, S. (2012). Evaluation of genetic diversity among some of Iranian chrysanthemum cultivar using morphological characteristics. *Jouran of Agronomy and Plant Breedong*, **8**: 43-54 (In persian).

Kim, I.S., Koppula, S., Park, P.-J., Kim, E.H., Kim, C.G., Choi, W.S., Lee, K.H. and Choi, D.-K. (2009). Chrysanthemum morifolium Ramat (CM) extract protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP+-induced cytotoxicity. *Journal of ethnopharmacology*, **126**: 447-454.

Kulcheski, F.R., Muschner, V.C., Lorenz-Lemke, A.P., Stehmann, J.R., Bonatto, S.L., Salzano, F.M. and Freitas, L.B. (2006). Molecular phylogenetic analysis of Petunia juss.(Solanaceae). *Genetica*, **126**: 3-14.

Liu, P.L., Wan, Q., Guo, Y.P., Yang, J. and Rao, G.Y. (2012). Phylogeny of the genus Chrysanthemum L.: evidence from single-copy nuclear gene and chloroplast DNA sequences. *PloS one*, **7**: e48970.

Luo, C., Chen, D., Cheng, X., Zhao, H. and Huang, C. (2017). Genome size estimations in *Chrysanthemum* and correlations with molecular phylogenies**.** *Genetic Resources and Crop Evolution*, **64**: 1451-1463.

Meyer, K. (2007). WOMBAT-A tool for mixed model analyses in quantitative genetics by restricted maximum likelihood (REML). *Journal of Zhejiang University Science*, **8**:815-821.

Mukherjee, A.K., Dey, A., Acharya, L., Palai, S.K. and Panda, P.C. (2013). Studies on genetic diversity in elite varieties of Chrysanthemum using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 12:161-169.

Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, **8**: 4321-4326.

Ohashi, H. and Yonekura, K. (2004). New combinations in Chrysanthemum (Compositae-Anthemideae) of Asia with a list of Japanese species. *The Journal of Japanese Botany*, **79**: 186-195.

Panwar, P., Nath, M., Yadav, V.K. and Kumar, A. (2010). Comparative evaluation of genetic diversity using RAPD, SSR and cytochrome P450 gene based markers with respect to calcium content in finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.). *Journal of Genetics*, **89**: 121-133.

Provan, J., Powell, W. and Hollingsworth, P.M. (2001). Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**: 142-147.

Roein, Z., Asil, M.H., Sabouri, A. and Dadras, A.R. (2014). Genetic structure of Chrysanthemum genotypes from Iran assessed by AFLP markers and phenotypic traits. *Plant Systematics and Evolution*, **300**(3): 493-503.

Scott, M., Caetano-Anollés, G. and Trigiano, R. (1996). DNA amplification fingerprinting identifies closely related Chrysanthemum cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **121**: 1043-1048.

Shao, Q.S., Guo, Q.S., Deng, Y.M. and Guo, H.P. (2010). A comparative analysis of genetic diversity in medicinal Chrysanthemum morifolium based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, **38**: 1160-1169.

Shinoyama, H., Aida, R., Ichikawa, H., Nomura, Y. and Mochizuki, A. (2012). Genetic engineering of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*): current progress and perspectives. *Plant Biotechnology*, **29**: 323-337.

Taghipour, Sh. and Ehteshamnia, A. (2017). Evaluation Genetic Diversity of some Tall Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) using Morphological Traits in Khorramabad conditions. *Journal of Plant Production Research*, **24**: 95-107 (In Persian).

Xin, T. and De Zhu, L. (2002). Application of DNA Sequences in Plant Phylogenetic Study. *Acta Botanica Yunnanica*, **24**(2)170-184.

Xu, W., Guo, Q., Li, Y. and Wang, T. (2005). Comparative study on internal quality of various Chrysanthemum morifolium. *Journal of Chinese Materia Medica*, **30**: 1645-1648.

Yagi, Y. and Shiina, T. (2014). Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. *Frontiers in Plant science*, **5**: 1-7.

Yang, J.Y. and Pak, J.H. (2006). Phylogeny of Korean Rubus (Rosaceae) based on ITS (nrDNA) and trnL/F intergenic region (cpDNA). *Journal of Plant Biology*, **49**: 44-54.

Zhao, H.B., Chen ,F.D., Chen, S.M., Wu, G.S. and Guo, W.M. (2010). Molecular phylogeny of Chrysanthemum, Ajania and its allies (Anthemideae, Asteraceae) as inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast trnL-F IGS sequences. *Plant systematics and evolution*, **284**: 159-163.

Zhang, Y., LUO, X.Y., Zhu, J., Wang, C., Hong, Y., Lu, J., LIU, Q.Q., LI, B.Q., ZHU, M.L. and WANG, Z.F. (2014). A classification study for chrysanthemum (Chrysanthemum× grandiflorum Tzvelv.) cultivars based on multivariate statistical analyses. *Journal of Systematics and Evolution*, **52**: 612-628.

Phylogenetic Analysis of *Chrysanthemum morifolium* Cultivars by *rpoC* Chloroplastic Gene Sequencing and Morphological Traits

Seyedeh Maryam Salehan[1] and Farhad Nazarian-Firouzabadi[2,*]

1- M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Professor¸ Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received: April 11, 2017 – Accepted: August 19, 2017)

Abstract

Chrysanthemum is one of the world's most important cut flower crops. The genetic diversity assessment among present Iranian *Chrysanthemum* cultivars are needed for future *Chrysanthemum* breeding programs. In an attempt to reveal the genetic variation and relationship among 30 *Chrysanthemum* cultivars, some morphological and a chloroplastic gene (*rpoC*) DNA molecular markers were employed. *Chrysanthemum* cultivars were cultivated in a Randomized Complete Block design (RCBD) with 3 replications in the field. Meanwhile, a phylogenetic tree was constructed based on chloroplast *rpoC* gene sequence. Analysis of variance (ANOVA) indicated that a significant variation exists among the *Chrysanthemum* cultivars for almost all the traits under study. In general, phenotypic coefficient of variation was higher than the genotypic coefficient of variation indicating the predominant role of environment effects. Ward Cluster analysis divided cultivars in two main clusters with highest number of cultivars falling under cluster I. Phylogenetic relationships among *Chrysanthemum* cultivars based on Maximum likelihood method showed that Iranian cultivars belong to *Chrysanthemum morifolium*, suggesting that these cultivars have presumably been bred from the same set of parents. Furthermore, genetic distance between cultivars ranged from 0.4 to 2.9, indicating sufficient genetic diversity among cultivars for crossing and selecting the most appropriate parents for *Chrysanthemum morifolium* breeding programs.

Keywords: *Asteraceae*, Chloroplast, *Chrysanthemum*, Genetic Diversity, Plant Breeding

[*] **Corresponding Author, E-mail: nazarian.f@lu.ac.ir**