# ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های مارچوبه (*Asparagus officinalis* L.) بومی شمال ایران با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانگر مولکولی RAPD

# Evaluation of Genetic Diversity of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Accessions from North of Iran Using Morphological and Molecular Markers

محمدرضا حسندخت[۱*]، محمدجواد آهی[۲] و حسن قلیچ‌نیا[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۱۶

**چکیده**

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۴۸ توده مارچوبه بومی استان مازندران با استفاده از ۲۴ صفت مورفولوژیکی و ۳۸ توده با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس تجزیه به عامل‌ها، نه عامل اصلی، ۸۰ درصد تغییرات کل را توجیه کردند و صفات مربوط به اسپیر در تفکیک توده‌ها موثرتر عمل کردند. براساس تجزیه کلاستر صفات مورفولوژیکی، توده‌های مارچوبه مورد مطالعه به دو گروه اصلی تقسیم شدند. تعداد ۱۷ آغازگر از ۹۰ آغازگر مورد استفاده توانستند قطعات واضح و قابل ارزیابی تکثیر کنند و میزان چندشکلی ۹۸/۱۱ درصد بود. براساس نتایج تجزیه کلاستر در آزمایش RAPD با استفاده از روش UPGMA، توده‌های مورد مطالعه در ضریب تشابه ۰/۴۲به هفت گروه تقسیم شدند و توده‌های مارچوبه بومی مازندران از رقم ماری واشنگتن UC350، *Asparagus persicus* و مارچوبه بومی طالقان جدا گردیدند. در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی RAPD، رقم ماری واشنگتن UC350 از توده‌های بومی مازندران جدا شد.

**واژه‌های کلیدی:** اسپیر، تجزیه کلاستر، ماری واشنگتن UC350، *Asparagus persicus*

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشیار و دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳. استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

*: نویسنده مسئول Email: mrhassan@ut.ac.ir

**مقدمه**

مارچوبه خوراکی (*Asparagus officinalis*) گیاهی بسیار با ارزش از جهت مصرف تغذیه‌ایی و دارویی می‌باشد. این گیاه بیش از دو هزار سال سابقه کشت و کار دارد، اما پرورش آن در قرن ۱۶ و ۱۷ میلادی در کشورهای آلمان، فرانسه، انگلستان و هلند گسترش یافت (*پروهنز*[1] و همکاران، 2008). در سال‌های اخیر کشت و کار این گیاه در بسیاری از کشورهای جهان به‌ویژه کشورهای آسیایی رواج یافته است (*بنسون*[2]، 2009). ندام قابل‌مصرف آن جهت تغذیه، جوانه‌های برگی در زیر سطح خاک است که با افزایش طول، این جوانه‌ها به اندامی به نام اسپیر[3] (ساقه کاذب) تغییر شکل می‌دهند (*نیسون*[4]، 2004). گونه‌های مارچوبه در سراسر دنیا گسترش یافته‌اند و مناطق مدیترانه، آفریقا و بخشی از آسیا مهم‌ترین مناطق پراکنش آن می‌باشند (*دالگرن* و *یئو*[5]، 1985). مارچوبه کالری و سدیم کمی دارد و منبع خوبی برای تأمین فیبر، پروتئین، ویتامین A، تیامین، ریبوفلاوین، ویتامین $B_6$، ویتامین C، ویتامین E، ویتامین K، کلسیم، منیزیم، فسفر، پتاسیم، روی، آهن، مس، منگنز و سلنیم می‌باشد (*یواس‌دی‌ای*[6]، 2010). مطالعات متعددی فعالیت‌های ضدمیکروبی (*مندال*[7] و همکاران، 2000) و فعالیت‌های ضدالتهابی (*مندال* و همکاران، 1998) مارچوبه را نشان داده‌اند.

براساس فلور ایران (قهرمان، ۱۳۷۵)، انتشار جغرافیایی مارچوبه خوراکی در ایران در استان مازندران (ساری، نوشهر، محمودآباد، رامسر، علمده، بهشهر، نکا)، استان آذربایجان شرقی (تبریز)، استان کرمانشاه (ریجاب، بیجار)، استان البرز (طالقان) و در استان تهران (قصر قجر) ذکر شده است. علاوه‌بر مارچوبه خوراکی گونه‌های *A. persicus*، *A. breslerianus*، *A. sprengeri* و *A. verticillatus* نیز در ایران به‌صورت پراکنده وجود دارند که در میان آن‌ها گونه *A. Persicus* از بیش‌ترین پراکنش برخوردار است (قهرمان، ۱۳۷۵). سرابی (2010، ۱۳۹۰، ۱۳۸۹) ۵۸ ژنوتیپ مارچوبه خوراکی بومی طالقان را مورد ارزیابی مورفولوژیک و ۳۴ ژنوتیپ از آن‌ها را مورد ارزیابی مولکولی رپید (RAPD)[8] قرار داد. در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شامل ۱۹ بوته ماده (۶۹ /۲۹درصد) و ۴۵ بوته نر (۷۰/۳۱ درصد) بودند. از ۱۸ آغازگر مورد استفاده در ۳۴ ژنوتیپ (ژنوتیپ‌های بومی طالقان، گونه *A. persicus* و رقم ماری واشنگتن) ۱۷۵ قطعه دی‌ان‌آ تکثیر شد، از بین آن‌ها ۱۶۰ قطعه چند شکل (۹۱/۴ درصد) و باقی مانده آن‌ها (۱۵ قطعه) تک شکل بودند. بیش‌ترین قطعات چند شکل (۱۲ عدد) توسط آغازگر TIBM BB- 12 تولید شد. دندروگرام حاصل از داده‌های RAPD ژنوتیپ‌ها را به هفت زیر گروه تقسیم کرد. تمامی ۲۸ ژنوتیپ بومی طالقان در یک زیر گروه قرار گرفتند. نشانگر RAPD ژنوتیپ‌های طالقان را از گونه *A. persicus* و رقم ماری واشنگتن جدا کرد و در زیر گروه مجزایی قرار داد که بیانگر توانایی روش RAPD در تفکیک گونه‌های جنس *Asparagus* می‌باشد.

*جیانگ* و *سینک*[9] (1994) از نشانگر مولکولی RAPD برای تهیه نقشه ژن پیوستگی[10] در مارچوبه خوراکی (*A. officinalis*) استفاده کردند. از ۲۵۰ آغازگر مورد استفاده ۵۰ باند چند شکل ایجاد شد. *کای* و *جان*[11] (1995) در تحقیقی تنوع صفات مورفولوژیک بوته‌های مارچوبه رشد یافته در مکان‌های مختلف را بررسی کردند و عامل خاک و در معرض نور قرار گرفتن را مرتبط با تنوع در صفات مورفولوژیک دانستند. *ریموندی*[12] و همکاران (2001) بررسی تنوع سوماکلونال مارچوبه خوراکی را توسط نشانگر RAPD و بررسی سیتوژنتیک انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که ۷۷ گیاه ایجاد شده از سه لاین رویانی هیچ‌گونه تنوعی را برای ۱۵۷ آغازگر RAPD نشان ندادند. آن‌ها بیان کردند که احتمالاً تعداد آغازگرهای موردبررسی در تحقیق مذکور برای پوشش ژنوم مارچوبه کافی نبوده است.

*استاجنر*[13] و همکاران (2002) تنوع ژنتیکی گونه‌های اقتصادی مارچوبه را توسط آنالیز اندازه ژنوم و چند شکلی rDNAITS بررسی کردند و نتیجه گرفتند که گونه‌های دو پایه مارچوبه در اروپا از نظر میانگین اندازه ژنوم دو برابر گونه‌های هرمافرودیت آفریقا هستند. آن‌ها با استفاده از تشابه ژنتیکی و سطوح پلوییدی، هیبریداسیون موفقیت‌آمیز بین گونه‌های *A. tenuifolius* و *A. officinalis* و ناتوانی هیبریداسیون میان *A. officinalis* و تعدادی دیگر از گونه‌های مارچوبه را گزارش کردند. *سیکا*[14] و همکاران (2005) تنوع ژنتیکی جمعیت مارچوبه *A. actifolius* را با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی ۲۳

1. Prohense
2. Benson
3. Spear
4. Neeson
5. Dahlgren and Yeo
6.United State Department of Agriculture
7. Mandal
8. Random Amplified Polymorphic DNA
9. Jiang and Sink
10. Linkage map
11. Kay and John
12. Raimondi
13. Stajner
14. Sica

آغازگر مورد استفاده قرار گرفت که در مجموع ۲۲۸ قطعه چند شکل تولید کرد. نتایج حاصله نشان داد که نشانگر مولکولی ISSR ابزار کارآمد برای در تفکیک جمعیت‌های *Asparagus actifolius* است و هم‌چنین بیان‌کننده اهمیت مطالعات ژنتیکی در مورد راهبرد طراحی ژرم‌پلاسم است. *مورینو*[1] و همکاران (2006) آنالیز مولکولی و سطوح پلوئیدی یک توده تتراپلوئید مارچوبه خوراکی بومی اسپانیا را با هدف افزایش عملکرد، حفظ کیفیت و هم‌چنین ارتباط آن با سایر رقم‌های تجاری موجود، توسط نشانگر مولکولی RAPD انجام دادند. با توجه به آنالیز کلاستر مشخص شد که مارچوبه‌های تتراپلویید به خوبی از رقم تجاری مارچوبه متمایز می‌شوند. هم‌چنین نتایج نشان داد که که رقم‌های تتراپلویید و دیپلویید به‌خوبی با استفاده از نشانگر RAPD از یکدیگر جدا شدند.

*گبلر*[2] و همکاران (2007) از نشانگر RAPD برای شناسایی گیاهان نر کامل مارچوبه استفاده کردند. نتایج نشان داد که آغازگر OPB-20 با جنسیت ارتباط دارد و گیاهان نر توسط قطعه تکثیر شده در وزن مولکولی ۷۰۰، جفت بازکامل جدا شدند. *ویجی*[3] و همکاران (2009) تنوع ژنتیکی *Asparagus racemosus* را با استفاده از تکنیک RAPD مورد بررسی قرار دادند. شش آغازگر استفاده شد که چهار آغازگر قطعات تکثیر شده واضح نشان دادند. از مجموع ۷۱ قطعه تکثیر شده ۳۹ قطعه چند شکل بود که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی اندک در بین توده‌های مورد بررسی بود. آنالیز کلاستر بر پایه ضریب دایس توده‌ها را به دو گروه اصلی تقسیم کرد.

*لال*[4] و همکاران (2011) تنوع ژنتیکی پنج گونه مختلف مارچوبه (*A. densiflora*، *A. springeri*، *A. officinalis*، *A. racemosus* و *A. plumosus*) جمع‌آوری شده از هند را با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد ارزیابی قرار دادند. با استفاده از شش آغازگر RAPD، ۲۷۳ قطعه تکثیر شد که از میان آنها ۲۵۸ قطعه چند شکل بود. براساس داده‌های RAPD دندروگرام مربوطه گونه‌های مورد مطالعه را به دو گروه اصلی تقسیم کرد.

با توجه ارزش غذایی و دارویی مارچوبه، کشت‌وکار بسیار محدود در کشور و وجود توده‌های بومی در نقاط مختلف کشور، لزوم شناسایی و مطالعه صفات مورفولوژیکی آن‌ها ضرورت دارد. هدف از انجام این تحقیق تهیه شناسنامه مورفولوژیکی توده‌های مارچوبه خوراکی بومی استان مازندران و مقایسه آن‌ها با رقم تجاری ماری واشنگتن UC350 و *A. persicus* با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگر مولکولی RAPD بود.

## مواد و روش‌ها

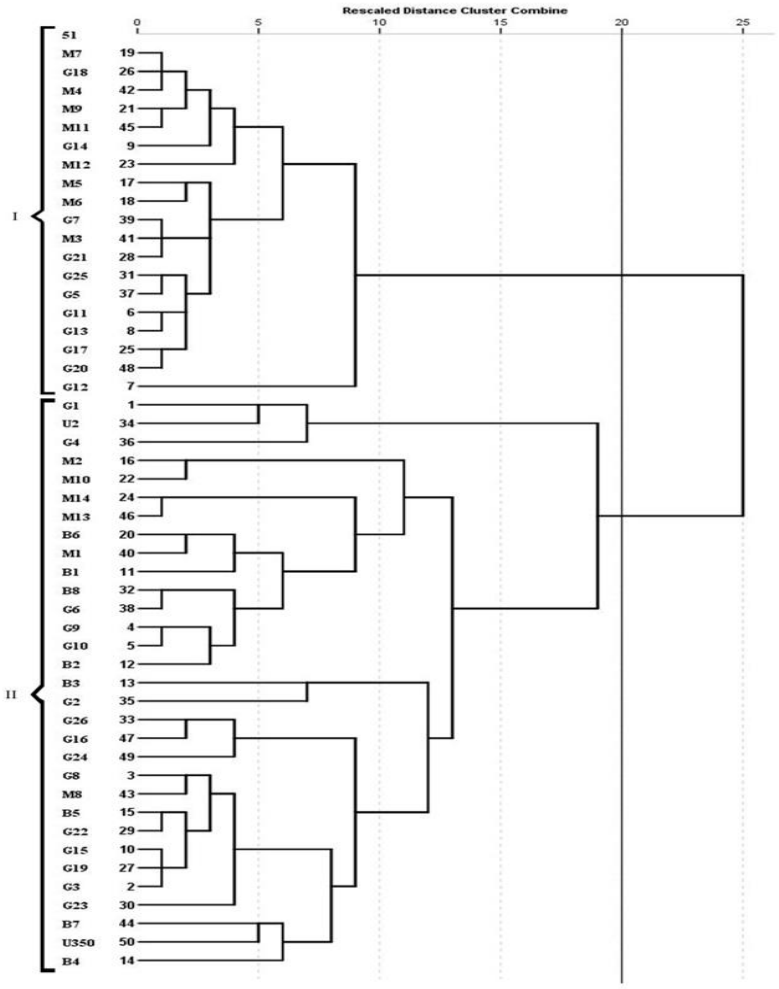
### جمع‌آوری نمونه

چهل و هشت توده مارچوبه از سه منطقه گزنک (۲۶ نمونه)، بلده ۸ (نمونه) و محمودآباد (۱۴ نمونه) جمع‌آوری شد. جدول ۱ مشخصات جغرافیایی و شرایط اقلیمی این مناطق را نشان می‌دهد. هم‌چنین برای مقایسه صفات مورفولوژیکی از رقم تجاری ماری‌واشنگتن (U2 و UC350) جمع‌آوری شده از ساری استفاده شد (جدول ۲).

### ارزیابی صفات مورفولوژیک

بیست و چهار صفت شامل جنسیت، ارتفاع بوته، تعداد کلادود، ارتفاع بوته تا محل اولین انشعاب پانیکولی، تعداد انشعاب درجه یک، تعداد انشعاب درجه دو، فاصله انشعاب درجه یک، فاصله انشعاب درجه دو، قطر ساقه اصلی زیر اولین انشعاب پانیکولی، قطر شاخه درجه یک، قطر شاخه درجه دو، طول شاخه درجه یک، طول شاخه درجه دو، تعداد فلس تا محل اولین انشعاب پانیکولی، طول اسپیر، قطر اسپیر، تعداد فلس روی اسپیر، طول فلس روی اسپیر، عرض فلس روی اسپیر، طول گل، عرض گل، زمان گل‌دهی، تعدادگل بر روی شاخه اصلی، تعداد گل روی شاخه‌های فرعی بودند (*بی‌نام*، 2010). تجزیه همبستگی بین صفات و تجزیه به عامل‌ها توسط نرم‌افزار اس‌پی‌اس‌اسو با استفاده از تکنیک چرخش عامل‌ها[5] و به روش وریماکس[6] انجام شد. آنالیز کلاستر با استفاده از *روش وارد*[7] و محاسبه فواصل پس از استاندارد کردن داده‌ها انجام گرفت.

1. Moreno
2. Gebler
3. Vijay
4. Lal
5. Factor rotation
6. Varimax
7. Ward method




شکل ۱: دندروگرام تجزیه خوشه‌ای حاصل از داده‌های مورفولوژیکی برای توده‌های بومی مازندران به روش وارد (اسامی توده‌ها براساس جدول ۲ می‌باشد)

Fig. 1: Dendrogram of cluster analysis of morphological data for asparagus accessions from Mazandaran using Ward method (Number of accessions is based on Table 2)

**آزمایش RAPD**

در بخش آنالیز مولکولی، ۳۵ توده از مناطق گزنک (۱۹ توده)، بلده (۶ توده) و محمودآباد (۱۰ توده)، یک بوته از رقم ماری‌واشنگتن UC350، یک نمونه از گونه *A. persicus* و یک نمونه *A. officinalis* از منطقه طالقان استفاده گردید. استخراج دی‌ان‌آ[1] ژنومی از نمونه برگی با استفاده از روش *دویل و دویل*[2] (1987) تغییر یافته صورت گرفت. تکثیر دی‌ان‌آ ژنومی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر بایوراد (مدل i-cycler) انجام شد. در این آزمایش از ۹۰ آغازگر برای تکثیر استفاده شد و از میان آن‌ها ۱۷ آغازگر که قطعات واضح و قابل ارزیابی تکثیر کردند جهت تکثیر دی‌ان‌آ انتخاب شدند (جدول ۵). براساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه که با استفاده از ضریب جاکارد به‌دست آمده بود، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای با روش *یو پی جی ام آ*[3] و با استفاده از نرم‌افزار ان‌تی‌سیس (نسخه ۲/۰۲) انجام گرفت.

1. DNA
2. Doyle and Doyle
3. Unweighed pair group method with artithamtical average

جدول ۱: موقعیت جغرافیایی و شرایط اقلیمی مناطق جمع‌آوری توده‌های مارچوبه بومی مازندران

Table 1: Geoghraphical situation and climate conditions of regions gathered asparagus accession from Mazandaran

| مناطق مورد بررسی Studied regions | کد نوده Accession code | ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude (m) | طول جغرافیایی (درجه- دقیقه) Longitude (Degree-minute) | عرض جغرافیایی (درجه- دقیقه) Latitude (Degree-minute) | میانگین بارندگی سالانه (میلی‌متر) Annual precipitation (mm) | حداکثر دمای مطلق سالیانه (درجه سانتی‌گراد) Annual maximum Absolute temperature (°C) | حداقل دمای مطلق سالیانه (سانتی‌گراد) Annual minimum Absolute temperature (°C) | میانگین دمای سالیانه (سانتی‌گراد) Annual mean temperature (°C) | رطوبت نسبی (درصد) Ralative humidity (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| گزنک Gazanak | G | 1643 | 52-12 | 36-53 | 578 | 36 | -25 | 21.7 | 64 |
| بلده Baladeh | B | 1665 | 52-4 | 36-11 | 205 | 34 | -16 | 9.8 | 56 |
| محمودآباد Mahmoudabad | M | 10 | 52-21 | 36-25 | 1088 | 37.5 | -1 | 15.5 | 74 |

جدول ۲: فهرست توده‌های بررسی شده مارچوبه بومی مازندران

Fig. 2: List of studied accessions of asparagus from Mazandaran

| منطقه جمع‌آوری Region of collection | گونه Species | شماره توده‌های مورد بررسی No. of studied accessions |
|---|---|---|
| گزنک Gazanak | *A. officinalis* (وحشی) *A. officinalis* (wild) | G1……G26 |
| بلده Baladeh | *A. officinalis* (وحشی) *A. officinalis* (wild) | B1…...B8 |
| محمودآباد Mahmoudabad | *A. officinalis* (وحشی) *A. officinalis* (wild) | M1…..M14 |
| ساری Sari | *A. officinalis* (اهلی) *A. officinalis* (domestic) | U350, U2 |

جدول ۳: همبستگی صفات مورفولوژیکی توده‌های مارچوبه بومی مازندران

Table 3: Correlation of morphological traits of asparagus accessions from Mazandaran

| F | Nfd | Nfm | Df | Lf | Dbs | Lbs | Bs | Ds | Ls | Ns | Hbp | L2 | L1 | D2 | D1 | Dp | R2 | R1 | n2 | n1 | hp | h | Cn | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | Cn |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 0.32 | h |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 0.30* | 0.62 | hp |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | -0.07 | 0.50** | -0.32 | n1 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 0.64** | 0.08 | 0.47** | 0.24 | n2 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 0.01 | 0.04 | 0.13 | 0.18 | -0.14 | R1 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 0.80** | -0.15 | 0.03 | 0.14 | 0.11 | -0.15 | R2 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | -0.09 | -0.03 | 0.16 | 0.18 | -0.10 | 0.47** | -0.08 | Dp |
| | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 0.52** | -0.06 | 0.01 | 0.23 | 0.02 | 0.15 | 0.60** | 0.29* | D1 |
| | | | | | | | | | | | | | | 1 | 0.21 | 0.10 | 0.04 | 0.05 | -0.21 | -0.35 | 0.04 | 0.11 | -0.08 | D2 |
| | | | | | | | | | | | | | 1 | -0.11 | 0.17 | 0.03 | -0.03 | -0.12 | 0.28 | 0.10 | 0.19 | 0.23 | 0.30* | L1 |
| | | | | | | | | | | | | 1 | 0.91** | -0.07 | 0.23 | 0.12 | 0.16 | 0.27 | 0.22 | 0.07 | 0.09 | 0.24 | 0.32* | L2 |
| | | | | | | | | | | | 1 | 0.21 | 0.26 | -0.14 | 0.33* | -0.14 | 0.03 | -0.05 | 0.13 | 0.11 | 0.65** | 0.35** | 0.07 | Hbp |
| | | | | | | | | | | 1 | -0.06 | 0.18 | 0.24 | -0.06 | 0.02 | -0.12 | -0.03 | -0.09 | 0.16 | -0.04 | 0.05 | 0.02- | 0.08 | Ns |
| | | | | | | | | | 1 | -0.17 | 0.18 | -0.03 | 0.01 | 0.03 | 0.41** | 0.11 | 0.08 | 0.14 | 0.13 | 0.12 | -0.12 | 0.16 | 0.01 | Ls |
| | | | | | | | | 1 | -0.07 | -0.08 | 0.09 | -0.08 | -0.15 | 0.03 | 0.32* | 0.53** | -0.10 | 0.14 | 0.15 | -0.01 | 0.20 | 0.21 | -0.08 | Ds |
| | | | | | | | 1 | 0.02 | 0.60** | -0.12 | 0.23 | 0.02 | 0.03 | -0.07 | 0.27 | 0.21 | 0.02 | 0.01 | 0.14 | 0.38** | -0.04 | 0.33* | -0.17 | Bs |
| | | | | | | 1 | 0.17 | 0.12 | 0.37** | 0.05 | 0.01 | 0.06 | 0.02 | 0.24 | 0.22 | 0.33* | 0.04 | 0.01 | 0.16 | 0.11 | 0.06 | 0.10 | -0.10 | Lbs |
| | | | | | 1 | 0.20 | -0.01 | 0.95** | -0.11 | -0.02 | 0.11 | -0.08 | -0.11 | 0.04 | 0.30* | 0.52** | -0.02 | -0.07 | 0.17 | 0.04 | 0.26 | 0.24 | -0.06 | Dbs |
| | | | | 1 | 0.16 | 0.23 | 0.07 | 0.17 | -0.10 | 0.15 | 0.15 | 0.11 | 0.06 | -0.05 | 0.19 | 0.25 | -0.26 | -0.16 | 0.43** | 0.24 | 0.06 | 0.12 | -0.10 | Lf |
| | | | 1 | 0.63** | 0.33* | 0.41 | 0.25 | 0.36 | 0.06 | 0.25 | 0.16 | 0.12 | 0.09 | -0.04 | 0.24 | 0.31 | -0.10 | 0 | 0.41** | 0.27 | 0.21 | 0.31* | -0.10 | Df |
| | | 1 | 0.21 | 0.32* | -0.01 | 0.01 | 0.27 | 0.02 | -0.07 | -0.04 | -0.14 | 0.24 | 0.14 | -0.05 | -0.02 | 0.44** | -0.08 | -0.04 | 0.07 | 0.38** | 0.12- | 0.19 | -0.32* | Nfm |
| | 1 | 0.41** | 0.14 | 0.21 | 0.07 | -0.07 | 0.14 | -0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.06 | 0.16 | 0.26 | -0.02 | 0.23 | 0.30** | 0.18 | 0.12 | 0.39** | 0.42** | 0.01 | 0.48** | -0.01 | Nfd |
| 1 | -0.07 | -0.01 | 0.01 | 0.17 | -0.11 | 0.19 | -0.06 | 0.02- | 0.27 | 0.21 | -0.13 | -0.14 | -0.15 | 0 | 0.17 | 0.16 | -0.06 | 0.02 | 0.07 | -0.10 | 0.23- | -0.11 | -0.13 | F |

**: r = 1%, *: r =5%

Cn: تعداد کلادود، h: ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، hp: ارتفاع تا محل اولین انشعاب پانیکولی (سانتی‌متر)، n1: تعداد انشعاب درجه یک، n2: تعدادانشعاب درجه دو، R1: فاصله شاخه درجه یک (سانتی‌متر)، R2: فاصله شاخه درجه دو (سانتی‌متر)، Dp: قطر ساقه اصلی زیر محل اولین انشعاب پانیکولی (سانتی‌متر)، D1: قطر شاخه درجه یک (سانتی‌متر)، D2: قطر شاخه درجه دو (سانتی‌متر)، L1: طول شاخه درجه یک (سانتی‌متر)، L2: طول شاخه درجه دو (سانتی‌متر)، Hbp: تعداد فلس تا محل اولین انشعاب پانیکولی، Ns: تعداد اسپیر، Ls: طول اسپیر (سانتی‌متر)، Ds: قطر اسپیر (سانتی‌متر)، Bs: تعداد فلس روی اسپیر، Lsb: طول فلس روی اسپیر (سانتی‌متر)، Dsb: عرض فلس روی اسپیر (سانتی‌متر)، Lf: طول گل (سانتی‌متر)، Df: عرض گل (سانتی‌متر)، Nfm: تعداد گل در ساقه اصلی، Nfd: تعداد گل در شاخه‌های فرعی، F: زمان گل‌دهی

Cn: Cladode number, h: Plant height (cm), hp: Height to frist panicule branch (cm), n1: Branch number 1, n2: Branch number 2, R1: Distance to branch number 1 (cm), R2: Distance to branch number 2 (cm), Dp: Diameter of the main stem below the first panicule branch (cm), D1: Shoot diameter number 1 (cm), D2: Shoot diameter number 2 (cm), L1: Shoot length number 1 (cm), L2: Shoot length number 2 (cm), Hbp: Scale number to the first panicule branch, Ns: Spear number, Ls: Spear length, Ds: Spear diameter (cm), Bs: Scale number on spear, Lsb: Scale length on spear (cm), Dsb: Scale width on spear (cm), Lf: Flower length (cm), Df: Flower width (cm), Nfm: Flower number on main stem, Nfd: Flower number in lateral stem, F: Flowering time

جدول ۴: نتایج تجزیه به عامل‌ها، درصد واریانس تجمعی و مقادیر ویژه با استفاده از تکنیک چرخش عامل‌ها به روش وریماکس

Table 4: Results of factor analysis, cumulative variance percentage, and Eigin values using factor rotation with Varimax method

| 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | عامل‌ها<br>Eigen vectors |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 80.13 | 72.49 | 64.42 | 56.34 | 47.96 | 39.25 | 30.19 | 21.11 | 11.65 | درصد واریانس تجمعی<br>Cumulative proportion of variation (%) |
| 1.83 | 1.93 | 1.93 | 2.011 | 2.062 | 2.174 | 2.17 | 2.27 | 2.79 | مقادیر ویژه<br>Eigen values |
| | | | | | | | | | صفات<br>Traits |
| | | | | | | | | 0.93 | عرض فلس روی اسپیر<br>Width of spear scale |
| | | | | | | | | 0.92 | قطر اسپیر<br>Spear diameter |
| | | | | | | | | 0.64 | قطر ساقه زیر انشعاب پانیکولی<br>Stem diameter under panicule branch |
| | | | | | | | 0.92 | | طول شاخه درجه دو<br>Branch no. 2 lenght |
| | | | | | | | 0.91 | | طول شاخه درجه یک<br>Branch no. 1 lenght |
| | | | | | | 0.89 | | | طول اسپیر<br>Spear lenght |
| | | | | | | 0.74 | | | تعداد فلس روی اسپیر<br>Scale no. on spear |
| | | | | | | 0.58 | | | طول فلس روی اسپیر<br>Scale length on spear |
| | | | | | 0.83 | | | | انشعاب درجه یک<br>Branch no. 1 |
| 80.13 | 72.49 | 64.42 | 56.34 | 47.96 | 39.25 | 30.19 | 21.11 | 11.65 | درصد واریانس تجمعی<br>Cumulative proportion of variation (%) |
| 1.83 | 1.93 | 1.93 | 2.011 | 2.062 | 2.174 | 2.17 | 2.27 | 2.79 | مقادیر ویژه<br>Eigen values |
| | | | | | | | | | صفات<br>Traits |
| | | | | -0.68 | | | | | قطر شاخه درجه دو<br>Diameter of Branch no. 2 |
| | | | 0.92 | | | | | | فاصله شاخه درجه دو<br>Distance to branch no. 2 |
| | | | 0.90 | | | | | | فاصله شاخه درجه یک<br>Distance to branch no. 1 |
| | | 0.90 | | | | | | | تعداد فلس زیر اولین انشعاب پانیکولی<br>Scale no. below first panicule branch |
| | | 0.84 | | | | | | | ارتفاع تا محل انشعاب پانیکولی<br>Height to panicule branch |
| | 0.66 | | | | | | | | تعداد اسپیر<br>Spear no. |
| | 0.64 | | | | | | | | طول گل<br>Flower lenght |
| | 0.62 | | | | | | | | عرض گل<br>Flower width |
| 0.81 | | | | | | | | | تعداد گل در ساقه اصلی<br>Flower no. in main stem |
| -0.73 | | | | | | | | | تعداد کلادود<br>Cladode no. |

جدول ۵: آغازگرهای مورد استفاده و قطعات تکثیر شده در آزمایش RAPD توده‌های مارچوبه بومی مازندران
Table 5: Used primers and replicated segments in RAPD analysis of asparagus accessions from Mazandaran

| شماره No. | آغازگر Primer | توالی Sequence | تعداد قطعه Segment number | تعداد قطعه چندشکل Polymorphism segment number | چند شکلی(درصد) Polymorphism (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | TIBM BA03 | GTGCGAGAC | 7 | 6 | 85.7 |
| 2 | TIBM BA16 | CCACGCATCA | 4 | 4 | 100 |
| 3 | TIBM BB05 | GGGCCGAACA | 9 | 9 | 100 |
| 4 | TIBM BB07 | GAAGGCTGGG | 5 | 5 | 100 |
| 5 | TIBM BC10 | AACGTCGAGG | 8 | 8 | 100 |
| 6 | TIBM BC14 | GGTCCGACGA | 6 | 8 | 100 |
| 7 | TIBM BD05 | GTGCGGAGAG | 6 | 6 | 100 |
| 8 | TIBM BD07 | TGTGCCTGAC | 5 | 5 | 100 |
| 9 | TIBM BE06 | AAGCGGCCCT | 6 | 6 | 100 |
| 10 | TIBM BE08 | GGGAAGCGT | 10 | 10 | 100 |
| 11 | TIBM BE10 | GGGTAACGCC | 4 | 4 | 100 |
| 12 | TIBM BE16 | CTCCACGACT | 5 | 5 | 100 |
| 13 | TIBM BE19 | AGGCCAACAG | 6 | 6 | 100 |
| 14 | TIBM BE20 | CAAAGGCGTG | 6 | 5 | 83.3 |
| 15 | OPC13 | AAGCCTCGTC | 5 | 5 | 100 |
| 16 | OPE 17 | CTACTGCCGT | 6 | 6 | 100 |
| 17 | OPG12 | CAGCTCACGA | 4 | 4 | 100 |
| کل Total | - | - | 104 | 102 | - |
| میانگین Mean | – | – | 6.11 | 6 | 98.11 |

## نتایج و بحث

### ارزیابی صفات مورفولوژیک

با بازدید از استان مازندران، گونه *A. officinalis* در سه منطقه گزنک، بلده و محمودآباد شناسایی شد. منطقه نمونه‌برداری گزنک بزرگ‌ترین منطقه از نظر وسعت و تعداد بوته بود و بیش‌ترین توده‌های نمونه‌برداری شده برای ارزیابی صفات مورفولوژیک و مولکولی متعلق به این منطقه بود. توده‌های بومی این منطقه از اوایل اردیبهشت تا اواسط خرداد به گل رفتند. تعداد کاسبرگ و گلبرگ و پرچم در همه توده‌ها شش عدد بود و تعداد بذر در میوه بین سه تا۱۰ عدد متغیر بود. رنگ گل در ابتدای گل‌دهی سبز رنگ بود و با بالغ شدن گل رنگ آن به ارغوانی تغییر یافت. در تمام توده‌ها گل‌های نر کشیده و عموماً آویزان بودند که در مورد توده‌های منطقه گزنک این مورد محسوس‌تر بود. رنگ اسپیرهای خارج شده از خاک در تمامی توده‌ها سبز و فلس‌های روی اسپیر فشرده و به رنگ ارغوانی بود. در رقم ماری واشنگتن UC350 تعداد کلادودها هشت عدد و رنگ اسپیر آن ارغوانی بود. از نظر جنسیت توده‌های مارچوبه بومی مورد بررسی در این تحقیق ۶۸ درصد را گیاهان نر و ۳۲ درصد را گیاهان ماده تشکیل دادند.

صفات تعداد انشعاب درجه دو (۷۸ در برابر ۲۶۰)، قطر شاخه درجه یک (۰/۱۵ سانتی‌متر در برابر ۰/۲۵ سانتی‌متر)، قطر شاخه درجه دو (۰/۰۸ سانتی‌متر در برابر ۰/۱۳ سانتی‌متر)، تعداد اسپیر (۱/۲ در برابر ۲)، قطر اسپیر (۰/۳۹ سانتی‌متر در برابر ۰/۵۶ سانتی‌متر)، طول فلس روی اسپیر

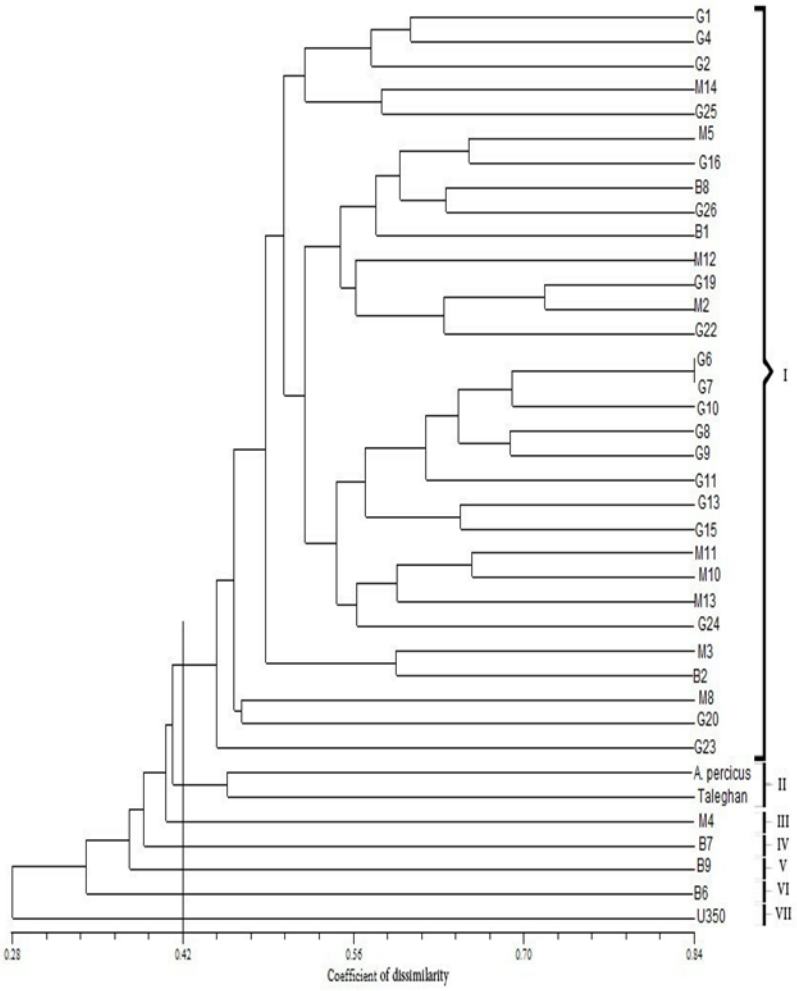
(۰/۸۷ سانتی‌متر در برابر ۱/۲ سانتی‌متر)، عرض فلس روی اسپیر (۰/۳۴ سانتی‌متر در برابر ۵۴/ سانتی‌متر)، طول گل (۰/۵۲ سانتی‌متر در برابر ۹۳/ سانتی‌متر)، عرض گل (۰/۲ سانتی‌متر در برابر ۰/۳۶ سانتی‌متر) در توده‌های بومی مازندران نسبت به رقم ماری واشنگتن UC350 کمتر بودند. *سرابی* و همکاران (2010) با مقایسه مورفولوژی رقم ماری واشنگتن و توده‌های بومی طالقان به نتایج مشابه در صفات قطر اسپیر، طول و عرض فلس روی اسپیر دست یافتند. در توده‌های بومی سه منطقه مورد مطالعه صفات تعداد گل روی شاخه‌های فرعی (۸۸/۳۰)، قطر شاخه درجه دو (۷۷/۳۲)، تعداد شاخه درجه دو (۶۹/۶۸)، طول اسپیر (۶۵/۹۷)، تعداد گل روی شاخه اصلی (۵۴/۴۱)، ارتفاع تا اولین محل انشعاب پانیکولی (۵۲/۵۸)، بالاترین ضریب تغییرات را داشتند. بیش‌ترین ضریب تغییرات در رقم ماری واشنگتنUC350 شامل صفات تعداد گل در شاخه‌های فرعی، فاصله شاخه درجه یک و تعداد انشعاب درجه دو بود. بیش‌ترین درصد ضریب تغییرات در کلیه توده‌ها مربوط به صفت تعداد گل روی شاخه‌های ثانوی بود، که بیش‌ترین مقدار آن (۹۰ درصد) مربوط به توده‌های منطقه محمودآباد بود. در صفات زایشی بوته‌های نر نسبت به بوته‌های ماده از کمیت بیشتری برخوردار بودند. در بین توده‌های مورد بررسی میانگین تعداد گل در بوته در بوته‌های نر تقریباً دو برابر بوته‌های ماده بود. با توجه به این‌که بوته‌های نر انرژی برای تولید میوه صرف نمی‌کنند، بنابراین تعداد گل‌های بیشتر در بوته‌های نر امری طبیعی به‌نظر می‌رسد. قبلاً نیز گزارش شده بود که تعداد گل در پایه‌های نر مارچوبه نسبت به پایه‌های ماده بیشتر هستند (*پروهنز* و همکاران، 2008).

کمیت صفات رویشی بوته‌های ماده نسبت به بوته‌های نر بیشتر بود، فقط ارتفاع اسپیر بوته‌های نر نسبت به بوته‌های ماده بیشتر بود. حداکثر قطر اسپیر در توده‌های بومی مورد بررسی ۱/۱ سانتی‌متر بود که متعلق به بوته‌هایی با جنسیت ماده بود. این درحالی است که در رقم‌های تجاری حداقل مقدار این صفت برای حفظ کیفیت ۱/۲ سانتی‌متر در رقم‌های تمام نر هیبرید است (*نافلوسکی*[1] و همکاران، 2001).

## تجزیه همبستگی

تجزیه همبستگی (جدول ۳) بین صفات کمی با استفاده از ضریب پیرسن[2] نشان داد عرض فلس روی اسپیر با قطر اسپیر (r= ۰/۹۵) همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت، البته این همبستگی قابل انتظار بود زیرا در اکثر توده‌ها فلس روی اسپیر اندازه‌ای تقریباً برابر با قطر اسپیر داشت. تعداد فلس اسپیر با طول اسپیر (r= ۰/۶۰) در سطح ۹۹ درصد همبستگی مثبت نشان داد. لازم به ذکر است که سرابی و همکاران (۱۳۸۹) با مطالعه صفات مورفولوژیکی مارچوبه بومی طالقان و رقم ماری واشنگتن، به ضریب همبستگی (r= ۰/۷۲) در صفات قطر اسپیر و عرض فلس روی اسپیر دست یافتند، که در این مطالعه مقدار آن r= ۰/۹۵ بود. طول گل با عرض گل (r= ۰/۶۲) در سطح ۹۵ درصد و قطر ساقه زیر اولین محل انشعاب پانیکولی با ارتفاع گیاه (r= ۰/۴۷) در سطح ۹۹ همبستگی مثبت داشتند. این نتیجه با نتایج *ماچون*[3] و همکاران (1995) تطابق داشت. در تحقیق سرابی و همکاران (۱۳۸۹) صفات طول و عرض فلس روی اسپیر بیش‌ترین همبستگی را داشتند (r= ۰/۹۲)، درحالی‌که در این مطالعه میزان همبستگی این دو صفت برابر ۰/۲۰ و معنی‌دار نبود. قطر شاخه درجه دو با تعداد انشعاب درجه یک (r= -۰/۳۵)، تعداد کلادود با تعداد گل بر روی شاخه اصلی (r= -۰/۳۲)، بالاترین همبستگی منفی را در سطح ۹۵ درصد داشتند.

1. Knaflewski
2. Pearson
3. Machon




شکل ۲: دندروگرام مربوط به داده‌های حاصل از نشانگر RAPD توده‌های مارچوبه بومی مازندران براساس ضریب تشابه جاکارد و گروه‌بندی یوپی‌جی‌ام‌آ (اسامی توده‌ها براساس جدول ۲ می‌باشد)

Fig. 2: Dendrogram of RAPD molecular data of *Asparagus* accessions from Mazandaran based on Jaccard coefficient similarity and UPGMA (Number of accessions is based on Table 2)

**تجزیه به عامل‌ها**

در تجزیه به عامل‌ها نه عامل اصلی و مستقل که مقادیر ویژه آن‌ها بیشتر از یک بودند، توانستند در مجموع ۸۰/۳۵ درصد کل واریانس را توجیه کنند (جدول ۴). عامل اول شامل قطر ساقه اصلی زیر محل اولین انشعاب پانیکولی، قطر اسپیر، عرض فلس روی اسپیر با ضرایب مثبت (به‌ترتیب با ضرایب عاملی ۰/۶۷، ۰/۹۲، ۰/۹۳) بالاتر از بقیه قرار گرفتند و در مجموع ۱۱/۶۵ درصد واریانس کل را توجیه کردند. عامل دوم شامل طول شاخه درجه یک و طول شاخه درجه دو با ضرایب عاملی ۰/۹۱ و ۰/۹۳ بود و مقدار ۹/۴۵ درصد واریانس کل را توجیه کرد. عامل سوم شامل طول اسپیر، تعداد فلس روی اسپیر و طول فلس روی اسپیر با ضرایب مثبت عاملی به‌ترتیب ۰/۸۹، ۰/۷۴ و ۰/۵۸بود و مقدار ۹/۰۸ درصد واریانس کل را توجیه کرد. عامل چهارم شامل تعداد انشعاب درجه یک و تعداد انشعاب درجه دو با ضرایب مثبت عاملی ۰/۸۳ و ۰/۶۶ بود و مقدار ۹/۰۵ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. عامل پنجم شامل ارتفاع بوته، قطر شاخه درجه یک، قطر شاخه درجه دو، تعداد گل در انشعابات فرعی به‌ترتیب با ضرایب عاملی ۰/۶۲، ۰/۶۷، ۰/۶۸، ۰/۶۷ بود و ۸/۷۱ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. عامل ششم شامل فاصله شاخه درجه یک و فاصله شاخه درجه دو با ضرایب عاملی ۰/۹۰ و ۰/۹۲ بود و ۸/۳۸ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. عامل هفتم شامل ارتفاع ساقه تا محل اولین انشعاب پانیکولی و تعداد فلس زیر محل اولین انشعاب پانیکولی با ضرایب عاملی ۰/۸۴ و ۰/۹۰ بود و مقدار ۸/۰۷ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. عامل هشتم شامل تعداد اسپیر، طول گل و عرض گل با ضرایب عاملی به‌ترتیب ۰/۶۶، ۰/۶۴، ۰/۶۲ بود و ۸/۰۶ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. عامل نهم و آخرین عامل شامل تعداد کلادود و تعداد گل در ساقه اصلی با ضرایب عاملی ۰/۷۳-، ۰/۸۱ بود و توانست ۷/۶۴ درصد از واریانس کل را توجیه کند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از تجزیه عامل‌ها صفات مورد بررسی (۲۴ صفت) به نه عامل اصلی تقسیم شد. عامل اول تفاوت بیشتری با سایر عامل‌ها داشت، اما تفاوت عامل‌ها با یکدیگر آنقدر زیاد نبود که بتوان آن‌ها را از سایر عامل‌ها جدا کرد، هم‌چنین تعداد صفات در عامل‌ها کم بود (تقریباً سه صفت در هر عامل). بنابراین برای بررسی مورفولوژیک گیاه نمی‌توان به چند صفت خاص در عامل‌های اول تا سوم اکتفا کرد، شایان ذکر است که صفات قطر اسپیر و عرض فلس روی اسپیر ازجمله صفاتی بودند که در عامل اول قرار گرفتند و اندازه‌گیری آن‌ها حائز اهمیت است. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه به عامل‌ها در تحقیق سرابی و همکاران (۱۳۸۹) بر روی مارچوبه‌های بومی طالقان و نتایج حاصل از این مطالعه، صفات تعداد انشعاب درجه یک، تعداد انشعاب درجه دو، طول شاخه درجه یک، طول شاخه درجه دو، تعداد فلس روی اسپیر، قطر اسپیر، عرض فلس روی اسپیر، طول فلس اسپیر و طول اسپیر بیش‌ترین سهم از واریانس کل را به خود اختصاص دادند.

### تجزیه کلاستر

تجزیه کلاستر براساس نه عامل اصلی که بیش‌ترین توجیه واریانس را بین صفات داشتند انجام گرفت (شکل ۱). در فاصله ۲۰، توده‌ها به دو گروه اصلی تقسیم شدند. علت انتخاب این محل قرار گرفتن دو نمونه متعلق به رقم اصلاح شده ماری واشنگتن در گروه دوم بود. گروه اول شامل ۱۹ توده بود. یازده توده متعلق به منطقه گزنک و هشت توده متعلق به منطقه محمودآباد در این گروه قرار گرفتند. گروه دوم شامل ۳۱ توده بود که ۱۵ توده متعلق به منطقه گزنک، هشت توده متعلق به منطقه بلده، شش توده متعلق به منطقه محمودآباد و دو نمونه متعلق به رقم تجاری ماری واشنگتن (U2, UC350) بود.

در تجزیه کلاستر (شکل ۱) تمام توده‌های متعلق به منطقه بلده در گروه دوم قرار گرفتند. میزان دمای سالیانه در این منطقه نه درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۱) و برای رشدونمو مارچوبه منطقه سردی بود. بنابراین در این منطقه امکان کاهش جریان ژنی وجود داشت.

در اکثر بوته‌های ماده منطقه محمودآباد نسبت به دو منطقه دیگر تعداد میوه کمتری مشاهده شد که احتمال گرده‌افشانی ناقص را در این منطقه افزایش می‌دهد. توده‌های منطقه گزنک در صفات مختلف تفاوت کمتری با یکدیگر داشتند. منطقه محمودآباد، منطقه سه ساحلی بود و احتمالاً شرایط آب و هوای مرطوب و وزش بادهای شدید مانع از گرده‌افشانی مناسب شده است. البته این احتمال داده می‌شود که در این شرایط گرده‌افشانی توسط باد انجام شود، ولی ساختار گل در مارچوبه این احتمال را کم می‌کند (پروهنز و همکاران، 2008).

### آزمایش RAPD

هفده آغازگر مورد استفاده، ۱۰۴ قطعه دی‌ان‌آ تکثیر کردند. از میان قطعات تکثیر شده ۱۰۲ قطعه در دو یا چند توده چند شکل و یک قطعه در تمام توده‌ها یک شکل بود. این نتایج نشان‌دهنده میزان بالای چند شکلی بود (۹۸/۱۱ درصد). بنابراین انتظار می‌رود تنوع زیادی بین توده‌ها وجود داشته باشد. بیش‌ترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگر TIBM BE08 با تکثیر ۱۰ قطعه دی‌ان‌آ بود و کم‌ترین مربوط به آغازگرهای BE10، OPG12 و BE16 با تکثیر چهار قطعه دی‌ان‌آ بود، هم‌چنین میانگین قطعات تکثیر شده برابر ۶/۱۱ قطعه به ازای هر آغازگر بود (جدول ۵). ضریب کوفنیتیکی بین ماتریس تشابه و دندروگرام مربوطه r= ۰/۸۴ به‌دست آمد. نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که بیش‌ترین میزان شباهت مربوط به دو توده بومی G6 و G7 منطقه گزنک با میزان شباهت (۰/۸۴) و کم‌ترین تشابه (۰/۱۷) مربوط به توده G23 مربوط به منطقه گزنک و رقم ماری واشنگتن UC350 بود. میانگین میزان تشابه در بین توده‌های مناطق گزنک، بلده، محمودآباد به‌ترتیب ۰/۴۳، ۰/۵۱ و ۰/۴۷ بود. هم‌چنین میانگین میزان تشابه بین کل توده‌های بومی مورد مطالعه ۰/۴۵ بود.

### تجزیه کلاستر

با قطع دندروگرام در میزان تشابه ۰/۴۲توده‌ها به هفت گروه تقسیم شدند (شکل ۲). علت انتخاب این محل قرار گرفتن نمونه متعلق به رقم اصلاح شده ماری واشنگتن در گروه مستقل و جدا از سایر نمونه‌های مورد مطالعه بود. گروه یک شامل ۳۱ توده بود که ۱۹ توده متعلق به منطقه گزنک، سه توده متعلق به منطقه بلده و نه توده متعلق به منطقه محمودآباد بودند. تمام توده‌های منطقه گزنک در این گروه قرار گرفتند و بیش‌ترین میزان تشابه در بین توده‌های G6 و G7 با میزان تشابه ۰/۸۴ بود، هر دو توده مذکور جنسیت ماده داشتند و بوته‌های نزدیک به هم از جهت فاصله مکانی بودند، هم‌چنین از نظر صفات مورفولوژیکی، بخصوص صفات زایشی مورفولوژیکی، قرابت زیادی با یکدیگر داشتند. بین توده‌های G7 و G8 و هم‌چنین G7 و G10 میزان تشابه ۰/۷۱ مشاهده شد. این احتمال وجود دارد که که توده‌های مذکور نتاج یک والد اولیه باشند. علاوه‌بر توده‌های منطقه گزنک، نه توده از منطقه محمودآباد در این زیر گروه قرار داشت. توده‌های M2 و

M5 با شباهت ۰/۶۷ بیش‌ترین میزان شباهت را در بین توده‌های منطقه محمودآباد داشتند. از منطقه بلده نیز سه توده در این زیر گروه جای گرفتند (B1، B2، B8). هر سه توده دارای جنسیت نر بودند و حداکثر میزان شباهت بین این سه توده مربوط به توده‌های B1 و B8 با یکدیگر بود، هم‌چنین مشابهت صفات مورفولوژیک در توده‌های B1 و B8 بیشتر بود، علی‌رغم این‌که فاصله جغرافیایی توده B2 با توده B1 کمتر بود. میزان شباهت توده B1 و B2 مقدار ۰/۴۸ و میزان شباهت توده‌های B1 و B8، ۰/۶۳ بود، هم‌چنین میزان شباهت توده‌های B2 و B8، ۰/۵۵ بود. گروه دوم شامل توده طالقان و *A. persicus* بود. میزان شباهت آن‌ها با یکدیگر ۰/۴۵ بود. در تحقیقی که توسط سرابی و همکاران (2010،۱۳۹۰) بر روی توده‌های طالقان و *A. persicus* انجام پذیرفت، میانگین میزان تشابه ۰/۳۷ بود و حداکثر میزان تشابه بین توده ۲۱ طالقان و *A. persicus*، ۰/۴۳ بود. نتایج آن مطالعه و نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، موید میزان شباهت اندک توده‌های بومی طالقان و *A. persicus* بود. گروه سوم شامل توده M4 از منطقه محمودآباد بود. این توده دارای جنسیت نر بوده و بیش‌ترین میزان تشابه آن با توده M13 با مقدار ۰/۵۲ بود. این دو توده متعلق به منطقه محمودآباد بودند و منطقه جمع‌آوری این دو توده نزدیک یکدیگر بود. گروه چهارم شامل توده B7 از منطقه بلده بود. جنسیت این توده ماده بود و دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی از لحاظ مورفولوژیکی مانند عدم وجود گل در ساقه اصلی، ارتفاع بسیار زیاد (۲۱۰ سانتی‌متر) و بیش‌ترین طول کلادود (۶ سانتی‌متر) در کل توده‌های مورد بررسی بود و این احتمال وجود دارد که این توده یک گونه متفاوت از مارچوبه خوراکی باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد. گروه پنجم شامل توده B9 بود که در منطقه بلده واقع شده بود. جنسیت این بوته نر بود. گروه ششم شامل توده B6 متعلق به منطقه بلده بود. این توده دارای جنسیت نر بود و بیش‌ترین میزان تشابه آن با توده G20 با مقدار ۰/۴۵بود. این تشابه نشان‌دهنده وجود جریان ژنی در دو منطقه گزنک و محمودآباد بود. گروه هفتم شامل رقم ماری واشنگتن UC350 بود. میانگین میزان شباهت رقم ماری واشنگتن UC350 با تمام توده‌های مورد بررسی ۰/۲۸ بود، که نشان‌دهنده شباهت بسیار کم این رقم با سایر توده‌ها بود، هم‌چنین مؤید توانایی نشانگر مولکولی RAPD در تفکیک رقم تجاری مارچوبه از توده‌های مارچوبه بومی ایران است. حداکثر شباهت رقم ماری واشنگتن UC350 با توده‌های G15 و G10 به‌ترتیب ۰/۳۹ و ۰/۳۶ بود. میانگین شباهت *A. persicus* با سایر توده‌های مورد مطالعه ۰/۴۱ بود و حداکثر شباهت را با توده G10 با مقدار ۰/۵۳ داشت، هم‌چنین با توده‌های G11، G24 و G8 به‌ترتیب ۰/۵۱، ۰/۵۱ و ۰/۵۰ شباهت را داشت. هم‌چنین *A. persicus* نسبت به دیگر توده‌ها در زیر گروهی جدا قرار گرفت، که می‌تواند مؤید توانایی نشانگر مولکولی RAPD در تفکیک گونه‌های جنس *Asparagus* باشد. قرار گرفتن توده‌هایی با جنسیت نر و ماده در کنار یکدیگر در دندروگرام (شکل ۲) نشان می‌دهد که نشانگر RAPD توانایی کافی برای تکثیر ژن‌های کدکننده جنسیت را ندارد. البته تعداد کم آغازگر مورد استفاده نیز در این عدم توانایی نقش داشته است. ضریب به‌دست آمده از PCO مقدار ۴۸٪ بود، که بیانگر ناکافی بودن تعداد آغازگرها و قدرت تفکیک آنها در بیان ژنوم گیاه بوده است. با توجه به نتایج حاصل از دندروگرام نشانگر RAPD توانست توده‌های بومی را از رقم ماری واشنگتن UC350 و *A. persicus* و توده بومی طالقان جدا کند (شکل ۲). با این وجود نشانگر RAPD در جدا کردن توده‌های سه منطقه مورد بررسی از یکدیگر کاملاً موفق نبود. البته نشانگر RAPD توانست اکثر توده‌های منطقه گزنک را در کنار یکدیگر قرار دهد و هم‌چنین توده B7 را در گروهی جدا قرار دهد (شکل ۲) و این احتمال که این توده به گونه دیگری تعلق دارد را تقویت کند. علاوه‌بر توده B7 دو توده B6 و B9 نیز در خوشه‌های جداگانه قرار گرفتند. این در حالی است که دو توده مذکور از لحاظ صفات مورفولوژیک در محدوده میانگین این صفات بودند و ویژگی شاخصی نداشتند که آن‌ها را از توده‌های دیگر از نظر مورفولوژیکی جدا کند. بنابراین نشان‌دهنده اهمیت نشانگر مولکولی RAPD در عملکرد مستقل از محیط است. در منطقه گزنک اکثر بوته‌های مارچوبه پراکنشی نزدیک به یکدیگر داشتند و هم‌چنین دمای سالیانه منطقه برای فعالیت حشرات گرده‌افشان مناسب بود (جدول ۱)، بنابراین منطقی است که جریان ژنی مناسبی در این منطقه وجود داشته باشد و تنوع در این منطقه کاهش یابد. با این وجود بیش‌ترین و کم‌ترین تفاوت با رقم ماری واشنگتن در بین توده‌های این منطقه وجود داشت که با فرضیه مطرح شده در ارتباط با یکنواختی ژنتیکی این منطقه منافات دارد. نکته حائز اهمیت در این منطقه سنگلاخی‌بودن این منطقه است که این احتمال وجود دارد که بذرهایی که در اطراف گیاه پراکنده می‌شوند لابه‌لای سنگ‌ها محبوس‌شده و از پراکنش آن‌ها کاسته شود.

نتایج حاصل از بررسی سه منطقه تحت مطالعه در استان مازندران نشان داد که در منطقه گزنک بیش‌ترین تعداد بوته مارچوبه وجود داشت و از لحاظ فاصله مکانی نیز نسبت به دو منطقه دیگر بوته‌ها به هم نزدیک‌تر بودند. بنابراین انتظار می‌رود که در این منطقه بیش‌ترین میزان شباهت وجود داشته

باشد، که نتایج حاصل از بررسی مولکولی توسط نشانگر مولکولی RAPD بر این فرض صحه گذاشت. هم‌چنین توده‌های موجود در این منطقه بیش‌ترین میزان شباهت با رقم ماری واشنگتن UC350 داشتند، به‌طوری‌که میانگین میزان شباهت ماری واشنگتن UC350 با تمام توده‌ها ۰/۲۸ بود و با توده G15 از منطقه گزنک میزان شباهت برابر با ۰/۳۹ بود. نتایج حاصل از بررسی مورفولوژیک نشان داد که میانگین صفات اسپیر در بوته‌های منطقه گزنک نسبت به دو منطقه دیگر به رقم ماری واشنگتن UC350 نزدیک‌تر بود. در منطقه محمودآباد توده‌ها در فاصله حدود ۱۰۰ متری از ساحل پراکنده شده بودند و pH بالای خاک در مناطق ساحلی عامل محدودکننده بود، با این وجود بوته‌های مستقر در این منطقه میانگین ارتفاعی نزدیک به ارتفاع رقم ماری واشنگتن UC350 داشتند و دارای اسپیرهای ارغوانی رنگ با میانگین ارتفاع ۱۱ سانتی‌متر بودند. در منطقه بلده فاصله توده‌ها از یکدیگر نسبت به دو منطقه دیگر بیشتر بود و تعداد بوته‌های این منطقه بسیار کمتر بود. نتایج حاصل از بررسی مولکولی توده B7 متعلق به منطقه بلده را از دیگر توده‌ها جدا کرد و در گروهی مجزا جای داد. همبستگی بین داده‌های RAPD و مورفولوژیک بسیارکم (۱۱- درصد) بود که بیان‌کننده عدم تشابه نتایج آن‌ها می‌باشد، هم‌چنین تأثیرپذیری صفات مورفولوژیکی را از عوامل محیطی نشان می‌دهد. نشانگر RAPD در جداسازی رقم ماری واشنگتن UC350 و *A. persicus* نیز توانا بود و آن‌ها را در گروه‌هایی جدا قرار داد. میانگین میزان شباهت گونه *A. persicus* با کلیه توده‌ها ۰/۴۱ بود و حداکثر میزان شباهت این گونه با توده‌های منطقه گزنک بود. با توجه به نتایج می‌توان اظهار کرد که احتمالاً این توده‌ها از منشأ مشترک به‌وجود آمده باشند. شایان توجه است که میزان شباهت توده طالقان و *A. persicus* مقدار ۰/۳۴ بود که تاییدکننده نتایج تحقیق *سرابی* و همکاران (2010) می‌باشد. بنابراین توده‌های منطقه گزنک بیش‌ترین شباهت را با *A. persicus* و رقم ماری واشنگتن UC350 داشتند. نتایج نشان داد فاصله جغرافیایی گویای تفاوت بین توده‌ها نیست، زیرا در بین توده‌های منطقه گزنک و محمودآباد میزان شباهت ۰/۷۲ نیز وجود داشت و این درحالی است که این دو منطقه بیش‌ترین فاصله جغرافیایی را در بین مناطق مورد بررسی داشتند. در دو منطقه گزنک و بلده در چند توده میزان شباهت بیش از ۰/۶۰ وجود داشت، بنابراین جریان ژنی بین این دو منطقه را نمی‌توان نادیده گرفت. با توجه به دندروگرام حاصل از داده‌های مولکولی مشخص شد که توده‌هایی با جنسیت نر و ماده در کنار یکدیگر قرار گرفتند که نشان‌دهنده عدم توانایی آغازگرهای RAPD در تکثیر ژن‌های کدکننده جنسیت می‌باشد. دامنه تغییرات برخی صفات اندازه‌گیری شده بسیار بالا بود، البته با توجه به اینکه مارچوبه گیاهی دوپایه و دگر گرده‌افشان می‌باشد، تنوع در صفات موردانتظار قابل قبول است و می‌تواند به‌عنوان ویژگی کارآمد درکارهای به‌نژادی مورد استفاده قرار گیرد. همبستگی بین داده‌های RAPD و مورفولوژی ۱۱- درصد بود که بیان‌کننده عدم تشابه نتایج آن‌ها می‌باشد، هم‌چنین تأثیرپذیری صفات مورفولوژیکی را از عوامل محیطی را نشان می‌دهد.

براساس این تحقیق و تحقیقی که توسط *سرابی* و همکاران (2010) روی مارچوبه‌های بومی ایران صورت گرفت صفات طول شاخه درجه یک، طول شاخه درجه دو و تعداد فلس روی اسپیر در تفکیک بهتر توده‌ها از نظر مورفولوژی تأثیر زیادی داشتند. هم‌چنین دامنه تغییرات زیاد برخی صفات اندازه‌گیری شده در این تحقیق و تحقیقی که توسط *سرابی* و همکاران (2010) انجام گرفت می‌تواند در برنامه های بهنژادی مورد استفاده قرار گیرد و تکنیک RAPD به‌عنوان یک ابزار مناسب در تعیین روابط ژنتیکی بین توده‌ها و ارزیابی تنوع ژنتیکی مارچوبه در کشور به کار رود. البته استفاده از نشانگرهای قوی‌تر مانند ریزماهوارها و آاف‌ال‌پی و اطلاعات دقیق در مورد مورفولوژی و سیتوژنتیک گیاه می‌تواند اطلاعات بیشتری در مورد توده‌های مارچوبه ایرانی به‌دست دهد. هم‌چنین می‌توان در تحقیقات بعدی به جمع‌آوری، کشت، اهلی‌کردن، تجزیه عناصر معدنی، متابولیت‌های ثانویه و دارویی جهت شناخت بهتر این گیاه بومی اقدام کرد.

## منابع


سرابی، ب.، حسندخت، م. ر.، حسنی، م. ا. و رمک معصومی، ت. ۱۳۸۹. ارزیابی تنوع مورفولوژیکی مارچوبه خوراکی (*Asparagus officinalis*) وحشی بومی ایران. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۱ (۳): ۱۹۷-۲۰۷.

سرابی، ب.، حسندخت، م. ر.، حسنی، م. ا. و رمک معصومی، ت. ۱۳۹۰. ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های مارچوبه خوراکی (*Asparagus officinalis*) بومی ایران به کمک نشانگرهای مولکولی RAPD. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۲ (۳): ۲۳۷-۲۴۴.

قهرمان، ا. ۱۳۷۵. فلور رنگی ایران. مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، شماره ۲۳۸۹، کد ۱۴۸.

Anonymous, 2010. International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). Geneva, TG/130/4.

Benson, B. L. 2009. Update of the world's asparagus production areas spear utilization, yields and production period. Acta Horticulturea, 776: 495-507.

Dahlgern, R. N. and Yeo, P. F. 1985. The family of monocotyledons. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 520 pp.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19: 11-15.

Gebler, P., Wolko, L. and Knaflewski, M. 2007. Identification of molecular markers for selection of supermale (YY) asparagus plants. Journal of Applied Genetics, 48 (2): 129-134.

Jiang, C. and Sink, K. 1994. RAPD marker mapping of the *Asparagus* (*Asparagus officinalis* L.) genome. HortScience, 29: 10.

Kay, Q. and John, R. 1995. The Conservation of scare and declining species in lowland Wales: Population genetics, demographic ecology and recommendations for future conservation in 32 species of lowland grassland and related habitats. CCW Science Report, 110: 2 pp.

Knaflewski, M., Kaluzewicz, A. and Gebler, K. 2001 Changes in field quality of 12 *Asparagus* cultivars during 10 years of harvest. Vegetable Crop Research, 54: 11-14.

Lal, S., Kinnari, N., Mistry, P. B., Vaidya, S. D. and Shah, R. A. 2011. Genetic diversity among five economically important species of *Asparagus* collected from central Gujarat (India) utilizing RAPD markers (Random Amplification Polymorphic DNA. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 2: 414-421.

Machon, N., Deletre-Le Boulc'h, V. and Rameau, C. 1995. Quantitive analysis of sexual dimorphism in *Asparagus*. Canadian Journal of Botany, 73: 1780-1786.

Mandal, S. C., Maiti, B. C., Maity, T. K., Pal, M. and Saha, B. P. 1998. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Asparagus racemosus* Willd. (Liliaceae) root extract. Natural Product Sciences, 4 (4): 230-233.

Mandal, S. C., Nandy, A., Pal, M. and Saha, B. P. 2000. Evaluation of antimicrobial activity of *Asparagus racemosus* wild root. Phytotherapy Research, 14 (2): 118-119.

Moreno, R., Espejo, J. A., Cabrera, A., Millan, T. and Gil, J. 2006: Ploidic and molecular analysis of Morado de Huetor *Asparagus officinalis* L. population; a Spanish tetraploid landrace. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 729-736.

Neeson, R. 2004. Organic *Asparagus* production. New Agriculture, 5 pp.

Prohense, J., Neuz, F. and Carena, M. J. 2008. Handbook of Plant Breeding. Springer Publishing, 364 pp.

Raimondi, J. P., Masuelli, R. W. and Camadro, E. L. 2001. Assessment of somaclonal variation in *Asparagus* by RAPD fingerprinting. Scientia Horticulturae, 90 (1): 19-29.

Sarabi, B., Hassandokht, M. R., Hassani, M. E., Ramak Masoumi, T. and Rich, T. 2010. Evaluation of genetic diversity among some Iranian wild asparagus populations using morphological characteristics and RAPD markers. Scientia Horticulturae, 126: 1-7.

Sica, M., Gamba, G., Montirri, S., Gaudio, L. and Aceto, S. 2005. ISSR markers show differention among Italian population of *Asparagus actifolius* L. BMC Genet. 8 pp.

Stajner, N., Bohance, B. and Javornik, B. 2002. Genetic variability of economically important *Asparagus* species as revealed by genome size analysis and rDNA ITS polymorphisms. Plant Science, 162: 931-937.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. 2010. *Asparagus officinalis* Germplasm Resources Information Network. Beltsville, Maryland: National Germplasm Resources Laboratory, 5 pp.

Vijay, N., Sairkar, P., Silwat, N., Gary, R. K. and Mehrotra, N. N. 2009. Genetic variability in *Asparagus racemosus* (Wild.) from Madhya Pradesh India by random amplified polymorphic DNA. African Journal of Biotechnology, 14: 3135-3140.

# Evaluation of Genetic Diversity of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Accessions from Mazandaran Province Using Morphological Traits and RAPD Molecular Marker

Hasandokht[1*], M. R., Ahi[2], M. J. and Ghelichnia[3], H.

**Abstract**

In this study genetic diversity of 48 asparagus accessions from Mazandaran province was evaluated using 24 morphological characteristics and 35 accessions using Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) molecular marker. Based on factor analysis, nine main factors explained 80 percentage of total variation and spear characters were more effective in accessions classification. Based on cluster analysis of studied morphological traits accessions divided into two main groups. Seventeen out of 90 primers could produced sharp and evaluable bands and the amount of polymorphism was 98.11%. Based on cluster analysis of RAPD analysis using unweighed pair group method with artithemtical average (UPGMA) method, accessions were classified into seven groups at 0.42 of similarity coefficient and asparagus accessions from Mazandaran were separated from Mary Washington UC350 cultivar, *A. persicus* and Taleghan accession. In this research, using morphological traits and RAPD marker, Mary Washington UC350 cultivar was separated from asparagus accessions from Mazandaran.

**Keywords:** Spear, Cluster analysis, Mary Washington UC350, *Asparagus persicus*

1 and 2. Associate Professor and MSc Graduated, Respectively, Department of Horticultural Sciences, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj

3. Research Assistant Professor, Department of Natural Resources, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research Center, (AREEO), Sari, Iran

※: Corresponding author Email: mrhassan@ut.ac.ir