

تجزیه ارتباطی صفات زراعی با نشانگرهای ریز ماهواره در

جوهای بومی ایران

امین ابراهیمی^{۱*}، محمدرضا نقوی^۲، منیژه سبکدست^۳، امیر مرادی سرابشلی^۴

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجو، استاد، مربی و دانشجوی گروه زراعت و اصلاح نباتات،

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aminebrahimi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۳۰)

چکیده

در این تحقیق ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی در جو با استفاده از ۱۰ صفت زراعی و ۷۰ نشانگر مولکولی حاصل از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره روی ۱۱۵ ژنوتیپ بومی مورد مطالعه قرار گرفت. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها بین ۰/۳۱ تا ۰/۸۵ متغیر بود. نشانگرهای AF220725A، Bmag0013 و HVM40 با بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها، بیشترین شاخص چندشکلی را نشان دادند، به این معنی که این نشانگرها بهتر از همه نشانگرهای استفاده شده توانستند فاصله ژنتیکی ارقام را مشخص کنند، در حالیکه نشانگر HVM70 با کمترین مقدار شاخص چندشکلی، به خوبی توانایی جداسازی ژنوتیپها را نداشته است. با استفاده از روش رگرسیون چند گانه (گام به گام) ارتباط بین هر کدام از ۱۰ صفت زراعی و ۷۰ نشانگر چند شکل مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرهای HVM20، Gms003، Bmac0306 و HvHVA1 تغییرات بیشتری از صفات مورد بررسی را نشان دادند. نتایج نشان داد که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط نشان می‌دهند که بیانگر این است که این صفات پیوستگی بسیار نزدیکی با همدیگر داشته و یا احتمالا تحت تأثیر ژنهای چند اثره قرار دارند. برای درک این موضوع تهیه نسل‌های در حال تفرق و نقشه‌های پیوستگی ضروری می‌باشد.

مقدمه

جو زراعی متعلق به خانواده Poaceae و جنس *Hordeum* بوده و شامل ۳۲ گونه و ۴۵ تاکسون است. این گیاه از نظر اهمیت غذایی و سطح زیر کشت در میان غلات، پس از گندم، ذرت و برنج مقام چهارم را دارد، اما با توجه به اینکه در شرایط متنوع آب و هوایی قابل کشت است، از نظر دامنه گسترش کشت مقام اول را داراست. جو در سراسر جهان به دلیل سازگاری وسیع به شوری، خشکی و دمای پایین، به جز نواحی استوایی کشت می‌گردد (۳).

واژه‌های کلیدی

آغازگرها،
جو بومی،
رگرسیون گام به گام،
محتوای اطلاعات چندشکلی،
مورفولوژی،
SSR

برآورد تنوع ژنتیکی در محصولات زراعی، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از منابع ژنتیکی دارد، که از طریق صفات مورفولوژیکی، بررسی شجره‌ها و نشانگرهای مولکولی میسر می‌گردد. افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات زراعی و استفاده بهینه از ذخایر ژنی مستلزم جمع آوری، نگهداری، توصیف و ارزیابی مواد ژنتیکی است. ایجاد تنوع ژنتیکی و ژرم پلاسما جدید در اصلاح گندم و بهبود برخی از خصوصیات و ایجاد تیپ‌های ایدال گیاه نیز بسیار مهم می‌باشد (۲۰). جهت تعیین و برآورد تنوع ژنتیکی گیاهان، از نشانگرهای متفاوتی مانند نشانگرهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و DNA استفاده می‌شود (۱۹). قبل از شناسایی و کاربرد نشانگرهای مولکولی در ارزیابی روابط بین ژنوتیپ‌ها در یک گونه خاص، اغلب صفات مورفولوژیک نقش عمده را ایفا می‌نمودند. پیشرفت علم بیوتکنولوژی در سال‌های اخیر کمک شایانی در تشخیص روابط ژنتیکی و فیلوژنی و نیز در اصلاح گیاهان نموده است. نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیک تکمیل کننده یکدیگر بوده و نمی‌توانند به تنهایی ابزار مفید و سودمندی در روش‌های مختلف اصلاحی محسوب شوند (۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۲۲). مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی دارای کاربردهای متعددی است که برخی از آنها عبارت است از امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی، شناسایی آلل‌های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرم پلاسما، تسهیل مکان یابی دقیق QTLها و تأیید ژن‌های کاندیدای مسئول صفات کمی (۷). در طی دو دهه اخیر نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA بطور گسترده‌ای برای اهداف مختلف در گیاهان و جانوران مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از جمله توانمندترین این نشانگرها، نشانگرهای ریزماهواره هستند که در DNA هسته‌ای تمام یوکاریوت‌ها و حتی بعضی از پروکاریوت‌ها از جمله باکتری‌ها یافت شده (۵) و بطور مکرر دچار چندشکلی می‌شوند (۹). ریز ماهواره‌ها در هر دو قسمت توالی‌های کد کننده^۱ و غیر کد کننده^۲ در همه موجودات عالی مورد آزمایش قرار گرفته،

^۱ Coding^۲ Non- coding

وجود دارند (۱۲). ارزش ریزماهواره‌ها از خاصیت چند آلی طبیعی آنها، وراثت هم‌بارز آنها، فراوانی نسبی و پوشش وسیع ژنومی و همچنین سهولت آشکارسازی و تشخیص آنها به وسیله کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با دو آغازگر اختصاصی که از روی نواحی مجاور^۳ ریز ماهواره‌ها طراحی می‌گردد، ناشی می‌شود (۲۵). کاربردهای ریزماهواره‌ها در نقشه‌یابی ژنومی، انگشت نگاری DNA، نشانمند کردن ژنها^۴، سازماندهی ژرم پلاسما و مطالعات سیتوژنتیکی مشخص شده است (۸). از کاربردهای دیگر ریزماهواره‌ها، می‌توان به عنوان نشانگرهایی جهت (نقشه یابی)^۵ ژنها در گندم و سایر گیاهان اشاره کرد (۱۳). یکی از پیشرفت‌های بزرگ که در سال‌های اخیر در زمینه سیستم‌های تشخیص نشانگرها ایجاد شده است، شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مفید است و همچنین ارزش نشانگرها در آنالیز وراثت صفات در گیاهان زراعی ساختار و سازمان دهی ژنوم مشخص شده است (۱). در یک تحقیق با مطالعه ۱۴۶ رقم جو بهاره با استفاده از ۲۳۶ نشانگر AFLP ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات عملکرد و پایداری عملکرد تعیین شد. رگرسیون چندگانه گام به گام نشان داد که ۱۸ تا ۲۰ نشانگر ۴۰ تا ۵۸ درصد تغییرات این دو صفت را تبیین می‌کنند (۱۴). رشیدی و همکاران (۱۳۸۷) ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی با استفاده از ۶ صفت زراعی و ۷۴ نشانگر مولکولی حاصل از ۱۰ جفت آغازگر چند - شکلی حاصل توالی اختصاصی تکثیر شونده^۶ (SSAP) روی ۱۰۸ ژنوتیپ بومی و ۲۱ رقم زراعی گندم دوروم مطالعه کردند. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی^۷ (PIC) آغازگرها بین ۰/۱۸ تا ۰/۴۱ متغیر بود. با استفاده از روش رگرسیون چند گانه (گام به گام) ارتباط بین هر کدام از ۶ صفت زراعی و ۷۴ نشانگر چند شکل مورد بررسی قرار دادند که در نهایت ۳۲ نشانگر چند شکلی توالی‌های اختصاصی تکثیر یافته رابطه معنی داری با حداقل یکی

^۳ Flank^۴ Gene tagging^۵ Mapping^۶ Sequence Specific Amplified Polymorphism^۷ Polymorphic information content

از ۶ صفت زراعی داشتند آنها نتیجه گرفتند که می توان از آنها در اصلاح وابسته به نشانگر بهره گرفت.

در دسترس بودن نشانگرهای ریز ماهواره ها مطالعه تجزیه ارتباطی بین این نشانگرها و صفات مورفولوژیکی را ممکن می سازد. هدف ما از این تحقیق شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش^۸ مرتبط با صفات زراعی مورد نظر در ۱۱۵ ژنوتیپ جو بومی با استفاده از سیستم نشانگری ریز ماهواره ها می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

در سال زراعی ۸۸-۱۳۸۷ تعداد ۱۱۵ ژنوتیپ جو از ۵ گونه شامل *H. vulgare* (۲۶ ژنوتیپ)، *H. spontaneum* (۴۸ ژنوتیپ)، *H. marinum* (۱۵ ژنوتیپ)، *H. murinum* (۱۵ ژنوتیپ)، *bulbosum* (۱۱ ژنوتیپ) که از قسمت های مختلف ایران جمع آوری شده بودند، هر کدام در یک کرت هایی با یک ردیف به طول یک متر، فاصله ۲۵ سانتیمتر از هم و ۳ تکرار بصورت سیستماتیک در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تهران کشت و ارزیابی گردید. صفات مورد ارزیابی بر اساس شاخص های موسسه بین المللی ذخایر توارثی (۱۰) اندازه گیری شدند (جدول ۱) و برای بررسی تنوع بین ارقام در سطح مولکولی، از ۱۰ آغازگر ریز ماهواره بهره گرفته شد (جدول ۲).

⁸ Informative markers

جدول ۱- صفات اندازه گیری شده ژنوتیپ های جو در شرایط مزرعه

شماره	صفت	واحد اندازه گیری	زمان اندازه گیری
۱	تعداد گلچه های جانبی	-----	زمان رسیدگی
۲	تعداد سنبله در هر سنبله	-----	زمان رسیدگی
۳	ارتفاع بوته	سانتی متر	زمان خوشه دهی
۴	طول سنبله	سانتی متر	زمان گلدهی
۵	طول دانه	میلی متر	پس از رسیدگی فیزیولوژیک
۶	عرض دانه	میلی متر	پس از رسیدگی فیزیولوژیک
۷	تعداد برگ	-----	زمان خوشه دهی
۸	بیرون زدگی رادیکل	سانتی متر	زمان خوشه دهی
۹	طول رادیکل	سانتی متر	زمان خوشه دهی
۱۰	تعداد گره	-----	زمان خوشه دهی

استخراج و تکثیر DNA

استخراج DNA از نمونه های برگ با استفاده از روش سقایی معروف و همکاران (۱۹۸۴) با اندکی تغییر انجام گرفت (۲۴). واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر 1mM dNTPs، ۰/۳ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی مرز، ۱/۹۲ میکرولیتر از کلرید منیزیم ۱۵ میلی مولار و در نهایت با ۷/۲۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی که به صورت Touch Down برنامه ریزی شده بود، به این صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۱۰ درجه سانتیگراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و در هر چرخه دور اول با کاهش یک درجه دما، به دمای اتصال واقعی رسید. در ۲۵ چرخه بعد دمای اتصال ثابت (بسته به دمای اتصال آغازگر) و با زمان ۳۰ ثانیه انجام شد، در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۴ درجه در نظر گرفته شد. همچنین زمان و دمای بسط رشته نیز به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه در نظر گرفته شد. محصولات تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل پلی اکریلامید واسرشته ساز ۶ درصد تفکیک و رنگ آمیزی به روش نیترا نقره بر اساس دستور کار باسام و همکاران (۲) با اندکی تغییر انجام گرفت.

جدول ۲- اسامی آغازگرها و مشخصات آنها

نام آغازگر	توالی رفت 5'→3'	توالی برگشت 5'→3'	موتیف
HvWaxy4	AGTATCGCAGACGCTCAC	GTTATGTACTCGCTCGCTC	(GCAT)4
HVM20	CTCCACGAATCTCTGCACAA	CACCGCCTCCTCTTTTCAC	(GA)19
HVM40	CGATTCCCCCTTTTCCCAC	ATTCTCCGCCGTCCACTC	(GA)7
HVM70	CCGCCGATGACCTTCTC	ACCCACGACCTATGGCAC	(CA)8
Bmac0040	AGCCCGATCAGATTTACG	TTCTCCCTTTGGTCCTTG	(AC)20
Bmac0306	CCTTGTGTGAGTGTGTGTG	ACATGCACATGAACTAATCAA	(AC)10
Bmag0013	AAGGGGAATCAAAATGGGAG	TCGAATAGGTCTCCGAAGAAA	(CT)21
HvHVA1	CATGGGAGGGGACAACAC	CGACCAAACACGACTAAAGGA	(ACC)5
Bmac0316	ATGGTAGAGGTCCCAACTG	ATCACTGCTGTGCCTAGC	(AC)19
AF022725A	AGTATGGGGAATTTATTTGG	GCTGCAAAGTATGACAATATG	(TG)8
GMS003	TTTCAGCATCACACGAAAGC	TTGCATGCATGCATACCC	(GT)15
EBmac0415	GAAACCCATCATAGCAGC	AAACAGCAGCAAGAGGAG	(AC)17

تجزیه های آماری

داده های مولکولی بر اساس وجود و عدم وجود باند به ترتیب به صورت یک و صفر برای هر جفت آغازگر اختصاصی کد گذاری گردید. میزان اطلاعات چندشکل آغازگرها با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$ محاسبه گردید. بطوریکه P_i فراوانی آلل i ام و n تعداد آلل ها می باشد. سپس تجزیه رگرسیونی ۱۰ صفت زراعی در ۱۱۵ ژنوتیپ جو بومی با استفاده از نرم افزار SPSS با روش رگرسیون گام به گام انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان می دهد که بین گونه ها و همچنین درون گونه ها اختلاف معنی داری وجود دارد. بنابراین نتیجه گیری شد که بین گونه ها از نظر این صفات تنوع زیادی وجود دارد. نشانگرهای مورد بررسی در مجموع ۷۰ آلل چند شکل نشان دادند، بطوریکه تعداد آلل برای هر آغازگر از ۱ تا ۷ و با میانگین تعداد آلل ۳/۸۵ برای هر آغازگر مشاهده شد (جدول ۴).

بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها مربوط به آغازگر AF220725A و کمترین آن مربوط به آغازگر HVM70 بود. در کل آغازگرهای AF220725A, HVM20, Bmag0013, Bmac0316 و HVM40 دارای محتوای اطلاعات چندشکلی بالایی بودند. بیشترین و کمترین تعداد آلل به ترتیب مربوط به آغازگرهای AF220725A و HVM70 بود. از آنجائیکه میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریزماهواره، مناسب بودن هر مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می دهد (۲۱). بنابراین آغازگرهایی که تعداد آلل زیادی نشان داده اند برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب تشخیص داده می شوند از این جدول می توان نتیجه گیری کرد که با توجه به میزان محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها و تعداد آلل، آغازگرهای AF220725A, HVM20, Bmag0013, Bmac0316 و HVM40 در بررسی تنوع ژنتیکی مناسب می باشند. کادری و همکاران (۲۰۰۹) با مطالعه ۱۴ نمونه جو بومی و زراعی با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر SSR، میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها و تعداد جایگاه آللی را به ترتیب ۰/۵۳ و ۲/۸۷ بدست آوردند.

جدول ۳- تجزیه واریانس بین و درون گونه‌ها

تعداد دانه در خوشه	عرض دانه (میلی متر)	طول دانه (سانتی متر)	تعداد برگ	طول خوشه (سانتی متر)	طول رادیکل (میلی متر)	بیرون زدگی رادیکل (میلی متر)	تعداد گره	ارتفاع (سانتی متر)	تعداد خوشه	df
۴۲۶/۳۳**	۱۱/۹۲**	۵۹/۱۴**	۱۳/۴۷**	۲۳/۸۹**	۴۵۱/۹۴**	۱۲/۴۲ ^{ns}	۱۷/۸۳**	۴۹۸۲/۸۲**	۱۰۶/۵۸**	۴
۱۵۰۹/۸۱	۱۲/۹۱	۱۰۴/۴۳	۲۱۲/۱۵	۱۹۵/۷۰	۳۷۴۱/۳۸	۱۶۷۲/۶۱	۵۲/۶۲	۱۴۶۹۲/۶۱	۳۷۷/۴۵۳	۱۱۰
درون گونه‌ها										
۴۴/۴۵**	۰/۴**	۱/۵۴**	۲/۰۶**	۳/۳۷**	۷۱/۴۹**	۳۰/۲۴**	۲/۶۵**	۶۱۵/۳۲**	۱۱/۱۱**	۲۵
۲۸/۳۱**	۰/۴۳**	۳/۳۷**	۰/۷۸**	۴/۳۴**	۶۰/۲۳**	۲۷/۹۴**	۱/۲۳**	۲۸۶/۰۵**	۷/۰۷**	۴۷
۱۲۲/۷۸**	۰/۴۱**	۵/۱۵**	۱/۷۳ ^{ns}	۴/۶۰**	۱۵۱/۵۵**	۵۴/۸۱**	۱/۱۵**	۲۳۲/۷۵**	۳۰/۶۹**	۱۰
۲۶/۲۱**	۰/۵۶**	۱/۳۲**	۳۴/۸۸**	۹/۹۰**	۱۹۴/۸۳**	۸۷/۰۸**	۱/۰۶**	۵۱۹/۷۲**	۶/۵۵**	۱۵
۳۵/۸۶**	۰/۲۲**	۳/۴۳**	۰/۵۵ ^{ns}	۷/۹۹**	۱۰۴/۴۱**	۸۴/۱۴**	۰/۴۴*	۳۹۴/۳۸**	۸/۹۶**	۱۳

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

جدول ۴- میزان محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها و تعداد آلل‌های چند شکل برای هر آغازگر

Primer	محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها	polymorph allele	Primer	محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها	polymorph allele
HvWaxy4	۰/۵۵	۳/۲	Bmag0013	۰/۷۱	۴/۲
HVM20	۰/۷۸	۳/۸	HvHVA1	۰/۶۶	۳/۶
HVM40	۰/۶۹	۴/۴	Bmac0316	۰/۶۹	۴
HVM70	۰/۳۱	۱/۴	AF220725A	۰/۸۵	۶/۶
Bmac0040	۰/۵۴	۳	GMS003	۰/۵۲	۵/۶
Bmac0306	۰/۶۱	۳/۲	EBmac0415	۰/۵۳	۳/۲
Mean Total of PIC			۰/۵۴		
Mean Total of Polymorph allele			۳/۸۵		

از همه نشانگرهای استفاده شده، توانسته است فاصله ژنتیکی ارقام را مشخص کند، در حالیکه نشانگر HVM70 با کمترین مقدار شاخص چند شکلی، به خوبی توانایی جداسازی ژنوتیپ‌ها را نداشته است. نتیجه دیگری که از جدول ۴ می‌توان گرفت، این است که ارتباط خاصی بین افزایش تعداد آلل و مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها محاسبه شده وجود ندارد.

همچنین بیشترین تعداد آلل‌های چند شکل به ترتیب مربوط به نشانگرهای HVM40، AF220725A، GMS003 و کمترین تعداد آلل‌های چند شکل در نشانگرهای Bmac00040 و HVM70 دیده شد.

به طور کلی از جدول شماره ۴ می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نشانگرهای AF220725A، Bmag0013 و HVM40 با بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها، بیشترین شاخص چندشکلی را نشان می‌دهند. به این معنی که این دو نشانگر بهتر

جدول‌های ۵ و ۶ تجزیه داده‌های مورفولوژی و مولکولی را با استفاده از روش رگرسیون گام به گام نشان می‌دهد. بیشترین تعداد نشانگر برای صفت تعداد گره و کمترین آن مربوط به صفات تعداد برگ و طول رادیکل شناسایی شد. همچنین بیشترین و کمترین r^2 (ضریب تبیین) کل به ترتیب مربوط صفت عرض دانه و بیرون زدگی رادیکل بدست آمد. همچنین بیشترین و کمترین r^2 max به ترتیب مربوط به صفات ارتفاع و بیرون زدگی رادیکل بود.

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون، مشخص گردید که نشانگری از جفت آغازگر مکان ژنی HvHVA1 در اندازه ۸۰ جفت باز به ترتیب ۳۵ و ۳۵ درصد از تغییرات صفات تعداد سنبلچه و تعداد دانه در خوشه را توجیه نمود. نشانگری از جفت آغازگر مکان ژنی HVM20 در اندازه ۱۱۰ جفت باز دارای بیشترین r^2 با مقادیر ۴۵، ۶۱ و ۴۹ درصد به ترتیب تغییرات صفات ارتفاع، عرض دانه و طول دانه را توجیه نمودند. همچنین نشانگری از جفت آغازگر مکان ژنی Gms003 در طول ۷۵ جفت باز دارای بیشترین r^2 (۳۲ و ۸۲/۰ درصد) برای صفت تعداد گره و تعداد برگ بود. نشانگری از جفت آغازگر مکان ژنی

Bmac0306 بیشترین r^2 (۲۳ درصد) برای صفات طول رادیکل و طول خوشه در اندازه ۱۱۵ جفت باز را توجیه نمود. روی و همکاران (۲۰۰۶) تجزیه ارتباطی بین ۱۱ صفت زراعی و ۵۱۹ نشانگر ریز ماهواره را در گندم نان بررسی کردند. بیشترین میزان R^2 برای صفت شاخص برداشت با ۲۸ درصد و طول ۲۹۱ bp در آغازگر Xwmc44 بدست آمد. آنان چنین نتیجه گرفتند که در کل نشانگرهای انتخاب شده توزیع یکنواختی در اطراف صفات زراعی مورد ارزیابی داشتند. رشیدی و همکاران (۱۳۸۷) ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی با استفاده از ۶ صفت زراعی و ۷۴ نشانگر مولکولی حاصل از ۱۰ جفت آغازگر SSAP روی ۱۰۸ ژنوتیپ بومی و ۲۱ رقم زراعی گندم دوروم مطالعه کردند. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها بین ۰/۱۸ تا ۰/۴۱ متغیر بود. با استفاده از روش رگرسیون چند گانه (گام به گام) ارتباط بین هر کدام از ۶ صفت زراعی و ۷۴ نشانگر چند شکل مورد بررسی قرار دادند که در نهایت ۳۲ نشانگر SSAP رابطه معنی داری با حداقل یکی از ۶ صفت زراعی داشتند آنها نتیجه گرفتند که می‌توان از آنها در اصلاح وابسته به نشانگر بهره گرفت.

جدول ۵- تعداد نشانگرهای آگاهی بخش پیوسته با صفت و درصد تغییراتی از صفات که توسط این نشانگرها توجیه می‌شود.

صفت	تعداد نشانگر (T)	R^2 Max (%)	R^2 T (%)
تعداد سنبلچه	۱۰	۳۵	۷۱
ارتفاع	۷	۴۵	۶۵
تعداد گره	۱۴	۳۲	۶۳
بیرون زدگی رادیکل	۴	۰/۴۲	۱۳
طول رادیکل	۳	۲۳	۳۴
طول خوشه	۴	۲۳	۳۴
تعداد برگ	۳	۰/۸۲	۱۴
طول دانه	۱۰	۴۹	۷۷
عرض دانه	۱۰	۶۱	۸۱
تعداد دانه در خوشه	۱۰	۳۵	۷۱

(T) تعداد نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات کمی

R^2 max) بیشترین ضریب تبیین مربوط به یک نشانگر برای صفات کمی (درصد)

R^2 T) مجموع کل ضریب تبیین نشانگرها آگاهی بخش برای صفات کمی (درصد)

جدول ۶- جزئیات تجزیه واریانس رگرسیون گام به گام ۷۱ باند چند شکل نشانگر ریز ماهواره و ۱۰ صفت کمی

صفت	منبع واریانس	df	SSR Max	df	SSR Complete
تعداد سنبلچه	(X) رگرسیون	۱	۲۹۱/۴۴**	۱۱۳	۵۹/۵۷**
	(Y) خطا	۱۰	۴/۵۳	۱۰۴	۲
ارتفاع	(X) رگرسیون	۱	۱۵۹۶۵**	۱۱۳	۳۳۲۹/۳۴**
	(Y) خطا	۷	۱۶۵/۱۲	۱۰۷	۱۰۵/۷۸
تعداد گره	(X) رگرسیون	۱	۴۰/۸۹**	۱۱۳	۹/۷۹**
	(Y) خطا	۸	۰/۷۳۵	۱۰۶	۰/۴۳
بیرون زدگی رادیکل	(X) رگرسیون	۱	۸۷/۳۹ ^{ns}	۱۱۳	۷۲/۶۱۷**
	(Y) خطا	۴	۱۴/۴۶	۱۱۰	۱۳/۰۱۷
طول رادیکل	(X) رگرسیون	۱	۱۲۹۲/۷۳**	۱۱۳	۶۳۷/۹۸**
	(Y) خطا	۳	۳۵/۲۷	۱۱۱	۳۰/۳۱
طول خوشه	(X) رگرسیون	۱	۶۹/۳۴**	۱۱۳	۲۶/۴۷**
	(Y) خطا	۴	۱/۹۶۴	۱۱۰	۱/۶۸
تعداد برگ	(X) رگرسیون	۱	۲۳/۹۱**	۱۱۳	۱۴/۴۳**
	(Y) خطا	۳	۲/۱۴	۱۱۱	۲
طول دانه	(X) رگرسیون	۱	۱۷۱/۳۰**	۱۱۳	۳۳/۵۱**
	(Y) خطا	۸	۱/۵	۱۰۶	۰/۶۸۸
عرض دانه	(X) رگرسیون	۱	۳۷/۷۰**	۱۱۳	۵/۰۲۱**
	(Y) خطا	۱۰	۰/۲۰۳	۱۰۴	۰/۱
تعداد دانه در خوشه	(X) رگرسیون	۱	۱۱۶۵/۷۹**	۱۱۳	۲۳۸/۲۸**
	(Y) خطا	۱۰	۱۸/۱۳	۱۰۴	۸

SSR max) میانگین مربعات مارکری که بیشترین R^2 برای صفت مورد نظر را دارد.

SSR complete) میانگین مربعات مجموع کل نشانگرها برای صفت مورد نظر.

ns، * و ** به ترتیب عدم اختلاف معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و یک درصد.

مکانهای کروموزومی را شامل شده‌اند. برای درک این موضوع تهیه نسل‌های تفرق و نقشه‌های پیوستگی ضروری می‌باشد. البته برای اطمینان از وجود ارتباط پیوستگی بین نشانگرها و صفات مختلف زراعی نیاز به تهیه جمعیت‌های تفرق مانند F₂، RIL، و DH می‌باشد تا بر اساس این جمعیت‌ها نقشه‌های پیوستگی تهیه و سپس محل مکان‌های کنترل کننده این صفات بر روی کروموزوم‌ها مشخص شوند (۲). مسلماندر تهیه نقشه‌های پیوستگی اطلاعات نشانگری بدست آمده در این تحقیق در جهت انتخاب آغازگرهای مناسب مفید خواهد بود. چنانکه بعضی از این نشانگرها جهت انجام کارهای اصلاحی در گونه‌های دیگر استفاده شده اما در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق جهت

کراکمن و همکاران (۲۰۰۴) با مطالعه ۱۴۶ رقم جو بهاره با استفاده از ۲۳۶ نشانگر AFLP نشان دادند که ۱۸ تا ۲۰ نشانگر ۴۰ تا ۵۸ درصد تغییرات این دو صفت عملکرد و پایداری آن را تبیین می‌کنند (۱۴). با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت آغازگرهای HVM20، Gms003، Bmac0306 و HvHVA1 بیش از سایر آغازگرها در نواحی کد کننده صفات زراعی بودند. به همین دلیل تغییرات بیشتری از صفات مورد بررسی را نشان دادند. همچنانکه نتایج نشان می‌دهد برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط نشان می‌دهند، با توجه به وجود همبستگی معنی دار بین صفات مورفولوژیکی می‌توان دریافت که برخی از این صفات پیوستگی بسیار نزدیکی با همدیگر دارند و یا احتمالا به صورت پلیوتروپی

6. Gabor T., Z. Gaspar and J. Jurka. (2000). Microsatellite in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*. 10: 967-981.
7. Gebhardt, C., Ballvora, A., Walkemeier, B., Oberhagemann, P. and Schuler, K., (2004). Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: A case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Molecular Breeding*, 13: 93-102.
8. Gupta P. K., H. S. Balyan, P. C. Sharma and B. Ramesh. (1996). Microsatellite in plants: a new class of molecular marker. *Curr. Sci*. 70: 45-54.
9. Gupta P. K., R. K. Varshney. (2000). the development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*. 113: 163-185
10. IBPGR, 1981, Revised Descriptors for Wheat. IBPGR, Rome, Italy.
11. Kadri K., R. Abdellawi., H. Cheikh-Mhamed. (2009). Genetic diversity in barley genetic diversity in local Tunisian barley based on RAPD and SSR analysis. *Biological Diversity and Conservation*. 2(1): 27-35.
12. Kantety R.V., M. La Rota, D. E. Matthews and M.E. Sorrells. (2002). Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, Maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology*. 48: 501-510
13. Khelestkina E.K., E.G. Pestsova, E. Salina, M. S. Roder, V. S. Abruzova, S. F. Koval and A. Borner. (2002). Genetic mapping and tagging of wheat Genes using RAPD, STS and SSR markers. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 7: 795-802.
14. Kraakman, A.T.W., Niks, R.E., Van den berg, P.M.M.M., Stam, P., and Van Eeuwijk, F.A., (2004). Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics*, 168: 435-446.
15. Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Noli, E. and Tuberosa, R., (2005), Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. *Mol. Breed.*, 15: 271-289.
16. Martinez, L., Caragnaro, P., Masuekki, R. And Rodriguez, J., (2003), Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Journal of Biotechnology*. 6: 241-250.
17. Mcharo, M., Labonte, D. R., Oard, J. H., Kays, S. J. and Mclaurin, W. J., (2004), Linking quantitative traits with AFLP markers in sweet potatoes using discriminate analysis, *Acta Hort*. 637:285-293.
18. Mwamburi, M. T., (2005). Associating molecular markers which phenotypes in sweet potatoes and liriopogons using multivariate statistical modeling, PhD dissertation Louisiana State Univ.
19. Naghavi MR., M. Mardi., H.A. Ramshini. And B. Fazelinasab. (2004). Comparative analyses of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD

نقشه‌یابی، در اختیار نبودن زمان کافی و نبود لینکاژ مناسب بین صفات زراعی و نشانگرهای ملکولی از جمله مهمترین محدودیت‌ها در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی می‌باشد (۱۱). همچنین با استفاده از نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با صفات زراعی از جمله اجزای عملکرد مخصوصاً در مورد نشانگرهای که مکان کروموزومی آنها مشخص می‌باشد می‌توان با تولید لاین‌های با جایگزینی کروموزومی، صفات زراعی مورد نظر را در یک لاین فاقد آن صفت از طریق تلاقی‌های فی مابین انتقال داد. که با انجام آنالیز ارتباطی می‌توان تا حدودی بر این محدودیت‌ها فائق آمد (۱).

شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن‌های بزرگ اثر برای صفات مورد نظر در سال‌های اخیر از طریق ایجاد جمعیت‌های در حال تفرق همچون F₂، RIL، و DH انجام گرفته است. می‌توان باند نشانگر(ها) آگاهی بخش شناسایی شده را که R^2 بالای دارند را از روی ژل جدا و همسان سازی نمود. سپس توالی شناسایی شده را در پایگاه‌های اطلاعاتی با توالی‌های موجود هم ردیفی (Alignment) نمود، همچنین می‌توان از روی توالی مورد نظر آغازگرهای اسکار (SCAR) را برای صفات مورد نظر طراحی کرد (۱).

منابع

۱. رشیدی منفرد س، مردی م، حسین زاده ا، و نقوی م ر (۱۳۸۷) تجزیه ارتباطی بین صفات زراعی مهم و نشانگرهای رتروترانسپوزنی SSAP در نمونه های گندم دوروم، فصل نامه علمی-پژوهشی ژنتیک نوین، دوره سوم، شماره ۲: ۳۶-۲۹.
2. Bassam B., J.G. Caetano-Anolles. and P.M. Gressho. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochemistry*. 19: 680-683.
3. Bothmer von R., N. Jacobsen., C. Baden., R. B. Jrgensen and I. Linde Laursen. (1991). An ecogeographical study of genus *Hordeum*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 127pp.
4. Breseghello, F. and Sorrells, M. E., (2005), Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*, DOI 10.1534/genetics.105.044586.
5. Flavell, A.J., E. Dunbar., R. Anderson., S.R. Pearce. R. Hartley and A. Kumar. (1992). Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic .Acids. Res*. 20: 3639-3644.

and SSR markers. Iranian Journal of Biotechnology, 2: 195 – 202.

20. Pearce, S.R., M. Knox., T.N.H. Ellis., A.J. Flavell and A. Kumar. (2000). Pea Ty1-copia group retrotransposons: transitional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*. Mol. Gen. Genet. 263: 898–907.

21. Röder M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy and M.W. Ganal (1998). A microsatellite map of wheat. Genetics 149:2007–2023.

22. Roldan-ruiz, L., Vaneewijk, F. A., Gilliland, T, J, Dubreil, P., Dillman, c., (2001). A comparative study of molecular and morphological method of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium preenne* L.) varieties. Theoretical and Applied Genome, 103(8): 1138-1150.

23. Roy JK, Bandopadhyay R, Rustagil S, Bailyan HS and Gupta PK. (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Current science 90:5-10.

24. Saghai-Maroo M.A., K. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS. 81:8014-8018.

25. Thiel T., W. Michalek, R. K. Varshney and A. Graner. (2003). Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet., 106:411-422

26. Virk, P.S., Ford-Lloyd, B.V., Jackson, M.T., Pooni, H.S., Clemeno, T.P., and Newbury, H.J., (1996). Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. In: IRRI, Rice genetics III, Proceedings of The Third International Rice Genetics Symposium, Manilla, Philippines, 16(20): 307-316.

