

شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش ریزماهوره در بخشی از

یونجه‌های زراعی (*Medicago sativa* L.) ایران

رحمت محمدی*^۱، محمدرضا نقوی^۲، رضا معالی امیری^۳، مهدی رضایی^۴

۱، ۲، ۳، ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار و
دانشجوی کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rm1387@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۹ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۳۰)

چکیده

ارتباط بین ۱۱ صفت زراعی و ۵۰ نشانگر مولکولی حاصل از مطالعه ده جفت آغازگر ریزماهوره در ۶۷ اکوتیپ یونجه نواحی مختلف ایران به کمک رگرسیون گام به گام مطالعه شد و در مجموع ۱۷ نشانگر SSR رابطه معنی‌داری با حداقل یکی از ۱۱ صفت مورفولوژیکی نشان دادند که می‌توان از آنها در اصلاح به کمک نشانگر استفاده کرد. مقدار قابل توجهی از تغییرات مورفولوژیکی (صفات وزن تر و خشک برگ، وزن خشک ساقه، وزن خشک کل و وزن تر کل) توسط نشانگر B14B03 با محتوای اطلاعات چند شکلی ۰/۷۴ توجیه شد که این نتایج نشان می‌دهد احتمالاً ژن‌های مربوط به این صفات در مکان‌های کروموزومی نزدیک به هم قرار دارند. نتایج نشان می‌دهد با توجه به توزیع مناسب ریزماهوره‌ها در ژنوم یونجه و نشانگرهایی که پیوستگی بالا با صفات مهم زراعی دارند، می‌توان از آنها در شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش پیوسته با صفات مهم زراعی امید داشت.

مقدمه

نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA بطور گسترده با اهداف مختلف در گیاهان و حیوانات مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۰). نشانگرهای مولکولی ابزارهای بسیار مهمی برای مدیریت نمونه‌های ژرم پلاسما در بانک ژن، ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف می‌باشند، که برای دستیابی به این اهداف از نشانگرهای مولکولی متعددی استفاده می‌شود (۵). نشانگرهای مولکولی ریزماهوره یا توالی تکراری ساده (SSR) شامل توالی دوگانه تکراری کوتاهی (۶-۲ جفت باز) از DNA هستند (۱۱). این نشانگرها به علت دارا بودن خاصیت چند آلی، وراثت هم بارز، فراوانی نسبی و پوشش وسیع ژنومی و همچنین سهولت آشکار سازی و تشخیص آنها کاربرد فراوانی دارند (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۹). مزیت نشانگرهای SSR در بررسی نشانگرهای آگاهی

واژه‌های کلیدی

یونجه زراعی
(*Medicago sativa*)
نشانگرهای آگاهی بخش،
صفات مورفولوژیکی،
SSR
تجزیه رگرسیون

از نشانگرهای SSR توانستند ۷۰۹ سانتی مورگان از ژنوم را پوشش دهند (۶).

مطالعات تجزیه ارتباطی مبتنی بر لینکاژ، ردیابی ژن‌های مختلف مرتبط با صفات زراعی را مقدور کرده است ولی اغلب به دلیل فاصله زیاد بین نشانگر و صفت زراعی، هم اصلاح با کمک نشانگر، جداسازی و هم‌سانه‌سازی ژن مورد نظر مشکل می‌باشد و هم از تعداد کمی ژنوتیپ به عنوان والد در نقشه‌یابی جمعیت‌ها استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر برای فائق آمدن بر این مشکل از تجزیه ارتباطی بین نشانگرها و صفات زراعی استفاده شده است که نه تنها نقشه‌یابی ژن‌ها را با درجه اطمینان بالا ممکن می‌سازد، بلکه شناسایی ژن‌هایی را که در نقشه‌یابی مبتنی بر پیوستگی قابل ردیابی نیستند مقدور می‌سازد (۱۵، ۱۸). در سیستم‌های گیاهی مطالعات کمی در مورد تجزیه ارتباطی صورت گرفته است (۱۷، ۲۰). در این تحقیق شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش^۱ مرتبط با صفات زراعی مطالعه شده در ۶۷ توده یونجه با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این آزمایش با ۶۷ اکوتیپ یونجه زراعی از نواحی مختلف کشور، در قالب طرح مربع لاتیس با دو تکرار در مزرعه‌ی پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج در سال ۱۳۸۷ انجام گرفت. بذور از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تهیه گردید (جدول ۱).

ارزیابی فنوتیپی

به منظور بررسی‌های مورفولوژیکی، هر اکوتیپ در چهار خط سه متری و با فاصله‌ی ۳۰ سانتیمتر در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۷ کشت گردید. کرت‌های آزمایشی با یک خط نکاشت از یکدیگر جدا شدند. در هر خط حدود یک گرم بذر مصرف شد. صفات مورد بررسی شامل روز پس از اولین برداشت تا ۱۰٪ گلدهی، وزن خشک و تر برگ، وزن خشک ساقه، وزن تر و خشک کل، نسبت وزن تر برگ به ساقه، نسبت وزن خشک برگ به ساقه،

بخش در یونجه از آنجا حائز اهمیت است که اکثر نشانگرهای SSR در یونجه زراعی (*M. sativa*) بر اساس EST-SSR گیاه *M. truncatula* (یونجه دیپلوئید مدل) طراحی شده‌اند و EST‌ها جز ناحیه رونویسی شده ژنوم می‌باشند در نتیجه احتمال اینکه آغازگرهای طراحی شده در ناحیه عملکردی ژنوم قرار بگیرند بسیار زیاد است. مطابق گزارش ایوجای و همکاران (۲۰۰۴) ۴۸ درصد آغازگرهای طراحی شده از نواحی EST، در یونجه زراعی (*M. sativa*) با ژن‌های عملکردی پیوسته هستند و در نتیجه در صورت شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش قابل اطمینان می‌توان این ژن‌ها را انتقال داد (۸). یکی از کاربردهای مهم نشانگرهای ملکولی در گیاهان زراعی پیدا کردن نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی می‌باشد که اصولی‌ترین روش شناسایی این نشانگرها تهیه جمعیت‌های در حال تفرق و پس از آن ردیابی صفات کیفی یا کمی در این جمعیت‌ها می‌باشد. اگر صفت مورد بررسی کیفی باشد با استفاده از تجزیه تفرق توده می‌توان نقشه لینکاژی در اطراف ژن مورد نظر تهیه نمود. در حالتی که صفت کمی باشد تهیه نقشه‌های پیوستگی یکی از گام‌های اساسی در مکان‌یابی ژن-ها است (۱۶). موسیال و همکاران (۲۰۰۸) برای شناسایی QTL های مقاومت به بیماری *Stagonospora meliloto* در یونجه زراعی (*M. sativa*) از نشانگرهای SSR استفاده کردند، بدین منظور ۵۱۷ آغازگر SSR، برای غربال کردن بر روی گیاهان حاصل از تلاقی برگشتی استفاده شد و در مجموع ۲۷ آغازگر چندشکلی نشان دادند که با نقشه پیوستگی *M. sativa* تراپلوئید همبستگی نشان داشت (۱۵). سلچ و همکاران (۲۰۰۵) جهت پیدا کردن QTL های خشکی در یونجه زراعی از EST های *truncatula* استفاده کردند. دو والد و نسل F₁ را با ۱۶۸۰ آغازگر SSR غربال کردند. آنها با استفاده از این نشانگرها توانستند یک نقشه به طول ۶۲۴ سانتی مورگان با میانگین تراکم نشانگر ۱/۵ تا ۴/۴ سانتی مورگان در هر گروه پیوستگی تهیه کنند (۲۲). برنات و همکاران (۲۰۰۳) دو نقشه پیوستگی را با استفاده از نشانگرهای SSR و AFLP در یونجه زراعی (*M. sativa*) تهیه کردند. در این تحقیق ۸ گروه پیوستگی حاصل شد که با استفاده

¹ Informative markers

درصد ماده خشک کل بوته، درصد ماده خشک ساقه، درصد ماده خشک برگ بود. کلیه اندازه‌گیری‌ها در مرحله رسیدن به ۱۰٪ گلدهی انجام شد. در اندازه‌گیری وزن‌های تر از هر تکرار دو گیاه و در مجموع چهار گیاه از هر اکوتیپ از قسمت طوقه جدا شده و پس از اندازه‌گیری وزن کل چهار بوته، برگ‌ها جدا شده و وزن برگ و ساقه جداگانه اندازه‌گیری شد. برگ‌ها و ساقه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آون ۷۲ درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس وزن خشک برگ و ساقه محاسبه گردید. در محاسبات آماری میانگین کلیه صفات استفاده گردید (فقط صفات فنوتیپی ذکر شده‌اند که برای آنها نشانگرهای آگاهی بخش یافت شده است).

ارزیابی ملکولی

در این تحقیق از ده جفت نشانگر ریزماهواره استفاده شد (جدول ۲). استخراج DNA از ۶۷ توده و از هر توده ۵ بوته جهت نمونه‌گیری انتخاب گردید. نمونه‌های گیاهی پس از خشک شدن در ازت مایع بلافاصله در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. استخراج DNA از برگ‌های جوان (برگ‌های سالم و سبز) بر اساس روش سقایی معروف (۱۹۸۴) انجام شد (۲۱).

جدول ۳ ضریب همبستگی دوگانه صفات مورد نظر را نشان می‌دهد. وزن تر برگ دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار با وزن خشک برگ (۰/۹۸۶)، وزن خشک ساقه (۰/۸۵۷) و وزن کل تر (۰/۹۳) بود. همبستگی وزن خشک برگ و وزن خشک ساقه نیز مثبت و معنی‌دار (۰/۸۶۵) بود و همبستگی مثبت و معنی‌داری میان نسبت وزن تر برگ به ساقه با نسبت وزن خشک برگ به ساقه (۰/۹۳۳) وجود داشت. همبستگی‌های فوق نشان داد که هر چه وزن ساقه در یونجه بیشتر باشد، وزن برگ‌های بوته نیز بیشتر خواهد بود. وزن خشک ساقه با نسبت وزن تر برگ به ساقه و نسبت وزن خشک برگ به ساقه همبستگی منفی و معنی‌دار (به ترتیب -۰/۲۷۳ و -۰/۴۱۶) داشت.

نتایج و بحث

ده جفت آغازگر بکار رفته در این تحقیق چند شکلی نشان دادند و به کمک آغازگرها در مجموع ۵۰ باند نمره‌دهی شد که از این تعداد ۳۷ باند چند شکلی نشان داد. آغازگر MTIC332 دارای بیشترین مقدار PIC (۰/۹۴) و آغازگر MAL369471 کمترین مقدار PIC (۰/۳۴) را داشتند و میانگین PIC در آغازگرها ۰/۶۳ برآورد شد. آغازگر ENOD20 بیشترین میزان MI (۴/۸) و

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در دستگاه Bio Rad انجام گرفت و چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۱۰ چرخه اول به صورت تاچ داون (Touch down) انجام شد بطوریکه در هر چرخه دمای اتصال یک درجه سانتی‌گراد کاهش یافت و مرحله بسط آغازگری در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه بود. ۲۵ چرخه بعدی به صورت چرخه‌های دمای ۹۴ درجه در ۲ دقیقه، ۵۵ درجه در ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه در یک دقیقه انجام شد. در نهایت ده میکرولیتر از محتوی محصولات PCR بر روی ژل پلی آکرلامید واسرشته ساز ۶ درصد با توان ثابت ۹۰ وات الکتروفورز شده و رنگ آمیزی با روش نترات نقره انجام شد (۴).

تجزیه آماری

با استفاده از فراوانی آللی، آماره PIC و MI در هر نشانگر جداگانه محاسبه شد. میزان اطلاعات چند شکلی^۲ بر اساس فرمول

^۲ Polymorphic Information Content

زراعی مورد بررسی رابطه معنی‌داری داشت (۱). اسکات و همکاران از نشانگرهای AFLP برای پیدا کردن نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی در چاودار استفاده کردند. آنها ۳ نشانگر پیوسته با تاریخ خوشه‌دهی را شناسایی کردند که با QTL های شناسایی شده بر روی کروموزوم ۷ پیوستگی نزدیکی نشان داد و توانست ۷۰ درصد از تغییرات تاریخ خوشه‌دهی را توجیه - کند (۲۳). زی سیانگ و همکاران (۲۰۰۸) از نشانگرهای SSR برای پیدا کردن نشانگرهای پیوسته با ۱۶ صفات زراعی و کیفی در گونه‌های زراعی و وحشی سویا استفاده کردند که به ترتیب ۲۷ و ۳۴ نشانگر پیوسته با این صفات در گونه‌های زراعی و وحشی شناسایی کردند (۲۴). ما قبلاً در بررسی تنوع ژنتیکی اکتیپ‌های یونجه از نشانگرهای ریزماهوره استفاده کردیم. آغازگرهای ریزماهوره توانستند نمونه‌های درون و بین جمعیتی یونجه‌های نواحی مختلف ایران را به خوبی از یکدیگر تفکیک کنند که این نتایج احتمالاً نشان دهنده توزیع مناسب ریزماهوره‌ها در ژنوم یونجه می‌باشد (۲). بنابراین، در برنامه‌های اصلاحی بکارگیری این آغازگرها ممکن است در شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش که همبستگی بالایی با صفات مهم زراعی دارند، مفید باشند. برخی از نشانگرها (مثل نشانگر B14B03) با بیش از یک صفت (وزن تر و خشک برگ، وزن خشک ساقه، وزن خشک و تر کل) ارتباط داشت و همبستگی دو به دو این صفات نیز در سطح یک درصد معنی‌دار بود. نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام نشان داد که مقدار قابل توجهی از تغییرات (بالای ۱۰ درصد) توسط این نشانگر (B14B03) توجیه می‌شوند و احتمالاً ژن‌های مربوط به این صفات، ژن‌های نزدیک به هم در مکان‌های کروموزومی بوده و ممکن است در فراهم آوردن اطلاعات اولیه در خصوص انتخاب غیرمستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید باشند. البته برای اطمینان از وجود ارتباط پیوسته بین نشانگرها و صفات مختلف زراعی نیاز به تهیه جمعیت‌های تفرق مانند F_2 ، RIL ^۵، DH ^۶ می‌باشد تا بر اساس این جمعیت‌ها نقشه-های پیوستگی تهیه و سپس محل مکان‌های کنترل کننده این

آغازگر MAL369471 کمترین میزان MI (۰/۶۸) را نشان داد و میانگین MI در آغازگرها ۲/۵ بود (جدول ۲). به منظور تعیین ارتباط بین صفات کمی یادداشت شده با داده‌های مولکولی و شناسایی نشانگرهایی که بالقوه قابلیت پیوستگی با این صفات را دارند از روش رگرسیون گام به گام استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون ارتباط معنی‌دار ۱۷ نشانگر را با ۱۱ صفت نشان داد (جدول ۴ و ۵). بیشترین تعداد نشانگر، در صفت تاریخ گلدهی (۸ نشانگر) و کمترین تعداد نشانگر در صفات وزن تر و خشک برگ (هر کدام با یک نشانگر) شناسایی شد. بیشترین ضریب تبیین (R^2) مربوط به نسبت برگ به ساقه خشک (۰/۲۴/۱) و بیشترین ضریب تبیین در مجموع نشانگرهای آگاهی بخش (R^2_T) مربوط به نسبت برگ به ساقه تر (۰/۶۲) بود. نشانگر MAL36947 دارای بیشترین R^2 (۰/۲۴/۱۱) در صفت نسبت برگ به ساقه خشک و دارای بیشترین R^2 (۰/۱۰/۳) برای تاریخ گلدهی بود. نشانگر FMT13 ۱۹/۲٪ از تغییرات صفت نسبت برگ به ساقه تر و نشانگر ENOD20 ۱۸/۷٪ از تغییرات درصد ماده خشک برگ را توجیه نمودند. نشانگر B14B03 با بیشترین تعداد صفات همبستگی نشان داد و توانست ۱۰/۷٪ تا ۱۳/۵٪ تغییرات صفات مورد بررسی را توجیه کند به طوری که دارای بیشترین R^2 در صفات وزن تر و خشک برگ، وزن خشک کل، وزن تر کل و وزن خشک ساقه بود. نشانگر MTIC332 دارای بیشترین R^2 (۰/۱۳/۵) در درصد ماده خشک کل بوته بود و نشانگر B21E13 ۱۳/۱٪ از تغییرات درصد ماده خشک کل ساقه را توجیه کرد.

روی و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی تجزیه ارتباطی ۱۴ صفت مورفولوژیکی در گندم نان با نشانگرهای SSR، AFLP^۳ و SAMPL^۴ از طریق روش رگرسیون گام به گام قادر به شناسایی ۵۱ نشانگر شدند که با حداقل یکی از صفات ارتباط داشت و در نهایت پیشنهاد نمودند که از این نشانگرها می‌توان در برنامه‌های اصلاح به کمک نشانگر همراه استفاده کرد (۲۰). رشیدی و همکاران نیز با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزن ۳۲ نشانگر SSAP در گندم را شناسایی کردند که حداقل با یکی از ۶ صفت

⁵ Recombinant Inbreed Line

⁶ Double Haploid

³ Amplified Fragment Length Polymorphism

⁴ Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic

صفات را بر روی کروموزومها مشخص نمود (۱۶). در تهیه نقشه های پیوستگی، اطلاعات نشانگری فراهم شده در این تحقیق، در جهت انتخاب آغازگرهای مناسب مفید خواهد بود ولیکن در دسترس نبودن جمعیت های در حال تفرق، عدم وجود لینکاژ مناسب بین صفات زراعی و نشانگرهای ملکولی و زمان کافی از جمله مهمترین محدودیت ها در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی می باشند (۹). با استفاده از نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با صفات مهم زراعی از جمله اجزاء عملکرد، به

خصوص نشانگرهایی که مکان کروموزومی آنها مشخص می باشد، می توان با تولید لاین های با جایگزینی کروموزومی^۷، صفات زراعی مورد نظر را در یک لاین فاقد آن صفت از طریق تلاقی انتقال داد. توالی یابی باندهای آگاهی بخش و مقایسه آنها با توالی های موجود در بانک های اطلاعاتی به اطمینان انتخاب به کمک مارکر و همسانه سازی آنها می افزاید.

⁷ Chromosome Substitution Line

جدول ۱- منشا جغرافیایی توده های بومی مورد استفاده در این تحقیق

کد دسترسی*	محل جمع آوری	کد دسترسی	محل جمع آوری	کد دسترسی	محل جمع آوری	کد دسترسی	محل جمع آوری
۴۴-۱	زرین شهر ۱	۲۶۸	فزوه ۳	۴۰-۱	همدان- قریه فامین چه	۲۰۴	مرد- عریان تپه
۲۳-۱	دامغان	۱۱-۱	کهریزسنگ	۱۹۱	همدان- ترکیه	۴۳-۱	آذربایجان شرقی
۱۲۶-۱	فزوه ۱	۱۲۶	فزوه ۴	۱۷۶	همدان- آب انبار	۴۳-۲	آذربایجان شرقی
۶۸	زرین شهر	۱۸۸	رفسنجان	۱۸۲	همدان- ایتالیا	۲۱۲	جلفا- سیه رود
۴۲	کوهپایه ۱	۲۵	سبزوار	۱۸۹	جهاد همدان- ترکیه	۲۰۲	جلفا- مرزاد
۴۷	کاشان ۱	۲۴	یزد	۱۷۹	همدان- ایتالیا	۱۷۲	دیواندره- باقرآباد چهارمحال و بختیاری
۹-۲	گرگان ۱	۱۴۵	جیرفت	۱۸۶	همدان- ترکیه	۲۸۱	کوشک کرج
۳۹	کوهپایه ۲	۲۹	گناباد	۱۷۵	همدان- عبدالرحیم	۶۵-۱	کوشک کرج
۲۷	شاهرود	۱۰-۲	نیشابور	۱۷۰	همدان- ایتالیا	۶۵-۲	کوشک کرج
۴۵	گلستانکوه	۳۴-۲	بیرجند ۱	۲۰۸	همدان	۳۰	ورامین
۶۷	گرگان ۲	۶	سیرجان	۱۸۰	همدان- اصفهان	۲۲۳	شاهرود
۸۳	فلاورجان	۳۴-۱	بیرجند ۲	۱۰۳	همدان- جفه	۲۷-۲	شاهرود
۳۰-۲	ورامین	۳۶-۱	شهر بابک	۱۸۴	همدان- اسدآباد	۱۹۳	دامغان
۱۴۷-۱	فزوه ۲	۴	سیستان و بلوچستان	۱۹۶	همدان	۴۹-۲	کرمانشاه
۸	اصفهان	۳۲	تریت	۱۸۵	همدان- کرج	۵۷	ایتالیا
۱۴-۲	کاشان ۲	۵۶-۲	بم	۲۱۳	گلپایگان- همدان	۵۴-۲	ترکیه
۵	میمه			۲۱۹	مهاباد	۵۲-۱	استرالیا

* اکوتیپ های مورد استفاده در این تحقیق با کدهای ارائه شده از مرکز اصلاح بذر و گیاه اصفهان قابل دسترس است.

جدول ۲- نمایش توالی و مشخصات آغازگرها و میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI)

نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چند شکلی	درصد چند شکلی	میزان اطلاعات چند شکلی	شاخص نشانگر
MTIC345	5'-tccgatcttgcgtcctaact-3' 3'-ccattgcgggtgctactct-5'	4	3	75	0/56	1/68
B21E13	5'-gccgatggactaatgtagg-3' 3'-aaatctgtcttctcag-5'	5	4	80	0/56	1/68
MTIC332	5'-ccctgggttttgatccag-3' 3'-ggtcatacagactcctccat-5'	4	4	100	0/94	3/76
B14B03	5'-gctgttcttctcaagctc-3' 3'-acctgactgtgtttatgc-5'	5	4	80	0/74	2/96
MTIC432	5'-tggaaattgggatagaa-3' 3'-ggccataagaactccactt-5'	5	3	60	0/66	2/64
FMT13	5'-gatgagaaaatgaaaagaac-3' 3'-caaaaactcactctaacacac-5'	7	5	71	0/51	3/03
AFct45	5'-taaaaaacggaaagattggttag-3' 3'-gccatcttttcttcttc-5'	5	4	80	0/62	2/48
MAL369471	5'-attcacacaaacctcttc-3' 3'-aaaccttagcaccgaca-5'	4	1	25	0/34	0/68
ENOD20	5'-cgaactcgaattaccaagctc-3' 3'-ttgagtagctttgggtg-5'	6	6	100	0/84	4/18
MTIC250	5'-gcctgaactattgtgaatgg-3' 3'-cgtgatgatgtcttgatg-5'	5	3	60	0/62	1/86
میانگین		5/1	3/8	73/4	0/63	2/5

جدول ۳- ضرایب همبستگی دوگانه بین صفات اندازه گیری شده در اکوتیپ های یونجه زراعی.

PDSW	PDLW	PDTW	DSLrate	FLSrate	DSW	DLW	TDW	FLW	FTW	DATE	علائم اختصاری	صفات
											DATE	تاریخ گلدهی
										-۰/۰۷	FTW	وزن کل تر
								۰/۹۳**	۰/۰۸۹		FLW	وزن تر برگ
								۰/۹۲۳**	۰/۹۸**	-۰/۱۰۶	TDW	وزن کل خشک
							۰/۹۳۳**	۰/۹۸۶**	۰/۹۳**	-۰/۱۲۵	DLW	وزن برگ خشک
						۰/۸۶۵**	۰/۹۸۷**	۰/۸۵۷**	۰/۹۷**	-۰/۱۰۳	DSW	وزن خشک ساقه
					-۰/۲۷۳*	۰/۱۳۸	-۰/۱۴۳	۰/۱۵۶	-۰/۱۳**	۰/۰۶۹	FLSrate	نسبت وزن برگ به ساقه تر
				۰/۹۳۳**	-۰/۴۱۶**	۰/۰۱۹	-۰/۲۹۷*	۰/۰۱۶	۰/۲۷۵*	۰/۰۳۲	DSLrate	نسبت وزن برگ به ساقه خشک
			-۰/۱۱۸	۰/۰۵۰	۰/۲۵۴*	۰/۲۲۶	۰/۲۵۳*	۰/۱۲۷	۰/۱۳	-۰/۱۱	PDTW	درصد ماده خشک کل بوته
	۰/۶۸۷**	۰/۰۱۹	-۰/۰۹۸	-۰/۰۹	۰/۰۴۵	-۰/۰۷۸	-۰/۱۹۱	-۰/۱۷	-۰/۰۸		PDLW	درصد ماده خشک برگ
۰/۴۶۴**	۰/۹۵۱**	-۰/۰۱۱	۰/۲۳۶	۰/۲۸۴	۰/۳۰۲*	۰/۲۹۹**	۰/۲۳۳	۰/۱۹	-۰/۱۴		PDSW	درصد ماده خشک ساقه

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و یک درصد.

جدول ۴- نشانگرهای آگاهی بخش پیوسته با صفات و میزان تغییرات توجیه شده این صفات به کمک نشانگرها

طول نشانگر* (bp)	نشانگر سرگروه*	R^2_T (%)	R^2_{max} (%)	تعداد نشانگر(T)	صفت
۷۵	MAL36947	۲۷/۳	۱۰/۳	۸	تاریخ گلدهی
۱۱۵	B14B03	۲۰/۷	۱۰/۹	۲	وزن کل تر
۱۱۵	B14B03	۱۳/۵	۱۳/۵	۱	وزن برگ تر
۱۱۵	B14B03	۲۲	۱۲/۳	۲	وزن کل خشک
۱۱۵	B14B03	۱۳/۵	۱۳/۵	۱	وزن برگ خشک
۱۱۵	B14B03	۲۰/۱	۱۰/۷	۲	وزن ساقه خشک
۱۰۰	FMT13	۶۲	۱۹/۲	۵	نسبت برگ به ساقه تر
۷۵	MAL36947	۴۵/۶	۲۴/۱	۳	نسبت برگ به ساقه خشک
۱۳۰	MTIC332	۳۶/۱	۱۳/۵	۳	درصد ماده خشک کل بوته
۲۵۰	ENOD20	۴۵/۲	۱۸/۷	۳	درصد ماده خشک برگ
۱۱۵	B21E13	۳۵/۳	۱۳/۱	۳	درصد ماده خشک ساقه

T: تعداد نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات کمی

 R^2_T : ضریب تبیین در مجموع نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات کمی R^2_{max} : بیشترین ضریب تبیین مربوط به یک نشانگر برای صفت کمی* طول نشانگر با بیشترین R^2

جدول ۵- تجزیه رگرسیون چندگانه با روش گام به گام برای ۱۱ صفت زراعی بعنوان متغیرهای وابسته و نشانگرهای آگاهی بخش بعنوان متغیرهای مستقل با استفاده از ۳۷ نوار چند شکل SSR.

صفت	منبع واریانس	df	SSR Max %	df	SSR Complete%
تاریخ گلدهی	X***	۱	۷۳*	۸	۲۵/۹۶
	Y****	۱۹۶	۳/۱۲	۱۸۹	۲/۵۳
وزن کل تر	X	۱	**۱۹۶۵۷/۸۳	۲	۱۸۶۳۷/۰۹
	Y	۳۸	۴۲۲۳/۹۸	۳۷	۳۸۶۲/۰۳
وزن برگ تر	X	۱	**۳۲۳۲/۷۱	۱	۳۲۳۲/۷۱
	Y	۳۸	۵۴۳/۰۵	۳۸	۵۴۳/۰۵
وزن کل خشک	X	۱	**۱۴۱۳/۳۷	۲	۱۲۶۵/۳۷
	Y	۳۸	۲۶۵/۴۴	۳۷	۲۴۲/۴۱
وزن برگ خشک	X	۱	۱۳۹**	۱	۱۳۹/۶۹
	Y	۳۸	۲۳/۵۱	۳۸	۲۳/۵۱
وزن ساقه خشک	X	۱	**۶۶۴/۳۹	۲	۶۲۵/۴۱
	Y	۳۸	۱۴۶/۱۷	۳۷	۱۳۴/۲۸
نسبت برگ به ساقه تر	X	۱	**۰/۲۲۵	۵	۰/۱۴
	Y	۳۸	۲/۴۹	۳۴	۱/۳
نسبت برگ به ساقه خشک	X	۱	*۰/۱۶	۳	۰/۱۰
	Y	۳۸	۱/۳۵	۳۶	۱/۰۲
درصد ماده خشک کل	X	۱	*۳۴	۳	۳۰/۶۵
	Y	۳۸	۵/۸۰	۳۶	۴/۵۲
درصد ماده خشک برگ	X	۱	**۲۲/۸۸	۳	۱۸/۴۶
	Y	۳۸	۲/۶۲	۳۶	۱/۸۶
درصد ماده خشک ساقه	X	۱	*۵۶/۴۴	۳	۵۰/۷۴
	Y	۳۸	۹/۸۴	۳۶	۷/۷۳

* و ** به ترتیب معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد.

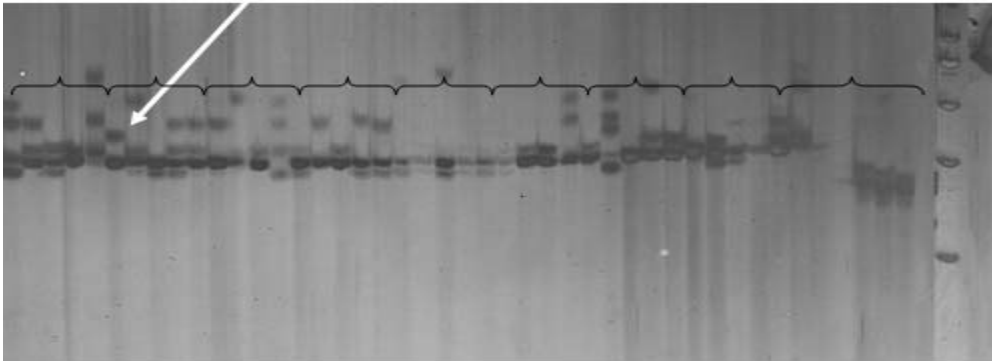
SSR Max: درصدی از تغییرات که توسط متغیر مستقل اول توجیه می شود.

SSR Complete: درصدی از تغییرات که توسط کل متغیرهای مستقل که وارد رگرسیون شده اند توجیه می شود.

X***: رگرسیون

y****: باقیمانده (خطا)

M



شکل ۱: نشانگر آگاهی بخش (علامت پیکان) مربوط به آغازگر B14B03 که با صفات وزن تر و خشک برگ، وزن خشک ساقه و کل گیاه و وزن کل تر ارتباط رگرسیون معنی داری نشان داد. M نشانگر اندازه (SM1131) می باشد. ۱:همدان-قریه فامین چه؛ ۲:دامغان؛ ۳:کرمانشاه؛ ۴:همدان؛ ۵:همدان-آب انبار؛ ۶:ورامین؛ ۷:همدان (۱۹۶)؛ ۸: کوشک کرج؛ ۹:مرد-عریان تپه.

منابع

۱. رشیدی منفرد س، مردی م، حسین زاده ع، نقوی م (۱۳۸۷) تجزیه ارتباطی بین صفات زراعی مهم و نشانگرهای رتروترانسپوزونی SSAP در نمونه های گندم دوروم، مجله ژنتیک نوین، ج ۳، ش ۲: ۲۹-۳۶.
۲. محمدی م، نقوی م، معالی امیری ر، رضایی م، کابلی م، م (۱۳۸۸) ارزیابی تنوع ژنتیکی یونجه های زراعی غرب و شمال غرب ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، مجله تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، (زیر چاپ).
۳. Anderson J A, Church J E, Autrique S D, Thanksley S and Sorrells M E (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage map. *Journal of Genome*, 36(1): 181-188.
۴. Bassam B, Caetano-Anolles J G and Gressho P M (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 196(1): 80-83.
۵. Botstein D R, White R L, Skolmick M, and Davis R W (1980) construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, *Human Genetic*, 32: 314-332.
۶. Bernadette J, Sandrine V, Philippe B, Gaele C, Sylvain S, Thierry H and Christian H (2003). Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology*. 3:1-19.
7. Breseghello F & Sorrells M E (2005) Association of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum sativum* L.) cultivars. *Genetics*, DOI 10.1534/genetics.105:44586.
8. Eujayl I M, Sledge K, Wang L and May G D (2004) *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theor Appl Genet*, 108: 414-422.
9. Gupta P K, Rustgi S and Kulwal P L (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Mol. Biol*, 57: 461-485.
10. Langridge P, Langudah E S, Holton T A, Apples R, Sharp P J & Chalmer K J (2001) Trends in genetics and genome analysis in wheat: a review. *Australian J. Agri. Res*, 52: 1043-1077.
11. Litt M, and Luty J A (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*, 44: 397-401.
12. King D, Soller M and Kashi Y (1997) Evolutionary tuning knobs. *Endeavour*, 21: 36-40.
13. Kashi Y and Soller M (1999) Functional roles of microsatellites and minisatellites pp: 12-23. In: Goldstein D B, Schlötterer C (Eds) *Microsatellites: evolution and application*. Oxford University Press, Oxford, 564pp
14. Kashi Y, King D, Soller M (1997) Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet*, 13: 74-78.
15. Musial J M, Mackie J M, Armour J D, Phan T T H and Ellwood E S (2008) Identify of QTL for resistance and susceptibility to *Stagonospora meliloti* in autotetraploid Lucern. *Applied Genetic*, 1148: 1427-1435.

16. Naghavi M R, Mardi M, Pirseyedi S M, Kazemi M, Potki P and Ghaffari M R (2007) Comparison of genetic variation among accessions of *Aegilops tauschii* using AFLP and SSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol*, 54: 237-240.
17. Neale D B & Savolainen O (2004) Association genetic of complex traits in conifers. *Trend Plant Science*, 9: 325-330.
18. Powell W, Morgante M, Ander C, Hanafey M, Vogel J, Tingy S and Rafalaski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR(microsatellite) marker for germplasm analysis. *Journal of Molecular Breeding*, 2: 225-238.
19. Roder M S, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M H and Gamal M W (1998) A microsatellite map of wheat, *Genetics*, 149: 2007-2023.
20. Roy J K, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan H S and Gupta P K (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science*, 90:5-10.
21. Saghai-Maroo M A, Soliman K M, Jorgensen R A and Allard R W (1984) DNA spacerlength polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 81: 8014-8018.
22. Sledge M K, Ray I M and Jiang G (2005) An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 111: 980-992.
23. Skøt L, Humphreys M O, Armstead I P, Heywood S, Skøt K P, Sanderson R, Thomas I D, Chorlton K H and Sackville Hamilton N R (2005). An association mapping approach to identify flowering time genes in natural populations of *Lolium perenne* (L.). *Molecular Breeding*, 15: 233-245.
24. Zi-Xiang W, Tuan-Jie Z, Yong-Zhan Z, Shun-Hu L, Chun-E W, Fang W and UN-I C (2008) Association Analysis of Agronomic and Quality Traits with SSR Markers in *Glycine max* and *Glycine soja* in China: Population Structure and Associated Markers. *acta agronomica sinica*, 34: 1169-1178.