

تجزیه ارتباط بین صفات بیوشیمیایی و نشانگرهای ملکولی AFLP در ژنوتیپ‌های گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)

Association analysis of biochemical traits with AFLP markers in *Chrysanthemum* genotypes (*Chrysanthemum morifolium*)

زینب روئین^{۱*}، معظم حسن‌پور اصیل^۲، عاطفه صبوری^۲

۱- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

۲- به‌ترتیب استاد، استادیار، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

Roein Z^{*1}, HassanpourAsil M², Sabouri A²

1- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Ilam University

2- Professor, Assistant Professor, Faculty of Agricultural Science, University of
Guilan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: z.roein@ilam.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۸)

چکیده

فعالیت‌های فیزیولوژیک و تغییرات بیوشیمیایی بعد از برداشت گل‌های بریدنی هم‌چنان ادامه دارد. این شرایط سبب کاهش ماندگاری و تسریع فرایند پیری گل می‌شود. با هدف شناسایی نشانگرهای AFLP مرتبط با پیری گل داوودی از تجزیه ارتباط استفاده شد. ارتباط بین صفات بیوشیمیایی و نشانگرهای ملکولی با استفاده از ۲۵ ترکیب آغازگری (*MseI* و *EcoRI*) و ۴۴ ژنوتیپ گل داوودی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری ($r=0/304^{**}$) بین غلظت پروتئین و پراکسیداسیون لیپید به‌عنوان شاخص‌های پیری، وجود دارد. بررسی تجزیه ارتباط در مدل MLM برای پنج متغیر سبب شناسایی ۱۴۳ نشانگر معنی‌دار و مرتبط با صفات بیوشیمیایی شد، در حالی که در مدل GLM، ۴۱۹ نشانگر مرتبط با صفات مذکور شناسایی شد. بیش‌ترین تعداد نشانگر معنی‌دار برای میزان مالون‌دی‌آلدئید (۴۹ نشانگر) و کم‌ترین تعداد نشانگر (۱۴ نشانگر) برای پیری گلبرگ داوودی مشاهده شد. قوی‌ترین ارتباط (۴۷ درصد)، بین میزان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و نشانگر M-CAC/E-AGA13 برقرار بود. از طرف دیگر بیش از ۳۲ درصد از تغییرات مربوط به پیری گلبرگ توسط نشانگر M-CTT/E-AAC35 بیان شد. هم‌چنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط دارند. بنابراین نشانگرهای آگاهی‌بخش حاوی اطلاعات مفید مانند M-CTG/E-ACC16، M-CAA/E- AAG40 و M-CTG/E-AGA3 که همبستگی معنی‌داری با چندین صفت دارند، در صورت تأیید در سایر آزمایش‌ها، می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی برای افزایش ماندگاری گل داوودی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی

آنزیم

پیری گلبرگ

داوودی

نشانگر آگاهی‌بخش

همبستگی

مقدمه

همانند سایر محصولات فسادپذیر باغبانی، ماندگاری گیاهان زینتی نیز تحت تأثیر عامل‌های فیزیکی، محیطی و بیولوژیک است. انتخاب مواد گیاهی مناسب و رعایت عوامل مؤثر پس از برداشت، نقش مهمی در ماندگاری مطلوب با حداقل ضایعات را دارد. پیری یکی از تغییرات رو به زوال است که منجر به مرگ سلول، بافت، اندام و در نهایت تمام گیاه می‌شود. این فرآیند ژنتیکی در کنترل ژن‌هاست که به وسیله عامل‌های محیطی در طول رشد و نمو گیاه مدیریت می‌شود (Elanchezhian and Srivastava 2001). پیری در برگ و گلبرگ به وسیله علائم قابل مشاهده مانند زردی برگ، ریزش، پژمردگی و پلاسیدگی گلبرگ که تعیین‌کننده کیفیت و ارزش زینتی گیاه است مشخص می‌شود. اما این نشانه‌ها در مراحل پایانی و بعد از تغییرات ساختاری، ملکولی و بیوشیمیایی ظاهر می‌شوند (Battelli et al. 2011; Lerslerwong et al. 2009). گل داوودی یکی از پرکاربردترین گیاهان زینتی است. آنچه مهم به نظر می‌رسد اهمیت شناخت تغییرات فیزیولوژیک است که در طی پیری در گل به عنوان اندام نهایی برای ارزیابی اتفاق می‌افتد. شناسایی این رفتارهای فیزیولوژیک در زمان پیری و پس از برداشت برای انتخاب ژنوتیپ برتر مهم به نظر می‌رسد. تنوع ژنوتیپی یک فرصت مناسب برای توسعه گیاهان با ماندگاری طولانی است. از طرف دیگر، درک دامنه تنوع و ساختار ژنتیکی از خزانه ژنی، معیاری برای مدیریت و استفاده مؤثر از منابع ژرمپلاسم است. تکنولوژی‌های نوین ژنتیک به ویژه توالی‌یابی DNA، منجر به توسعه روش‌های جدید اندازه‌گیری شباهت و تفاوت ژنتیکی در گونه‌ها و جمعیت‌های گیاهی شده است (Xu 2010). از جمله اهداف متخصصین ژنتیک گیاهی و به‌نژادگران تبیین تنوع فنوتیپی است که با تغییرات در توالی DNA ارتباط دارد (Myles et al. 2009). در این راستا استفاده از تجزیه ارتباط به عنوان یک رهیافت برای آشکارسازی ارتباط بین صفت و نشانگر می‌تواند مکمل مناسبی برای مطالعات اصلاح کلاسیک باشد. تجزیه ارتباط به طور موفقیت‌آمیزی در محصولات مختلف برای شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با انواع صفات به کار گرفته شده است (Berger et al. 2013). از جمله روش‌های ملکولی تجزیه صفات کمی با استفاده

از نشانگرهای DNA، تجزیه ارتباط می‌باشد. این روش می‌تواند راه حل سودمندی برای آشکارسازی ارتباط بین صفت و نشانگر باشد، اما اطلاعات اندکی از کاربرد این تکنیک برای جمعیت‌های در حال اصلاح گیاهی وجود دارد. با روش‌های مناسب آماری، تجزیه ارتباط می‌تواند به گونه‌ای صحیح و معتبر برای جمعیت‌های گیاهی انجام شود. با این روش امکان مکان‌یابی دقیق و مطمئن ژن‌ها و مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی فراهم می‌شود (Bressegello and Sorrells 2006). به عبارت دیگر تجزیه ارتباط روشی جایگزین برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی و پیچیده در مجموعه ژرمپلاسم است، به طوری که قبل از استفاده از ژرمپلاسم در برنامه‌های به‌نژادی اطلاعات مناسبی را در اختیار به‌نژادگر قرار می‌دهد (Hwang 2008). برای طبقه‌بندی جمعیت‌ها در ابتدا تنها از مدل خطی عمومی یا GLM^1 استفاده می‌شد که بر ارتباط‌های ساختاری، کنترل ژنومی و روابط خویشاوندی استوار است. اما با گذشت زمان مدل خطی مخلوط یا MLM^2 به عنوان یک روش بهبود یافته برای محاسبه هم‌زمان ساختار جمعیت و ارتباط بین افراد جمعیت معرفی شد (Zhang et al. 2010). حاصل تجزیه ساختار جمعیت یک ماتریس Q است که میزان شباهت نسبی ژنوتیپ‌ها در زیر گروه‌ها را مشخص می‌کند. روش Q به صورت خطی عمومی یا مدل GLM اجرا می‌شود. مجموع داده‌های این روش شامل داده‌های ملکولی، داده‌های صفات مورد ارزیابی و ماتریس Q حاصل از تجزیه ساختار جمعیت است. برای فراهم کردن تحلیل‌های پیش‌تری از ساختار جمعیت، ماتریس Kinship ارائه شد (Hardy and Vekemans 2002). بنابراین تعیین ساختار با استفاده از ماتریس Kinship دقت تخمین فاصله ژنتیکی بین افراد را افزایش می‌دهد (Hwang 2008). روش Q+K در مقایسه با مدل‌های خطی رایج در تجزیه ارتباط روش برتری است، زیرا هر دو اطلاعات حاصل از K (ضریب خویشاوندی افراد) و Q (ضرایب ساختار جمعیت) را با هم تلفیق می‌کند، به طوری که به صورت خطی مختلط یا MLM قابل اجراست (Yu et al. 2006; Wang et al. 2012). مجموع داده‌های این روش شامل داده‌های ملکولی، داده‌های

¹ General linear model² Multiple linear model

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد ارزیابی شامل ۴۴ ژنوتیپ داوودی از ایستگاه ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی شهرستان محلات تهیه شدند. لازم به یادآوری است که ژنوتیپ‌های مذکور از نوع اسپری با کاربرد گلدانی و باغچه‌ای بودند. این بررسی به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد به گونه‌ای که هر ژنوتیپ به عنوان یک تیمار و هر گلدان حاوی یک گل به عنوان تکرار در نظر گرفته شد. به منظور فراهم کردن شرایط رشد مناسب، قلمه‌های ریشه‌دار شده به مدت سه هفته تحت شرایط روز بلند (تیر ماه) و دمای 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس برای القا و نمو گل شرایط روز کوتاه با ۹ ساعت روشنایی (با استفاده از لامپ‌های سدیمی) مهیا شد. برای مقایسه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از لحاظ رفتار فیزیولوژیک گل داوودی بعد از برداشت و در طی پیری، گل‌ها با گلچه‌های زبانه‌ای کاملاً باز برداشت شدند. چهار عدد گل از هر بوته برداشت و بدون ساقه گل در لوله‌های آزمایشی محتوی آب مقطر قرار گرفت. سپس گل‌ها در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد و نور ۱۵ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه نگهداری شدند. برای ارزیابی صفات مورد نظر، نمونه‌برداری در سه مرحله باز شدن کامل گلچه‌های زبانه‌ای (۱)، باز شدن کامل گلچه‌های لوله‌ای (۲) و پایان ماندگاری گل (۳) انجام شد (Wang et al. 2013). برای اندازه‌گیری پروتئین کل در گلچه‌های زبانه‌ای در سه مرحله مذکور از روش برادفورد (Bradford 1976) استفاده شد. جهت اندازه‌گیری غلظت مالون-دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی از روش Heath and Packer (1968) استفاده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Luck (1974) استفاده شد. تجزیه آب اکسیژنه با کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر همراه است که از طریق همین کاهش جذب، فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد. از طرف دیگر، سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (Giannopolitis and Ries 1977) نیز انجام شد. آغاز پیری گل به صورت تعداد روز از برداشت گل (باز شدن گل) تا زمانی که یک یا دو گلچه زبانه‌ای بیرونی پژمرده شوند، محاسبه شد (Lv et al. 2011). مراحل استخراج DNA با روش CTAB (-Saghai-Marooft et al. 1984) انجام پذیرفت. روش AFLP بر اساس

صفات مورد بررسی، ماتریس Q حاصل از تجزیه ساختار جمعیت و ماتریس Kinship است. این مدل نتایج بهتری را در مطالعات ارتباطی در مقایسه با مدل‌هایی که فاکتورهای ساختار جمعیت و ماتریس Kinship را نادیده می‌گیرند، به دست می‌دهد (Yu et al. 2006).

پژوهش‌های متعددی در سال‌های اخیر برای درک رابطه بین صفت و نشانگر در محصولات مختلف انجام شده است. بیش‌تر مطالعات در گل داوودی به صفات زینتی و رویشی محدود شده است. این در حالی است که تهیه نقشه ژنی، استفاده از نشانگرهای ملکولی و تجزیه QTL در گل داوودی کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته و به کندی در حال پیشرفت است (Zhang et al. 2010; Zhang et al. 2011).

در پژوهشی برای بررسی ارتباط ۱۹ نشانگر SRAP و ۱۸ صفت مهم فنوتیپی از ۵۸ رقم داوودی استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که شش مکان در نشانگرهای SRAP ارتباط معنی‌داری با پنج صفت کمی مربوط به گل و برگ دارند. به طوری که مقدار تبیین فنوتیپی مکان‌ها بین ۰/۰۷۴ تا ۰/۴۸ بود (Li et al. 2012).

تکنیک AFLP به خاطر مزایایی که دارد می‌تواند به عنوان یک روش کارا و مناسب برای انگشت‌نگاری DNA و بررسی تنوع ژنتیکی به کار رود (Fu and Williams 2008). از جمله مزایای AFLP می‌توان به تکرارپذیری بالا، امکان بررسی هم‌زمان چندین مکان ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر، غیرحساس بودن به غلظت DNA الگو، ظرفیت بررسی کل ژنوم برای نمایان کردن چندشکلی و تولید تعداد زیاد نوار تکرارپذیر در مدت زمان کوتاه اشاره کرد (Bleas et al. 1998; Meudt and Clarke 2007). نشانگر AFLP توسط بسیاری از محققین برای مطالعات مربوط به مکان‌یابی ارتباطی در گیاهان مختلف مانند آرابیدوپسیس، پنبه، ذرت و جو استفاده شده است (Kraakman et al. 2006; Stich et al. 2006; Zhao et al. 2007, Wu et al. 2007).

هدف از انجام پژوهش حاضر شناسایی عوامل موثر در پیری و کاهش ماندگاری گل داوودی و هم‌چنین آشکارسازی ارتباط صفات مهم بیوشیمیایی از جمله فعالیت آنزیمی در زمان پیری گل داوودی با نشانگرهای AFLP بود.

نسخه ۲۱ (IBM Corp 2012) انجام شد. برای برآورد تعداد جمعیت‌های ژنتیکی در ۴ ژنوتیپ مورد بررسی از نرم-افزار Structure نسخه 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) استفاده شد. برای مطالعه رابطه بین ویژگی‌های بیوشیمیایی و ملکولی ژنوتیپ‌های گل داوودی از روش تجزیه ارتباط با نرم‌افزار TASSEL نسخه 3.1 (Bradbury et al. 2007) استفاده شد.

روش Vos et al. (1995) انجام شد. مطابق جدول ۱، از ۲۵ ترکیب آغازگری مبتنی بر دو آنزیم برشی *MseI* و *EcoRI* برای تحقیق حاضر استفاده شد (Roein et al. 2014). تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از میانگین صفات مورد ارزیابی برای محاسبه همبستگی پیرسون استفاده شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS

جدول ۱- توالی آغازگرهای AFLP مورد استفاده برای بررسی ژنوتیپ‌های گل داوودی

توالی	کد	آغازگر انتخابی
		MseI +3
5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'	M-CAC	MseI+ CAC
5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'	M-CAG	MseI+ CAG
5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'	M-CAA	MseI+ CAA
5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3'	M-CTT	MseI+ CTT
5'-GATGAGTCCTGAGTAACCTG-3'	M-CTG	MseI+ CTG
		EcoRI+3
5'-GTAGACTGCGTACCAATTCACA-3'	E-ACA	EcoRI+ ACA
5'-GTAGACTGCGTACCAATTC AAC-3'	E-AAC	EcoRI+ AAC
5'-GTAGACTGCGTACCAATTC AAG-3'	E-AAG	EcoRI+ AAG
5'-GTAGACTGCGTACCAATTC AGA-3'	E-AGA	EcoRI+ AGA
5'-GTAGACTGCGTACCAATTC ACC-3'	E-ACC	EcoRI+ ACC
5'-GTAGACTGCGTACCAATTC ACG-3'	E-ACG	EcoRI+ ACG
5'-GTAGACTGCGTACCAATTC AA-3'	E-AA	EcoRI+ AA

جدول ۲- آماره‌های توصیفی مرتبط با صفات بیوشیمیایی مورد مطالعه

دامنه تغییرات	میانگین	حداکثر	حداقل	واحد	صفت
۲۰/۲۶	۱۵/۲۸	۲۲	۲/۱۲	میلی گرم بر گرم وزن تر	پروتئین (۱)*
۱۶/۰۱	۹/۲۹	۱۶/۶۸	۰/۶۷	-	پروتئین (۲)
۱۶/۰۵	۳/۷۹	۱۷/۱۵	۱/۱	-	پروتئین (۳)
۲/۷۱	۱/۱۹	۲/۸۱	۰/۱	نانومول بر گرم وزن تر	مالون‌دی‌آلدئید (۱)
۴/۴۲	۲/۱۱	۵/۴۵	۱/۰۳	-	مالون‌دی‌آلدئید (۲)
۸/۷۱	۳/۱۲	۹/۷۱	۱	-	مالون‌دی‌آلدئید (۳)
۶/۸۵	۱۷/۷۳	۲۰/۹۵	۱۴	واحد آنزیمی بر گرم وزن تر	سوپراکسیددیس‌موتاز (۱)
۲/۱۳	۱۷/۵۸	۱۸/۸۳	۱۶/۷	-	سوپراکسیددیس‌موتاز (۲)
۴/۸۸	۱۷/۴۱	۱۹/۰۸	۱۴/۲۰	-	سوپراکسیددیس‌موتاز (۳)
۴۳۴/۶۳	۱۹۶/۸۵	۴۹۱/۹	۵۷/۳۴	واحد آنزیمی بر گرم وزن تر	کاتالاز (۱)
۷۹۸/۱۶	۴۵۶/۸۶	۹۲۴/۳	۱۲۶/۱۵	-	کاتالاز (۲)
۱۲۲۲/۴۷	۵۰۴/۹۱	۱۳۰۲/۷۵	۸۰/۲۸	-	کاتالاز (۳)
۳۰	۱۹/۴۵	۴۰	۱۰	روز	پیری

*: اعداد (۱)، (۲) و (۳) مراحل مختلف نمونه برداری هستند.

میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در طول این آزمایش نشان داد که با نزدیک شدن به مرحله پیری، فعالیت آنزیم کاتالاز نیز افزایش یافت، به طوری که میانگین آن از ۱۹۶/۸۵ واحد بر گرم وزن تر به ۵۰۴/۹ واحد بر گرم وزن تر رسید (جدول ۲). اما تفاوتی چشمگیری بین میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز از آغاز باز شدن گلچه‌ها تا زمان پیری مشاهده نشد. خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو به دلیل ناتوانی سیستم خنثی‌سازی بافت در کاهش تأثیر اکسیژن فعال است که سبب افزایش تشکیل رادیکال-های آزاد و کاهش فعالیت آنزیم‌های خنثی‌کننده می‌شود (Yordanova et al. 2004). در پژوهش Yin و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ‌های گیاه با نوسان همراه بود، به طوری که در روزهای اول افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز چشم‌گیر بود سپس با اندک کاهشی مواجه شد و با نزدیک شدن به روزهای پایانی افزایش فعالیت مجدد آنزیم کاتالاز مشاهده شد. افزایش زود هنگام فعالیت آنزیمی برخی ژنوتیپ‌ها، می‌تواند بازتابی از ظرفیت ژنوتیپ مورد نظر برای سازگاری سریع به تنش حاصل از افزایش فعالیت انواع اکسیژن فعال باشد (Yin et al. 2009).

با این توصیف انتخاب چنین ژنوتیپ‌هایی برای برنامه‌های اصلاحی جهت بهبود رفتار فیزیولوژیک در طی پیری می‌تواند سبب بهبود ماندگاری گل شود. بیان سطح بالای آنزیم‌های آنتی-اکسیدان سبب برقراری تعادل بین تولید اکسیژن‌های آزاد و سم-زادایی آن‌ها می‌شود و بدین ترتیب گیاه را از آسیب ناشی از این نوع تنش‌ها که در طی پیری هم اتفاق می‌افتد، محافظت می‌کند. بر اساس نتایج حاصل از آماره‌های توصیفی (جدول ۲) میانگین زمان تا شروع پیری گل در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی ۱۹/۴۵ روز بود. ماندگاری گل به‌عنوان یکی از مهم‌ترین معیارها برای ارزیابی ارزش زینتی گل‌ها محسوب می‌شود، به طوری که گل‌هایی با ماندگاری بیشتر، از موقعیت مناسب‌تری برای انتخاب جهت اهداف مختلف برخوردارند. تأخیر در پیری گل و آغاز فرایندهای مرتبط با پیری به‌عنوان یک عامل مثبت برای انتخاب گل محسوب می‌شود.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر زمان تا مشاهده علائم پیری بین ژنوتیپ‌ها

در تحقیق حاضر برای اجتناب از نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب که در اثر تجزیه ارتباط شکل می‌گیرند، از دو مدل GLM و MLM برای تجزیه ارتباط استفاده شد. برای به‌دست آوردن سطح معنی‌داری از ۱۰۰۰ جایگشت استفاده شد. اما در نهایت با توجه به برتری و پایداری نتایج مدل MLM (Yu et al. 2006)، از این مدل برای تفسیر نتایج استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از خلاصه آماره‌های توصیفی در جدول ۲ ارائه شده‌است. بر اساس نتایج جدول مذکور مشخص شد که با گذشت زمان و نزدیک شدن به مرحله پیری و پژمردگی گلبرگ میزان پروتئین در این بافت کاهش یافت، اما شدت کاهش در میان ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. مقدار پروتئین از مرحله باز شدن گل تا پژمردگی گل به تدریج کاهش یافت و از میانگین ۱۵/۲۸ به ۳/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسید. مقاومت در برابر تجزیه پروتئین یکی از عوامل مؤثر برای تأخیر در پیری گل است، به طوری که ژنوتیپ‌های با ویژگی‌های حفظ پروتئین در طول پیری، ماندگاری بیش‌تری خواهند داشت.

خلاصه آماره‌های توصیفی (جدول ۲) نشان داد که با گذشت زمان و نزدیک شدن به زمان پیری گلبرگ، میزان مالون‌دی‌آلدئید که نشان‌دهنده پراکسیداسیون چربی‌هاست، افزایش یافت. به طوری که میانگین مالون‌دی‌آلدئید در سه مرحله اندازه‌گیری به ترتیب از ۱/۱۹ و ۲/۱۱ به ۳/۱۲ نانومول بر گرم وزن تر رسید. افزایش تولید انواع اکسیژن فعال بافت در طی تنش اکسیداتیو سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌شود که اندازه‌گیری سطح مالون‌دی‌آلدئید می‌تواند به‌عنوان یک نشانه و آشکارساز برای پراکسیداسیون لیپید در شرایط تنش باشد (Wu et al. 2003). در پژوهشی افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید در برگ داوودی طی تنش غرقابی گزارش شد (Yin et al. 2009)، نتایج نشان داد که بین دو رقم مورد بررسی از لحاظ تولید مالون‌دی‌آلدئید تفاوت معنی‌دار وجود داشت. مطابق با نتایج مذکور، در پژوهش حاضر نیز بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ تولید مالون‌دی‌آلدئید در طی پیری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.

صفات اعتماد کرد و باید گزینش بر اساس صفت مذکور با احتیاط بیشتری انجام شود. با استفاده از نرم افزار Structure بهترین تعداد خوشه (K) بر اساس احتمال لگاریتمی مستخرج از داده‌ها بدست آمد. کلاستر بندی بیزین^۱ از ۲۵ ترکیب آغازگری حاصل از این پژوهش نشان داد که بالاترین دلتا K برای ۴۴ ژنوتیپ در $K=4$ حاصل می‌شود (Roein et al. 2014). بر همین اساس برای تجزیه نهایی $K=4$ به عنوان بهترین گروه بندی انتخاب شد. نتایج شاخص‌های تنوع نشانگرهای AFLP و همچنین ساختار جمعیت در پژوهش قبلی آورده شده است (Roein et al. 2014).

وجود داشت. این موضوع از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا انتخاب ژنوتیپ‌هایی که در بروز نشانه‌های پیری تأخیر دارند، امکان انتخاب و تولید ارقام با ماندگاری بالا را فراهم می‌سازد. نتایج حاصل از برآورد ضرایب همبستگی ساده بین صفات نشان داد که بین غلظت پروتئین در مرحله سوم نمونه برداری و پراکسیداسیون لیپید در مرحله دوم نمونه برداری همبستگی مثبت و معنی داری ($r=0/304^{**}$) وجود داشت (جدول ۳). رابطه مثبت و معنی دار بین آغاز پیری با فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله سوم نمونه برداری ($r=0/254^{**}$) مشاهده شد. هر چند نتیجه ضریب همبستگی از لحاظ آماری معنی دار است، اما این صفت دارای ضریب تبیین پایین است و سهم اندکی در بیان تغییرات پیری گل دارد. لذا تنها نمی‌توان به مقادیر کم ولی معنی دار همبستگی بین

^۱ Bayesian

جدول ۳- ضرایب همبستگی بین صفات بیوشیمیایی بعد از برداشت گل در ژنوتیپ‌های مختلف گل داوودی

پیری	کاتالاز (۳)	کاتالاز (۲)	کاتالاز (۱)	سوپراکسیددیسمو تاز (۳)	سوپراکسیددیسمو تاز (۲)	سوپراکسیددیسمو تاز (۱)	مالوندی آلدئید (۳)	مالوندی آلدئید (۲)	مالوندی آلدئید (۱)	پروتئین (۳)	پروتئین (۲)	پروتئین (۱)
پروتئین (۱)												۱
پروتئین (۲)											۱	۰/۴۱۵ ^{***}
پروتئین (۳)										۱	۰/۴۷۹ ^{***}	-۰/۱۰۰
مالوندی آلدئید (۱)									۱	۰/۱۰۳	۰/۱۴۲	-۰/۰۵۳
مالوندی آلدئید (۲)								۱	۰/۳۵۴ ^{***}	۰/۳۰۴ ^{***}	۰/۲۰۰ [*]	-۰/۰۲۱
مالوندی آلدئید (۳)							۱	۰/۴۵۵ ^{***}	۰/۱۴۷	۰/۱۷۲	۰/۲۲۸ [*]	۰/۱۲۹
سوپراکسیددیسمو تاز (۱)						۱	۰/۰۰۵	۰/۰۳۷	-۰/۱۰۹	۰/۱۰۸	۰/۱۸۷	۰/۰۹۱
سوپراکسیددیسمو تاز (۲)					۱	۰/۳۸۰ ^{***}	۰/۰۲۷	-۰/۰۸۹	۰/۰۵۳	۰/۱۱۲	۰/۰۴۲	۰/۲۰۵ [*]
سوپراکسیددیسمو تاز (۳)				۱	۰/۳۹۶ ^{***}	۰/۱۷۸	۰/۱۱	-۰/۰۴۷	-۰/۰۸۷	۰/۰۵۱	۰/۰۸۳	۰/۱۰۸
کاتالاز (۱)			۱	۰/۰۵۳	-۰/۱۵۷	-۰/۰۹۹	۰/۰۸۵	-۰/۱۲۳	-۰/۱۹۱ [*]	۰/۰۹۹	۰/۰۹۴	-۰/۰۶۶
کاتالاز (۲)		۱	۰/۴۱۴ ^{***}	-۰/۰۳۴	-۰/۲۰۶ [*]	-۰/۲۲۳ [*]	-۰/۰۹۹	-۰/۰۱۱	-۰/۱۰۴	۰/۰۶۲	-۰/۰۹۶	-۰/۱۹۵
کاتالاز (۳)		۱	-۰/۱۰۳	-۰/۱۸۶ [*]	۰/۰۸۷	۰/۰۴۰	-۰/۰۰۶	-۰/۲۳۴ [*]	۰/۱۴۴	۰/۱۱۹	۰/۲۶۷ ^{***}	۰/۰۶۳
پیری	۱	۰/۲۵۴ ^{***}	۰/۱۳۱	۰/۰۴۰	۰/۱۵۶	۰/۰۰۵	-۰/۱۵۲	۰/۰۳۶	۰/۱۴۹	۰/۲۲۳ [*]	۰/۰۱۶	۰/۰۳۸

* اعداد (۱)، (۲) و (۳) نشان دهنده مراحل مختلف نمونه برداری است.

جدول ۴- تعداد نشانگرهای معنی دار و مرتبط با صفات بیوشیمیایی پس از برداشت ژنوتیپ‌های گل داوودی در مدل‌های GLM و MLM

تعداد نشانگر (Q+K)	تعداد نشانگر (Q)	صفت
۱۷	۱۱۳	پروتئین (۱)
۹	۱۹	پروتئین (۲)
۸	۳۱	پروتئین (۳)
۱۴	۲۶	مالوندی آلدئید (۱)
۱۴	۲۷	مالوندی آلدئید (۲)
۲۱	۳۳	مالوندی آلدئید (۳)
۱۹	۴۷	سوپراکسیددیسمو تاز (۱)
۴	۱۰	سوپراکسیددیسمو تاز (۲)
۳	۱۳	سوپراکسیددیسمو تاز (۳)
۸	۱۸	کاتالاز (۱)
۷	۲۳	کاتالاز (۲)
۵	۳۱	کاتالاز (۳)
۱۴	۲۸	پیری
۱۴۳	۴۱۹	مجموع نشانگرها

* اعداد (۱)، (۲) و (۳) نشان دهنده مراحل مختلف نمونه برداری است.

جدول ۵- نشانگرهای AFLP مرتبط با خصوصیات بیوشیمیایی در گل داوودی با استفاده از مدل MLM

ضریب تبیین (درصد) (R^2)	سطح معنی داری (P value)	نشانگر	صفت	
23	0.002866	M-CAC/E-ACA14	پروتئین (۱)	
18	0.00866	M-CAC/E-AAG23		
31	0.002817	M-CAA/E-AGA23		
24	0.009679	M-CAA/E-AGA27		
33	0.002203	M-CAA/E-AGA39		
25	0.008147	M-CAA/E-AGA43		
28	0.005385	M-CAA/E-AGA67		
17	0.00889	M-CTT/E-AAG63		
19	0.006933	M-CTT/E-AGA12		
3	0.003207	M-CTT/E-AGA21		
18	0.00804	M-CTT/E-AGA77		
17	0.008804	M-CTG/E-AAG8		
17	0.009384	M-CTG/E-AAG98		
20	0.005439	M-CTG/E-AGA34		
21	0.004259	M-CTG/E-AGA49		
28	0.001126	M-CTG/E-ACC16		
17	0.009929	M-CTG/E-AA64		پروتئین (۲)
17	0.009845	M-CAC/E-AAC33		
29	9.55E-04	M-CAC/E-AAC49		
22	0.003959	M-CAC/E-AAG93		
24	0.002677	M-CAG/E-AAG9		
21	0.004613	M-CTT/E-ACA10		
20	0.00585	M-CTT/E-ACA23		
18	0.007959	M-CTG/E-AGA64		
18	0.008395	M-CTG/E-ACC72		
24	0.002397	M-CTG/E-AA12	پروتئین (۳)	
33	5.41E-04	M-CAC/E-AAG73		
29	0.001036	M-CAC/E-AGA24		
27	0.001567	M-CAC/E-AGA44		
20	0.005214	M-CAC/E-ACG3		
28	0.001254	M-CAG/E-AAG93		
19	0.006332	M-CAA/E-AAG42		
17	0.009681	M-CTG/E-AAC50		
18	0.007303	M-CTG/E-AAC90		
23	0.003257	M-CAC/E-AAG10		مالوندی آلدنید (۱)
24	0.002484	M-CAC/E-AAG18		
19	0.007096	M-CAC/E-AAG21		
19	0.007243	M-CAC/E-AAG40		
17	0.008926	M-CAC/E-AAG55		
22	0.003962	M-CAC/E-AAG107		
21	0.004066	M-CAC/E-ACG36		
20	0.005435	M-CAC/E-ACG94		
19	0.006349	M-CAA/E-AAG40		
28	0.001202	M-CTT/E-AAG47	مالوندی آلدنید (۲)	
18	0.007795	M-CTG/E-AAC80		
18	0.00884	M-CTG/E-AAG77		
19	0.006862	M-CTG/E-AGA3		
18	0.007795	M-CTG/E-ACG29		
25	0.001921	M-CAC/E-AAC21		
18	0.008631	M-CAC/E-AAG18		
20	0.00507	M-CAC/E-AAG67		
20	0.00528	M-CAC/E-AGA95		
36	2.91E-04	M-CAC/E-ACG87		مالوندی آلدنید (۲)
24	0.002583	M-CAG/E-ACA14		
17	0.009287	M-CAA/E-ACA26		
21	0.004852	M-CAA/E-ACA85		
30	0.003902	M-CAA/E-AGA49		
28	0.005123	M-CAA/E-AGA78		
20	0.005536	M-CTT/E-ACA26		
23	0.002958	M-CTG/E-ACA8		
21	0.004698	M-CTG/E-ACA22		
18	0.00871	M-CTG/E-ACA91	مالوندی آلدنید (۳)	
18	0.008603	M-CAC/E-AAC77		
17	0.009456	M-CAC/E-AAG96		

21	0.004515	M-CAC/E-AGA32
29	0.001007	M-CAC/E-ACC26
24	0.0024	M-CAC/E-ACG51
26	0.001666	M-CAC/E-ACG87
19	0.006112	M-CAG/E-AAG88
24	0.002445	M-CAA/E-ACA85

ادامه جدول ۵- نشانگرهای AFLP مرتبط با خصوصیات بیوشیمیایی در گل داوودی با استفاده از مدل MLM

ضریب تبیین (درصد) (R^2)	سطح معنی داری (P value)	نشانگر	صفت
20	0.005664	M-CAA/E-AAC71	
27	0.006512	M-CAA/E-AGA48	
32	0.002863	M-CAA/E-AGA78	
18	0.008603	M-CTT/E-AAC25	
17	0.009536	M-CTT/E-AAG20	
18	0.008421	M-CTG/E-AAC4	
21	0.004423	M-CTG/E-AAC6	
26	0.001618	M-CTG/E-AAC8	
21	0.00486	M-CTG/E-AAC20	
21	0.00486	M-CTG/E-AAC21	
21	0.00486	M-CTG/E-ACC30	
18	0.008833	M-CTG/E-ACG66	
17	0.00991	M-CTG/E-ACG67	
24	0.002402	M-CAC/E-AAG3	سوپراکسیددیسموتاز (۱)
17	0.009891	M-CAC/E-AAG87	
39	1.83E-04	M-CAC/E-AGA5	
18	0.008711	M-CAC/E-AGA8	
47	5.54E-05	M-CAC/E-AGA13	
17	0.009388	M-CAC/E-AGA47	
39	2.02E-04	M-CAC/E-AGA63	
20	0.005781	M-CAC/E-AGA64	
30	7.99E-04	M-CAC/E-AGA86	
18	0.008553	M-CAC/E-ACC74	
31	7.15E-04	M-CAA/E-ACA48	
22	0.00345	M-CAA/E-ACA80	
19	0.006171	M-CTT/E-AAC6	
19	0.006564	M-CTT/E-AAG40	
25	0.002173	M-CTG/E-AAC15	
22	0.00362	M-CTG/E-AAG8	
17	0.009658	M-CTG/E-AGA7	
22	0.003824	M-CTG/E-AA6	
27	0.001367	M-CTG/E-AA7	
22	0.003612	M-CTG/E-AAG36	سوپراکسیددیسموتاز (۲)
18	0.008105	M-CTG/E-AAG112	
19	0.006556	M-CTG/E-ACC16	
18	0.008644	M-CTG/E-AA10	
21	0.004798	M-CTG/E-AAC14	سوپراکسیددیسموتاز (۳)
22	0.003452	M-CTG/E-AAC77	
17	0.009149	M-CTT/E-AGA23	
17	0.008781	M-CAC/E-AAG45	کاتالاز (۱)
18	0.008631	M-CAC/E-ACG55	
26	0.001633	M-CAG/E-AAG16	
20	0.005446	M-CAG/E-AAG64	
19	0.00672	M-CTT/E-AGA64	
17	0.008844	M-CTG/E-AAC22	
22	0.003304	M-CTG/E-AGA3	
18	0.008357	M-CTG/E-ACG79	
19	0.007035	M-CAC/E-ACA36	کاتالاز (۲)
17	0.009655	M-CAC/E-AAC94	
20	0.00593	M-CAG/E-AGA17	
17	0.00941	M-CAA/E-AAC26	

21	0.00434	M-CTT/E-ACA4	
25	0.001935	M-CTT/E-ACA6	
18	0.008359	M-CTG/E-AAC83	
18	0.007713	M-CAG/E-ACA41	کاتالاز (۳)
17	0.00967	M-CAG/E-AAG88	
18	0.006838	M-CAA/E-ACA63	
19	0.005773	M-CTT/E-AAC19	

ادامه جدول ۵- نشانگرهای AFLP مرتبط با خصوصیات بیوشیمیایی در گل داوودی با استفاده از مدل MLM

صفت	نشانگر	سطح معنی داری (P value)	ضریب تبیین (درصد) (R^2)
	M-CTG/E-AA43	0.004421	21
پیری	M-CAC/E-ACA60	0.007055	19
	M-CAC/E-AAG16	0.005296	20
	M-CAC/E-AGA3	0.003827	22
	M-CAC/E-ACC11	0.007731	18
	M-CAC/E-ACC19	0.008472	25
	M-CAG/E-AAC18	0.008591	18
	M-CAG/E-AGA53	0.006186	19
	M-CAA/E-AAC49	0.00727	18
	M-CAA/E-AAC56	0.007633	18
	M-CAA/E-AAG40	0.001087	28
	M-CTT/E-AAC35	0.002689	32
	M-CTT/E-AGA68	0.008885	17
	M-CTG/E-ACA36	0.001159	28
	M-CTG/E-AAG60	0.006184	19

R^2 : درصد توجیه تغییرات فنوتیپی صفات مورد نظر را نشان می دهد

این مدل در ارتباط با صفات مختلف بیوشیمیایی مورد بحث قرار می گیرد.

پروتئین

در مجموع ۳۴ نشانگر برای مراحل مختلف اندازه گیری پروتئین شناسایی شد که سهم هر کدام از این مراحل در میزان نشانگر مرتبط و معنی دار متفاوت بود. اطلاعات مربوط به این نشانگرها در جدول ۵ آورده شده است.

الف- پروتئین (۱): در مجموع ۱۷ نشانگر معنی دار و مرتبط با میزان پروتئین در مرحله اول نمونه برداری به دست آمد. مهم ترین نشانگر، M-CAA/E-AGA39 بود که ۳۳ درصد از تغییرات واریانس فنوتیپی این صفت را بر عهده داشت. بعد از آن، نشانگر M-CAA/E-AGA23 توانست ۳۱ درصد از تغییرات فنوتیپی را شرح دهد. لازم به یادآوری است که به جز دو نشانگر M-CTG/E-AAG8 و M-CTG/E-ACC16 که به ترتیب با میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مرحله یک و دو ارتباط

اطلاعات ارائه شده در جدول ۴ تعداد نشانگرهای مرتبط و معنی دار در دو مدل GLM (Q) و MLM (Q+K) در صفات مختلف بیوشیمیایی را نشان می دهد. در اکثر صفات مورد بررسی در مدل GLM تعداد نشانگرهای بیشتری با صفات ارتباط معنی داری نشان دادند، اما در خروجی مدل MLM، تعداد نشانگرهای مرتبط با صفات مذکور نسبت به مدل GLM کاهش یافت. دلیل این امر، همبستگی بین نشانگرهایی است که در مدل MLM برآورد شده اند، به طوری که این مدل نشانگرهای غیر همبسته یا نشانگرهایی با همبستگی کاذب را حذف می کند (Zhao et al. 2007). لازم به ذکر است که حداقل سطح معنی داری برای تجزیه ارتباط بین صفات و نشانگرها در این پژوهش یک درصد ($P < 0.01$) در نظر گرفته شد. در مجموع در این بررسی برای دو مدل GLM و MLM، به ترتیب ۴۱۹ و ۱۴۳ نشانگر شناسایی شد که با صفات بیوشیمیایی ارتباط معنی دار (در سطح احتمال یک درصد) داشتند. با توجه به پایداری نتایج در مدل MLM، در این پژوهش نتایج

ب- مالوندی آلدئید (۲): همانند مرحله قبل، برای این مرحله نیز تعداد ۱۴ نشانگر شناسایی شد (جدول ۵). اصلی ترین نشانگر، نشانگر M-CAC/E-ACG87 بود که ۳۶ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را بیان می نماید. همان طور که قبلاً اشاره شد نشانگر M-CAC/E-AAG18 با میزان مالوندی آلدئید در مرحله یک ارتباط مشترک دارد. بر اساس اطلاعات ارائه شده در جدول پنج، سه نشانگر M-CAC/E-ACG87، M-CAA/E-ACA85 و M-CAA/E-AGA78 به طور مشترک با میزان مالوندی آلدئید در مرحله سه ارتباط داشتند.

پ- مالوندی آلدئید (۳): از بین مراحل مختلف اندازه گیری مالون-دی آلدئید، بیشترین تعداد نشانگر یعنی ۲۱ نشانگر برای میزان مالوندی آلدئید در مرحله سه شناسایی شد. بیشترین درصد تبیین و توجیه به نشانگر M-CAA/E-AGA78 با ۳۲ درصد تعلق داشت. همان طور که پیش تر نیز بیان شد، نشانگر M-CAA/E-AGA78 همراه با دو نشانگر M-CAC/E-ACG87 و M-CAA/E-ACA85 با میزان مالوندی آلدئید در مرحله دو ارتباط مشترک و معنی دار داشت. علاوه بر آن نشانگر M-CAG/E-AAG88 ارتباط معنی داری با میزان فعالیت کاتالاز در مرحله سه دارد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس نتایج به دست آمده که در جدول ۵ نیز ارائه شده است در مجموع ۲۶ نشانگر مرتبط با میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شناسایی شد. سهم هر کدام از مراحل در برقراری ارتباط با نشانگرها متفاوت بود که در زیر به صورت جداگانه مورد بررسی قرار می گیرند.

الف- آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (۱): تعداد ۱۹ نشانگر با میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مرحله یک مرتبط بودند که از بین آنها نشانگر M-CAC/E-AGA13 با توجیه ۴۷ درصد از تغییرات فنوتیپی به عنوان مؤثرترین نشانگر در نظر گرفته شد. دو نشانگر M-CAC/E-AGA63 و M-CAC/E-AGA5 با توضیح ۳۹ درصد از واریانس فنوتیپی در رتبه بعدی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در بین نشانگرهای شناسایی شده تنها نشانگر M-CTG/E-AAG8 با میزان پروتئین در مرحله یک ارتباط مشترک و معنی دار داشت.

دارند، سایر نشانگرها مختص صفت میزان پروتئین در مرحله یک بودند.

ب- پروتئین (۲): مطابق با نتایج به دست آمده، نه نشانگر مرتبط با میزان پروتئین در مرحله دو شناسایی شد که نشانگر M-CAC/E-AAC49 با ضریب تبیین ۲۹ درصد و بیشترین سطح معنی داری $(P=9/55E-04)$ به عنوان مؤثرترین نشانگر برای توضیح تغییرات میزان پروتئین در مرحله دو شناخته شد. عدم وجود ارتباط مشترک بین نه نشانگر مرتبط با پروتئین در مرحله دو با سایر صفات فیزیولوژیک نشان می دهد که این نشانگرها تنها به این صفت اختصاص دارند.

پ- پروتئین (۳): سهم صفت میزان پروتئین در مرحله سه از تعداد نشانگر مرتبط و معنی دار، کم تر از سایر مراحل بود و به هشت نشانگر کاهش یافت. بارزترین نقش را نشانگر M-CAC/E-AAG73 با توجیه ۳۳ درصد از تغییرات به عهده داشت. نشانگرهای مرتبط با میزان پروتئین در مرحله سه با هیچ کدام از صفات بیوشیمیایی ارتباط مشترک نداشتند.

بر اساس نتایج به دست آمده که در جدول ۵ نیز ارائه شده است در مجموع ۴۹ نشانگر مرتبط با میزان مالوندی آلدئید شناسایی شدند. سهم هر کدام از مراحل در برقراری ارتباط با نشانگرها متفاوت بود که در زیر به صورت جداگانه مورد بررسی قرار می گیرند.

الف- مالوندی آلدئید (۱): تعداد ۱۴ نشانگر معنی دار و مرتبط با میزان مالوندی آلدئید در مرحله یک شناسایی شد. نشانگر M-CTT/E-AAG47 با توجیه ۲۸ درصد از تغییرات مربوط به میزان مالوندی آلدئید به عنوان بارزترین نشانگر مؤثر بر این صفت در نظر گرفته شد. بین نشانگرهای مرتبط با میزان مالوندی آلدئید و سایر صفات بیوشیمیایی مورد ارزیابی ارتباط معنی دار وجود داشت. بر این اساس، نشانگر M-CTG/E-AGA3 با میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله یک و نشانگر M-CAA/E-AAG40 با پیری گل ارتباط مشترک و معنی دار داشت. همان طور که در جدول همبستگی (جدول ۳) مشاهده می شود، میزان مالون دی آلدئید در مرحله یک با دو صفت مذکور همبستگی معنی داری را نشان داد.

نشانگر M-CAG/E-AAG88 از ارتباط مشترکی با صفت میزان مالوندی‌آلدئید در مرحله سه برخوردار بود.

پیری گل

مطابق با نتایج و آنچه در جدول ۵ ارائه شده است، ۱۴ نشانگر مرتبط با پیری گل به دست آمد. از بین این تعداد نشانگر، می‌توان به نشانگر M-CTT/E-AAC35 با ضریب تبیین ۳۲ درصد اشاره کرد که به عنوان مهم‌ترین نشانگر در بیان پیری گل به حساب می‌آید. لازم به ذکر است که ضریب تبیین سایر نشانگرها کم‌تر از ۳۰ درصد بود. در این پژوهش ارتباط معنی‌دار بین نشانگر M-CAA/E-AAG40 و میزان مالوندی‌آلدئید در مرحله یک مشاهده شد. نکته جالب توجه و قابل ذکر این‌که همبستگی مثبت و معنی‌دار بین پیری گل با میزان مالوندی‌آلدئید در مرحله یک ($r=0/223^*$) وجود داشت.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر اولین پژوهشی است که به تجزیه ارتباط ژنوتیپ-های داوودی ایران با نشانگرهای ملکولی (نشانگر AFLP) می‌پردازد. بررسی حاضر نشان داد که ژنوتیپ‌های داوودی مورد بررسی دارای تنوع بالایی از نظر ماندگاری و رفتارهای بیوشیمیایی در زمان پیری هستند. از طرف دیگر، مقایسه دو مدل GLM و MLM نشان داد که در مدل MLM، تعداد نشانگرهای مرتبط با صفات کاهش یافت. این امر می‌تواند ناشی از توانایی این مدل در شناسایی و حذف نشانگرهایی با همبستگی کاذب باشد. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان بیان کرد که نشانگرهای M-CAC/E-AGA13، M-CAC/E-AGA5 و M-CAC/E-AGA63 بیش از سایر نشانگرها پیوسته به ژن‌های کنترل‌کننده میزان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مرحله یک بودند و به همین دلیل تغییرات بیش‌تری از صفت مورد بررسی را نشان دادند. نتایج نشان می‌دهد که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط دارند. بر این اساس و با توجه به همبستگی فنوتیپی ساده معنی‌دار بین صفات مورد مطالعه، به نظر می‌رسد این امر ناشی از پلیوتروپی^۱ یا پیوستگی بین ژن‌های کنترل‌کننده این صفات باشد. بنابراین، شناسایی نشانگرهایی با اطلاعات مفید مانند M-CTG/E-ACC16، M-CAA/E-AAG40 و M-CTG/E-AGA3 که

ب- آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (۲): تعداد چهار نشانگر مرتبط با میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مرحله دو شناسایی شدند. نشانگر M-CTG/E-AAG36 با ضریب تبیین ۲۲ درصد به عنوان اصلی‌ترین نشانگر در توجیه تغییرات معرفی شد. بین نشانگر M-CTG/E-ACC16 و میزان پروتئین در مرحله یک رابطه مشترک و معنی‌دار مشاهده شد.

پ- آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (۳): تعداد سه نشانگر با میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مرحله سه مرتبط بودند که نشانگر M-CTG/E-AAC77 با ضریب تبیین ۲۲ درصد نقش بیش‌تری در توجیه واریانس فنوتیپی داشت. این سه نشانگر با هیچ‌یک از صفات بیوشیمیایی ارتباط نداشتند و مختص این مرحله از فعالیت آنزیم بودند.

آنزیم کاتالاز

مطابق با آنچه که در جدول ۵ ارائه شده است تعداد ۲۰ نشانگر مرتبط با میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شناسایی شد. سهم هر کدام از مراحل در برقراری ارتباط با نشانگرها متفاوت بود که در زیر به صورت جداگانه مورد بررسی قرار می‌گیرند.

الف- آنزیم کاتالاز (۱): مطابق با نتایج به دست آمده، هشت نشانگر مرتبط با میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله یک شناسایی شد که نشانگر M-CAG/E-AAG16 با ۲۶ درصد توجیه واریانس فنوتیپی به عنوان مهم‌ترین نشانگر مرتبط با صفت مذکور معرفی شد. تنها نشانگری که با سایر صفات ارتباط مشترکی داشت نشانگر M-CTG/E-AGA3 بود که با صفت میزان مالوندی‌آلدئید مرحله یک رابطه معنی‌دار داشت.

ب- آنزیم کاتالاز (۲): در این بررسی هفت نشانگر معنی‌دار و مرتبط با میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله دو مشاهده شد. بیش‌ترین ضریب تبیین (۲۵ درصد) مربوط به نشانگر M-CTT/E-ACA6 بود. هیچ‌کدام از این هفت نشانگر با سایر صفات رابطه مشترکی نداشتند.

پ- آنزیم کاتالاز (۳): ارتباط بین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله سه توسط پنج نشانگر قابل درک است. نشانگر M-CTG/E-AA43 به خاطر ضریب تبیین حدود ۲۱ درصد که بالاتر از بقیه نشانگرها بود به عنوان نشانگر مؤثر صفت شناسایی شد.

¹ Pleiotropy

تهیه نشانگرهای SCAR از روی ژل جدا و همسانه‌سازی نمود. تحقیق حاضر می‌تواند شروعی باشد برای انتخاب نشانگر مناسب و صفات مطلوب مانند تاخیر در پیری یا ماندگاری، تا با انتخاب بر اساس آن‌ها بتوان به نتیجه بهتری برای به‌نژادی رسید.

همبستگی معنی‌دار با چند صفت دارند می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی داوودی به کار روند. علاوه بر آن در تهیه نقشه‌های پیوستگی اطلاعات نشانگری به‌دست آمده از این تحقیق جهت انتخاب آغازگرهای مناسب، مفید خواهد بود. هم‌چنین می‌توان نوار نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده که ضریب تبیین بالایی دارند را پس از تأیید ارتباط آن‌ها با صفات مورد بررسی با

منابع

- Battelli R, Lombardi L, Rogers HJ, Picciarelli P, Lorenzi R and Ceccarelli N (2011) Changes in ultrastructure, protease and caspase-like activities during flower senescence in *Lilium longiflorum*. *Plant Science* 180: 716-725.
- Berger GL, Liu S, Hall MD, Brooks WS, Chao S, Muehlbauer GJ, Baik BK, Steffenson B and Griffey CA (2013) Marker-trait associations in Virginia Tech winter barley identified using genome-wide mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 693-710.
- Bleas MJ, De Grandis SA, Lee H and Trevors JT (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21: 99-114.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y and Buckler ES (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633-2635.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
- Breseghele F and Sorrells ME (2006) Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science* 46: 1323-1330.
- Elanchezian R and Srivastava GC (2001) Physiological responses of chrysanthemum petals during senescence. *Biologia plantarum* 44: 411-415.
- Fu YB and Williams DJ (2008) AFLP variation in 25 *Avena* species. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 333-342.
- Giannopolitis CN and Ries SK (1977) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology* 59: 309-314.
- Hardy OJ and Vekemans X (2002) Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular ecology notes* 2: 618-620.
- Heath R and Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid per-oxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* 196: 385-395.
- Hwang EY (2008) Association analysis in soybean. Ph.D. Thesis. University of Maryland, College Park.
- IBM Corp. Released (2012) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Kraakman ATW, Martinez F, Mussiraliyev B, van Eeuwijk FA and Niks RE (2006) Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Molecular Breeding* 17: 41-58.
- Lerslerwong L, Ketsa S and van Doorn WG (2009) Protein degradation and peptidase activity during petal senescence in *Dendrobium* cv. Khao Sanan. *Postharvest Biology and Technology* 52: 84-90.
- Li RW, Chen W and Dai SL (2012) The Association Analysis of Phenotypic Traits with SRAP Markers in *Chrysanthemum*. *Scientia Agricultura Sinica* 45: 1355-1364.
- Luck H (1974) *Methods in Enzymatic Analysis II* (ed.) Bergmeyer. (Publ.) Academic Press, New York. 885.
- Lv G, Tang D, Chen F, Sun Y, Fang W, Guan Z, Liu Z and Chen S (2011) The anatomy and physiology of spray cut chrysanthemum pedicels, and expression of a caffeic acid 3-O-methyltransferase homologue. *Postharvest Biology and Technology* 60: 244-250.
- Meudt HM and Clarke AC (2007) Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12: 106-117.
- Myles S, Peiffer J, Brown P, Ersoz E, Zhang Z, Costich D and Buckler E (2009) Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. *The Plant Cell* 21: 2194-2202.
- Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Roeyn Z, Hassanpour Asil M, Sabouri A and Dadras AR (2014) Genetic structure of *Chrysanthemum* genotypes from Iran assessed by AFLP markers and phenotypic traits. *Plant Systematics and Evolution* 300: 493-503.
- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA and Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 8014-8018.
- Stich B, Maurer HP, Melchinger AE, Frisch M, Heckenberger M, Rouppe van der Voort J, Peleman J,

- Srensen AP and Reif JC (2006) Comparison of linkage disequilibrium in elite European Voort ean maize inbred lines using AFLP and SSR markers. *Molecular Breeding* 17: 217-226.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, delee TV, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M and Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* 23: 4407-4414.
- Wang M, Jiang N, Jia T, Leach L, Cockram J, Waugh R, Ramsay L, Thomas B and Lu Z (2012) Genome-wide association mapping of agronomic and morphologic traits in highly structured populations of barley cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 233-246.
- Wang T, Zhu Z, Guo Q and Mao P (2013). Variation in major flavonoids glycosides and caffeoylquinic acids during florescence of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. 'Hangju' genotypes. *Biochemical Systematics and Ecology* 47: 74-79.
- Wu FB, Zhang GP and Dominy P (2003) Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environmental and Experimental Botany* 50: 67-78.
- Wu J, Jenkins JN, McCarty JC, Zhong M and Swindle M (2007) AFLP marker associations with agronomic and fiber traits in cotton. *Euphytica* 153: 153-163.
- Xu Y (2010) *Molecular Plant Breeding*. CAB International.
- Yin D, Chen S, Chen F, Guan Z and Fang W (2009) Morphological and physiological responses of two *chrysanthemum* cultivars differing in their tolerance to water logging. *Environmental and Experimental Botany* 67: 87-93.
- Yordanova RY, Christov KN and Popova LP (2004) Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany* 51: 93-101.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh Bi I, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB, Kresovich S and Buckler ES (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature genetics* 38: 203-208.
- Zhang F, Chen S, Chen F, Fang W and Li F (2010) A preliminary genetic linkage map off chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers. *Scientia Horticulturae* 125: 422-428.
- Zhang F, Chen S, Chen F, Fang W, Chen Y and Li F (2011) SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*). *Molecular Breeding* 27: 11-23.
- Zhao K, Aranzana MJ, Kim S, Lister C, Shindo C, Tang C, Toomajian C, Zheng H, Dean C, Marjoram P and Nordborg M (2007) An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. *PLoS Genetics* 3: 71-82.

Association analysis of biochemical traits with AFLP markers in Chrysanthemum genotypes (*Chrysanthemum morifolium*)

Rooin Z^{*1}, HassanpourAsil M², Sabouri A²

1. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Ilam University

2. Professor, Assistant Professor, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan

* Corresponding Author, Email: z.roein@ ilam.ac.ir

ABSTRACT

Physiological activity and biochemical changes continues in postharvest of cut flowers. These conditions reduce the longevity of flowers and accelerate the senescence process. In order to identify informative AFLP markers for description of senescence in Chrysanthemum, association analysis was used. The relationships between biochemical traits and molecular markers based on 25 primer combinations (*EcoRI* and *MseI*) and genetic structure of 44 chrysanthemum genotypes were evaluated. The results of correlation coefficient indicated a positive and significant correlation between protein concentration and lipid peroxidation ($r=0.304^{**}$) as indicators of senescence. Results of MLM association analysis model for 5 variable showed that 143 AFLP markers were found to be associated with biochemical traits in Chrysanthemum, whereas GLM model identified 419 markers for biochemical traits. Moreover, we were able to identify 49 markers associated with malondialdehyde. However, only 14 AFLP markers associated with petal senescence. The strongest association was detected between AFLP markers of M-CAC/E-AGA13, with superoxide dismutase enzyme which explained 47 percent of variation. The most variation of petal senescence (32%) was accounted by M-CTT/E-AAC35 marker. Also, our results showed that some of the markers were co-associated with different chemical traits. Moreover, informative markers such as M-CTG/E-ACC16, M-CAA/E-AAG40 and M-CTG/E-AGA3 that have been shown to significant correlation with several traits can used for breeding programs and other analyses associated with future studies of Chrysanthemum if they contribute to increase longevity in other experiments.

Key Words

Chrysanthemum, Correlation, Enzyme, Informative markers, Petal senescence