

بررسی همبستگی و روابط علیت ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فنولوژیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch.)

اسماعیل عرب طازان‌دره^۱، عبدالحسین رضایی‌نژاد^{۲*}، احمد اسماعیلی^۲، فرهاد کرمی^۳ و علی قرقانی^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

۲- عضو هیئت‌علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

۳- عضو هیئت‌علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کردستان

۴- عضو هیئت‌علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۱۹

چکیده

به‌منظور تعیین روابط میان عملکرد و ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فنولوژیکی، تجزیه همبستگی‌ها و پی بردن به آثار مستقیم و غیرمستقیم ویژگی‌های گوناگون بر عملکرد، آزمایشی بر روی ۲۰ ژنوتیپ توت‌فرنگی در مرکز تحقیقات کردستان انجام گرفت. تجزیه و تحلیل‌های چندمتغیره شامل تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از داده‌های حاصل به‌منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها انجام گرفت. نتایج تجزیه کلاستر بر اساس تمام ویژگی‌های اندازه‌گیری شده، ژنوتیپ‌ها را در حدود فاصله اقلیدسی ۱۰ به پنج گروه اصلی تقسیم‌بندی کرد. از عوامل مهم تفکیک کلاسترهای اصلی، ویژگی‌هایی از جمله کلروفیل a، b، ab، میزان آنتوسیانین، عملکرد، دوره گل‌دهی، ظهور اولین گل و اولین میوه بود. بر اساس نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، چهار مؤلفه اصلی در مجموع ۶۸/۶۲ درصد از تغییرات کل را توجیه کردند. مؤلفه اول شامل کلروفیل a، b، ab، میزان آنتوسیانین و عملکرد حدود ۲۹/۵۷ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. مؤلفه دوم شامل دوره گل‌دهی، ظهور اولین گل و اولین میوه بود و حدود ۱۷/۲۴ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. نتایج حاصل از تجزیه بای‌پلات تا حدود زیادی با نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تجزیه کلاستر مطابقت داشت. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین کلروفیل a، b، ab، دوره گل‌دهی و ظهور اولین میوه با عملکرد مشاهده شد اما همبستگی معنی‌داری بین عملکرد و میزان مواد جامد محلول، عملکرد و میزان اسیدپتیک قابل تیتراسیون مشاهده نشد. همبستگی بین آنتوسیانین و ظهور اولین گل با عملکرد منفی و معنی‌دار بود. نتایج رگرسیون مرحله‌ای نشان داد که ویژگی‌های میزان آنتوسیانین، دوره گل‌دهی، ظهور اولین میوه، ظهور اولین گل، ظهور اولین استولون و دوره میوه‌دهی وارد مدل شدند. نتایج تجزیه علیت ژنتیکی نشان داد که ویژگی ظهور اولین میوه بیشترین اثر مستقیم و مثبت را بر عملکرد داشت و ویژگی آنتوسیانین بالاترین اثر مستقیم و منفی را بر عملکرد توت‌فرنگی دارا بود.

واژگان کلیدی: توت‌فرنگی، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، همبستگی ژنتیکی، آنتوسیانین

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: rezaeinejad.hossein@gmail.com

مقدمه

توت‌فرنگی تجارتي (*Fragaria × ananassa* Duch.) گیاهی علفی و چندساله از خانواده رز می‌باشد. آنتونی-نیکولاس داجسن (Antoine Nicolas Duchesnee)، گیاه‌شناس معروف فرانسوی اولین کسی بود که دورگه-گیری طبیعی بین دو گونه *F. virginiana* Duch. و *F. chiloensis* L. را در سال ۱۷۶۶ شناسایی کرد و به دلیل داشتن عطر و طعم شبیه به آناناس آن را *Fragaria × ananassa* نامید. این دورگه منشأ ارقام تجاری امروزی است و از اوایل قرن ۱۹ میلادی کارهای به‌نژادی زیادی در اروپا و آمریکا بر روی آن انجام شده است (Kashi and Hekmati, 1990). توت‌فرنگی به‌طور موفقیت‌آمیزی در گستره وسیعی از اقلیم‌ها شامل معتدل، مدیترانه‌ای، جنگل‌های باتلاقی و نیمه‌گرمسیری کشت می‌شوند. بیشترین تولید به اقلیم‌های معتدل و مدیترانه‌ای در عرض‌های جغرافیایی ۲۸ تا ۶۰ درجه محدود می‌شود (Kashi and Hekmati, 1990).

با افزایش اندازه نمونه‌هایی که در برنامه‌های اصلاحی استفاده می‌شود، روش‌های طبقه‌بندی و تنظیم تغییرات ژنتیکی نیز به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابند. استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره به‌طور همزمان چندین متغیر مربوط به افراد تحت بررسی را تجزیه و تحلیل می‌کند و یک راهکار مهم جهت طبقه‌بندی ژرم-پلاسم و تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی بین مواد اصلاحی است (Mohammadi and Prasanna, 2003). تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (Principal Component Analysis; PCA) روشی برای کم کردن حجم داده‌ها، به‌منظور روشن ساختن روابط بین دو یا چند ویژگی و توزیع تغییرات کل داده‌ها، در تعداد محدودی متغیر مستقل جدید به نام مؤلفه‌های اصلی می‌باشد. اولین مؤلفه اصلی نشان دهنده بیشترین مقدار تغییرات داده‌های اولیه، نسبت به سایر مؤلفه‌ها است. مؤلفه دوم بیشترین مقدار تغییرات، به‌جز مقادیر مربوط به مؤلفه اول را نشان می‌دهد و این وضعیت

به‌ترتیب برای سایر مؤلفه‌ها برقرار است (Farshadfar, 2010).

توجه کافی به همبستگی بین ویژگی‌ها در برنامه‌های اصلاحی و انتخاب برای بهبود یک یا چند ویژگی ممکن است نتایج مطلوبی به همراه داشته باشد. از این رو همبستگی و نحوه تأثیر ویژگی‌ها بر یکدیگر باید در برنامه‌های به‌نژادی مورد توجه قرار گیرند (Abasifar, 2000). همبستگی بین ویژگی‌ها، میزان و نوع رابطه ژنتیکی و غیر ژنتیکی بین دو یا چند ویژگی را اندازه‌گیری می‌نماید. همبستگی ژنوتیپی و فنوتیپی بین ویژگی‌های مختلف ممکن است به‌نژادگر را در گزینش غیرمستقیم برای ویژگی‌های کم اهمیت که اندازه‌گیری آن‌ها آسان‌تر است یاری نماید. همبستگی ژنتیکی بین ویژگی‌ها عمدتاً ناشی از چندشکلی و یا پیوستگی ژن‌ها می‌باشد و از لحاظ آماری بیانگر میزان کواریانس دو ژن با ویژگی‌های مشابه یا به‌شدت پیوسته است که هم زمان در یک محیط یکسان واریانس‌های متفاوتی نشان می‌دهند (Singh, 1990). مزیت محاسبه ضریب همبستگی ژنتیکی نسبت به ضریب همبستگی فنوتیپی این است که در همبستگی‌های ژنتیکی اثر عوامل خارجی (که در ایجاد ارتباط غیرواقعی بین ویژگی‌ها دخالت داشته‌اند) حذف یا به حداقل مقدار خود می‌رسد (Ghannadha, 2002).

روش تجزیه و تحلیل ضرایب مسیر (Wright, 1921)، روشی است که روابط بین ویژگی‌ها و اثرات مستقیم و غیرمستقیم آن‌ها را بر عملکرد روشن می‌سازد. در این روش ضریب همبستگی بین دو ویژگی به اجزائی که اثرات مستقیم و غیرمستقیم را اندازه‌گیری می‌کنند، تفکیک می‌گردد (Allah Gholipour, 1998). روابط همبستگی به‌تنهایی نمی‌توانند روابط علت و معلولی میان ویژگی‌ها را توجیه کنند. در چنین حالاتی که یک متغیر دارای همبستگی مثبت با عملکرد، ولی دارای اثر مستقیم ناچیز و یا منفی در عملکرد است، باید این ویژگی را هنگام گزینش برای عملکرد حذف کرد، زیرا هیچ‌گونه رابطه

واقعی میان این ویژگی و عملکرد وجود ندارد.

مطالعات اندکی مبنی بر ارتباط ویژگی‌های فیزیولوژیکی صورت گرفته است. در تحقیق با بررسی میزان آنتوسیانین، تنوع ژنتیکی بالایی بین ۱۹ ژنوتیپ توت-فرنگی را مشاهده کردند (Debnath and Ricard, 2009). در پژوهش دیگری ۲۲ ژنوتیپ توت فرنگی مورد بررسی قرار گرفت و بین میزان مواد جامد محلول و اسیددیده قابل تیتراسیون با عملکرد، هیچ‌گونه همبستگی معنی‌داری مشاهده نگردید (Singh et al., 2013). در صورتی‌که پژوهشگران دیگر همبستگی مثبت و معنی‌داری بین میزان مواد جامد محلول و عملکرد گزارش نمودند (Das et al., 2006). همبستگی منفی بین آنتوسیانین و میزان مواد جامد محلول گزارش شده است (Voca et al., 2008). چندین پژوهشگر به همبستگی غیرمعنی‌دار بین میزان مواد جامد محلول و اسیددیده قابل تیتراسیون اشاره کرده‌اند (Kafkas et al., 2007; Sims et al., 1997). از طرفی دیگر بر اساس گزارش هانکوک و برینگهورست (Hancock and Bringham, 1988) تفاوت در فتوسنتز می‌تواند در تغییر عملکرد ارقام مختلف نقش داشته باشد. در مجموع دیده می‌شود که تجزیه علیت برای عملکرد و سایر ویژگی‌ها در بسیاری از محصولات باغی و زراعی از قبیل پیاز (Rajalingam and Haripriya., 2000)، سویا (Board et al., 1997)، گندم (Ehdaie and Waines, 1989)، گلرنگ (Khidir, 1974) و بادام (Bahmani et al., 2008) انجام شده است.

هدف از اجرای این پژوهش بررسی همبستگی فنوتیپی و ژنتیکی بین ویژگی‌های مورد مطالعه و تعیین اثرات مستقیم و غیرمستقیم هر یک از ویژگی‌ها با عملکرد بود. همچنین در این پژوهش به بررسی گروه‌بندی ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی مورد مطالعه در شرایط آب و هوایی کردستان پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۰ در مزرعه ایستگاه تحقیقات کشاورزی استان کردستان انجام شد. آزمایش در قالب

طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۲۰ تیمار در ۳ تکرار اجرا گردید. ژنوتیپ‌های مورد بررسی شامل "پاجارو، پاروس، کویین‌الیزا، میسنری، تن‌بیوتی، آلیسو، فرزنو، تیوگا، سکویا، یالووا، مک‌دونانس، بلک‌مور، کت‌اسکیل، ژنوتیپ شماره ۱۴، سلوا، کاماروزا، چاندلر، گاوینوتا، مراک، کردستان" بود که از لحاظ ویژگی‌های فیزیولوژیکی (میزان کلروفیل a، b و ab، اسیددیده قابل تیتراسیون، میزان مواد جامد محلول و آنتوسیانین) و فنولوژیکی (ظهور اولین استولون، اولین گل و اولین میوه، دوره گل‌دهی و میوه‌دهی) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ، برگ سالم و یکسان تهیه شده از هر ژنوتیپ در داخل ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و تا زمان اندازه‌گیری کلروفیل، در داخل ازت مایع نگهداری شد. اندازه‌گیری میزان کلروفیل نمونه‌ها به روش تغییریافته آرنون انجام گرفت (Ashraf et al., 1994). برای این منظور مقدار ۰/۱ گرم از هر نمونه برگ با ۰/۲ گرم پودر اکسیدمنیزیم، در یک هاون چینی کاملاً ساییده شد و بعد با اضافه کردن استون ۸۰٪ حجم نمونه به ۱۰ میلی‌لیتر رسید و هموژن گردید. نمونه در لوله آزمایش درون سانتریفیوژ با ۳۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت و عصاره حاوی کلروفیل برگ، استخراج و سپس میزان جذب نور توسط عصاره حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer, Jenway) در طول‌موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر تعیین گردید. غلظت کلروفیل a، b و مجموع آن‌ها از طریق روابط زیر به دست آمد (Ashraf et al., 1994). در روابط زیر V حجم نهایی نمونه استخراج شده و W وزن تر نمونه است.

$$W \times (1000 \times V) / \{ \text{جذب در } 645 \text{ (نانومتر)} \} - 2/69 \text{ (جذب در } 663 \text{ (نانومتر)} \} = \text{میلی گرم کلروفیل } a \text{ در هر گرم وزن تر}$$

$$W \times (1000 \times V) / \{ \text{جذب در } 663 \text{ (نانومتر)} \} - 4/69 \text{ (جذب در } 645 \text{ (نانومتر)} \} = \text{میلی گرم کلروفیل } b \text{ در هر گرم وزن تر}$$

$$W \times (1000 \times V) / \{ \text{جذب در } 663 \text{ (نانومتر)} \} + 8/02 \text{ (جذب در } 645 \text{ (نانومتر)} \} = \text{میلی گرم کلروفیل } a \text{ و } b \text{ در هر گرم وزن تر}$$

$$W \times (1000 \times V) / \{ \text{جذب در } 645 \text{ (نانومتر)} \} - 20/2 = \text{میلی گرم کلروفیل } a \text{ و } b \text{ در هر گرم وزن تر}$$

(2001) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان آنتوسیانین موجود در میوه تعیین شد. برای محاسبه ظهور اولین گل، میوه و استولون، به ترتیب تاریخ ظهور اولین گل، میوه و استولون بر حسب روز، از اول فروردین یادداشت شد. طول دوره گل‌دهی از ظهور اولین گل تا آخرین گل و طول دوره میوه‌دهی از برداشت اولین میوه تا آخرین میوه محاسبه شد. در پایان، تجزیه کلاستر با استفاده از الگوریتم WARD و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از میانگین ویژگی‌ها و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام گرفت. دیاگرام پراکنش ژنوتیپ‌ها بر اساس دو مؤلفه اصلی توسط نرم‌افزار Minitab رسم گردید. ضرایب همبستگی فنوتیپی و ژنتیکی بین ویژگی‌ها نیز با توجه به فرمول زیر با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شد (Kwon and Torrie, 1964).

$$r_p = \frac{COV_p X_1 X_2}{\sqrt{S_p^2 X_1 S_p^2 X_2}}, \quad r_g = \frac{COV_g X_1 X_2}{\sqrt{S_g^2 X_1 S_g^2 X_2}}$$

که در آن‌ها r_p = همبستگی فنوتیپی، r_g = همبستگی ژنتیکی، $COV_p X_1 X_2$ = کواریانس فنوتیپی ناشی از X_1 و X_2 ، $COV_g X_1 X_2$ = کواریانس ژنتیکی ناشی از X_1 و X_2 ، $S_p^2 X_1$ و $S_p^2 X_2$ = واریانس فنوتیپی ویژگی‌های X_1 و X_2 ، $S_g^2 X_1$ و $S_g^2 X_2$ = واریانس ژنتیکی ویژگی‌های X_1 و X_2

قبل از محاسبه ضرایب در تجزیه علیت باید متغیرهای شرکت‌کننده در تجزیه، تعیین و مشخص گردند. انتخاب متغیرها می‌تواند طبق روابط علی و معلولی، دانش قبلی پژوهشگر از ارتباط موجود در بین متغیرها، روابط فیزیولوژیکی بین ویژگی‌ها و یا از طریق رگرسیون مرحله‌ای انجام شود (Rezaei and Soltani, 1998). در این مطالعه نیز از طریق رگرسیون مرحله‌ای با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویژگی‌هایی که وارد مدل شدند به‌عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته و اثرات مستقیم و غیرمستقیم آن‌ها بر ویژگی عملکرد توت‌فرنگی با استفاده از نرم‌افزار PATH2 ارزیابی شد.

نتایج

در نهایت مقدار کلروفیل برگ با توجه به نسبت وزن خشک به وزن تر برگ به‌صورت غلظت برحسب میلی-گرم بر گرم وزن خشک ارائه شد. برای اندازه‌گیری کل مواد جامد محلول میوه از رفراکتومتر دستی (Refractometer, Atago, Japan) استفاده شد. بعد از کالیبره نمودن دستگاه به‌وسیله آب مقطر، دو قطره از عصاره میوه از هر ژنوتیپ بر روی قسمت مخصوص رفراکتومتر قرار داده شد و درجه بریکس (Brix) قرائت و یادداشت شد. اعداد حاصله با توجه به دمای محیط آزمایشگاه و بر اساس جداول مربوطه کالیبره شد. در هر مرحله مقدار کل مواد جامد محلول سه عدد میوه در هر واحد آزمایشی محاسبه و میانگین داده‌های ثبت شده به‌عنوان میزان مواد جامد محلول آن ژنوتیپ در نظر گرفته شد. اسید غالب در میوه توت‌فرنگی، اسید سیتریک می‌باشد که جرم مولکولی آن ۱۲۸ گرم می‌باشد. برای اندازه‌گیری میزان اسید قابل تیتراسیون میوه از روش تیتراسیون استفاده شد. برای این منظور دو میلی‌لیتر عصاره صاف شده آب میوه داخل ارلن ریخته شد و ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. پس از اضافه نمودن چند قطره فنل‌فالتین (۰/۰۱ در الکل) به‌عنوان شناساگر، با سود ۰/۱ نرمال در pH=۸/۲ تیترا گردید. اسیدیته قابل تیتراسیون با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Asadi Gharnah et al., 2012) و مقدار آن بر حسب میلی‌گرم اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه به‌دست آمد.

$$C = \frac{N \times V_b \times E}{V_i} \times 100$$

که در آن C = اسید قابل تیتراسیون میوه بر حسب میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه، N = نرمالیه سود مصرفی، V_b = حجم سود مصرفی، E = وزن اکی والان اسیدسیتریک (۱۲۸/۲=۶۴)، V_i = حجم نمونه آب میوه

به‌منظور اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین میوه که عامل رنگ قرمز در توت‌فرنگی است، از هر واحد آزمایشی ۱۰ عدد میوه، به‌طور تصادفی انتخاب و در هاون چینی کاملاً ساییده شدند. سپس با استفاده از استون و اتر، آنتوسیانین موجود در نمونه‌ها استخراج شد (Giusti and Wrolstad,

کتاسکیل در این گروه قرار گرفتند. این ژنوتیپ‌ها دارای کمترین میزان کلروفیل *a* و *b* بودند و همچنین این ژنوتیپ‌ها از لحاظ میزان آنتوسیانین و طول دوره میوه‌دهی مشابه همدیگر بودند. گروه پنجم: گاوپوتا تنها ژنوتیپی بود که در این گروه قرار گرفت. از ویژگی‌های بارز این ژنوتیپ داشتن کمترین عملکرد و پایین‌ترین میزان مواد جامد محلول بود.

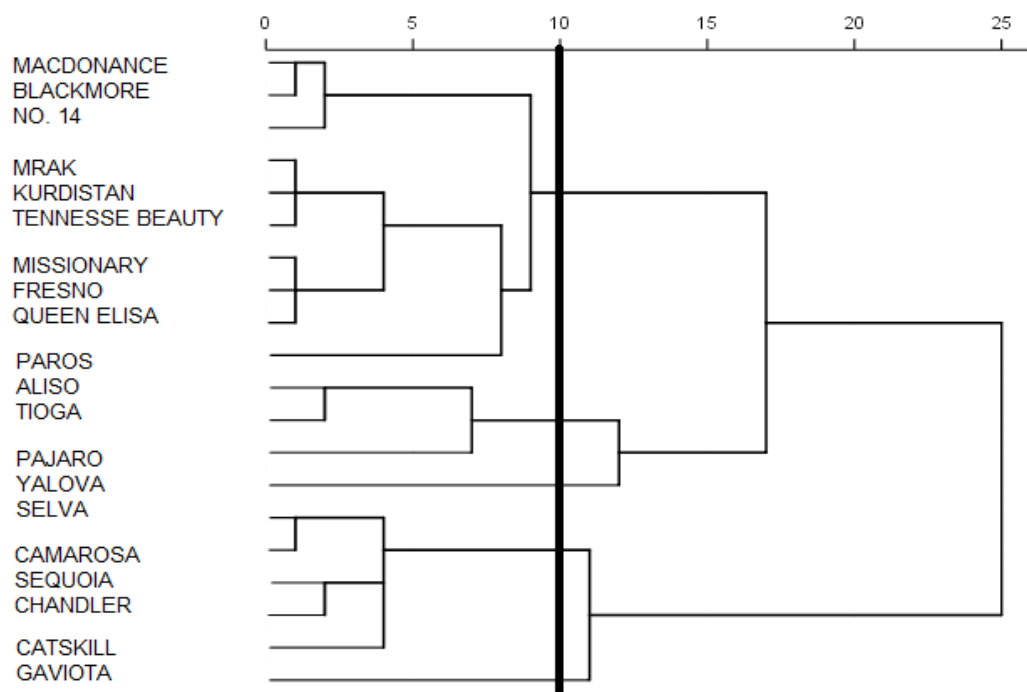
آزمون بای‌پلات قادر است تصویر دو بعدی ایجاد نماید که هر یک از ابعاد آن‌ها یک مؤلفه اصلی تفکیک‌ساز محسوب می‌شوند. بنابراین پراکنش ژنوتیپ‌ها در محدوده مؤلفه اصلی می‌تواند به تعیین بهتر فاصله ژنوتیپ‌ها و تفاوت بین آن‌ها کمک نماید. این روش برای نمایش دو بعدی پراکنش ژنوتیپ‌ها بر اساس ویژگی‌های مؤثر در مؤلفه اول و دوم به‌کار برده می‌شود و تجمع در یک ناحیه از پلات نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی آن‌ها می‌باشد. در این پژوهش تجزیه بای‌پلات با استفاده از دو مؤلفه اصلی اول و دوم انجام گردید که مجموعاً $46/82$ درصد از سهم کل واریانس را توجیه نمودند (شکل ۲). بر اساس تجزیه بای-پلات، ژنوتیپ شماره ۲ (پاروس) از نظر ویژگی‌های مؤثر در مؤلفه اول در بالاترین سطح (قسمت مثبت) و ژنوتیپ شماره ۱۸ (گاوپوتا) در پایین‌ترین سطح (قسمت منفی) قرار دارد. بنابراین بر اساس تجزیه بای‌پلات، ژنوتیپ‌هایی که در یک محدوده نزدیک به هم قرار دارند، از نظر ویژگی‌های مؤثر در مؤلفه‌های اول و دوم شباهت بیشتری نشان داده و در یک گروه قرار می‌گیرند. مثلاً ژنوتیپ‌های شماره ۱ (پاجارو)، ۶ (آلیسو)، ۸ (تیوگا) و ۱۰ (یالووا) از نظر ویژگی‌های مؤثر در مؤلفه اول و دوم شباهت بیشتری نشان دادند و در یک گروه قرار گرفتند.

ضرایب همبستگی فنوتیپی و ژنتیکی بین ویژگی‌های مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. این ضرایب بین عملکرد و کلروفیل *a*، عملکرد و کلروفیل *b*، عملکرد و کلروفیل *ab*، عملکرد و دوره گل‌دهی و عملکرد و ظهور اولین میوه مثبت و معنی‌دار بود. بنابراین می‌توان استنباط کرد که هر چه میزان کلروفیل *a*، *b*، *ab*، دوره

برای تعیین نقش هر یک از ویژگی‌ها در تنوع موجود میان ژنوتیپ‌ها تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام شد. مؤلفه‌های حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، شامل مقادیر ویژه، درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی برای مؤلفه‌های یک تا چهار در جدول ۱ آمده است. حدود ۶۸ درصد از واریانس کل بین ژنوتیپ‌ها توسط چهار مؤلفه اول توجیه شد. مؤلفه اول شامل کلروفیل *a*، *b*، *ab*، میزان آنتوسیانین و عملکرد حدود $29/57$ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. مؤلفه دوم شامل دوره گل‌دهی، ظهور اولین گل و اولین میوه بود و حدود $17/24$ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. مؤلفه سوم شامل ظهور اولین استولون، اسیدپتیه قابل تیتراسیون و دوره میوه‌دهی و مؤلفه چهارم شامل مواد جامد محلول و ظهور اولین میوه بود که به ترتیب $11/85$ و $9/94$ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. نتایج گروه‌بندی از طریق آنالیز خوشه‌ای به روش وارد با استفاده از عملکرد، ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فنولوژیکی ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی را در فاصله ۱۰ از ۲۵ به پنج گروه اصلی تقسیم کرد (شکل ۱). گروه اول: اکثر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این گروه قرار گرفتند. مک-دونانس، بلک‌مور، ژنوتیپ شماره ۱۴، مراک، کردستان، تن بیوتی، میسنری، فرزنو، کویین الیزا و پاروس از اعضای این گروه بودند. از مشخصات این گروه می‌توان به طول دوره گل‌دهی بالا و میزان اسیدپتیه قابل تیتراسیون متوسط به پایین اشاره کرد. گروه دوم: این گروه شامل ژنوتیپ‌های آلیسو، تیوگا، پاجارو بود. وجه مشترک تمامی ژنوتیپ‌های این گروه ویژگی دیر گل‌دهی بوده و طول دوره گل‌دهی پایینی داشتند. همچنین این گروه از لحاظ میزان مواد جامد محلول و اسیدپتیه قابل تیتراسیون در محدوده مشترکی قرار داشتند. گروه سوم: در این گروه تنها ژنوتیپ یالووا قرار گرفت. یالووا نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها بیشترین میزان اسیدپتیه قابل تیتراسیون را داشت و همچنین کمترین طول دوره میوه‌دهی و زودترین استولون‌دهی از مشخصات بارز این ژنوتیپ بود. گروه چهارم: ژنوتیپ‌های سلوا، کاماروزا، سکویا، چندلر و

جدول ۱- نتایج مربوط به مؤلفه‌های اصلی برای ویژگی‌های مختلف فیزیولوژیکی و فنولوژیکی ۲۰ ژنوتیپ توت‌فرنگی

مؤلفه‌های اصلی				ویژگی‌ها
مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم	مؤلفه چهارم	
0.890	0.147	-0.067	-0.160	کلروفیل a
0.872	0.142	-0.076	-0.149	کلروفیل b
0.934	0.153	-0.074	-0.166	کلروفیل ab
0.070	0.266	-0.458	-0.518	مواد جامد محلول
-0.064	0.377	-0.519	0.400	اسیدیته قابل تیتراسیون
-0.667	-0.007	0.044	-0.123	آنتوسیانین
0.112	0.168	0.690	0.150	ظهور اولین استولون
-0.180	0.907	0.067	0.016	ظهور اولین گل
0.313	-0.739	-0.126	0.277	دوره گل‌دهی
0.172	0.584	0.056	0.571	ظهور اولین میوه
0.398	0.031	0.643	-0.165	دوره میوه‌دهی
0.583	-0.228	-0.117	0.470	عملکرد
3.549	2.070	1.423	1.193	مقادیر ویژه
29.576	17.247	11/855	9.943	میزان واریانس توجیه شده (درصد)
29.576	46.823	58.678	68.621	درصد تجمعی واریانس توجیه شده



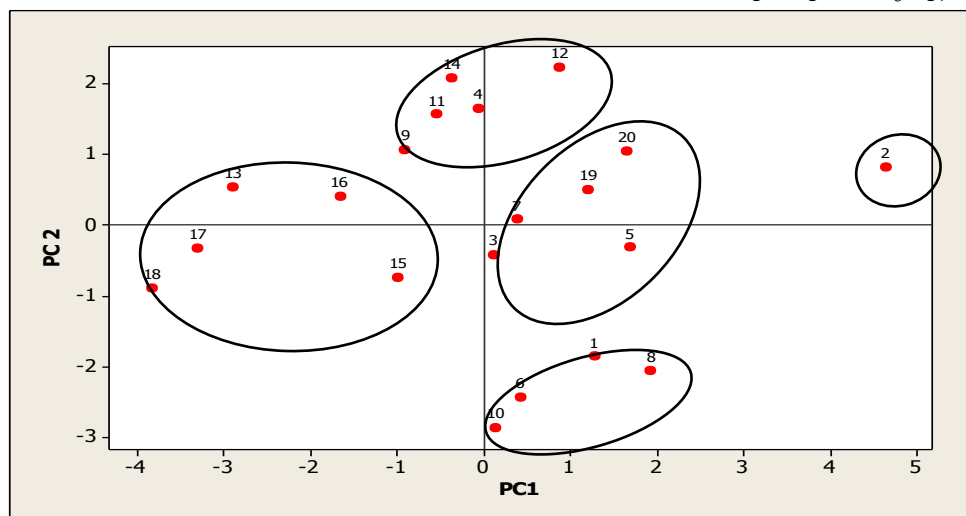
شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۰ ژنوتیپ توت‌فرنگی مورد مطالعه به روش Ward

جدول ۲- ضرایب همبستگی فنوتیپی و ژنتیکی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فنولوژیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه توت‌فرنگی

ویژگی‌ها	نوع همبستگی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل ab	مواد جامد محلول	اسیدیته قابل تیتراسیون	آنتوسیانین	ظهور اولین گل	ظهور اولین میوه	دوره گل‌دهی	دوره میوه- ظهور اولین میوه	عملکرد دهی	
کلروفیل a	r _p	1											
	r _g	1											
کلروفیل b	r _p	0.762**	1										
	r _g	0.306	1										
کلروفیل ab	r _p	0.975**	0.886**	1									
	r _g	0.385	0.353	1									
مواد جامد محلول	r _p	0.138	0.007	0.122	1								
	r _g	0.059	0.003	۰/۰۵۲	1								
اسیدیته قابل تیتراسیون	r _p	0.004	0.017	0.008	-0.011	1							
	r _g	0.002	0.007	0.003	-0.005	1							
آنتوسیانین	r _p	-0.44**	-0.487**	-۰.481**	-0.084	-0.033	1						
	r _g	-0.177	-0.191	-0.168	-0.035	-0.013	1						
ظهور اولین استولون	r _p	0.12	0.009	0.089	-0.174	-0.116	-0.113	1					
	r _g	0.043	0.003	0.032	-0.068	-0.044	-0.04	1					
ظهور اولین گل	r _p	-0.06	-0.065	0.065	0.172	0.192*	0.036	0.087	1				
	r _g	-0.023	-0.025	-0.025	0.07	0.116	0.014	0.03	1				
دوره گل-دهی	r _p	0.172	0.081	0.151	-0.122	-0.092	-0.227	-0.012	-0.672**	1			
	r _g	0.062	0.03	0.054	0.047	-0.035	-0.08	-0.004	-0.232	1			
ظهور اولین میوه	r _p	0.147	0.115	0.145	0.021	0.148	-0.062	0.191	0.457**	-0.159	1		
	r _g	0.057	0.045	0.056	0.009	0.06	-0.023	0.067	0.17	-0.056	1		
دوره میوه-دهی	r _p	0.246	0.298*	0.277*	-0.135	-0.288*	-0.214	0.214	0.064	-0.023	-0.014	1	
	r _g	0.104	0.127	0.116	-0.06	-0.127	-0.089	0.082	0.026	-0.008	-0.005	1	
عملکرد	r _p	0.323*	0.363*	0.355**	-0.064	-0.046	-0.42**	-0.139	-0.272*	0.348**	0.266*	0.208	1
	r _g	0.212	0.24	0.231	-0.046	-0.032	-0.27	0.083	-0.17	0.207	0.17	0.145	1

** و * به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک و پنج درصد.

r_p: همبستگی فنوتیپی و r_g: همبستگی ژنتیکی



شکل ۲- تجزیه بای پلات پراکنش ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی مورد بررسی بر اساس ویژگی‌های مؤثر در مؤلفه‌های اول و

دوم

ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تجزیه کلاستر تا حدود نسبتاً زیادی مطابقت داشت. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر مبنای ویژگی‌های مختلف یکی از شیوه‌های مناسب در تعیین قرابت، دوری و نزدیکی آن‌ها است (Alexandra, 2005). بر اساس نتایج این پژوهش و وجود تنوع ژنتیکی بالا بین ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی و با توجه به ذخایر ژنتیکی ارزشمند موجود در کشور، لزوم حفظ و توجه به این ذخایر در برنامه‌های پژوهشی می‌تواند مفید واقع شود.

بیشترین همبستگی منفی و معنی‌دار بین عملکرد و آنتوسیانین مشاهده شد. در ارقام کویین الیزا و پاروس که دارای بیشترین عملکرد، وزن و اندازه میوه بودند، پایین بودن مقدار آنتوسیانین میوه‌ها به صورت ظاهری نیز قابل رویت می‌باشد به طوری که غالباً انتهای میوه در رقم کویین الیزا رنگ نگرفته و سفید باقی می‌ماند و میوه‌های رقم پاروس نیز همواره به رنگ قرمز روشن مایل به نارنجی می‌باشد. همبستگی منفی و معنی‌دار بین کلروفیل و آنتوسیانین به این مفهوم است که هر چه میزان کلروفیل بیشتر باشد تأثیر منفی بر افزایش رنگیزه آنتوسیانین دارد. همبستگی بسیار بالا و معنی‌دار بین کلروفیل با عملکرد نیز بیانگر همان واقعیت است.

همبستگی منفی و معنی‌دار بین عملکرد و ظهور اولین گل نشان می‌دهد ارقامی که دیرتر وارد مرحله گل‌دهی شدند از عملکرد کمتری برخوردار بودند. به نظر می‌رسد تأخیر در فرآیند گل‌دهی با شرایط گرم‌تری مواجه می‌گردد و هرچه دما افزایش یابد طول دوره گل‌دهی کاهش یافته و از طرفی میوه‌های رسیده وزن و اندازه کوچک‌تری دارند، لذا عملکرد این ارقام کاهش می‌یابد. بنا به عقیده شارما (Sharma, 2002) در ابتدای فصل، میانگین دوره باز شدن گل تا رسیدن میوه‌ها ۲۸-۳۱ روز است، درحالی‌که در اواسط فصل، این مدت به ۲۵ روز می‌رسد. گیاهانی که در دماهای بالاتر نگهداری می‌شوند نسبت به آن‌هایی که در شرایط خنک‌تر رشد می‌کنند، دارای شاخساره کوچک‌تری هستند که در نتیجه عملکرد آن‌ها افت می‌کند. دماهای بالاتر نگهداری می‌شوند نسبت به آن‌هایی که در شرایط

گل‌دهی و ظهور اولین میوه بیشتر باشد میزان عملکرد بیشتر خواهد بود. اما همبستگی معنی‌داری بین عملکرد و میزان مواد جامد محلول، عملکرد و میزان اسیدپتید قابل تیتراسیون مشاهده نشد. نتایج این آزمایش بیانگر وجود همبستگی منفی و معنی‌دار بین عملکرد و آنتوسیانین و عملکرد و ظهور اولین گل بود. همچنین بین رنگیزه‌های کلروفیل و آنتوسیانین نیز همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد. ضریب همبستگی بین عملکرد و ظهور اولین استولون و میزان مواد جامد محلول، منفی اما از نظر آماری معنی‌دار نبود.

در تجزیه رگرسیون گام به گام عملکرد به‌عنوان متغیر وابسته و در مقابل سایر صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی به‌عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شدند. نتایج رگرسیون مرحله‌ای (شکل ۳) نشان داد که شش ویژگی (میزان آنتوسیانین، دوره گل‌دهی، ظهور اولین میوه، ظهور اولین گل، ظهور اولین استولون و دوره میوه‌دهی) وارد مدل شدند.

نتایج حاصل از تجزیه ضرایب علیت ژنتیکی برای عملکرد توت‌فرنگی (جدول ۳) نشان داد که ویژگی ظهور اولین میوه بیشترین اثر مستقیم و مثبت (۰/۱۹۷) را بر عملکرد داشت ولی از طریق دوره گل‌دهی و ظهور اولین گل اثر غیرمستقیم و منفی و ناچیزی بر عملکرد داشت. ویژگی ظهور اولین میوه، همبستگی ژنتیکی مثبت و بالایی را با عملکرد توت‌فرنگی داشت که این همبستگی مثبت بیشتر ناشی از اثر مستقیم آن بوده است و تأثیر غیرمستقیم آن از طریق سایر ویژگی‌ها بر عملکرد منفی بوده است. ویژگی دوره گل‌دهی بعد از ظهور اولین میوه بالاترین اثر مستقیم و مثبت را بر عملکرد داشت. ویژگی آنتوسیانین بالاترین اثر مستقیم و منفی را بر عملکرد توت‌فرنگی دارا بود و ویژگی آنتوسیانین از طریق بقیه ویژگی‌ها نیز اثر غیرمستقیم منفی بر عملکرد داشت.

بحث

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که نتایج حاصل از بای‌پلات با نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و گروه‌بندی

جدول ۳- نتایج تجزیه علیت با استفاده از رگرسیون گام به گام و مرحله به مرحله

مرحله اول: تجزیه ضرایب علیت ژنتیکی با استفاده از همبستگی‌های ژنتیکی برای عملکرد ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی مورد مطالعه (اثرات باقیمانده: 0.905)

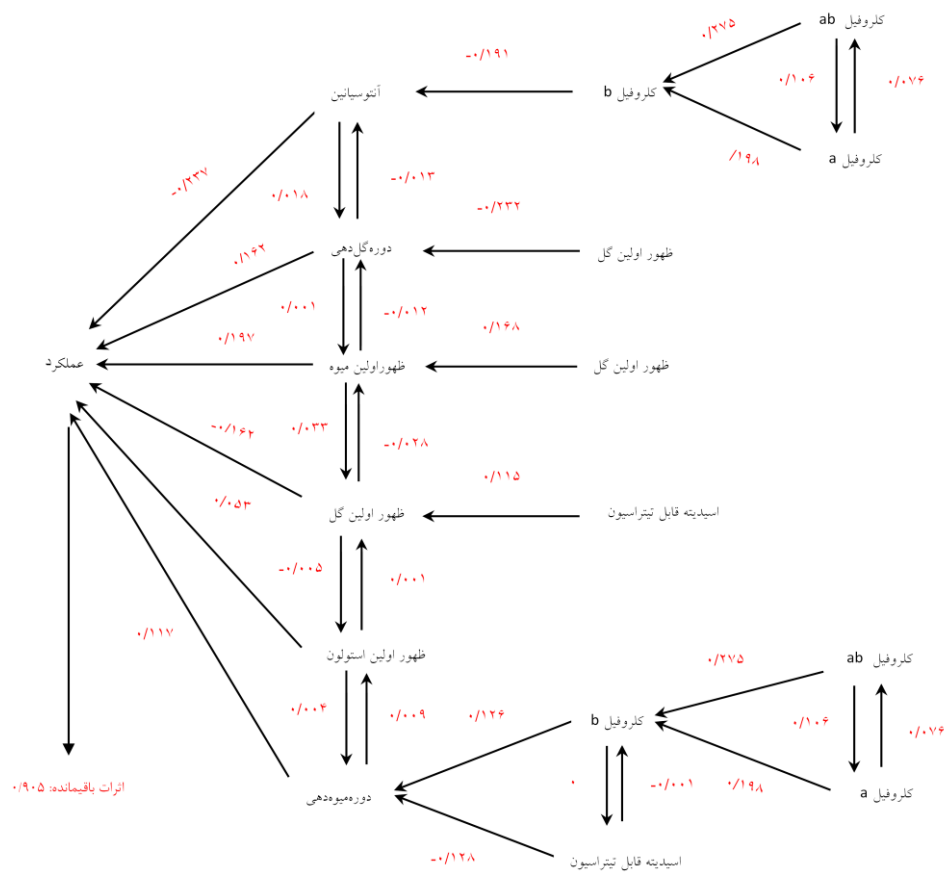
اثر غیرمستقیم از طریق						اثر مستقیم	ویژگی
دوره میوه‌دهی	ظهور اولین	ظهور اولین گل	ظهور اولین	دوره گل‌دهی	آنتوسیا		
-0.011	-0.003	-0.003	-0.005	-0.013	-0.237	آنتوسیانین	
-0.001	0	0.037	-0.012	0.018	0.162	دوره گل‌دهی	
-0.001	0.003	-0.028	-0.01	0.005	0.197	ظهور اولین میوه	
-0.003	0.001		0.033	-0.038	-0.162	ظهور اولین گل	
0.009		-0.005	0.013	0	0.053	ظهور اولین	
	0.004	0.004	-0.001	-0.002	0.117	دوره میوه‌دهی	

مرحله دوم: تجزیه ضرایب علیت ژنتیکی با استفاده از همبستگی‌های ژنتیکی برای دوره میوه‌دهی ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی مورد مطالعه (اثرات باقیمانده: 0.983)

اثر غیرمستقیم		اثر مستقیم	ویژگی
اسیدیته قابل تیتراسیون	کلروفیل b		
-0.001		0.126	کلروفیل b
		-0.128	اسیدیته قابل تیتراسیون

مرحله سوم: تجزیه ضرایب علیت ژنتیکی با استفاده از همبستگی‌های ژنتیکی برای کلروفیل b ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی مورد مطالعه (اثرات باقیمانده: 0.917)

اثر غیرمستقیم		اثر مستقیم	ویژگی
کلروفیل a	کلروفیل ab		
0.076		0.275	کلروفیل ab
		0.198	کلروفیل a



شکل ۳- شمای تجزیه علیت مرحله‌ای

اساس نتایج تجزیه علیت این تحقیق دیده شد که عملکرد تحت تأثیر مستقیم ظهور اولین میوه، طول دوره گل‌دهی و میوه‌دهی قرار می‌گیرد و ارقامی که تاریخ برداشت اولین میوه در آن‌ها زودتر اتفاق بیفتد از طول دوره میوه‌دهی بیشتری برخوردار بودند. طول دوره میوه‌دهی خود تحت تأثیر مستقیم مقدار کلروفیل برگ قرار می‌گیرد. بنابراین می‌توان استنباط نمود ارقامی که مقدار کلروفیل برگ در آن‌ها بیشتر است و فاز گل‌دهی در آن‌ها نیز زودتر اتفاق افتاده لذا در شرایط دمایی خنک‌تر، طول دوره میوه‌دهی بیشتری داشته که می‌تواند تأثیر مثبتی بر میزان عملکرد این ارقام داشته باشد. همچنین یکی از نکات قابل توجه نتایج این تحقیق این بود که ویژگی آنتوسیانین بالاترین اثر مستقیم و منفی را بر عملکرد توت‌فرنگی دارا بود و از این‌رو در انتخاب ارقام برای ویژگی‌های اصلاحی مورد نظر بایستی به این ویژگی آنتوسیانین ژنوتیپ‌ها نیز توجه کافی داشت.

در مجموع نتایج حاصل از گروه‌بندی نشان داد که تنوع ژنتیکی گسترده‌ای بین ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی از نظر ویژگی‌های مورد بررسی وجود دارد که حاکی از ارزشمند بودن این ذخایر و لزوم توجه بیشتر در حفظ، نگهداری، ارزیابی و شناسایی آن‌هاست. همچنین نتایج حاصل از تجزیه علیت نشان دهنده آن بود که برخی صفات اثر مستقیم بالایی (مثبت یا منفی) بر عملکرد دارند و از این‌رو در گزینش‌های اصلاحی بایستی به صفات مذکور توجه زیادی نمود.

خنک‌تر رشد می‌کنند، دارای شاخساره کوچک‌تری هستند که در نتیجه عملکرد آن‌ها افت می‌کند. عدم همبستگی معنی‌داری بین عملکرد و میزان مواد جامد محلول، عملکرد و میزان اسیدیته قابل تیتراسیون در این تحقیق با نتایج سینگ و همکاران (Singh *et al.*, 2013) کاملاً مطابقت دارد ولی با نتایج داس و همکاران (Das *et al.*, 2006) مغایر است

نتایج حاصل از رگرسیون گام به گام تا حدودی با نتایج همبستگی فنوتیپی و ژنتیکی مطابقت داشت ولی تفاوت در اولویت صفات تأثیرگذار بر عملکرد مشاهده گردید. این موضوع نشان‌دهنده این است که نتایج همبستگی صفات به‌تنهایی نمی‌تواند در توجیه روابط صفات با عملکرد کارایی لازم را داشته باشد. از این‌رو با استفاده از اثرات مستقیم و غیرمستقیم صفات بر عملکرد از طریق تجزیه علیت، این تفاوت‌ها بهتر تبیین می‌گردند. به‌عبارتی دیگر با توجه به این‌که هدف از انجام تجزیه ضرایب علیت، تعیین اجزایی از عملکرد است که دارای ویژگی‌هایی از قبیل همبستگی و اثر مستقیم بالا با عملکرد باشند و همچنین این اجزا دارای حداقل اثرات غیرمستقیم منفی از طریق سایر ویژگی‌ها بر عملکرد بوده و بتوانند به‌عنوان معیار انتخاب در برنامه‌های اصلاحی استفاده شوند. از این‌رو در این پژوهش مشخص گردید که بهره‌گیری از روش آماری تجزیه علیت می‌تواند در درک روابط اساسی میان متغیرها کارساز باشد و تنها استناد به روابط همبستگی برای توجیه روابط میان متغیرها کافی نیست. بر

References

- Abasifar, A.R. (2000). Compatibility and optimum sowing date and cultivar selection process in Central Province. Proceedings of the Second International Congress of Iranian Horticultural Sciences, Tehran, Iran. [in Persian].
- Alexandra, S. (2005). German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) population morphological and chemical diversity. Budapest Doktorin thesis. Budapest University Department of Horticulture.
- Allah Gholipour, M. (1998). Study of correlation between some agronomic traits and grain yield using Path analysis in rice. M.Sc. thesis, Agricultural University of Tehran, Iran. [in Persian].
- Asadi Gharneh, H.A., Arzani, K. and Shojaeian, A. (2012). Investigation on Yield and Fruit Quality of Some Cultivated Strawberry in Iran. Engineering and Technology 68: 1182-1184
- Ashraf, M.Y., Azmi, A.R., Khan, A.H. and Ala, S.A. (1994). Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat. Acta Physiologiae Plantarum 16(3): 185-191.
- Bahmani, A., Fazi Asl, V. and Matlabi, A.R. (2008). Study of relationships among different characteristics of almond nut and their effects on nut weight using path analysis. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology (9): 307-314. [in Persian].
- Board, J.E., Kang, M.S. and Harville, B.G. (1997). Path analysis identify indirect selection criteria for yield of late planted soybean. Crop Science 37: 879-884.

- Das, A.K., Singh, B. and Sahoo, R.K. (2006). Correlation and path analysis in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). Indian Journal of Horticulture 63(1): 83-85.
- Debnath, S.C. and Ricard, E. (2009). ISSR, anthocyanin content and antioxidant activity analyses to characterize strawberry genotypes. Journal of Applied Horticulture 11(2): 83-89.
- Ehdaie, B. and Waines, J.G. (1989). Genetic variation, heritability and path-analysis in landraces of bread wheat from southwestern Iran. Euphytica 41: 183-190.
- Farshadfar, E. (2010). Multivariate principles and procedures of statistics. University of razi-kermanshah Press, **Third Edition**, 734p. [in Persian].
- Ghannadha, MR. and Naghavi, M. (2002) Applicative Quantitative Genetics, Tehran University Publications, Iran, pp. 171. [in Persian].
- Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Protocols in Food Analytical Chemistry F1.2.1-F1.2.13.
- Hancock, J.F. and Bringham, R.S. (1988). Yield components interactions in wild populations of California *Fragaria*. Hortscience. (23): 889 - 890.
- Kafkas, E., Kosar, M., Paydas, S., Kafkas, S. and Baser, K.H.C. (2007). Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages. Food chemistry. 100: 1229-1236.
- Kashi, A.K. and Hekmati, J. (1990). Growing Strawberry, Ahmadi Press, Iran, 121 pp. [in Persian].
- Khidir, M.O. (1974). Genetic variability and interrelationship of some quantitative characters in safflower. Journal of Agricultural Science 83: 197-202.
- Kwon, S.H. and Torrie, J.H. (1964). Heritability and interrelationship among traits of two soybean populations. Crop Science (4): 196-198.
- Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. Crop Science 43: 1235-1248.
- Rajalingam, G.V. and Haripriya, K. (2000). Correlation and path coefficient analysis in onion (*Allium cepa* L. var. aggregatum Don.). Madras Agricultural Journal 87 (7-9): 405-407.
- Rezaei, A., and Soltani, A. (1998). An introduction to applied regression analysis. Isfahan University of Technology Press, Isfahan, Iran, 294p. [in Persian].
- Sharma, R.M. (2002). Growing strawberries. International book distributing co New Delhi.INDIA.
- Singh, M. (1990). Standard error of the estimates of genotypic and phenotypic correlation biometrics report. Computer service. Icarda. 7pp.
- Singh, S.R., Lal, S., Ahmed, N., Srivastava, K.K., Kumar, D.N., Amin, J.A. and Malik, A.R. (2013). Determination of genetic diversity in strawberry (*Fragaria × ananassa*) using principal component analysis (PCA) and single linkage cluster analysis (SLCA). African Journal of Biotechnology 12 (24): 3774-3782.
- Voca, S.D., Nadica, V., Dragovic, B., Duralija, J., Druzic, Z., and Babojelic, M.S. (2008). Fruit Quality of New Early Ripening Strawberry Cultivars in Croatia. Food Technology and Biotechnology 46 (3): 292-298.
- Wright, S. (1921). Correlation and causation. Journal of Agricultural Research. 20: 557-595.

Study of Correlation and Path Coefficient Analysis of Physiological and Phenological Characteristics and Clustering of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) Genotypes

Esmail Arab Tajandarreh¹, Abdolhossein Rezaei Nejad^{2,*}, Farhad Karami³ and Ali Gharaghani⁴

1- M.Sc. Student, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Assistant professor, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

3- Member of Scientific Board, Department of Seed and Plant Improvement, Agricultural and Natural Resources Research Center of Kurdistan, Sanandaj, Iran

4- Assistant professor, Department of Horticultural Sciences, Collage of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Abstract

In order to determination of relationship between yield and physiological and phenological traits and to understanding direct and indirect effects of various parameters on the yield, an experiment was conducted on 20 genotypes of strawberries at center of research of Kurdistan, Iran. Multivariate statistical analyses including principal components analysis (PCA) and cluster analysis were used to assess the pattern grouping of genotypes. Results of cluster analysis based on all measured traits, grouped genotypes into 5 clusters at Euclidean distance of 10. Important traits with high effects on clustering included chlorophyll a, b, ab, anthocyanin, yield, flowering period and appearance of first flower and fruit. PCA analysis revealed 4 principle components that covered 68.62% of total variance. The first component with 29.57% included chlorophyll a, b, ab, anthocyanin and yield, and the second component with 17.24% included flowering period and appearance of first flower and fruit. Results of biplot were similar to the results of cluster analysis. Although there was positive and significant correlation between chlorophyll a, b, ab, flowering period, and appearance of the first fruit with yield, there were not significant correlation between soluble solids and titratable acidity with yield. There was a negative and significant correlation between anthocyanin and appearance of the first flower with yield. The results of stepwise regression showed that 6 characters entered to model including anthocyanin content, flowering period, appearance of the first fruit and flower, stolon and fruiting period. Genetic Path coefficient analysis revealed that appearance of the first fruit had the highest positive direct effect on yield and anthocyanin had the highest negative direct effect on yield.

Key words: Strawberry, Principal components analysis, Genetic correlation, Anthocyanin

* Corresponding Author, E-mail: rezaeinejad.hossein@gmail.com