

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

تجزیه ارتباط خصوصیات زراعی - مورفولوژیک بزرک با نشانگرهای

مولکولی ISSR

نگارنده : زهرا فتحی

استاد راهنما:

دکتر مهدیه پارسائیان

اساتید مشاور:

دکتر علی اکبر محمدی میریک

دکتر شاهرخ قرنجیک

تیرماه ۱۳۹۶

شماره ۱۸۴
تاریخ ۲-۱۶۱-۱۳۹۶

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صور تجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای زهرا فتحی با شماره دانشجویی ۹۳۱۲۸۹۴ رشته کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی تحت عنوان: تجزیه ارتباط خصوصیات زراعی- مورفولوژیک بزرک با نشانگرهای مولکولی ISSR که در تاریخ ۱۳۹۶/۴/۲۶ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با امتیاز ۱۰۰٪ درجه ۱) مردود
نوع تحقیق: نظری عملی

امضاء	مرتبه علمی	نام و نام خانوادگی	عضو هیأت داوران
	استادیار	دکتر مهدیه پارسائیان	۱- استاد راهنمای اول
	استادیار	دکتر علی اکبر محمدی میریک	۲- استاد مشاور
	استادیار	دکتر شاهرخ قرنجیک	۳- استاد مشاور
	دانشیار	دکتر محمدرضا عامریان	۴- نماینده تحصیلات تکمیلی
	استادیار	دکتر امین ابراهیمی	۵- استاد ممتحن اول
	استادیار	دکتر پرویز حیدری	۶- استاد ممتحن دوم

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده:

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تقدیم به مهربان فرشتگانی که

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه‌های یکتا و زیبای زندگی، مدیون حضور سبز آنهاست.

تقدیم به

مقدس‌ترین واژگان در لغت‌نامه دلم، مادر و پدر مهربانم که زندگی را مدیون مهر و عطوفت آنها می‌دانم.

تقدیم به

خواهران و برادرانم که وجودشان شادی‌بخش و صفایشان مایه آرامش زندگی است.

و تقدیم به

روح پاک برادرم، که همه دنیایم بود...

تشکر و قدردانی

سپاس بی‌پایان بر ایزد باری تعالی که در لحظه لحظه زندگی خود، حضور نعمت‌های بیکران او را دیده‌ام و ستایش به درگاه او که مرا در انجام این پروژه یاری کرد.

بر خود لازم می‌دانم از تمام کسانی که با عنایت خویش اینجانب را یاری نموده‌اند، سپاسگزاری نمایم. از استاد راهنمای فرهیخته و مهربانم، خانم دکتر مهدیه پارسائیان که همیشه مورد لطف و مرحمت ایشان بوده‌ام و اجرای این پایان‌نامه بدون راهنمایی‌ها و مساعدت‌های فراوان ایشان میسر نبود و بدون شک رفتار ایشان چراغ راهنمای این حقیر در تمام مراحل زندگی خواهد بود تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم. همچنین مراتب احترام خود را تقدیم اساتید مشاور گرامی‌ام جناب آقای دکتر علی اکبر محمدی میریک و جناب آقای دکتر شاهرخ قرنچیک می‌نمایم.

از کلیه دوستانم که مرا در انجام این پایان‌نامه یاری نمودند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

تعهدنامه

اینجانب زهرا فتحی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه "تجزیه ارتباط خصوصیات زراعی- مورفولوژیک بزرک با نشانگرهای مولکولی ISSR" تحت راهنمایی دکتر مهدیه پارسائیان متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام گردیده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه صنعتی شاهرود» و یا «University of Technology Shahrood» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده‌اند، در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است، ضوابط و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت گردیده است.

امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

در این پژوهش، ارتباط بین ۱۴ صفت زراعی - مورفولوژیک و ۲۱ نشانگر مولکولی ISSR در ۲۶ ژنوتیپ بزرگ توسط تجزیه رگرسیون بررسی شد. ۲۱ نشانگر مورد مطالعه، در مجموع ۲۵۸ باند تولید کردند که ۲۱۸ باند از آن‌ها چندشکل بود. میانگین تعداد باندهای چندشکل ۱۰/۳۸ باند برای هر نشانگر بود. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نشانگرها بین ۰/۲۹ تا ۰/۴۹ متغیر بود. نشانگرهای IP3, UBC815, UBC811, PCT6, PCT2, 3PCT5L و 3PCT2 بیشترین میزان (PIC) را به خود اختصاص دادند. نتایج نشان داد که بین برخی از باندهای چندشکل و حداقل یکی از ۱۴ صفت مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری وجود دارد. نشانگرهای 3PCT2, 3PCT5L, IP5, 3PCT6, UBC811 بیشتر از سایر نشانگرها، قطعات مرتبط با صفات مختلف را تکثیر کردند. قطعه‌ی تولید شده توسط نشانگر 3PCT5L با اندازه‌ی ۱۲۰۰ جفت‌باز با صفات تعداد شاخه در بوته، تعداد کپسول در بوته، قطر کپسول و عملکرد دانه در بوته همبستگی نشان داد، چنین ارتباطی می‌تواند ناشی از آثار پلیوتروپیک این مکان در کنترل عملکرد و برخی اجزای آن باشد. قطعات تکثیر شده دارای ضریب تبیین بالا برای صفات مختلف، می‌توانند علاوه بر نقشه‌یابی صفات، پس از تبدیل شدن به نشانگر SCAR در برنامه‌های اصلاحی MAS (Marker Assisted Selection breeding program) جهت گزینش والدین مناسب برای تولید ارقام هیبرید در گیاه بزرگ که اطلاعات ژنتیکی زیادی از آن در دسترس نیست، بکار روند.

واژگان کلیدی: بزرگ، تجزیه ارتباطی، رگرسیون گام به گام، ضریب تبیین، ISSR

فهرست

فصل اول

۲	مقدمه.....
۲	۱-۱- تاریخچه.....
۲	۲-۱- گیاهشناسی.....
۴	۳-۱- اهمیت و مصارف.....
۵	۴-۱- صفات کمی.....
۶	۵-۱- مکان یابی صفات کمی.....
۹	۶-۱- مکان یابی ارتباطی.....
۱۲	۱-۶-۱- کاربردهای عمده مکان یابی ارتباطی در گیاهان.....
۱۴	۲-۶-۱- اهمیت ساختار جمعیت در مکان یابی ارتباطی.....
۱۶	۷-۱- نشانگرها.....
۱۶	۱-۷-۱- گروه بندی نشانگر.....
۱۷	۱-۱-۷-۱- نشانگر مورفولوژیکی.....
۱۷	۲-۱-۷-۱- نشانگرهای بیوشیمیایی.....
۱۸	۳-۱-۷-۱- نشانگرهای مولکولی.....
۱۸	۱-۳-۱-۷-۱- نشانگرهای مبتنی بر هبیریداسیون.....
۱۹	۲-۳-۱-۷-۱- نشانگرهای مبتنی بر PCR.....
۲۰	۱-۲-۳-۱-۷-۱- نشانگر مولکولی ISSR.....
۲۱	۲-۲-۳-۱-۷-۱- نحوه طراحی نشانگر ISSR.....
۲۴	۳-۲-۳-۱-۷-۱- نحوه تکثیر PCR با نشانگرهای ISSR.....

فصل دوم

۲۶	۱-۲- مروری بر پژوهش های مولکولی انجام شده در گیاه بزرک.....
۲۷	۲-۲- مروری بر پژوهش های تجزیه ارتباطی در گیاه بزرک و سایر گیاهان.....

فصل سوم

- ۳۶..... مواد و روش.....
- ۳۶..... ۱-۳- نمونه‌های گیاهی و صفات مورد بررسی.....
- ۳۶..... ۲-۳- آزمایش مزرعه‌ای.....
- ۳۸..... ۳-۳- محلول‌های مورد نیاز.....
- ۳۸..... ۱-۳-۳- بافر استخراج DNA.....
- ۳۸..... ۲-۳-۳- محلول اتیلن دی آمین تترااستیک اسید ۰/۵ مولار.....
- ۳۸..... ۳-۳-۳- محلول کلرید سدیم ۵ مولار.....
- ۳۸..... ۴-۳-۳- محلول استات سدیم ۳/۲ مولار.....
- ۳۹..... ۵-۳-۳- محلول بافر TBE.....
- ۳۹..... ۴-۳- روش استخراج DNA.....
- ۴۱..... ۵-۳- بررسی کمیت و کیفیت DNA.....
- ۴۱..... ۱-۵-۳- بررسی کمیت DNA.....
- ۴۱..... ۲-۵-۳- بررسی کیفیت DNA.....
- ۴۱..... ۶-۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR).....
- ۴۲..... ۱-۶-۳- الگوی دمای نشانگرها.....
- ۴۳..... ۲-۶-۳- بررسی محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز.....
- ۴۳..... ۳-۶-۳- رنگ‌آمیزی ژل آگارز.....
- ۴۵..... ۷-۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها.....
- ۴۵..... ۱-۷-۳- روش‌های آماری تعیین فاصله ژنتیکی.....
- ۴۵..... ۲-۷-۳- اندازه‌گیری فواصل و تشابه ژنتیکی.....
- ۴۵..... ۳-۷-۳- تجزیه‌های چندمتغیره آماری.....
- ۴۶..... ۴-۷-۳- تجزیه خوشه‌ای.....
- ۴۶..... ۵-۷-۳- ضریب کوفنتیک.....

- ۴۷-۳-۶ - تجزیه به مؤلفه‌های اصلی.....
- ۴۸-۳-۷ - شاخص محتوای اطلاعات چندشکل.....
- ۴۸-۳-۸ - شاخص اطلاعات شانون.....
- ۴۹-۳-۹ - هتروزیگوسیتی.....
- ۴۹-۳-۷-۹-۱ - هتروزیگوسیتی مورد انتظار.....
- ۵۰-۳-۷-۱۰ - تجزیه ارتباط صفات زراعی - مورفولوژیک و داده‌های مولکولی.....
- ۵۰-۳-۷-۱۰-۱ - معیارهای ارزیابی در گزینش متغیرها.....
- ۵۰-۳-۷-۱۰-۱-۱ - ضریب تبیین.....
- ۵۱-۳-۷-۱۰-۱-۲ - ضریب تبیین تصحیح شده.....

فصل چهارم

- ۵۴..... نتایج.....
- ۵۴-۴-۱ - بهینه سازی روش استخراج DNA.....
- ۵۵-۴-۲ - بررسی تنوع صفات زراعی-مورفولوژیک.....
- ۵۵-۴-۲-۱ - صفات تعداد روز تا ۵۰ درصد سبز شدن، روز تا گلدهی، روز تا رسیدگی.....
- ۵۶-۴-۲-۲ - صفت ارتفاع بوته.....
- ۵۶-۴-۲-۳ - صفت تعداد شاخه در بوته.....
- ۵۷-۴-۲-۴ - صفات عملکرد بیولوژیک و قطر کپسول.....
- ۵۷-۴-۲-۵ - تعداد دانه در کپسول.....
- ۵۷-۴-۲-۶ - صفت تعداد کپسول در بوته.....
- ۵۸-۴-۲-۷ - صفت وزن صد دانه.....
- ۵۸-۴-۲-۸ - صفت عملکرد دانه در بوته.....
- ۵۹-۴-۲-۹ - صفات شاخص برداشت، وزن دانه در کپسول و عملکرد در هکتار.....
- ۵۹-۴-۳ - همبستگی صفات.....
- ۶۶-۴-۴ - تجزیه‌ای خوشه‌ای ژنوتیپها براساس صفات زراعی-مورفولوژیک.....

- ۶۹..... ۵-۴ - نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات زراعی-مورفولوژیک
- ۷۰..... ۶-۴ - بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ISSR
- ۷۴..... ۷-۴ - گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای ISSR
- ۷۶..... ۳-۱-۴ - نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های مولکولی
- ۷۸..... ۹-۴ - نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام صفات زراعی-مورفولوژیک و داده‌های مولکولی
- ۷۸..... ۱-۹-۴ - صفت تعداد روز تا ۵۰ درصد سبز شدن
- ۷۸..... ۲-۹-۴ - صفت تعداد روز تا گلدهی
- ۷۹..... ۳-۹-۴ - صفت تعداد روز تا رسیدگی
- ۷۹..... ۴-۹-۴ - صفت ارتفاع بوته
- ۸۰..... ۵-۹-۴ - صفت تعداد شاخه در بوته
- ۸۰..... ۶-۹-۴ - صفت عملکرد بیولوژیک
- ۸۰..... ۷-۹-۴ - صفت قطر کپسول
- ۸۱..... ۸-۹-۴ - صفت تعداد دانه در کپسول
- ۸۱..... ۹-۹-۴ - صفت تعداد کپسول در بوته
- ۸۱..... ۱۰-۹-۴ - صفت وزن صد دانه
- ۸۲..... ۱۱-۹-۴ - صفت عملکرد دانه در بوته
- ۸۲..... ۱۲-۹-۴ - صفت شاخص برداشت
- ۸۲..... ۱۳-۹-۴ - صفت عملکرد دانه در هکتار
- ۸۳..... ۱۴-۹-۴ - صفت وزن دانه در کپسول
- ۹۵..... ۱۰-۴ - بحث
- ۹۸..... ۱۱-۴ - نتیجه‌گیری
- ۱۰۰..... ۱۲-۴ - پیشنهادات
- ۱۰۱..... منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱- مقایسه شماتیک آنالیز پیوستگی و مکان‌یابی ارتباطی..... ۱۰
- شکل ۱-۲ - مقایسه شماتیک مکان‌یابی ارتباطی گسترده ژنوم و مکان‌یابی ارتباطی تک ژن کاندید..... ۱۴
- شکل ۱-۳ - نحوه تکثیر PCR با استفاده از یک نشانگر ISSR..... ۲۰
- شکل ۱-۴-PCR-ISSR: واکنش PCR یک نشانگر تکی..... ۲۳
- شکل ۴-۱- الگوی بانندی DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد..... ۵۵
- شکل ۴-۲- نمودار حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA صفات زراعی..... ۶۶
- شکل ۴-۳- نمودار پراکنش گروه‌ها بر مبنای سه مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی براساس صفت زراعی-موروفولوژیک..... ۶۹
- شکل ۴-۴- قطعات DNA تکثیر یافته با نشانگر PCT1 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد..... ۷۰
- شکل ۴-۵- نمودار حاصل از تجزیه‌ای خوشه‌ای به روش UPGMA داده‌های مولکولی..... ۷۵
- شکل ۴-۶- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های ISSR..... ۷۷

فهرست جداول

- جدول ۳-۱ - ژنوتیپ‌های بزرک مورد مطالعه..... ۳۷
- جدول ۳-۲ - غلظت مواد مورد استفاده جهت تهیه‌ی بافر استخراج..... ۴۰
- جدول ۳-۳ - توالی نشانگرهای مورد آزمایش..... ۴۴
- جدول ۴-۱ - نتایج تجزیه واریانس صفات زراعی - مورفولوژیک مورد بررسی..... ۶۱
- جدول ۴-۲ - میانگین، LSD و دامنه تغییرات صفات زراعی-مورفولوژیک..... ۶۲
- جدول ۴-۳ - ضرایب همبستگی پیرسون بین صفات زراعی-مورفولوژیک..... ۶۴
- جدول ۴-۴ - نتایج واریانس فواصل ژنتیکی بین گروهی و درون گروهی صفات زراعی-مورفولوژیک..... ۶۷
- جدول ۴-۵ - میانگین صفات زراعی گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای..... ۶۷
- جدول ۴-۶ - نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات زراعی-مورفولوژیک..... ۷۰
- جدول ۴-۷ - نتایج حاصل از نشانگرهای ISSR..... ۷۳
- جدول ۴-۸ - نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشانگرهای ISSR..... ۷۷
- جدول ۴-۹ - جزئیات تجزیه واریانس رگرسیون گام به گام ۲۱۸ باند چندشکل نشانگر ISSR و صفت زراعی - مورفولوژیک..... ۸۴
- جدول ۴-۱۰ - فهرست نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات مختلف و درصد ضریب تبیین آن‌ها..... ۸۵
- جدول ۴-۱۱ - نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام..... ۸۶

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

۱- بهینه‌سازی استخراج DNA ژنومی از گیاه بزرک. دومین کنگره بین‌المللی و چهاردهمین کنگره

ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. ۹ تا ۱۱ شهریور ۱۳۹۵. رشت، دانشگاه گیلان

۲- بررسی تنوع ژنتیکی بزرک با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. دومین همایش ملی کشت

ارگانیک و ازدیاد گیاهان دارویی. ۲۹ مهرماه ۱۳۹۵. ساری، مازندران

فصل اول

مقدمه و کلیات

مقدمه

۱-۱ تاریخچه

بزرگ گیاهی با قدمت کشت بیش از ۱۰۰۰۰ سال قبل از میلاد، که به منظور استفاده از روغن و فیبر موجود در دانه و ساقه‌هایش مورد کشت قرار می‌گرفت. خاستگاه اولیه این گیاه سواحل مدیترانه و کشور هندوستان می‌باشد (جالا و هال، ۲۰۱۰). از سال ۱۸۰۵ کشت بزرگ جهت استخراج روغن در کشورهای زیادی رواج پیدا کرد. کشور کانادا بیشترین سطح زیر کشت و تولید این گیاه را بر عهده دارد (مرکز آمار فائو، ۲۰۱۴).

بزرگ از حدود ۵۰۰۰ سال قبل از میلاد در کشور ایران مورد کشت قرار می‌گرفت. با این حال امروزه علی‌رغم فواید زیاد این دانه روغنی، توسعه و کشت این گیاه در سال‌های اخیر رونق چندانی نداشته و مورد بی‌توجهی قرار گرفته است.

۲-۱ گیاه‌شناسی

بزرگ با نام علمی (*Linum usitatissimum* L.) و با نام انگلیسی flax، از خانواده Linacea می‌باشد، این خانواده دارای ۲۲ جنس و ۳۰۰ گونه بوده، که *Linum* مهمترین جنس آن‌ها است (هیچ‌کی، ۱۹۸۸). گونه‌های جنس *Linum* به ۵ بخش (*Linum*, *Syllinum*, *Cathartolinum*, *Linastrum*, *Dasylinum*) تقسیم شده‌اند (فو و همکاران، ۲۰۰۲)، که بخش *Linum* حاوی گونه‌ی زراعی *L.usitatissimum* و گونه‌های زینتی *L.graniflorum* و *L.perenne* می‌باشد. دو گونه‌ی آخر از اهمیت اقتصادی کمتری برخوردارند. تعداد کروموزوم‌ها در گونه‌های *Linum* محدوده وسیعی را از $2n=16$ تا $2n=72$ نشان می‌دهند. *L.usitatissimum* و خویشاوندان وحشی آن دارای $2n=30$ کروموزوم می‌باشند (موراونکو و همکاران، ۲۰۰۳).

بزرک گیاهی یک ساله، دیپلوئید و خودگرده افشان است، که البته بسته به عوامل رقم، فصل و حشرات تا ۲ درصد دگرگرده افشانی دارد، و به صورت بوته‌ای ایستاده رشد می‌کند. طول دوره رشد آن در کشت بهاره ۹۰ تا ۱۵۰ روز و در کشت پاییزه تا ۲۵۰ روز می‌رسد. این گیاه دارای سیستم ریشه‌ای قوی نبوده و ریشه راست و مستقیم آن در مراحل اولیه رشد با سرعت به عمق خاک نفوذ می‌کند. اغلب تک ساقه بوده ولی گاهی در بخش بالائی سطح خاک انشعاب ایجاد می‌کند. طول ساقه آن بین ۲۰ تا ۱۶۰ سانتی‌متر و رنگ ساقه به سبز روشن تا سبزه تیره تغییر می‌کند. برگ‌های این گیاه کوچک، باریک و نوک تیز و بدون دم‌برگ‌اند و برگ در محل اتصال به ساقه کمی باریک می‌شود. طول برگ‌ها بین ۲ تا ۳ سانتی‌متر بوده و بر روی ساقه به‌طور متناوب قرار می‌گیرند.

آرایش گل‌ها به صورت خوشه‌ای باز، گل آذین بر روی یک محور اصلی منتهی به یک گل، طول گل‌ها حدود یک سانتی‌متر و به رنگ آبی تا بنفش می‌باشند.

میوه‌های بزرک (بذر) دورن کپسول‌های گرد و خشک، با قطر ۶-۹ میلی‌متر قرار دارند. بذرها صاف با سطح براق، تا حدودی شبیه بذر کنجد ولی از نظر اندازه کمی بزرگتر، حدود ۵/۷ میلی‌متر می‌باشند. رنگ آن‌ها بسته به نوع رقم به دو رنگ قهوه‌ای و طلایی‌اند، که از نظر مقدار، نوع روغن، فوائد تغذیه‌ای و شرایط رشدی به یکدیگر شبیه هستند و حاوی مواد مغذی، آنتی‌اکسیدان، مواد معدنی، ویتامین و اسیدهای چرب امگا۳ می‌باشد.

بزرک در شرایط آب و هوایی نیمه‌گرمسیری و گرمسیری و در خاک‌های مرطوب عمیق حاوی شن، گل و لای و خاک رس زیاد به خوبی رشد می‌کند.

۳-۱ اهمیت و مصارف

بزرک به عنوان یک منبع غذایی و یک ملین طبیعی از سال‌های بسیار دور توسط یونانیان و مصریان باستان مورد استفاده قرار می‌گرفت (برگلوند و همکاران، ۲۰۰۲). خواص منحصربفرد و متنوع این گیاه آن را در سال‌های اخیر مورد توجه و علاقه زیادی قرار داد، به‌طوری‌که در سال ۲۰۰۵ حدود ۲۰۰ نوع غذای جدید که محتوی بذر بزرک یا روغن آن بودند به بازار عرضه شد (موریس، ۲۰۰۷).

این دانه‌ی روغنی دارای مقادیر فراوانی اسیدهای چرب غیراشباع، پروتئین و لیگنین است (استیون و ایرلیچ، ۲۰۰۹) و محتوی ۴۰ درصد روغن، ۳۰ درصد فیبر، ۲۰ درصد پروتئین، ۴ درصد خاکستر و ۶ درصد رطوبت می‌باشد (رودریگز لوی و همکاران، ۲۰۱۰).

بذر بزرک محتوی مخلوطی از دو نوع اسید چرب ضروری آلفا لینولنیک اسید یا همان امگا ۳ (ALA; C18:3) و آلفا لینولئیک اسید یا همان امگا ۶ (LA; C18:2) می‌باشد که برای سلامتی انسان ضروری‌اند ولی در داخل بدن انسان نمی‌توانند سنتز شوند. لذا انسان مجبور است که آن‌ها را از طریق خوردن غذا به دست آورد (لودویگووا و گریگا، ۲۰۱۵). اسید چرب آلفا لینولنیک اسید^۱ (ALA) در بدن انسان به ایکوزاپنتانوئیک اسید^۲ (EPA) و دوکوزاهگزانوئیک اسید^۳ (DHA)، که اسیدهای چرب امگا ۳ موجود در روغن ماهی هستند تبدیل می‌شود که هر کدام به نوبه خود در سلامتی انسان نقش بسزایی دارند (استیون و ایرلیچ، ۲۰۰۹). متخصصان تغذیه مصرف روزانه ۲/۲۲ گرم ALA را برای بزرگسالان تجویز می‌کنند (رودریگز لوی و همکاران، ۲۰۱۰). مطالعات جدید نشان می‌دهد رژیم غذایی حاوی ALA موجب کاهش ابتلا به بیماری‌هایی همانند فشارخون، کلسترول، دیابت، سرطان سینه، پروستات، مشکلات مفصلی پوکی استخوان، میگرن، استرس، اختلالات بینایی، اختلالات معده‌ای - روده‌ای، سکت و

^۱-Alpha-Linolenic Acid

^۲-Eicosapentaenoic Acid

^۳-Docosahexaenoic Acid

بیماری‌های قلبی می‌شود (فزاری و یونیس، ۲۰۱۵).

وجود مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع چند بانندی در روغن بزرک آن را برای صنایع رنگ سازی، مرکب چاپ، پارچه ضد آب، صابون و کف پوش مناسب ساخته است. کنجاله بزرک ۳۵ تا ۳۷ درصد پروتئین دارد و می‌تواند به عنوان مکمل پروتئین در غذای نشخوارکنندگان مورد استفاده قرار گیرد (برناردو، ۲۰۰۸). از الیاف بزرک نیز برای تولید کاغذهای ظریف و محکم و تهیه الیاف لفاف جهت ساختن مبل و تشک و همچنین برای تولید پارچه‌های ظریف و پردوام، بخصوص ملافه استفاده می‌شود.

۱-۴ صفات کمی^۱

بخش عمده‌ی صفات اقتصادی در گیاهان از نوع کمی هستند که دارای توزیع پیوسته می‌باشند. بر اساس تئوری ژنتیک کمی، گوناگونی این صفات در جامعه با دو مدل ژنتیکی "تعداد نامحدود ژن" و "تعداد محدود ژن" توصیف می‌شود. در مدل ژنتیکی تعداد نامحدود ژن فرض این است که صفات کمی توسط تعداد نامحدود از ژن‌های ناپیوسته با اثرهای ژنتیکی بسیار اندک کنترل می‌شوند (فیشر، ۱۹۳۴). در دهه‌های گذشته از این مدل ژنتیکی برای ابداع روش‌های مورد نیاز در اصلاح گیاهان استفاده شده است که سبب پیشرفت ژنتیکی در جوامع گیاهی شده است.

در طی ۱۰ سال گذشته علم ژنتیک مولکولی پیشرفت زیادی داشته و در زمان حاضر امکان تشخیص تعداد زیادی نشانگر در فاصله‌ی بسیار نزدیکی بر روی کروموزوم‌ها وجود دارد. بنابراین امکان بررسی نشانگرها در گیاهان و چگونگی انتقال آن‌ها به نسل بعد وجود دارد. در این صورت می‌توان پیوستگی نشانگرها را با مکان ژن‌های کنترل کننده‌ی صفات کمی دارای پیوستگی ژنتیکی با نشانگرها را مطالعه نمود. در نهایت از اطلاعات مربوط به مکان ژن‌های کمی می‌توان برای پیش بینی دقیق‌تر ارزش

^۱- Quantitative Trait

ارثی گیاهان و انتخاب آن‌ها به کمک نشانگرها^۱ (MAS) استفاده کرد (لینچ و والش، ۱۹۹۸).

۵-۱ مکان‌یابی صفات کمی^۲

مکان‌یابی ژنی جایگاه صفات کمی (QTL) یک ابزار رایج برای مطالعات ژنتیکی در گیاهان، حیوانات و انسان‌ها است. با چنین ابزاری، امکان پاسخ‌دهی به سوال‌های ژنتیکی بنیادی زیادی نظیر نحوه وراثت صفات کمی، تعامل ژنوتیپ × محیط و اساس ژنتیکی هتروزیس فراهم می‌شود (تنکس‌لی، ۱۹۹۳؛ تمپلیتون، ۱۹۹۹؛ وو و همکاران، ۲۰۰۰؛ مکی، ۲۰۰۱). بیش از ۱۰،۰۰۰ مقاله در طول سه دهه در زمینه مکان‌یابی QTL برای گونه‌های مختلف منتشر شده که در پایگاه اطلاعاتی (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) موجود می‌باشد.

بررسی خصوصیات مورفولوژیک، زراعی و فنولوژیک گیاهان جهت افزایش عملکرد و استفاده در برنامه‌های به‌نژادی از اهمیت خاصی برخوردار است. بیشتر صفاتی که برای اصلاح‌گران از اهمیت زیادی برخوردارند، دارای کنترل ژنتیکی پیچیده‌ای بوده و توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند که با همدیگر و نیز با محیط اثر متقابل داشته و به همین خاطر پیش‌بینی آن‌ها تا حدودی دشوار است. صفات کمی دارای توزیع پیوسته بوده و قابل اندازه‌گیری هستند. مطالعه‌ی ژن‌های کنترل‌کننده‌ی صفات کمی نقش مهمی در اصلاح گیاهان و حیوانات ایفا می‌کند، زیرا اکثر صفات دارای ارزش‌های اقتصادی مانند عملکرد از نوع صفات کمی هستند. از آنجایی که معمولاً اثر ژن‌های کمی کوچک است، شناسایی و تعیین دقیق تعداد محل قرارگیری آن‌ها در ژنوم مشکل بوده و از اصطلاح QTL برای آن‌ها استفاده می‌شود. در واقع QTL به قسمتی از ژنوم گفته می‌شود که روی صفت کمی تاثیر می‌گذارد و معمولاً شامل تعداد زیادی ژن یا مکان‌های ژنی می‌باشند که همه یا بعضی و یا گاهی حتی یکی از آن‌ها به صفت کمی مربوط می‌شوند.

^۱- Marker Assisted Selection(MAS)

^۲- Quantitative Trait Mapping

یک اختلاف بین QTL و ژن‌های اصلی در آن است که ژن‌های اصلی تولید کننده یک صفت هستند و ایجاد تغییر در آن‌ها باعث خاموش شدن تظاهر صفت می‌شود، در حالی که QTLها، ژن‌های مختلفی هستند که می‌توانند میزان بیان ژن‌های اصلی را تغییر دهند (رابعی، ۲۰۰۳).

مکان‌یابی ژنتیکی نقش مهمی در کشف اساس تنوع صفات کمی داشته و با ظهور نشانگرهای مولکولی مانند پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی چشم‌انداز روشنی در آینده خواهد داشت (ونگ و همکاران، ۱۹۹۸). بخاطر تفاوت‌های موجود در خواص بیولوژیکی نمونه‌های مورد مطالعه، تلاش‌های زیادی در توسعه‌ی روش‌های آماری مکان‌یابی ژنتیکی جمعیت‌ها یا گونه‌های خاص انجام شده است. از نظر اصول مکان‌یابی ژنتیکی، روش مکان‌یابی ژنی شامل دو حوزه‌ی اصلی: تجزیه پیوستگی^۱ و تجزیه ارتباطی^۲ (براساس عدم تعادل پیوستگی) می‌باشد (اولسون و همکاران، ۱۹۹۹). تجزیه پیوستگی براساس نوترکیبی غیرآلی یک مارکر و مکان صفت کمی در طول میوز می‌باشد و بنابراین می‌تواند به‌طور مستقیم برای تخمین فاصله (به‌وسیله‌ی اندازه‌گیری بخش‌های نوترکیبی) بین دو مکان ژنی استفاده شود. با این حال، تشخیص نوترکیبی بین مکان‌های نزدیک بهم (کمتر از یک سانتی مورگان) زمانی که تعداد محدودی میوز در جمعیت به وقوع پیوسته باشد مشکل است (هستباکا و همکاران، ۱۹۹۲؛ دارویزای و همکاران، ۱۹۹۳؛ لانگ و همکاران، ۱۹۹۵).

مفاهیم تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباطی نباید با یکدیگر اشتباه گرفته شوند. تجزیه پیوستگی به رابطه لوکوس برمی‌گردد، در حالی که تجزیه ارتباطی به رابطه‌ی آلل‌ها در یک فراوانی بزرگ‌تر برمی‌گردد. مکان‌یابی بر اساس تجزیه پیوستگی یک ابزار کلیدی برای شناسایی ژنتیکی صفات کمی در گیاهان می‌باشد. با این حال، در مطالعات پیوستگی که نیازمند تلاقی‌های مناسب می‌باشد، گاهی اوقات نوترکیبی

^۱- Linkage Analysis

^۲- Association Analysis

کم یا اندازه‌ی کوچک جمعیت، محدودیت ایجاد می‌کند. علاوه بر این، وجود تنها دو مکان برای هر جایگاه و وقوع نوترکیبی کم برای تخمین فاصله ژنتیکی بین مکان نشانگر و مکان صفات کمی (QTL)، منتج به وضوح کم مکان‌یابی می‌شود. برای حذف این محدودیت‌ها، مکان‌یابی براساس عدم تعادل پیوستگی^۱ (LD) یا مکان‌یابی ارتباطی^۲ (تجزیه ارتباطی) به‌طور گسترده برای کشف بیماری‌های انسان استفاده شده‌اند (اسلات‌کین، ۲۰۰۸). مکان‌یابی ارتباطی به‌طور بالقوه توانایی تشخیص ارتباط یک نشانگر با یک ژن مسؤل فنوتیپ‌های مختلف را دارد و همچنین ارتباط‌های ژنوتیپ-فنوتیپ بین افراد غیرمرتبط را شناسایی می‌کند. وضوح بالای آن‌ها به‌وسیله‌ی نوترکیبی‌های قدیمی جمع شده در مجموعه‌ی ژرم‌پلاسم محاسبه می‌شود.

در شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات کمی بر مبنای تجزیه‌ی پیوستگی اغلب از جمعیت‌های ساختگی مانند جمعیت F_2 ، جمعیت‌های حاصل از تلاقی‌های برگشتی^۳، لاین‌های اینبرد نوترکیب^۴ و هاپلوئیدهای مضاعف^۵ استفاده می‌شود. محدودیت اساسی استفاده از این جمعیت‌ها، تعداد محدود کراسینگ‌آور و در نتیجه وضوح پایین نقشه ژنتیکی (۱۰-۲۰ سانتی‌مورگان)، هزینه‌ی بالای تکثیر رگه‌ها برای رسیدن به تعداد کافی کراسینگ‌آور است. ضمن اینکه ایجاد چنین جمعیت‌هایی بسیار زمان‌بر بوده و جمعیت ایجاد شده فقط برای صفات و مطالعات محدودی کارآیی دارد (گوپتا و همکاران، ۲۰۰۵؛ هولند، ۲۰۰۷). به‌علاوه تعداد کمی ژنوتیپ به عنوان والدین جمعیت در حال تفرق برای شناسایی چندشکلی‌های مرتبط با صفات مورد مطالعه غربال می‌شوند که این خود، محدودیت دیگری را ایجاد می‌کند، زیرا ممکن است نشانگرهای شناسایی شده در این والدین برای گزینش به کمک نشانگر در

^۱-Linkage disequilibrium Mapping

^۲-Association Mapping

^۳-Backcross

^۴-Recombinant Inbred Lines

^۵-Double Haploid

زمینه‌های ژنتیکی والدین و ارقام دیگر مفید نباشد.

برای غلبه بر این محدودیت‌ها در سال‌های اخیر روش مکان‌یابی ارتباطی یا تجزیه ارتباطی^۱ معرفی شده است که نه تنها امکان مکان‌یابی دقیق و مطمئن ژن‌ها و مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی را فراهم می‌کند، بلکه امکان شناسایی نواحی کروموزومی دیگری که در مطالعات مبتنی بر پیوستگی امکان‌پذیر نیستند را نیز میسر می‌سازد. در این روش نیازی به تهیه‌ی جمعیت در حال تفرق که تولید آن نیاز به زمان زیادی دارد نمی‌باشد، ولی بهتر است از داده‌های فنوتیپی چندساله استفاده شود. از طرف دیگر کراسینگ‌آورهایی که در حین تهیه‌ی جمعیت‌های در حال تفرق صورت می‌گیرد، محدود می‌باشد، در نتیجه امکان مکان‌یابی دقیق فراهم نمی‌شود (برسیگلو و سوریلیس، ۲۰۰۶). استفاده از جمعیت‌های طبیعی مزیت بزرگ روش نقشه‌یابی ارتباطی است. در این روش مجموعه‌ی بزرگی از افراد یک جمعیت به‌طور تصادفی جمع‌آوری می‌شوند و بر اساس عدم تعادل پیوستگی نقشه‌یابی انجام می‌شود. نقشه‌یابی ارتباطی در مقایسه با نقشه‌یابی پیوستگی به مراتب دقیق‌تر است زیرا به دلیل نوترکیبی‌های زیاد، نقشه ژنتیکی وضوح بالایی دارد و به راحتی می‌توان از آن در فرآیند انتخاب به کمک نشانگر استفاده کرد (موس و موم، ۲۰۰۸). این روش در انسان برای شناسایی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مندلی مورد استفاده قرار گرفته است (جان و همکاران، ۲۰۰۸) کاربرد آن در علوم گیاهی نیز رو به گسترش است.

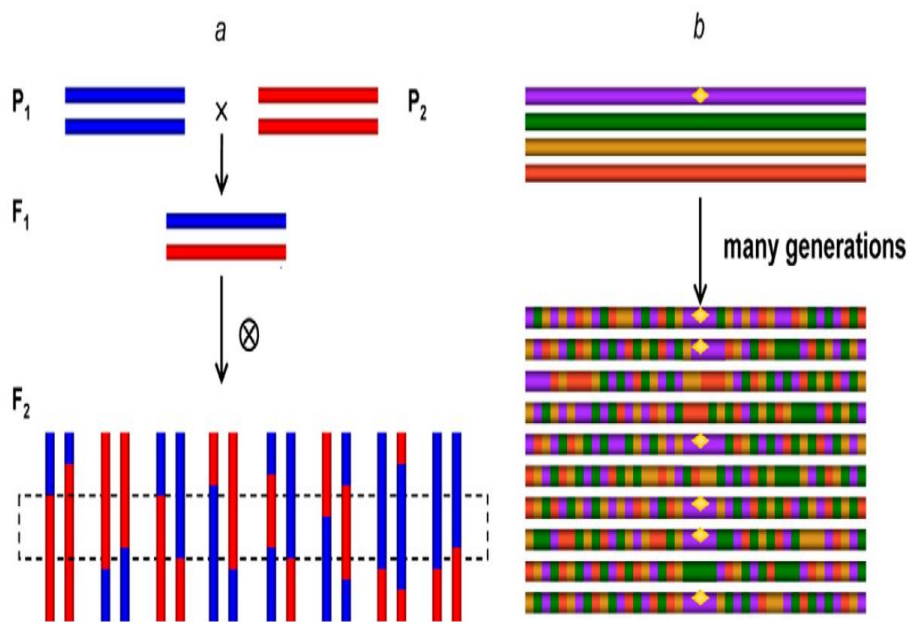
۱-۶ مکان‌یابی ارتباطی^۲

در سال‌های اخیر، علاقه‌ی فوق‌العاده‌ای در شناسایی ژن‌های مسئول صفات کمی پیچیده در گیاهان به‌وجود آمده است. پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی ژنومی، انگیزه‌های زیادی برای کشف تنوع‌های طبیعی و توسعه‌ی روش‌های تجزیه و تحلیل آماری شناسایی ارتباط صفات کمی و نشانگرهای مولکولی

^۱- Association Analysis

^۲- Association Mapping

ایجاد کرد. بدین منظور استفاده از روش مکان‌یابی ارتباطی به طور گسترده‌ای افزایش یافته است (هال و همکاران، ۲۰۱۰؛ ژو و همکاران، ۲۰۰۸). این روش با شناسایی تمام نوترکیبی‌های وقوع یافته در طی چند نسل، به تشخیص وجود ارتباط بین نشانگرهای ژنتیکی و ژن‌های کنترل‌کننده فنوتیپ‌های مورد علاقه بر پایه عدم تعادل پیوستگی می‌پردازد و بنابراین دقت و صحت ارتباطها افزایش می‌یابد. تجزیه پیوستگی و مکان‌یابی ارتباطی رایج‌ترین روش‌ها برای شناسایی صفات کمی پیچیده هستند. شکل ۱-۱ در قسمت a تجزیه پیوستگی در یک جمعیت F_2 را نشان می‌دهد، قسمت b مکان‌یابی ارتباطی در یک ژرم‌پلاسم طبیعی را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۱: مقایسه شماتیک تجزیه پیوستگی (تصویر a) و مکان‌یابی ارتباطی (تصویر b) (ژو و همکاران، ۲۰۰۸)

هدف از مکان‌یابی ارتباطی یافتن ارتباطات آماری بین نشانگرها و صفات کمی است. بر خلاف مکان‌یابی QTL، که نیاز به وجود شجره افراد برای مکان‌یابی می‌باشد، در مکان‌یابی ارتباطی به ارتباطات جمعیت‌های با افراد غیرخویشاوند، شناسایی ارتباط فنوتیپ- نشانگر جمعیت وسیع بر اساس منابع غیر

ثبت شده از عدم تعادل اشاره دارد (فلینت-گارسیا و همکاران، ۲۰۰۳). در مکان‌یابی ارتباطی نشانگرهای ژنتیکی معمولاً در کنار ژن‌های کاندید قرار دارند و مکان‌یابی ارتباطی با استفاده از عدم تعادل پیوستگی (LD) بین نشانگر و ژن کاندید، باعث نمایان شدن چندشکلی‌های موجود در ژن می‌شود. این بدین معناست که مکان‌یابی ارتباطی، از طرفی توانایی شناسایی و مکان‌یابی QTLها دارد، و همچنین به‌طور بالقوه توانایی شناخت چندشکلی‌های ژن‌های مسؤل فنوتیپ‌های مختلف را دارد (گوپتا و همکاران، ۲۰۰۵).

از آنجایی که اشاره به عدم تعادل پیوستگی شد، می‌توان مکان‌یابی ارتباطی را با عنوان مکان‌یابی عدم تعادل پیوستگی نیز شناخت. عدم تعادل پیوستگی "ارتباط غیر تصادفی آلل‌های موجود بر روی جایگاه‌های ژنی مختلف" است این نباید با پیوستگی^۱ اشتباه شود (فلینت - گارسیا، ۲۰۰۳). در برخی موارد بین آلل‌های موجود در جایگاه‌های ژنی مختلف یک ارتباط پیش بینی نشده وجود دارد که با قوانین ژنتیک کلاسیک متفاوت است. این ارتباط غیر تصادفی بین آلل‌ها در جایگاه‌های ژنی مختلف را با عنوان عدم تعادل پیوستگی می‌شناسند و باعث می‌شود فراوانی هاپلوتایپی مشاهده شده در جمعیت با فراوانی های مورد انتظار آن در قانون هاردی واینبرگ متفاوت باشد (هایز، ۲۰۰۷). به‌طور کلی استفاده از عدم تعادل پیوستگی در مطالعاتی که هدف آن بررسی ارتباط یک نشانگر با نشانگر دیگر و یا بررسی ارتباط یک نشانگر با یک مکان ژنی و یا بررسی ارتباط یک نشانگر با یک ژن بیماری‌زا است، مورد استفاده قرار می‌گیرد (هایز و همکاران، ۲۰۰۳).

عموماً عدم تعادل پیوستگی قوی‌تر بین آلل‌هایی که در مکان‌های نزدیک‌تری نسبت به یکدیگر قرار دارند مشاهده می‌شود (چون که احتمال کمتری در جداسازی آن‌ها از یکدیگر به‌وسیله نوترکیبی وجود

^۱- Linkage

دارد). بنابراین، ارتباط تصادفی بین آلل‌ها کاهش یافته، پس در نتیجه میزان عدم تعادل پیوستگی افزایش می‌یابد. از طرف دیگر، در فواصل فیزیکی کروموزوم، قدرت تفکیک عدم تعادل پیوستگی به وسیله‌ی عوامل زیادی شامل رانش ژنتیکی، انتخاب مصنوعی و طبیعی، آمیزش و ترکیب جمعیت‌های مختلف تحت تأثیر قرار می‌گیرد (گات و لانگ، ۲۰۰۳؛ یو و بوکلر، ۲۰۰۶).

قدرت تفکیک عدم تعادل پیوستگی گستره‌ی متنوعی در نواحی مختلف کروموزوم دارد (یان و همکاران، ۲۰۰۹). این ممکن است به علت گوناگونی زیاد در میزان نوترکیبی، هم‌چون میزان نوترکیبی کم در نواحی سانتیمری و میزان زیاد نوترکیبی در نواحی ژنومی رتروترانسپوزونی در طول کروموزوم باشد. عدم تعادل پیوستگی به‌طور خیلی زیاد در ناحیه‌هایی که پیچیدگی ژنوم زیاد است یافت می‌شوند (جانگ و همکاران، ۲۰۰۴؛ تیان و همکاران، ۲۰۰۹).

پیوستگی، ارتباط جایگاه‌های ژنی روی یک کروموزوم با فواصل ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌مورگان و در نتیجه نوترکیبی محدود می‌باشد. عدم تعادل پیوستگی وقوع برخی ترکیبات آلی با فراوانی کمتر یا بیشتر در یک جمعیت نسبت به مورد انتظار، اگر ارتباط آلل‌ها غیر تصادفی باشد توصیف می‌کند، این می‌تواند به علت وقوع جهش‌های ناخواسته، مهاجرت ژنی یا انحراف باشد. مکان‌یابی ارتباطی اولین بار برای شناسایی تنوع طبیعی در ژن‌های مسئول بیماری‌های انسانی استفاده شد اما به نظر می‌رسد یک راهکار پر قدرت برای شناسایی صفات در گیاهان نیز باشد (فلینت - گارسیا و همکاران، ۲۰۰۳).

۱-۶-۱ کاربردهای عمده مکان‌یابی ارتباطی در گیاهان

۱. شناسایی ارتباط نشانگر - صفت در جمعیت‌های طبیعی و پس از آن انتخاب به کمک نشانگر

۲. مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های طبیعی (گوپتا و همکاران، ۲۰۰۵).

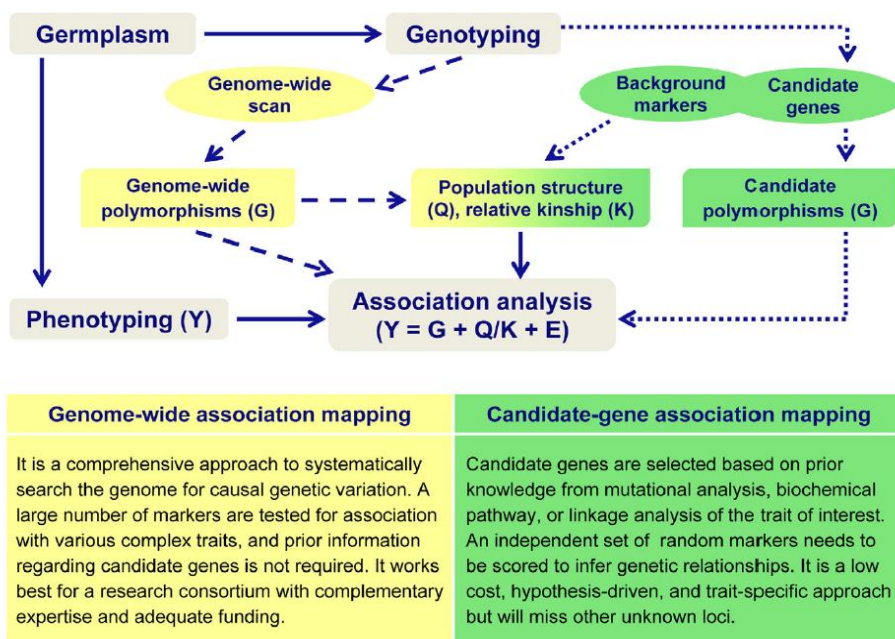
مکان‌یابی ارتباطی به‌طور موفقیت آمیزی جهت مکان‌یابی صفات مختلف در گیاهان مختلف به‌کار

رفته است، نظیر مکان‌یابی صفت عادت رشدی و گلدهی در چغندر (*Beta vulgaris* ssp. *Maritime*) (هانسن و همکاران، ۲۰۰۱)، محتوای کارتنوئید در ذرت (پلاسا و همکاران، ۲۰۰۳)، ترکیبات دانه (ویلسون و همکاران، ۲۰۰۴)، زمان گلدهی و ژن‌های مقاومت در آرابیدوپسیس (آرانزانا و همکاران، ۲۰۰۵) و اندازه‌ی دانه در گندم (*Triticum aestivum* L.) (بریسگلو و سوریلز، ۲۰۰۶).

مکان‌یابی ارتباطی می‌تواند از مزیت‌های موجود در جمعیت‌های طبیعی به‌جای جمعیت‌های ساختگی استفاده کند، و تعداد زیادی آلل را در چندین مکان به‌طور هم‌زمان بررسی کند و میزان وضوح را افزایش دهد (فلینت - گارسیا و همکاران، ۲۰۰۵). شباهت ژنتیکی گیاهان می‌تواند با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف مانند SNPها یا نشانگرهای سنتی هم‌چون AFLPها یا نشانگرهای ریزماهواره اندازه‌گیری شود (برادی و پرووارت، ۲۰۰۷). گاهی در مکان‌یابی ارتباطی مشکلاتی به‌علت ساختار جمعیت به‌وجود می‌آید (پریت‌چارد و همکاران، ۲۰۰۰). براساس علم تکامل، جمعیت‌های دارای هتروزیس می‌توانند باعث ارتباطات ساختگی شوند، بنابراین مطالعات ارتباط با محدودیت‌هایی روبرو می‌شود. با این حال، یک روش مدل مختلط^۱ توسط یو و همکارانش (۲۰۰۶) پیشنهاد شد که امکان جداسازی سیگنال‌های حقیقی ارتباطات کاربردی را از سیگنال‌های غیر حقیقی تولید شده به‌علت ساختار جمعیت را فراهم می‌آورد. زو و کرواچ (۲۰۰۸) گزارش کردند که " مکان‌یابی ارتباطی گسترده ژنوم بر اساس عدم تعادل پیوستگی (LD) ممکن است یک راه میان‌بر برای کشف آلل‌های کاربردی و تنوع‌های آللی صفات زراعی را فراهم کند". مکی و پویل (۲۰۰۷) پیش‌بینی کردند استفاده موفق از مکان‌یابی ارتباطی منجر به " کارآیی بیشتر انتخاب به کمک نشانگر، تسهیل کشف ژن و کمک به فهم بهتر توالی‌های متنوع مرتبط با فنوتیپ‌های توارثی مختلف " می‌شود.

^۱- Mixed-Model

مکان‌یابی ارتباطی بر خلاف مکان‌یابی پیوستگی، توانایی کشف همه نوترکیبی‌ها و جهش‌های به وقوع پیوسته در یک جمعیت را با وضوح بالا دارد (یو و بوکسر، ۲۰۰۶). با این حال، این روش ارتباطی قدرت کمتری در تشخیص آلل‌های کمیاب در جمعیت، حتی با آثار بزرگ‌شان، نسبت به مکان‌یابی پیوستگی دارد. عموماً مطالعات مکان‌یابی ارتباطی در دو گروه انجام می‌شود: (۱) مکان‌یابی ارتباطی تک ژن کاندید در کنترل تنوع فنوتیپی صفاتی خاص، (۲) مکان‌یابی گسترده ژنوم، و بررسی تنوع فنوتیپی و یافتن ارتباط صفات متنوع (ریچ و میرکانگاز، ۱۹۹۶). (شکل ۲-۱)



شکل ۲-۱: مقایسه شماتیک مکان‌یابی ارتباطی گسترده ژنوم و مکان‌یابی ارتباطی تک ژن کاندید (ژو و همکاران، ۲۰۰۸)

۲-۶-۱ اهمیت ساختار جمعیت در مکان‌یابی ارتباطی

نوع ساختار جمعیت باعث ایجاد تفاوت معنی‌داری در فراوانی بعضی آلل‌ها در زیر جمعیت‌ها می‌شود، که این می‌تواند ناشی از عدم تعادل پیوستگی غیرمنتظره بین لوکوس‌های غیرمرتبط در سراسر

ژنوم باشد (ارسوز و همکاران، ۲۰۰۹). مکان‌یابی ارتباطی توانایی شناسایی ارتباطات صفات - نشانگر در مجموعه‌ای از ژرم پلاسسم طبیعی را فراهم می‌کند. مکان‌یابی ارتباطی می‌تواند به وسیله‌ی عوامل منفی نظیر نوع ساختار جمعیت، اندازه کوچک جمعیت و فراوانی کم آلل‌های خاص تحت تاثیر قرار گیرد، که ممکن است باعث ایجاد ارتباطات مثبت دروغین شود. در این حالت قطعیت بیان صحت سطح معنی‌دار قابل قبول در یک مطالعه‌ی ارتباطی دشوار است. روشی برای تخمین احتمالات تشخیص‌های دروغین، استفاده از آزمون‌های بونفرونی^۱ می‌باشد. استفاده از آستانه‌های احتمال سختگیرانه^۲ خطر ارتباطات مثبت دروغین را کاهش خواهد داد، اما این باید برای به حداقل رساندن سطح رد شدن مثبت‌های حقیقی ناشی از تنظیم بیش از حد آستانه، به‌طور دقیق متعادل شود. اخیراً در مطالعه‌ای، تصمیم به تخمین ژن‌های مؤثر بر ارتفاع انسان گرفتند ولی به علت سخت‌گیری بیش از حد در آزمایشات، ژنی تشخیص داده نشد. که می‌تواند به دلیل کاهش تخمین وراثت پذیری نسبت به آنچه که از اندازه‌گیری صفت مورد انتظار است باشد (یانگ و همکاران، ۲۰۱۰).

برای غلبه بر محدودیت‌های مکان‌یابی ارتباطی، شناسایی نشانگرهای وابسته به صفات از طریق رگرسیون مناسب به نظر می‌رسد. آنالیز رگرسیون چند متغیره^۳ بر پایه‌ی رابطه‌ی بین نشانگرهای مولکولی (به عنوان متغیر مستقل) و صفات مورد مطالعه (به عنوان متغیر وابسته) روش مناسبی برای شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت می‌باشد. این آنالیز ضریب تبیین (R^2) را تعیین می‌کند که این ضریب میزان رابطه صفات را با نشانگر مولکولی نشان می‌دهد (گومز، ۱۹۸۴). در دسترس بودن تعداد زیادی از نشانگرهای مولکولی و صفات می‌تواند به مطالعه‌ی آنالیز رگرسیونی بین این نشانگرها و صفات کمک نماید. اکثر مطالعات تجزیه ارتباطی مبتنی بر پیوستگی، امکان ردیابی نشانگرهای مختلف مرتبط با صفات

^۱- Bonferroni

^۲- Stringent probability thresholds

^۳- Multiple regression analysis

را مقذور نموده است، ولی اغلب به دلیل فاصله زیاد بین نشانگر و صفات، انتخاب با کمک نشانگر و نیز جداسازی و همسانه‌سازی ژن مورد نظر را مشکل ساخته است. به‌علاوه فقط از تعداد کمی ژنوتیپ به عنوان والد برای مکان‌یابی ژن‌ها استفاده شده است که نه تنها مکان‌یابی ژن‌ها را با درجه اطمینان بالاتری ممکن می‌سازد، بلکه شناسایی نشانگرهای که در مکان‌یابی مبتنی بر پیوستگی قابل ردیابی نبودند را مقذور می‌سازد (نیئل و ساوولانین، ۲۰۰۴؛ روی و همکاران، ۲۰۰۶). بسیاری روش‌های دیگر را نیز می‌توان برای تأیید ارتباط چندشکلی شناسایی شده با صفت مورد نظر استفاده کرد. برای مثال، مقدار P ممکن است با افزودن جمعیت به همان جمعیت ساختگی یا جمعیت ژرم‌پلاسم طبیعی باعث بهبود، و در نتیجه اطمینان محققین از ارتباط صفت - نشانگر شود.

۷-۱ نشانگرها^۲

تفاوت‌های بین ردیف DNA یک موجود، که آن را از سایر موجودات جدا می‌کند را نشانگر ژنتیکی می‌گویند، به عبارتی هر آنچه میان افراد، لاین‌ها، جمعیت‌ها، گونه‌ها، نژادها، و یا سویه‌های مختلف تفاوت ایجاد کند و سبب تمایز آن‌ها از یکدیگر شود به عنوان نشانگر ژنتیکی شناخته می‌شود (چوهان و کومار، ۲۰۱۵).

۱-۷-۱ گروه‌بندی نشانگرها

به طور کلی نشانگرها در سه گروه تقسیم می‌شوند:

۱- گروهی که براساس تنوعات قابل مشاهده می‌باشند مانند صفات مورفولوژیکی و صفات زراعی که به نشانگرهای مورفولوژیکی^۳ مشهورند (چوهان و کومار، ۲۰۱۵).

^۱- *p* value

^۲- Genetic Markers

^۳- Morphologic Markers

۲- گروهی که براساس تنوعات محصول ژن (پروتئین) می‌باشند، که بازتابی از تنوع موجود در سطح ژنوم می‌باشند که به نشانگرهای بیوشیمیایی^۱ مشهورند (چوهان و کومار، ۲۰۱۵).

۳- گروهی که براساس تنوعات تفاوت‌های موجود در ردیف بازی DNA می‌باشند که در واقع توارث در سطح ژنوم را آشکار می‌کنند که به نشانگرهای مولکولی^۲ مشهورند (چوهان و کومار، ۲۰۱۵).

۱-۱-۷-۱ نشانگرهای مورفولوژیکی

صفات مورفولوژیکی اولین نشانگرها در ارزیابی تنوع میان جمعیت‌ها می‌باشند. استفاده از این نشانگرها با اینکه کم هزینه و آسان است ولی به علت وابستگی بالای صفات با شرایط محیطی، چندشکلی کم، توارث‌پذیری کم و بیان پایین، کارایی این نشانگرها تحت تاثیر قرار می‌گیرد و منجر به ارزیابی نادرست آن‌ها می‌شود و کاربرد این نشانگر را محدود می‌کند (اسمیت و اسمیت، ۱۹۹۲).

۱-۱-۷-۲ نشانگرهای بیوشیمیایی

نشانگرهای بیوشیمیایی در واقع نشانگرهای پروتئینی هستند که محصول نهایی ژن‌های ساختاری می‌باشند. اساس این نشانگر آنزیمی است و یک روش نسبتاً ارزان و قدرتمند برای اندازه‌گیری فراوانی آلل‌های برای یک ژن خاص می‌باشد (چوهان و کومار، ۲۰۱۵). معمول‌ترین نشانگرهای پروتئینی آیزوزایم‌ها و آلوزایم‌ها می‌باشند. آیزوزایم‌ها به طور کلی شکل‌های مشابه‌ای از آنزیم‌ها هستند در حالی که آلوزایم‌ها شکل‌های متفاوت از آنزیم‌های مشابه که این تفاوت‌ها نتیجه تنوع آلی موجود در سطح آنزیم می‌باشد (تنکسلی و اورتن، ۱۹۸۳). تعداد کم نشانگرهای پروتئینی قابل ثبت و مشاهده و چندشکلی پایین باعث محدودیت استفاده از این نشانگرها می‌باشد (موندینی و همکاران، ۲۰۰۹).

^۱- Biochemical Markers

^۲- Molecular Markers

۱-۷-۱-۳ نشانگرهای مولکولی

نشانگرهای مولکولی را نباید به عنوان ژنهای طبیعی شناخت، چون آنها آثار بیولوژیکی ندارند، و در عوض می‌توان آنها را به عنوان نقاط خاص پیوسته در ژنوم به حساب آورد. آنها در توالی‌های DNA قابل شناسایی هستند، در نقاط خاصی از ژنوم یافت می‌شوند، و قابل توارث از یک نسل به نسل دیگر می‌باشند (سیمانگن و همکاران، ۲۰۰۶). این نشانگرها تحت تأثیر محیط، آثار غالبیت، اپیستازی و پلیوتروپی قرار نمی‌گیرند. نشانگرهای مولکولی براساس نوع روش آشکارسازی آنها که می‌تواند روش هیبریداسیون^۱ اسیدهای نوکلئیک یا روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز^۲ (PCR) یا ترکیبی از هر دو باشد، توانایی ارزیابی یک یا چند مکان ژنومی را دارند، بنابراین توانایی تشخیص حضور یا عدم حضور یک آلل را برای یک مکان ژنی دارند. تشخیص حالت‌های هتروزیگوت برای آلل‌های مشابه بستگی به نوع نشانگر مولکولی مورد استفاده دارد. نشانگرهایی که توانایی تشخیص مکان‌های هموزیگوت را از هتروزیگوت دارا می‌باشند، نشانگرهای هم‌بارز نامیده می‌شوند (موندینی و همکاران، ۲۰۰۹).

به طور کلی نشانگرهای مولکولی در دو گروه تقسیم می‌شوند:

۱- نشانگرهای مولکولی مبتنی بر هیبریداسیون

۲- نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR

۱-۷-۱-۳-۱ نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون

این نشانگرها از اولین نشانگرهایی بودند که در مطالعات گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند. چند شکلی طولی قطعات برش یافته^۳ (RFLP) معروفترین نشانگر مولکولی بر پایه هیبریداسیون است. این

^۱- Hybridization

^۲- Polymerase Chain Reaction

^۳- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

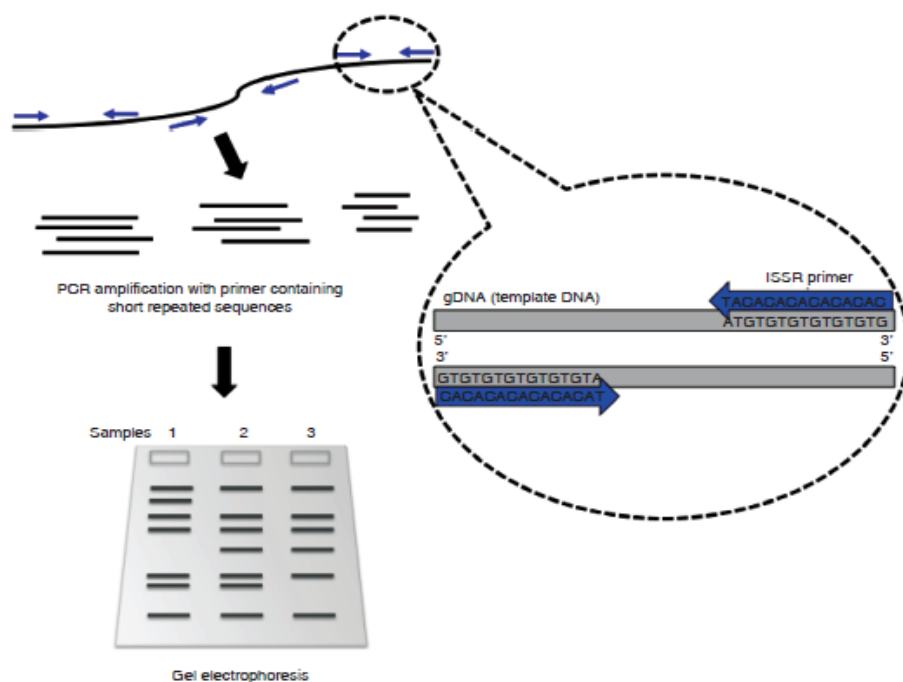
نشانگر اولین بار در سال ۱۹۷۵ برای شناسایی چند شکلی توالی DNA، در نقشه ژنتیکی ژن جهش یافته حساس به دما در ویروس adeno-virus serotypes استفاده شد (گرودرزیکر و همکاران، ۱۹۷۵). سپس برای نقشه‌یابی ژنوم انسان (بوتستین و همکاران، ۱۹۸۰) و پس از آن برای ژنوم‌های گیاهی (هلینت‌جاریز و همکاران، ۱۹۸۶) استفاده شد. تکنیک آن بر پایه آنزیم‌های برشی است و یک الگوی متفاوت از اندازه‌های قطعات مختلف DNA را ارائه می‌دهد. این نشانگر به خوبی توانایی آشکارسازی تفاوت‌های بین دو گونه‌ی مشابه را داراست. از توارث هم‌بارز و تکرارپذیری بالایی برخوردار می‌باشد. با این وجود، به دلیل نیاز به DNA با کیفیت بالا (پوتر و جونز، ۱۹۹۱؛ روی و همکاران، ۱۹۹۲؛ یونگ و همکاران، ۱۹۹۲) مواد رادیواکتیویته گران قیمت و سمی (یو و همکاران، ۱۹۹۳) و وقت‌گیر بودن، امروزه به‌طور وسیع مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. این محدودیت‌ها در نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون سبب شده است که روش‌هایی با پیچیدگی کمتر مانند نشانگرهای مبتنی بر PCR توسعه یابند.

۱-۷-۱-۲ نشانگرهای مبتنی بر PCR

پس از کشف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط مولیس و همکارانش (۱۹۸۳) نشانگرهای زیادی توسعه پیدا کردند. PCR یک تکنیک بیولوژی مولکولی برای تکثیر تعداد زیادی قطعات کوچک DNA بدون نیاز به موجود زنده می‌باشد. مزیت اصلی تکنیک PCR نسبت به روش‌های بر پایه هیبریداسیون ۱- نیاز به مقدار کم DNA ۲- حذف مواد رادیواکتیویته ۳- توانایی تکثیر توالی‌های DNA در نقاط محافظت شده ۴- چند شکلی بالا ۵- تکرار پذیری بالا ۶- عدم نیاز به صرف هزینه و وقت زیاد می‌باشد (ولف و لیستون، ۱۹۹۸). نشانگرهای چون RAPD، ALFP، ISSR، SSR و ... از جمله نشانگرهای مبتنی بر PCR هستند.

۱-۷-۱-۳-۲-۱ نشانگر مولکولی ISSR^۱

در سال ۱۹۹۰، کاربرد نشانگری به نام "Inter-Simple Sequence Repeat" (ISSR) توسط گروهی از محققان به طور جداگانه گزارش شد (مییر و همکاران، ۱۹۹۳؛ گوپتا و همکاران، ۱۹۹۴؛ ویو و همکاران، ۱۹۹۴؛ زیتکیویکز و همکاران، ۱۹۹۴). ریزماهواره (توالی‌های ساده تکراری)^۲ (SSRs)، یا تکرارهای پشت سر هم کوتاه^۳ (STRs) موتیف‌های کوتاه DNA، می‌باشند که چندین بار در یک ردیف تکرار شده‌اند، ISSRها شامل تکثیر یک قطعه‌ی DNAی موجود در فاصله‌ی تکثیرپذیر میان دو ناحیه‌ی تکراری ریزماهواره‌ی منحصر به فرد با جهات مخالف می‌باشد (شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳: نحوه تکثیر PCR با استفاده از یک نشانگر ISSR (انگ و تان، ۲۰۱۵)

^۱- Inter-simple Sequence Repeat

^۲- Simple Sequence Repeats

^۳- Short Tandem Repeats

نشانگر ISSR به گروه نشانگرهای چندمکانی^۱ تعلق دارد، اغلب نشانگرهای ژنتیکی مانند چندشکلی طول قطعات تکثیر یافته (AFLP)، چندشکلی تکثیر یافته تصادفی (RAPD) و دیگر مشتقات آن‌ها بارز^۲ هستند. نشانگرهای بارز به طور واضح تمایزات بین هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها را نشان نمی‌دهند. این نشانگرها، می‌توانند به عنوان گام اولیه برای توسعه نشانگرهای هم‌بارز^۳ مورد استفاده قرار گیرند (پاران و میشیل موری ۱۹۹۳). در بیشتر مطالعات تنوع ژنتیکی، یک نشانگر ژنتیکی خوب، با قدرت تشخیص بالایی، تنوع‌های ژنتیکی داده‌های چندمکانی از ژنوم تحت مطالعه را تولید می‌کند (آنی، ۲۰۰۶). نشانگرهای ISSR توانایی شناسایی تمامی تغییرات و تنوع موجود در سراسر ژنوم، با قدرت تکرارپذیری بالاتر نسبت به نشانگر RAPD در زمان مشابه و همچنین هزینه و زمان کمتر نسبت به نشانگر AFLP را دارند. با توجه به مزیت‌های نشانگر ISSR، این نشانگر بیشترین کاربرد را در مطالعات شناسایی تنوع ژنتیکی (وانگ و همکاران، ۲۰۱۲؛ شفیع‌آستانی و همکاران، ۲۰۱۵)، انگشت نگاری^۴ DNA (شین و همکاران، ۲۰۰۶) و فیلوژنتیکی^۵ (ایرولا و همکاران ۲۰۰۲) داراست.

ISSR ۱-۷-۱-۳-۲-۲ نحوه طراحی نشانگر

یک نشانگر ISSR معمولاً طولی در حدود ۲۵-۱۶ جفت باز^۶ (bp) دارد، و اساساً شامل، موتیف‌های DNA تکراری (۲-۴ جفت باز)، مکمل نواحی ریزماهواره در ژنوم می‌باشد. این نشانگر معمولاً در انتهای ۳' یا ۵' خود به دو تا چهار باز متصل بوده و بر اساس آن‌ها تکثیر می‌شود. بسته به نوع استفاده، سه شکل از نشانگرهای ISSR وجود دارد: غیر لنگردار^۷، (نشانگر شامل یک موتیف تکراری می‌باشد، مانند

^۱- Multilocus

^۲- Dominant

^۳- Co-dominant

^۴- Fingerprinting

^۵- Phylogenetic

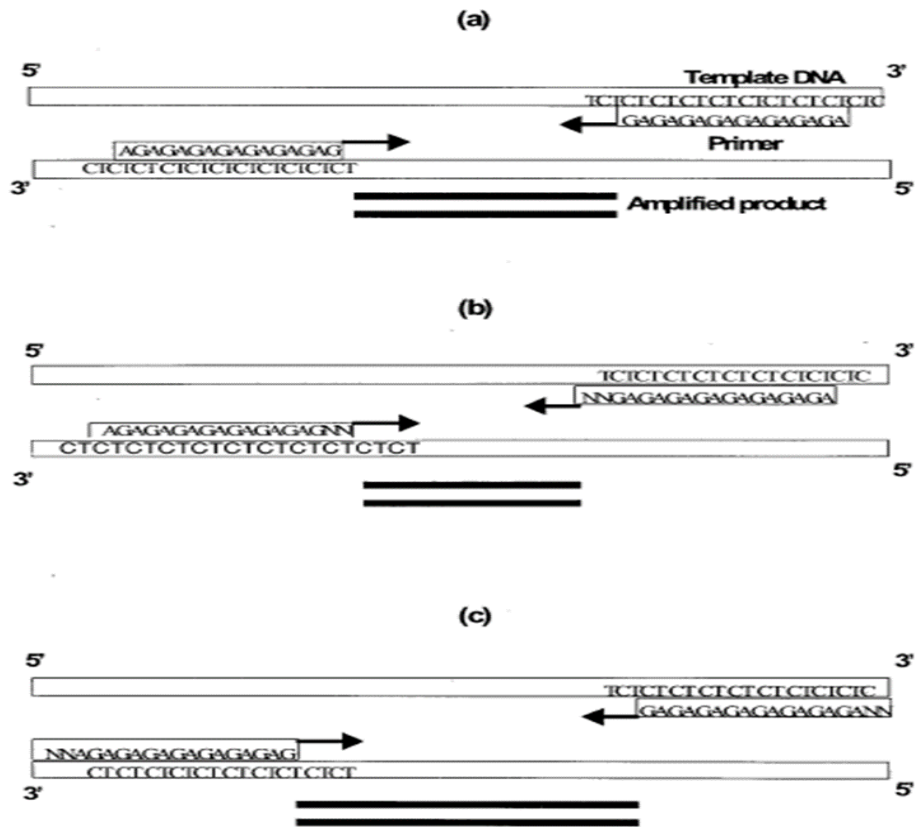
^۶- Base Pairs

^۷-unanchored

'3-(AC)₈-5', به انتهای ۵' لنگردار^۱، (نشانگر شامل یک موتیف تکرار شده متصل به یک یا چند نوکلئوتید غیر موتیف در انتهای ۵' می‌باشد، مانند '3-(GA(AC)₈-5', و به انتهای ۳' لنگردار^۲، (نشانگر شامل یک موتیف تکرار شده متصل به یک یا چند نوکلئوتید غیر موتیف در انتهای ۳' مانند -5') '3-AG(AC)₈ است (شکل ۱-۴) ریدی و همکاران (۲۰۰۲) در مورد جزئیات اثرات استفاده از تکرارهای چند نوکلئوتیدی متصل به نشانگرهای ISSR برای تولید باندهای بیشتر بحث‌های را مطرح کردند. در نهایت، آن‌ها برای مطالعاتی که هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی است، توصیه به استفاده از نشانگرهای ISSR که دارای اتصالات تکراری نوکلئوتیدی در انتهای ۵' یا ۳' خود هستند، می‌کنند، معمولاً این نوع نشانگرها چندشکلی‌های بیشتری را آشکار می‌کنند (ناگوکا و اوگی‌هارا، ۱۹۹۷؛ بلیر و همکاران، ۱۹۹۹؛ جوشی و همکاران، ۲۰۰۰).

^۱- 5'-anchored

^۲- 3'-anchored



شکل ۱-۴: ISSR-PCR واکنش PCR یک نشانگر تکی «AG» (a) غیر لنگردار، (b) لنگر در انتهای ۳'، (c) لنگر در انتهای ۵' (سیمگن و همکاران، ۲۰۰۶)

نشانگرهای دارای اتصال انتهایی ۳' الگوی باندی واضح تری نسبت به اتصال انتهایی ۵' را نشان می‌دهند (تسومورا و همکاران، ۱۹۹۶). نشانگرهای فاقد اتصال ممکن است دچار سرخوردگی^۱ (لغزش) از نواحی ریزماهواره مکمل‌شان در طول PCR شوند و تکثیرهای متفاوتی را در هر چرخه PCR تولید کنند و بنابراین در تکرارپذیری نتایج، تأثیر نامطلوبی داشته باشند. عموماً، نشانگرهای با تکرارهای (AG)، (GA)، (CA)، (AC)، (TC)، (CT) چند شکلی بالاتری نسبت به تکرارهای (AT) نشان می‌دهند، تکرارهای (AT) تمایل زیادی به خود اتصالی^۲ دارند.

^۱- Slip

^۲- Self-annealed

۱-۷-۱-۳-۲-۳ نحوه تکثیر PCR با نشانگرهای ISSR (ISSR-PCR)

اندکی تفاوت در واکنش معمولی PCR که حاوی یک جفت نشانگر مختلفاند وجود دارد، -ISSR

PCR حاوی تنها یک نشانگر در هر واکنش است، که این نشانگر تکی در واقع عمل هر دو نشانگر "رفت"^۱

و "برگشت"^۲ در یک واکنش PCR را انجام می‌دهد (شکل ۱-۳).

^۱- Forward

^۲- Reverse

فصل دوم

مروری بر منابع

۱-۲ مروری بر پژوهش‌های مولکولی انجام شده در گیاه بزرک

اولین بررسی تنوع ژنتیکی گیاه بزرک با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی (دیدریچ‌سین، ۲۰۰۱) و نشانگرهای آیزوزایم (منزبی و همکاران، ۲۰۰۰) انجام شد. اولین استفاده‌ی نشانگرهای مبتنی بر DNA در گیاه بزرک توسط اوه و همکاران در سال (۲۰۰۰) گزارش شد. تعداد کمی مطالعه در آشکارسازی روابط ژنتیکی بزرک انجام شده است، مطالعاتی در زمینه‌ی تنوع و فرسایش ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلفی از بزرک با استفاده از نشانگر RAPD انجام شده است (فو و همکاران، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳؛ دیدریچ‌سین و فو، ۲۰۰۶). مطالعاتی نیز با استفاده از نشانگرهای AFLP و ISSR صورت گرفته است (اسپیل‌میر و همکاران، ۱۹۹۸؛ اوپارت و همکاران، ۲۰۰۱؛ اوزال و همکاران، ۲۰۱۰). نشانگر ISSR اولین بار توسط ویسنرووا و ویسنر در سال (۲۰۰۴) برای انجام مطالعات ژنتیکی در بزرک مورد استفاده قرار گرفت. راجوید و همکارانش در سال (۲۰۱۰) یک بررسی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسمی از بزرک‌های هندی انجام دادند.

همچنین مطالعات تکمیلی دیگری مثل نشانگرهای سیتوژنتیکی برای آشکار شدن تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های بزرک و سایر گونه‌های *Linum* انجام شد (موراونکو و همکاران، ۲۰۱۰؛ راجینسکایا و همکاران، ۲۰۱۱).

در سال‌های اخیر نشانگرهای SSR زیادی برای مطالعات مولکولی بزرک توسعه یافته‌اند (ویسنر و همکاران، ۲۰۰۱؛ روس‌آمسالیگ و همکاران، ۲۰۰۶؛ کلوتیئر و همکاران، ۲۰۰۹؛ دنگ و همکاران، ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱؛ بیکیل و همکاران، ۲۰۱۱؛ سوتوسردا و همکاران، ۲۰۱۱؛ کالی و همکاران، ۲۰۱۲).

کلوتیئر و همکارانش (۲۰۰۹) مطالعاتی با استفاده از نشانگر EST-SSR بر روی صفات فیبر و روغن ارقام کانادایی بزرک انجام دادند.

اسمیکال و همکاران (۲۰۱۱) تنوع ژنتیکی بین ۷۰۸ رقم بزرک را با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی بررسی کردند.

۲-۲ مروری بر پژوهش‌های تجزیه ارتباطی در گیاه بزرک و سایر گیاهان

سوتوسردا و همکارانش (۲۰۱۴a) هفت صفت شامل، محتوای روغن، پالمیتیک اسید، استئاریک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید (LIO)، لینولنیک اسید (LIN) و مقدار آبودین را در ۳۹۰ مجموعه‌ی بزرک کانادایی با ۴۶۰ نشانگر ریزماهواره مورد شناسایی قرار دادند. در نهایت ۹ مکان صفت کمی (QTL)، در دامنه‌ای از یک مکان برای روغن تا سه مکان برای LIO و LIN شناسایی شد. مکان‌های نماینده‌ی LIO و LIN با QTL‌هایی که قبلاً در جمعیت‌های دووالدینی وجود داشتند، هم مکان بودند و مکان بعضی ژن‌ها در مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب (FA) به طور تقریبی نقشه‌یابی شد. پیشنهاد شد ۵۸ درصد از آل‌های QTL حاضر در ارقام کانادایی به‌طور بالقوه‌ای توانایی بهبود صفات کیفی دانه را دارند. در نتیجه، QTL‌های شناسایی شده، در آینده می‌توانند در اصلاح به کمک نشانگر گیاه بزرک به کار روند.

در پژوهش مشابهی دیگر سوتوسردا و همکارانش (۲۰۱۴b) ارتباط صفات مرتبط با عملکرد شامل عملکرد، تعداد غلاف، وزن هزار دانه، تعداد بذر هر غلاف، زمان شروع گلدهی، زمان پایان گلدهی، ارتفاع گیاه، شاخه بندی گیاه، و تاثیر نوع شرایط محیطی در گیاه، را در ۳۹۰ رقم بزرک کانادایی با ۴۶۴ نشانگر SSR مورد آزمایش قرار دادند. ۱۲ ارتباط معنی‌دار صفت - نشانگر برای ۶ صفت زراعی شناسایی شد. شبیه سازی آماری ۵ نشانگر مرتبط با وزن هزار دانه نشان داد که آل‌های مطلوب اثرات افزایشی داشتند. نتایج نشان داد هیچ کدام از ارقام جدید ۵ آل مطلوب را ندارند و بیشتر ارقام اصلاح شده از ۴ آل مطلوب برخوردار بودند. در نهایت، ساختار ژنتیکی پیچیده صفات مرتبط با عملکرد و مشکلات ذاتی مرتبط با تشخیص آن‌ها و سهولت شناسایی این صفات از طریق انتخاب به کمک نشانگرها مورد تأکید قرار گرفت.

دینگ و همکارانش (۲۰۱۶) در تحقیقی ارتباط صفت مقدار روغن دانه گیاه سنجد (*Hippophae rhamnoides* L.) را با ۱۳ نشانگر ISSR در ۵۱ رقم و لاین، (لاین‌ها در سه گروه) این گیاه بررسی کردند. مقدار روغن در ۴۵ رقم و لاین گروه I بین ۶/۶ - ۳۳/۱ درصد بود. این ارقام به گونه‌ی *H. rhamnoides ssp mongolica* و در بین هیبریدها به گونه‌ی *H. rhamnoides ssp sinensis* تعلق دارد. سه لاین دیگر از گونه‌ی (*H. rhamnoides ssp mongolica*) در گروه II از مقدار بالای روغن (۳۳/۷-۳۷/۵) برخوردار بودند، در حالی که لاین سوم هیبریدها در گروه III مقدار کمی روغن (۱۰/۹-۱۷/۵) داشتند. ارتباط مثبت ۴ نشانگر ISSR با صفت مقدار روغن ($P < 0.01$) با استفاده از آنالیز رگرسیون چندگانه بدست آمد. نتایج تایید کردند استفاده از نشانگرهای ISSR می‌تواند یک روش بالقوه برای انتخاب ژنوتیپ‌های با مقدار بالای روغن و ترکیب مناسب والدین برای بهبود سنجد تلخ دریایی باشد.

آقاعلی و همکارانش (۱۳۹۵) به تجزیه‌ی ارتباط ۱۶ نشانگر ISSR پیوسته با ۲۶ صفت مورفولوژیک در ۱۲ رقم گیاه کرچک (*Ricinus communis* L.) پرداختند. ۱۱۶ مکان تکثیری توسط نشانگرهای ISSR، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این تحقیق را به ۶ زیر جمعیت تقسیم کرد. با استفاده از آنالیز مدل خطی مخلوط^۱ (MLM) ۲۶ مکان پیوسته با ۱۷ صفت مورفولوژیک شناسایی شد. مقدار R² در محدوده‌ی ۱۲/۴ تا ۲۸/۱ متغیر بود. اکثر مکان‌ها به طور اختصاصی با یک صفت پیوسته بودند. مکان یک نشانگر با ۸ صفت مورد مطالعه پیوسته بود. وجود نشانگرهای مشترک در میان برخی صفات بررسی شده، می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، چرا که، گزینش هم‌زمان چند صفت از طریق انتخاب به کمک نشانگر (MAS) را امکان‌پذیر می‌سازند.

^۱- Mixed Linear Model

ژانگ و همکارانش (۲۰۱۴) در تحقیقی به بررسی ارتباط ۱۲ صفت زراعی، در ژرمپلاسمی از ۱۵۰ رقم برنج (*Oryza sativa* L.) محلی با ۲۷۴ نشانگر SSR پرداختند. سپس نتایج حاصل، مجدداً در دو گروه دیگر از ارقام برنج شامل (۱) ارقام برنج گرفته شده از ژرمپلاسم بین المللی چین (۲) ارقام برنج حاصل از برنامه‌های اصلاح مولکولی جهان نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، ۷۶ ارتباط معنی‌دار ($P < 0.05$) صفت - نشانگر را با استفاده از آنالیز مدل MLM در گروه محلی نشان داد، که از این میان ۳۲ درصد ارتباطات با مکان‌یابی QTL های قدیمی مشابهت داشتند. از میان کل ارتباط‌های مذکور، ۷ ارتباط صفت - نشانگر با استفاده از آنالیز مدل خطی عمومی (GLM) یافت شد. نتایج حاصل از این تحقیق اطلاعات مهمی برای کاوش‌های مجدد ژن‌های برگزیده‌ی برنج‌های محلی و استفاده از آن‌ها برای اصلاح برنج در بر داشت.

لی و همکارانش (۲۰۱۱) در پژوهشی تنوع ژنتیکی و ارتباط نشانگر - صفت بین ۱۵۹ رقم سویای چینی (*Glycine max* (L.) Merr) را با استفاده از ۵۵ نشانگر ریزماهواره (SSR) مورد ارزیابی قرار دادند. این صفات شامل صفت مقاومت به نماتد سیست سویا (soybean cyst nematode)، ویروس موزاییک سویا (soybean mosaic virus)، تحمل شوری، سرما، خشکی، مقدار روغن و مقدار پروتئین می‌باشند. در کل ۲۱ ارتباط نشانگر - صفت با ۱۸ نشانگر SSR مختلف شناسایی شد. نتایج آنالیز ارتباطی ارتباط صفت - نشانگر را برای ۵ صفت از کل ۷ صفت شناسایی کرد. در نهایت مقدار روغن با ۶ نشانگر مرتبط بود (۱۷/۵۹ درصد)، مقدار پروتئین با یک نشانگر (۵/۹۴ درصد)، مقاومت به نماتد سیست سویا ۶ نشانگر (۲۱/۸۲-۱۱/۵۳ درصد)، مقاومت به ویروس موزاییک سویا با ۳ نشانگر (۲۹/۹۵-۲۲/۵۹ درصد) مرتبط بودند. صفت تحمل به خشکی بیشترین درصد ارتباط (۴۵ درصد) را با یک نشانگر نشان داد. ۲۰ نشانگر از ۲۱ نشانگر مرتبط، هم مکان یا نزدیک به نواحی مکان صفات کمی (QTL)، که قبلاً شناسایی شده بودند، قرار داشتند.

شرفی و مجیدی (۱۳۹۳) در پژوهشی ارتباط ۲۷ جفت نشانگر ریزماهواره (SSR) را با ۱۶ صفت مورفولوژیک در رقم ۳۶ از گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) مورد ارزیابی قرار دادند. ۲۷ جفت نشانگر مورد مطالعه، ۱۳۰ آلل تولید کردند که ۱۲۷ آلل آن چندشکل بودند. میانگین تعداد آلل‌ها ۴/۸ آلل برای هر مکان بود. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی برای جایگاه‌ها از ۰/۱۶ تا ۰/۹۴ متغیر بود. نتایج تجزیه رگرسیون نشان داد که بین همه مکان‌های ژنی و حداقل یکی از ۱۶ صفت مورفولوژیک ارتباط معنی‌داری وجود دارد. مقدار قابل توجهی از تغییرات مورفولوژیک توسط دو نشانگر توجیه شد که نشان می‌دهد احتمالاً ژن‌های مربوط به این صفات در مکان‌های کروموزومی نزدیک به هم قرار دارند. تغییرات مربوط به صفت درصد روغن (۰/۹۲) توسط ۱۴ نشانگر تبیین می‌گردید. در این پژوهش مکان‌های مورد مطالعه در اطراف صفات مورد بررسی توزیع یکنواختی داشتند. بنابراین، در مطالعات بعدی می‌توان با توالی‌یابی مکان‌هایی که R^2 بالایی دارند، ژن‌های کدکننده‌ی صفات مهم زراعی را شناسایی کرد. از نشانگرهایی که دارای ارتباط قوی با صفات خاص هستند می‌توان در اشیاع نقشه‌های لینکاژی و نیز اصلاح کلزا استفاده کرد.

خالد و همکارانش (۲۰۱۵)، به شناسایی ارتباط ۲۶ نشانگر ISSR و ۲۰ نشانگر RAPD با صفات مرتبط با عملکرد، در ۲۰ لاین امید بخش گندم نان (*Triticum aestivum* L.) تحت شرایط نرمال و خشکی پرداختند. تنوع معنی‌داری در تمام صفات زراعی یافت شد. سه لاین (L2, L7, L8) در هر دو شرایط و در تمام اجزای عملکرد بهتر بودند. به‌علاوه، برخی لاین‌ها (L2, L4, L5, L7, L8) میزان عملکرد صفات زراعی‌شان در شرایط خشکی به خوبی شرایط نرمال بود. میزان چندشکلی حاصل برای نشانگر ISSR ۳۹/۳ درصد و برای نشانگر RAPD ۵۳/۲ درصد به‌دست آمد. نرخ شباهت بین لاین‌های گندم براساس نشانگرهای ISSR و RAPD به ترتیب در دامنه‌ی ۰/۸۱ تا ۱ و ۰/۸۶ تا ۰/۹۸ قرار داشت. متوسط PIC برای نشانگر ISSR (۰/۱۰) و RAPD (۰/۱۵) محاسبه گردید. در این پژوهش یک نشانگر ISSR با

دو صفت زراعی و نیز یک نشانگر RAPD با دو صفت زراعی دیگر ارتباط معنی‌داری با ضریب تبیینی معادل ۳۴/۹۵ تا ۱۸/۹۲ درصد داشتند.

رشیدی و همکاران (۱۳۸۷) ارتباط بین ۶ صفت زراعی و ۷۴ نشانگر مولکولی حاصل از ۱۰ جفت نشانگر چندشکلی حاصل توالی اختصاصی تکثیر شونده (SSAP) روی ۱۰۸ ژنوتیپ بومی و ۲۱ رقم زراعی گندم دوروم مطالعه کردند. آن‌ها رابطه معنی‌داری بین ۲۳ نشانگر چندشکل توالی‌های اختصاصی تکثیر یافته با حداقل یکی از ۶ صفت زراعی یافتند، آن‌ها نتیجه گرفتند که می‌توان از آن‌ها در اصلاح وابسته به نشانگر بهره گرفت.

عبدالهی مندولکانی و عزیزی (۱۳۹۳)، در پژوهشی به شناسایی ۱۶ نشانگر ISSR مرتبط با ۱۳ صفت مورفولوژیکی در ۸۰ ژنوتیپ یونجه‌ی زراعی (*Medicago sativa L.*) پرداختند. ۱۶ نشانگر مورد استفاده، ۱۱۷ مکان در ۸۰ ژنوتیپ را تکثیر کردند. میانگین تعداد مکان‌ها ۷/۳ مکان برای هر نشانگر بود. میانگین میزان اطلاعات چندشکل برای نشانگرها ۰/۷۷ و از ۰/۶۵ (برای یک نشانگر) تا ۰/۹۳ متغیر بود. نتایج تجزیه‌ی رگرسیون گام به گام انجام شده نشان داد که تعداد نشانگرهای مرتبط با صفات وزن خشک کل و وزن خشک برگ، یکسان بود. در این پژوهش بیشترین تغییرات مربوط به صفت میزان کلروفیل برگ (۸۲ درصد) توسط ۷ نشانگر شناسایی شد، درحالی‌که دو نشانگر دیگر (۱۵ درصد) تغییرات مربوط به صفت وزن تر برگ را توصیه نمودند.

جان و همکارانش (۲۰۰۸)، در تحقیقی به تجزیه‌ی ارتباط ۱۵۰ جفت نشانگر SSR با مکان صفت پروتئین دانه سویا (*Glycine max L. Merr.*) در جمعیتی با ۴۸ رقم پرداختند. جمعیت مورد آزمایش ترکیبی از دو گروه، با سطوح بالا و یا پایین پروتئین بود. یک نقشه ارتباطی شامل ۱۵۰ نشانگر، بر پایه‌ی تفاوت فراوانی آلل‌های توزیع شده بین دو زیر جمعیت تهیه شد و ۱۱ مکان صفت کمی بر پایه‌ی

نشانگرهای با معنی‌داری بالا شناسایی شدند. ۹ عدد از این ۱۱ مکان، با صفت پروتئین دانه مرتبط بودند، اما دو مکان دیگر در مطالعات قبلی مکان‌یابی پیوستگی گزارش نشده بودند. به‌علاوه، این مکان‌های جدید پروتئین در نزدیکی هیچ‌کدام از مکان‌های صفت کمی شناخته شده‌ی مؤثر در رسیدگی دانه قرار نداشتند.

ابراهیمی و همکارانش (۱۳۹۰) در پژوهشی با استفاده از روش رگرسیون چند گانه (گام به گام) ارتباط بین ۷۰ نشانگر مولکولی حاصل از ۱۰ جفت نشانگر ریزماهواره (SSR) را با ۱۰ صفت زراعی ۱۱۵ ژنوتیپ جو بومی ایران را مورد ارزیابی قرار دادند. بیشترین تعداد نشانگر برای صفت تعداد گره و کمترین آن مربوط به صفات تعداد برگ و طول رادیکل شناسایی شد. همچنین بیشترین و کمترین ضریب تبیین کل به ترتیب مربوط به صفت عرض دانه و بیرون‌زدگی رادیکل به دست آمد. همچنین بیشترین و کمترین $R^2 \max$ به ترتیب مربوط به صفات ارتفاع و بیرون‌زدگی رادیکل بود. همچنین 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 داشته‌اند و یا احتمالاً به‌صورت پلیوتروپی مکان‌های کروموزومی را شامل شده‌اند. برای درک این موضوع تهیه نسل‌های در حال تفرق و نقشه‌های پیوستگی ضروری می‌باشد.

هونس‌دورف و همکارانش (۲۰۱۰)، با استفاده از مدل خطی عمومی جهت بررسی ارتباط بین ۶۸۴ نشانگر AFLP با ۱۴ صفت کیفی، فنولوژیکی و مورفولوژیکی در ۸۴ رقم کلزای زمستانه (*Brassica napus L.*) گزارش نمودند که ۲۷ نشانگر از بین نشانگرهای مورد مطالعه، دارای ارتباط معنی‌دار با ۲ یا تعداد بیشتری صفت بودند. این صفات در زمره‌ی صفاتی بودند که در سطح فنوتیپی نیز از روابط معنی‌داری با یکدیگر برخوردار بودند. به‌طور واضحی نشان داد که مکان‌یابی صفات کمی در کلزا به‌وسیله‌ی تجزیه ارتباطی یک روش مناسب برای گزینش مولکولی در جمعیت‌های در حال تفکیک این گیاه است.

محمدزاده و همکارانش (۱۳۹۳)، در تحقیقی به شناسایی نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR مرتبط با صفات ریخت شناسی مهم میوه در ۳۵ ژنوتیپ فندق (*Corylus avellana* L.) پرداختند. نتایج نشان داد برخی از قطعات چندشکل RAPD و ISSR با صفات میوه فندق ارتباط و همبستگی نشان دادند. برخی از این نشانگرهای آگاهی بخش با بیش از یک صفت ارتباط نشان دادند که می تواند ناشی از آثار پلیوتروپیک QTL های مرتبط با صفات مختلف باشد. به عنوان مثال، برخی از نشانگرهای آگاهی بخش با دو صفت طول نات و طول مغز همبستگی معنی داری نشان دادند که مبین همبستگی مثبت این دو صفت با هم دیگر می باشد. همچنین برخی از این نشانگرها با طول و وزن نات و وزن مغز و برخی دیگر با هر دو صفت وزن و طول مغز میوه مرتبط بودند.

عبدالهی مندولکانی و همکارانش (۱۳۸۹)، به شناسایی ارتباط ۱۳ جفت نشانگر SSR مرتبط با ۱۳ صفت مورفولوژیکی در ۶۸ ژنوتیپ بادام زمینی پرداختند. ۱۳ جفت نشانگر مورد استفاده، ۸۰ آلل تولید کردند. میانگین تعداد آللها ۶/۱۵ آلل برای هر مکان ریزماهواره بود. میانگین میزان اطلاعات چندشکل برای جایگاهها ۰/۸۰ گزارش گردید که از ۰/۴۷ برای یک نشانگر تا ۰/۹۵ برای نشانگر دیگری متغیر بود. برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک مورد مطالعه، آنالیز رگرسیون گام به گام بین داده های مولکولی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورفولوژیک به عنوان متغیرهای وابسته انجام گرفت. نشانگرهای مرتبط با صفات تعداد دانه در بوته و وزن غلاف در بوته یکسان بودند. بیشترین تغییرات مربوط به صفت طول دانه (۸۸ درصد) توسط ۱۰ نشانگر تبیین شدند، در حالی که سه مکان تکثیر شده از ۳ نشانگر دیگر فقط ۲۶ درصد از تغییرات مربوط به صفت عرض دانه را تبیین کردند. با توجه به اینکه همه مکان های مورد مطالعه به جز یک نشانگر روی صفات مورد مطالعه موثر بودند، می توان از این مکان ها به همراه اطلاعات مربوط به صفات مورفولوژیک، در اصلاح بادام زمینی استفاده کرد.

کاراسکو و همکارانش (۲۰۱۳) در پژوهشی صفت طول دوره گلدهی را در توت فرنگی (*Fragaria*

chiloensis L. Duch. در بین ۴۱ رقم، توسط ۴۰ نشانگر ISSR مورد بررسی قرار دادند. بعد از انجام آنالیز توسط الگوریتم (PAM) the Partitioning Around Medoids، ۴۱ رقم در دو خوشه گروه‌بندی شدند. این خوشه‌ها به ترتیب ۲۳ و ۱۸ رقم با طول دوره گلدهی ۶۴/۱ و ۹۵/۶ روز داشتند. در این پژوهش، ۱۰ نشانگر الگوی بانندی پایدار و تکرارپذیر نشان دادند و از ۱۰۶ مکان آلی، ۷۹ مکان چندشکلی داشتند. ۳ مکان از ۳ نشانگر سهم معنی‌داری در تفاوت بین ارقام از نظر صفت طول دوره گلدهی داشتند. به‌طور مشابه، ۳ مکان از ۳ نشانگر دیگر ارتباط معنی‌داری با تنوع طول دوره گلدهی از خود نشان دادند. مکانی که ارتباط بالایی با طول دوره گلدهی داشت، استخراج، کلون و توالی‌یابی شد، اما این مکان سطح پایینی از همولوژی را با توالی‌های موجود در پایگاه GenBank نشان داد. تشخیص مکان دارای ارتباط بالا با زمان گلدهی به ساخت نقشه‌های مکان صفت کمی (QTL) برای برنامه‌های انتخاب و اصلاح در دیگر گونه‌های توت فرنگی بسیار کمک نمود.

شناسایی ارتباط ۵ نشانگر AFLP با ۹ صفت میوه در ۱۸ رقم زیتون (*Olea europaea* L.) توسط ایپیک و همکارانش (۲۰۱۵) انجام شد. در این پژوهش، اگرچه همه ارقام زیتون از یکدیگر متمایز بودند (با سطح شباهت <0.75)، اما نتایج خوشه‌بندی بر پایه‌ی نشانگرهای AFLP با تنوعات صفات میوه ارتباط معنی‌دار نداشت ($r = 0.13$). نتایج تجزیه‌ی رگرسیون گام به گام نشانگرهای AFLP و صفات میوه، ارتباط معنی‌داری بین ۸ نشانگر AFLP و این صفات را نشان داد. در حالی که ۵ نشانگر AFLP ارتباط معنی‌دار معکوسی با صفات وزن، عرض، طول در میوه و هسته، مقدار پلی‌فنول ($P < 0.05$)، ۳ نشانگر ارتباط معنی‌دار مثبتی با آلفا-توکوفرول و بتا-توکوفرول ($P < 0.01$) داشتند. که این ارتباطات قوی نشانگرها در جمعیت‌های بزرگ نیز باید تأیید شود.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

مواد و روش‌ها

در این فصل نمونه‌های گیاهی، صفات مورد بررسی، محلول‌ها و روش‌های به کاررفته در انجام این پژوهش نام برده و توضیحات لازم درباره هر کدام داده می‌شود.

۱-۳ نمونه‌های گیاهی و صفات مورد بررسی

ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل ۲۶ ژنوتیپ بزرگ بودند، که همگی از مؤسسه ژنتیک گیاهی و تحقیقات گیاهان زراعی آلمان (IPK) تهیه شدند. توده‌ی حاصل از این ۲۶ ژنوتیپ شامل ژنوتیپ‌های بومی ایران و ژنوتیپ‌هایی از کشورهای مختلف جهان می‌باشند (جدول ۱-۳).

۲-۳ آزمایش مزرعه‌ای

۲۶ ژنوتیپ در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان کشت شدند (جدول ۱-۳) و ۱۴ صفت زراعی و مورفولوژیک آن‌ها مورد اندازه‌گیری و ارزیابی قرار گرفتند.

هر پلات آزمایشی شامل سه ردیف به طول ۱۵۰ سانتی‌متر و با فاصله ۲۵ سانتی‌متر بود. کاشت بذور به صورت دستی و با فاصله ۲ سانتی‌متر و در عمق ۱ تا ۲ سانتی‌متر خاک بر روی ردیف‌ها انجام گردید. صفات تعداد روز از کاشت تا ۵۰ درصد سبز شدن، تعداد روز تا گلدهی، روز تا رسیدگی، ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، عملکرد بیولوژیک، تعداد کپسول در بوته، تعداد انشعاب در بوته، عملکرد دانه در بوته (گرم)، تعداد دانه در کپسول، وزن صد دانه (گرم)، قطر کپسول (میلی‌متر)، شاخص برداشت (درصد)، عملکرد دانه در هکتار (کیلوگرم) مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. سپس مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون LSD با

استفاده از نرم افزار SAS نسخه ی ۹/۱ انجام گرفت.

جدول ۳-۱: ژنوتیپ های بزرگ مورد مطالعه

نام ژنوتیپ	کد رقم	نام ژنوتیپ	کد رقم
۱. ایران ۲۵	IRNe25	۱۴. اروگوئه ۱۶۵	URY165
۲. روسیه ۱۴۰۴	SUN1404	۱۵. مجارستان ۲۵۹	HUN259
۳. بلاروس ۸۷۷	BLR877	۱۶. کانادا ۸۹۹	CAN899
۴. آرژانتین ۷۹۴	ARG794	۱۷. یوگوسلاوی ۲۳۰	YUG230
۵. شیلی ۱۱۷۱	CHL1171	۱۸. اسپانیا ۱۱۹۲	ESP1192
۶. آلمان ۲۰۹۶	DEU2096	۱۹. ایران ۹۶۰	IRN960
۷. سوئیس ۱۰۵۱	CHE1051	۲۰. اتیوپی ۳۱۲	ETH312
۸. ترکیه ۱۲۳۸	TUR1238	۲۱. مجارستان ۷۶۲	HUN762
۹. هند ۲۱۴	IND214	۲۲. اروگوئه ۱۱۸۲	URY1182
۱۰. ایرلند ۷۶۱	IRL761	۲۳. گواتمالا ۶۳۳	GTM633
۱۱. اریتره ۱۲۰۸	ERI1208	۲۴. مراکش ۱۲۶۵	MAR1265
۱۲. پرتغال ۱۰۹۹	PRT1099	۲۵. ایران ۶۶	IRNb66
۱۳. آرژانتین ۱۱۵۵	ARG1155	۲۶. آلمان ۱۰۱۱	DEU1011

۳-۳ محلول‌های مورد نیاز

۱-۳-۳ بافر استخراج DNA

برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر استخراج (۱۰ میلی‌لیتر Tris-HCL ۱ مولار pH=8، ۴ میلی‌لیتر EDTA 0.5 مولار (pH = 8) و ۲۸ میلی‌لیتر NaCl 5 مولار را با هم مخلوط کرده، سپس pH کل توسط HCL در میزان ۸ تنظیم شد و پس از اتوکلاو شدن، ۲ گرم CTAB و ۱ گرم PVP-40 به محلول فوق افزوده شده و با آب مقطر استریل به حجم کل ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

۲-۳-۳ محلول اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۵ مولار (EDTA, 0.5 M, pH = 8)

۱۸/۶۱۲ گرم EDTA در ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر توسط یک همزن مغناطیسی کاملاً مخلوط و حل گردید. برای تنظیم pH محلول، به میزان ۸ از NaOH استفاده شد و در نهایت حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، محلول پس از اتوکلاو شدن در یخچال نگهداری گردید.

۳-۳-۳ محلول کلرید سدیم ۵ مولار (NaCl, 5M)

۲۹۲ گرم NaCl در حدود ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و پس از این که حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده، اتوکلاو گردید.

۴-۳-۳ محلول استات سدیم ۳/۲ مولار (C₂H₃NaO₂, 3.2M , pH=5.4)

مقدار ۲۶/۲۴ گرم استات سدیم در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس pH با استیک اسید به ۵/۴ رسانده شد و نهایتاً حجم محلول در ۱۰۰ میلی‌لیتر تنظیم شد و اتوکلاو گردید.

۳-۳-۵ محلول بافر TBE

بافر TBE (بافر الکتروفورز) با غلظت استوک ۵X تهیه و نگهداری و با غلظت ۰/۵X مصرف گردید. برای تهیهی استوک ۵X، ۵۴ گرم Tris Base، ۲۷/۵ گرم اسید بوریک، ۲۰ میلی لیتر EDTA ۰/۵ مولار با هم مخلوط و به حجم ۷۵۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از تنظیم pH بر روی ۸، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسید.

۳-۴ استخراج DNA از بافت برگ

استخراج DNA از بافت برگ جوان و تازه گیاه بزرگ به روش دیول و دیول (۱۹۹۰) با کمی تغییرات انجام شد.

حدود یک گرم از نمونه برگ (بدون ساقه) درون هاون چینی استریل با استفاده از ازت مایع کاملاً پودر شد و سریعاً به تیوپ با حجم ۲ میلی لیتر انتقال داده شد، سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (جدول ۳-۲) از پیش گرم شده (۶۵ درجه سانتی گراد)، ۳ میکرولیتر بتا مرکاپتواتانول، ۱۰۰ میکرولیتر SDS (۵ درصد)، ۵ میکرولیتر تربتون (۱۰۰X) به آن افزوده شد و هر ویال ۳۰ ثانیه تا زمان همگنی کامل با استفاده از ورتکس مخلوط گردید. به منظور حذف آلودگی RNA و پروتئین، در این مرحله به تیوپ به ترتیب ۴ میکرولیتر آنزیم RNaseA و ۵ میکرولیتر ProteinaseK اضافه گردید.

تیوپها به مدت ۶۰ دقیقه درون بن ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و برای همگنی بیشتر هر ۱۰ دقیقه یکبار به آرامی سر و ته شدند. نمونهها پس از خروج از بن ماری به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و سپس مایع شناور رویی برداشته و به تیوپ جدید منتقل گردید.

محلول کلروفرم : ایزوآمیل الکل به نسبت (۲۴:۱) به صورت هم حجم با مایع رویی برداشته شد، و به نمونه‌ها اضافه گردید. سپس تیوپ تا بوجود آمدن امولسیون همگن به آرامی سر و ته شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی با احتیاط و بدون نزدیک شدن به فاز وسط که حاوی پروتئین است، برداشته و به یک تیوپ جدید منتقل شد. (اگر محلول شفاف نبود می‌توان این مرحله را دو یا سه بار دیگر تکرار کرد). مایع رویی برداشته شده، ۲/۳ حجم ایزوپروپانول سرد (۲۰- درجه سانتی گراد)، ۰/۱ حجمی استات سدیم (۳/۲M، pH=۸) و نصف حجم کلرید سدیم (۵ مولار) اضافه گردید و تیوپ به آرامی سر و ته شد و به مدت ۳۰ دقیقه تا یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمایی ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد تا اینکه رسوب DNA تشکیل شده و ته نشین شود. فاز رویی حذف و سپس رسوب حاصل یکبار با اتانول سرد ۹۶ درصد و دوبار با اتانول ۷۰ درصد شستشو گردید.

در پایان رسوب DNA در شرایط استریل به طور کامل خشک شد و سپس DNA در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و دیونیزه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و یا ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد حل گردید. سپس DNA حل شده برای نگهداری طولانی مدت به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید.

جدول ۳-۲: غلظت مواد مورد استفاده جهت تهیه‌ی بافر استخراج

مواد	غلظت (مولار)	در ۱۰۰ میلی‌لیتر	نیاز به اتوکلاو
Tris-Hcl , pH=8.0	۱ M	۱۰ ml	بله
EDTA , pH=8.0	0.5 M	۴ ml	بله
NaCl	5 M	۲۸ ml	بله
PVP-40	-	۴٪	خیر
CTAB	-	۲٪	خیر

در نهایت حجم بافر توسط آب مقطر استریل به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و pH آن را به ۸ رسانده می‌شود.

۳-۵ بررسی کمیت و کیفیت DNA

۳-۵-۱ بررسی کمیت DNA

برای بررسی کمیت DNA از دستگاه نانودارپ مدل (N60 UV/Vis Spectrophotometer) استفاده شد. ابتدا دستگاه با استفاده از آب دیونیزه کالیبره گردید، سپس یک میکرولیتر از نمونه DNA در محل مورد نظر دستگاه قرار گرفت و میزان جذب نور در طول موج $A_{260/280}$ نانومتر قرائت گردید. مطلوبترین کیفیت DNA استخراج شده در طول موج $A_{260/280}$ برابر $0.2 + 1/8$ بود.

۳-۵-۲ بررسی کیفیت DNA

برای تعیین کیفیت DNA از نظر شکستگی و یا وجود آلودگی RNA و پروتئین، مقداری از نمونه‌های DNA با بافر بارگذاری^۱ مخلوط گردیدند و در چاهک‌های حاصل از ژل آگارز ۰/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید بارگذاری شدند. سپس در کنار یک DNAی مقیاس^۲ با اندازه‌ی مشخص تحت جریان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. پس از پایان الکتروفورز، ژل بر روی دستگاه عکس‌برداری^۳ و تحت اشعه‌ی ماوراء بنفش قرار گرفته و از آن عکس‌برداری گردید. وجود باندهای کاملاً واضح^۴ و فاقد کشیدگی^۵ نشان دهنده‌ی کیفیت مطلوب DNA می‌باشد.

۳-۶ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

برای انجام PCR از مستر میکس آماده‌ی شرکت ویراژن با ترکیبات (Tris-HCl pH=8.5,

^۱- Loading Buffer

^۲- DNA Ladder

^۳- Gel Documentation

^۴- Sharp

^۵- Smear

0.2 units/ μ l Ampliqon Taq) و (0.4 mM dNTPs) و $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 mM MgCl_2 , Tween 20, 0.2% DNA polymerase) که حاوی رنگ قرمز خنثی و تثبیت کننده بود، استفاده شد. نشانگرهای مورد استفاده توسط شرکت تکاپو زیست سنتز گردیدند. بر روی هر ویال مقدار رقیق سازی درج شده است که بر همان اساس تمام نشانگرها رقیق شدند. فهرست و توالی نشانگرهای استفاده شده در جدول ۳-۳ آورده شده است. برای تهیهی ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR، ابتدا مخلوط اولیه‌ای شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر نشانگر، ۱ میکرولیتر DNA با غلظت ۲۰ نانوگرم و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه را در یک ویال ۰/۲ میلی لیتر ریخته و در آخر نیز چند ثانیه اسپین شده تا تمام مواد با هم مخلوط شوند. سپس ویال‌ها در چاهک‌های دستگاه ترموسایکلر^۱ قرار گرفته و بر اساس دمای اتصال خاص هر نشانگر، تنظیمات لازم جهت شروع واکنش PCR انجام شد.

۳-۶-۱ الگوی دمایی نشانگرها

دمای اتصال^۲ بهینه‌ی نشانگرها با وارد کردن توالی هر نشانگر (جدول ۳-۳) در نرم افزار آنلاین OligoAnalyzer، و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرادیان به دست آمد. در این پروژه چرخه دمایی تمام نشانگرها مشابه یکدیگر تنظیم شد و تنها بخش متغیر آن دمای اتصال نشانگر به DNA تک رشته‌ای الگو می‌باشد. برای تکثیر نشانگرهای ISSR، چرخه‌ی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با واسرشت سازی اولیه‌ی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه نشان و با ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه برای واسرشت سازی، اتصال نشانگرها به رشته الگو به مدت ۴۵ ثانیه (دمای اتصال نشانگرها از ۴۸ تا ۵۸ درجه سانتی‌گراد متناسب با نشانگر متغیر بود)، گسترش (بسط) رشته جدید به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی در دمایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به

^۱- Thermocycler

^۲- Annealing temperature

مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

۳-۶-۲ بررسی محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز

محصول PCR برای هر نشانگر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (W/V) در دستگاه الکتروفورز حاوی بافر ۰/۵× TBE جدا شد. برای تهیهی ژل، پس از مخلوط کردن ۱/۵ گرم آگارز با ۱۰۰ میلی لیتر بافر ۰/۵× TBE نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. DNA مقیاس (100 bp plus) به میزان ۶ میکرولیتر در هر ژل برای شناسایی و امتیازدهی باندها مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۶-۳ رنگ آمیزی ژل آگارز

برای نمایان شدن باندها، از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده شد. بعد از آماده شدن ۱۰۰ میلی لیتر ژل، و قبل از ریختن در سینی الکتروفورز، حدود ۶ میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید به ژل افزوده شد. در مرحله بعد ژل درون دستگاه عکس برداری تحت اشعه ماوراء بنفش قرار گرفت و پس از مشاهده نوارها، از ژل عکس تهیه شد.

جدول ۳-۳: توالی نشانگرهای مورد آزمایش

نشانگر	توالی	دمای اتصال (°C)	منبع
PCT1	5'-KKY HYH Y[GA] ₁₅	۵۸	Wiesnerová and Wiesner (2004)
PCT2	5'-KKV RVR V[CT] ₁₅	۵۸	Wiesnerová and Wiesner (2004)
PCT3	5'-KKY NSS H[ATG] ₆	۵۸	Wiesnerová and Wiesner (2004)
PCT4	5'-KKV RVR V[CT] ₆	۵۸	Wiesnerová and Wiesner (2004)
PCT5	5'-KKV RVR V[TG] ₆	۵۸	Wiesnerová and Wiesner (2004)
PCT6	5'-KKB NVS S[GATA] ₆	۵۸	Wiesnerová and Wiesner (2004)
3PCT1	5'-YHY [GA] ₁₅	۵۸	Wiesnerová and Wiesner (2004)
3PCT2	5'-VRV [CT] ₁₅	۵۸	Wiesnerová and Wiesner (2004)
3PCT5L	5'-VRV [TG] ₁₅	۵۸	Wiesnerová and Wiesner (2004)
IP2	5'- (GAG) ₃ GC	۴۶	Žiarovská <i>et al.</i> (2012)
IP3	5'- (GA) ₆ GG	۴۶	Žiarovská <i>et al.</i> (2012)
IP4	5'- (CTG) ₃ GC	۴۶	Žiarovská <i>et al.</i> (2012)
IP5	5'- (CA) ₆ GT	۴۶	Žiarovská <i>et al.</i> (2012)
PCT6	5'-[GATA] ₆	۵۸	Wiesner and Wiesnerová (2003)
3PCT6	5'-VSS [GATA]	۵۸	Wiesner and Wiesnerová (2003)
PCT6a	5'-[GATT] ₆	۵۸	Wiesner and Wiesnerová (2003)
TETRA1	5'-KKB NVS S[ATCT] ₅	۵۸	Wiesner and Wiesnerová (2003)
TETRA3	5'-KKB NVS S [CTTT] ₆	۵۸	Wiesner and Wiesnerová (2003)
TETRA5	5'-KKB NVS S [CTAT] ₆	۵۸	Wiesner and Wiesnerová (2003)
UBC807	5'-(AG) ₈ GC	۵۶	Ashwini <i>et al.</i> (2010)
UBC808	5'-(AG) ₈ GG	۵۶	Ashwini <i>et al.</i> (2010)
UBC810	5'-(GA) ₈ C	۵۶	Ashwini <i>et al.</i> (2010)
UBC811	5'-(GA) ₈ AA	۵۶	Ashwini <i>et al.</i> (2010)
UBC815	5'-(CA) ₈ T	۵۶	Ashwini <i>et al.</i> (2010)

S=G,C / B= C,G,T / D= A,G,T / R= A,G / Y= C,T / H=A,C,T / V= A,C,G / W= A,T / N= A,G,C,T
/ M= A,C / K= G,T

۷-۳ تجزیه و تحلیل داده‌ها

۱-۷-۳ روش‌های آماری تعیین فاصله ژنتیکی

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، وجود و عدم وجود نوار با اعداد یک و صفر مشخص شدند. استفاده از ماتریس تشابه می‌تواند به منظور شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌ها در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی بسیار مؤثر باشد. ضرایب تشابه از صفر تا یک متغیر است. در این ارزیابی زمانی که نشانگرها برای دو ژنوتیپ کاملاً یکسان باشند، ضریب تشابه یک می‌شود و صفر حالتی است که تمام نشانگرها برای دو ژنوتیپ کاملاً متفاوت باشند (ولف و همکاران، ۱۹۹۸).

۲-۷-۳ اندازه‌گیری فواصل و تشابه‌های ژنتیکی

هر تفاوت ژنتیکی قابل اندازه‌گیری در سطح توالی ژن‌ها یا فراوانی‌های آللی که بین افراد، جمعیت‌ها یا گونه‌ها قابل ثبت باشد تفاوت ژنتیکی بوده که تعیین آن و روابط ژنتیکی بین افراد یکی از اهداف ارزشمند اصلاح گونه‌های گیاهی است. فواصل یا تشابه‌های ژنتیکی بین دو ژنوتیپ، جمعیت یا فرد را می‌توان بسته به نوع داده‌ها از روش‌های آماری گوناگونی محاسبه کرد. به منظور اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی بر مبنای داده‌های نشانگرهای مولکولی چندین روش مختلف معرفی گردیده است. معمول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی یا تشابه ژنتیکی که برای داده‌های مولکولی به کار می‌روند شامل ضریب تشابه جاکارد (جاکارد، ۱۹۱۲)، تطابق ساده (سوکال و همکاران، ۱۹۵۸) و دایس می‌باشند.

۳-۷-۳ تجزیه‌های چندمتغیره آماری

با افزایش اندازه نمونه، شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی بین افراد مشکل‌تر می‌شود. یکی از بهترین راهکارهای طبقه‌بندی ذخایر توارثی و تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی بین افراد استفاده از الگوریتم‌های

آماري چندمتغیره است. در تکنیک‌های تجزیه و تحلیل چندمتغیره از تجزیه هم‌زمان چندین متغیر برای بررسی روابط بین افراد استفاده می‌شود. این تکنیک‌ها امروزه به‌طور گسترده‌ای برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی داده‌های مختلف از قبیل داده‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و نشانگرهای مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند از بین این الگوریتم‌ها تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بیشتر از بقیه کاربرد دارند.

۳-۷-۴ تجزیه خوشه‌ای

تجزیه خوشه‌ای به گروهی از تکنیک‌های چندمتغیره که هدف اولیه آن گروه‌بندی افراد می‌باشد اطلاق می‌شود. در این نوع تجزیه افراد مشابه از نظر صفات مورد بررسی در یک خوشه واحد کنار هم قرار می‌گیرند. در نتیجه گروه‌بندی، افرادی که در یک خوشه قرار می‌گیرند دارای شباهت زیاد و افرادی که در خوشه جداگانه قرار می‌گیرند ناهمگن هستند. در بین روش‌های تجزیه خوشه‌ای، بیشتر از الگوریتم‌های مبتنی بر فاصله استفاده می‌شود. در روش‌های مبتنی بر فاصله، ماتریس فاصله به عنوان ورودی و خروجی به صورت درختچه‌ای ارائه می‌گردد. الگوریتم UPGMA و حداقل واریانس (Ward) بیشترین کاربرد را برای تجزیه خوشه‌ای دارند. سایر روش‌ها نیز مانند نزدیک‌ترین همسایه و دورترین همسایه توسط برخی از محققین برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی به کار برده می‌شود.

۳-۷-۵ ضریب کوفنتیک

یکی از روش‌های مقایسه کارایی الگوریتم‌های مختلف خوشه‌بندی، تخمین ضریب همبستگی کوفنتیک می‌باشد، که در آن همبستگی بین ماتریس شباهت یا فاصله به عنوان ورودی تجزیه خوشه‌ای با ماتریس کوفنتیک دندروگرام به عنوان خروجی تجزیه برآورد می‌گردد. روشی که دارای بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک باشد به عنوان مناسب‌ترین روش تجزیه در نظر گرفته می‌شود. ضریب همبستگی را

با r نشان می‌دهند. درجه برآزش می‌تواند در دامنه $0/7$ تا $0/9$ متغیر باشد. اگر $r > 0/9$ باشد برآزش خیلی خوب، $0/8 < r < 0/9$ برآزش خوب، $0/7 < r < 0/8$ برآزش ضعیف و $r < 0/7$ برآزش خیلی ضعیف می‌باشد.

۳-۷-۶ تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مانند تجزیه خوشه‌ای یکی دیگر از تکنیک‌های چند متغیره است. این تکنیک را می‌توان برای نمایش دو بعدی پراکنش افراد به کار برد. تجمع افراد در یک ناحیه از نمودار نشان دهنده تشابه ژنتیکی آن افراد می‌باشد. PCA روشی برای کاستن حجم داده‌ها به منظور روشن ساختن روابط بین دو یا چند متغیر و توجیه تغییرات کل داده‌های اصلی و اولیه به وسیله تعداد محدودی از متغیره‌های جدید مستقل به نام مؤلفه‌های اصلی می‌باشد. کاسته شدن حجم داده‌ها به وسیله تبدیل خطی داده‌های اصلی به متغیره‌های مستقل جدیدی که به عنوان مؤلفه‌های اصلی شناخته می‌شوند انجام می‌گیرد. به طوری که اولین مؤلفه بیشترین مقدار تغییرات داده‌های اولیه را توجیه می‌کند و مؤلفه دوم بیشترین مقدار تغییرات باقیمانده را بعد از مؤلفه اول توجیه می‌کند. لازم به ذکر است که هر مؤلفه تغییراتی را توجیه می‌کند که توسط مؤلفه‌های قبلی بیان نشده است. به علت اینکه مؤلفه‌ها به صورت متعامد و مستقل از یکدیگر می‌باشند هر مؤلفه نشان‌دهنده خصوصیات متفاوتی از داده‌های اصلی می‌باشند و به صورت مستقل از یکدیگر باید تفسیر شوند. هر چه همبستگی میان متغیره‌ها بیشتر باشد، ۲ تا ۳ مؤلفه نخست تغییرات بیشتری را توجیه می‌کنند و هر چه همبستگی پایین‌تر باشد نشان دهنده تصادفی بودن این متغیره‌ها است. اگر سه مؤلفه نخست کمتر از $0/25$ تغییرات را توجیه نمایند، نمودارهای دو بعدی و سه بعدی برای گروه‌بندی داده‌ها ناکارآمد بوده چرا که همبستگی میان این سه مؤلفه اندک است و بخش بسیاری از تغییرات را مؤلفه‌های دیگر توجیه کرده‌اند و نمودارهای دو بعدی و سه بعدی دسته بندی قابل قبولی را انجام نداده ولی این رویداد نشان‌دهنده پراکنش خوب نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوم می‌باشد.

۳-۷-۷ شاخص محتوای اطلاعات چندشکل^۱

شاخص محتوای اطلاعات چندشکل، به منظور بررسی کارایی نشانگرها در تمایز بین ژنوتیپها استفاده می‌شود. PIC چندشکلی حاصل نشانگرها یا مکان‌های ژنی تکثیرشده توسط هر نشانگر را محاسبه می‌کند. در این شاخص، تعداد نشانگرهای تولیدشده توسط نشانگر تأثیری در برآورد ندارد و تنها چندشکلی‌های درون هر نشانگر اهمیت دارد. محتوای اطلاعات چندشکلی (شاخص PIC) با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$PIC=2f_i(1-f_i)$$

در این فرمول f_i فراوانی قطعه (آلل) تکثیر شده در یک مکان مشخص و $1-f_i$ فراوانی عدم وجود آلل (نبودنوار) می‌باشد (رولدین-روز و همکاران، ۲۰۰۰).

۳-۷-۸ شاخص اطلاعات شانون

شاخص اطلاعات شانون، یک معیار ریاضی برای نشان دادن تنوع گونه‌هاست که به زیست‌شناسان برای پی بردن به ساختار جامعه و تنوع موجود در آن کمک می‌کند. شاخص اطلاعات شانون از شاخص‌های مورد استفاده برای توصیف تنوع ژنوتیپها و گونه‌ها می‌باشد. جامعه‌ی با تنوع بالا دارای شاخص شانون بالا و جامعه با تنوع کم شاخص شانون پایینی دارد. این شاخص طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

$$p_i = \frac{n_i}{N}$$

p_i فراوانی نسبی آلل‌ها برای هر جمعیت، n_i تعداد آلل‌های دیده شده در جمعیت i ام و N تعداد کل آلل‌ها

^۱ - Polymorphism Information Content

می‌باشد (اوریانز، ۱۹۹۰).

۳-۷-۹ هتروزیگوسیتی

هتروزیگوسیتی برای یک جایگاه ژنی، نسبت فراوانی افراد هتروزیگوسیت برای آن جایگاه به کل افراد جمعیت تعریف می‌شود. مقدار آن با افزایش تعداد آلل‌ها، افزایش یافته و زمانی که فراوانی آللی یکسان باشد ماکزیمم می‌شود (فالكونر، ۱۹۹۶). یک جایگاه ژنی با هتروزیگوسیتی بیشتر از ۰/۱ چندشکل و با هتروزیگوسیتی بیشتر از ۰/۷ به شدت چندشکل است (جوسی، ۲۰۰۸).

۳-۷-۹-۱ هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)

نسبت برآورد شده افراد هتروزیگوس برای هر جایگاه ژنی که بصورت تصادفی انتخاب شده‌اند. پیش‌بینی براساس فراوانی‌های آللی نمونه گرفته‌شده صورت می‌گیرد و مطابق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

p_i فراوانی نسبی آلل‌ها می‌باشد.

در این پژوهش، پس از جمع‌آوری و ثبت داده‌ها، امتیازدهی الگوهای نواری به صورت یک و صفر انجام شد. تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها توسط ضریب تشابه جاکارد محاسبه شد. جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های بزرگ، ماتریس ضرایب تشابه ژنتیکی با الگوریتم UPGMA جهت ترسیم دندروگرام مورد استفاده قرار گرفت. تمام محاسبات از قبیل ضرایب تشابه ژنتیکی، رسم دندروگرام و تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از بسته‌ی نرم‌افزاری NTSYSpc نسخه ۲/۱۰ (رولف، ۲۰۰۰) انجام شد. همچنین نرم‌افزار Popgene نسخه ۱/۳۲ (یاه و همکاران، ۱۹۹۷) و نرم‌افزار GenAlex برای محاسبه دیگر شاخص‌ها مانند محتوای اطلاعات چندشکل (Polymorphism Information Content)، شاخص اطلاعات شانون (H')، تعداد آلل‌های موثر،

هتروزیگوستی مورد انتظار (He) و همچنین درصد چند شکلی استفاده گردید.

۳-۷-۱۰ تجزیه ارتباط صفات زراعی - مورفولوژیک و داده‌های مولکولی

به منظور شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات زراعی - مورفولوژیک مورد مطالعه، تجزیه رگرسیون چند متغیره بین نشانگرهای مولکولی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات زراعی - مورفولوژیک اندازه‌گیری شده به عنوان متغیر وابسته، با هدف توصیف تنوع متغیرهای وابسته با استفاده از حداقل تعداد متغیر مستقل با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد.

۳-۷-۱۰-۱ معیارهای ارزیابی در گزینش متغیرها

۳-۷-۱۰-۱-۱ ضریب تبیین

ضریب تبیین^۱ یا R squared با علامت اختصاری R^2 معیاری برای اندازه‌گیری کفایت مدل رگرسیون است که به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. در واقع این ضریب نشان‌دهنده میزان تغییرات متغیر وابسته توسط متغیر مستقل می‌باشد. ضریب تبیین برای مدل رگرسیون شامل زیر مجموعه‌ای از متغیرها با p جمله، یعنی $p-1$ متغیر مستقل و یک جمله مربوطه به عرض از مبدا، توسط R_p^2 نشان داده می‌شود. از نظر محاسباتی ضریب تبیین عبارت است از:

$$R_p^2 = \frac{SSR(P)}{SSY} = 1 - \frac{SSD(P)}{SSY}$$

که در آن $SSR(p)$ و $SSD(p)$ به ترتیب مجموع مربعات رگرسیون و مجموع مربعات مانده‌ها برای مدل زیر مجموعه p جمله‌ای هستند. از این معیار در حالت افزودن متغیرهای مستقل به مدل تا زمانی

^۱- Coefficient of Determination

استفاده می‌شود که اضافه کردن یک متغیر دیگر به مدل صرفاً افزایش ناچیزی در R^2_P ایجاد کند. به‌طور کلی استفاده از R^2 به عنوان معیاری برای انتخاب تعداد متغیر مستقل که باید در مدل وارد شوند، درست نیست. اما، برای تعداد ثابت متغیر مستقل می‌توان از R^2_P برای مقایسه آن‌ها استفاده کرد. در این حالت مدل‌های دارای مقدار زیاد R^2_P ترجیح داده می‌شوند.

۳-۷-۱۰-۱-۲ ضریب تبیین تصحیح شده

برای اجتناب از مشکلات تفسیر R^2 ، برخی تحلیل‌گران استفاده از آماره R^2 تصحیح شده را ترجیح می‌دهند، که به صورت زیر برای یک معادله p جمله‌ای تعریف می‌شود.

$$\bar{R}_p^2 = 1 - \left(\frac{n-1}{n-p}\right)(1 - R_p^2)$$

آماره R^2_P الزاماً با اضافه شدن متغیر مستقل به مدل افزایش نمی‌یابد. می‌توان نشان داد که اگر S متغیر مستقل به مدل اضافه شوند، \bar{R}_{p+S}^2 از \bar{R}_p^2 فقط در صورتی بیشتر است که آماره F جزء برای آزمون معنی‌دار بودن S متغیر مستقل اضافه شده بیشتر از یک باشد. در نتیجه، یک معیار برای گزینش یک مدل زیر مجموعه‌ای مطلوب، انتخاب مدلی است که حداکثر \bar{R}_p^2 را داشته باشد.

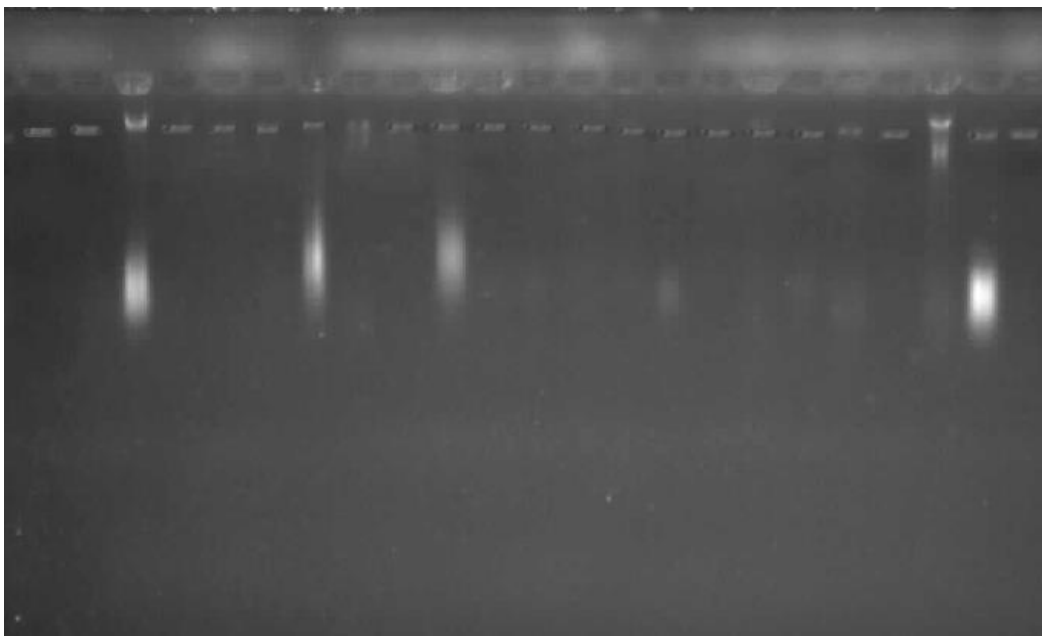
فصل چہارم

نتایج و بحث

۱-۴ بهینه سازی روش استخراج DNA

استخراج DNA گیاهی با کیفیت و کمیت مطلوب اهمیت خاصی در ارزیابی کارایی نشانگرهای مولکولی دارد. استخراج DNA با کیفیت بالا از گیاه بزرک به علت حضور اسیدهای چرب، پلی ساکاریدها، پروتئین ها و ترکیبات بازدارنده ای مانند پلی فنل ها و متابولیت های ثانویه بسیار مشکل می باشد، به طوریکه این ناخالصی ها می توانند اثر منفی بر کیفیت واکنش زنجیره ای پلی مرز داشته باشند. در این مطالعه با به کارگیری و تغییر برخی دستوالعمل ها، DNA مناسب و قابل قبولی از برگ گیاه بزرک به دست آمد که برای انجام کارهای مولکولی کاربردی است. پلی ساکاریدها سبب ژله ای شدن DNA می شوند و باعث ممانعت از فعالیت آنزیم Taq پلی مرز در واکنش PCR شده و همچنین در فعالیت صحیح آنزیم های برشی اختلال ایجاد می کنند.

در مطالعه حاضر در مرحله استخراج DNA تغییراتی در ترکیب و غلظت برخی مواد به کار رفته در روش دیول و دیول (۱۹۹۰) اعمال شد، در نهایت DNA با کیفیت و خلوص قابل قبول به دست آمد. شکل ۱-۴ نمونه ای الگوی باندهای DNA استخراج شده از بزرک در تعدادی از ژنوتیپ ها را نشان می دهد.



شکل ۴-۱: الگوی باندهای DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد. ژنوتیپ‌ها به ترتیب از سمت چپ به راست: ایران ۲۵، روسیه ۱۴۰۴، بلاروس ۸۷۷، آرژانتین ۷۹۴، شیلی ۱۱۷۱، آلمان ۲۰۹۶، سوئیس ۱۰۵۱، ترکیه ۱۲۳۸، هند ۲۱۴، ایرلند ۷۶۱، اریتره ۱۲۰۸، آلمان ۱۰۱۱، پرتغال ۱۰۹۹، آرژانتین ۱۱۵۵، اروگوئه ۱۶۵، مجارستان ۲۵۹، کانادا ۸۹۹، یوگسلاوی ۲۳۰، اسپانیا ۱۱۹۲، ایران ۹۶۰، ایتالیایی ۳۱۲، مجارستان ۷۶۲، اروگوئه ۱۱۸۲.

۲-۴ بررسی تنوع صفات زراعی - مورفولوژیک

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها در تمامی صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد که نشان‌دهنده تنوع موجود در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی برای صفات اندازه‌گیری شده می‌باشد (جدول ۴-۱)

۲-۴-۱ صفات تعداد روز تا ۵۰ درصد سبزشدن، روز تا گلدهی و روز تا رسیدگی

۱۴ روز پس از کاشت بذر، ۵۰ درصد بذور کاشته شده ژنوتیپ‌های مورد مطالعه سبز شدند و ۶۸ روز پس از کاشت وارد مرحله گلدهی گردیدند. به‌طور متوسط دوره کاشت تا رسیدگی فیزیولوژیک ۱۰۶

روز به طول انجامید. دامنه تغییرات ژنوتیپ‌ها برای صفت تعداد روز تا گلدهی بین ۵۹ تا ۸۵ روز بود (جدول ۴-۲). در بین ژنوتیپ‌های ارزیابی شده، ژنوتیپ بلاروس ۸۷۷ زودتر از بقیه وارد مرحله گلدهی شد. این ژنوتیپ همچنین زودرس از سایر ژنوتیپ‌ها بود. دیررس‌ترین ژنوتیپ‌ها با بیشترین تعداد روز تا گلدهی و روز تا رسیدگی به ژنوتیپ ایران ۶۶ تعلق داشت (جدول ۴-۲). خندان و سعیدی (۱۳۸۳) در بررسی خصوصیات زراعی و تنوع ژنتیکی بین ۱۰۰ لاین بزرک بومی و خارجی، متوسط روز تا گلدهی و رسیدگی برای لاین‌های اصلاحی خارجی را به ترتیب ۷۸ و ۱۱۰ روز و متوسط روز تا گلدهی و رسیدگی برای توده‌های بومی را به ترتیب ۸۳ و ۱۳۶ روز گزارش نمودند.

۴-۲-۲ صفت ارتفاع بوته

متوسط ارتفاع بوته ژنوتیپ‌ها ۴۹/۲۱ سانتی‌متر و دامنه تغییرات آن بین ۳۱ تا ۶۲ سانتی‌متر متغیر بود. ضریب تنوع ژنتیکی برای این صفت ۱۷/۰۱ درصد برآورد شد. در پژوهش حاضر ژنوتیپ اریتره ۱۲۰۸ از ارتفاع بوته بالاتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برخوردار بود درحالی‌که ژنوتیپ اروگوئه ۱۶۵ کمترین میزان ارتفاع بوته را داشت (جدول ۴-۲). سینگ و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی ضریب تنوع ژنتیکی، میزان وارث و همبستگی در ۵۳ ژنوتیپ بزرک، ارتفاع بوته‌ی این گیاه را در دامنه‌ای از ۷۶/۵۲ تا ۳۹/۸۳ سانتی‌متر با متوسط ۱۰۴/۷۰ سانتی‌متر گزارش نمودند.

۴-۲-۳ صفت تعداد شاخه در بوته

میانگین تعداد شاخه در بوته ژنوتیپ‌های ارزیابی شده ۵/۷۳ شاخه بود و دامنه تغییرات این صفت بین ۳ تا ۱۰ متغیر بود. در این مطالعه ژنوتیپ‌های بلاروس ۸۷۷، آلمان ۲۰۹۶، اریتره ۱۲۰۸، اسپانیا ۱۱۹۲ و اروگوئه ۱۱۸۲ کمترین تعداد شاخه و ژنوتیپ‌های اتیوپی ۳۱۲، ایران ۶۶، یوگسلاوی ۲۳۰ و اروگوئه ۱۶۵ بیشترین تعداد شاخه در بوته را داشتند. این صفت با میزان ۱۹/۶۳ درصد، درصد تنوع ژنتیکی نسبتاً

بیشتری در مقایسه با سایر صفات ارزیابی شده در این پژوهش نشان داد (جدول ۴-۲).

۴-۲-۴ صفات عملکرد بیولوژیک و قطر کپسول

متوسط عملکرد بیولوژیک ژنوتیپ‌ها ۵/۱۵ ارزیابی شد و دامنه تغییرات این صفت بین ۲ تا ۱۱ متغیر بود و ژنوتیپ مجارستان بیشترین میزان عملکرد بیولوژیک را داشت. میانگین صفت قطر کپسول برابر ۵/۸۰ میلی‌متر و ژنوتیپ‌های مجارستان ۷۶۲ و اریتره ۱۲۰۸ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان این صفت را داشتند (جدول ۴-۲).

۴-۲-۵ صفت تعداد دانه در کپسول

صفت تعداد دانه در کپسول یکی از اجزای عملکرد دانه محسوب می‌شود (شیم و همکاران، ۲۰۰۱). بدین ترتیب استفاده از تنوع ژنتیکی موجود برای این صفت و انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب، عملکرد دانه را افزایش خواهد داد. میانگین تعداد دانه در کپسول ژنوتیپ‌ها برابر ۶/۸۴ و دامنه تغییرات آن بین ۴ تا ۹ دانه متغیر بود. سینگ و همکاران (۲۰۱۵) دامنه تغییرات این صفت را بین ۷/۰۶ تا ۹/۸۰ و متوسط ۸/۶۱ عدد دانه در کپسول اعلام نمودند. بیشترین میانگین تعداد دانه در کپسول در ژنوتیپ‌های آرژانتین ۷۹۴ و شیلی ۱۱۷۱ و کمترین آن در ژنوتیپ پرتغال ۱۰۹۹ مشاهده شد (جدول ۴-۲). ضریب تنوع ژنتیکی برآورد شده برای این صفت ۹/۵۷ درصد بود. آدوگنا و لایوسچنگی (۲۰۰۳) نیز در بررسی همبستگی خصوصیات و تنوع ۶۰ ژنوتیپ بزرگ میانگین تعداد دانه در کپسول معادل ۹/۱۱ را گزارش نمودند.

۴-۲-۶ صفت تعداد کپسول در بوته

صفت تعداد کپسول در بوته نیز یکی دیگر از صفات با تأثیر غیرمستقیم در افزایش عملکرد

می‌باشد. در پژوهش حاضر ضریب تنوع ژنتیکی معادل $21/27$ درصد برای این صفت مشاهده گردید. میانگین این صفت در ژنوتیپ‌ها $26/36$ بود و دامنه تغییرات آن بین ۹ تا ۶۱ عدد متغیر بود. بیشترین تعداد کپسول در بوته به ژنوتیپ مجارستان ۷۶۲ و کمترین آن به ژنوتیپ بلاروس ۸۷۷ تعلق داشت (جدول ۴-۲). بیدخوانی نژاد و همکاران (۱۳۹۳) در ارزیابی تنوع ژنتیکی صفت عملکرد و اجزای آن دو زیر گونه بزرک در مناطق جغرافیایی مختلف، متوسط تعداد کپسول در بوته معادل $26/3$ و $35/5$ به ترتیب برای دو زیر گونه *Ustatissimum* و *Mediterrannum* گزارش نمودند.

۴-۲-۷ صفت وزن صد دانه

بیشترین میزان وزن صدانه در این ارزیابی مربوط به ژنوتیپ آلمان ۲۰۹۶ با میزانی معادل $0/49$ گرم و کمترین وزن صدانه با میزانی معادل $0/29$ گرم به ژنوتیپ سوئیس ۱۰۵۱ اختصاص داشت. میانگین این صفت برابر با $0/37$ گرم بود. صفت وزن صدانه ضریب تنوع ژنتیکی نسبتاً پایین و برابر $8/50$ درصد داشت (جدول ۴-۲). خندان و سعیدی (۱۳۸۳) در ارزیابی خصوصیات زراعی، تنوع ژنتیکی و روابط بین صفات در بین ۱۰۰ لاین حاصل از توده بومی بزرک متوسط وزن صدانه برابر با $0/52$ را گزارش کردند.

۴-۲-۸ صفت عملکرد دانه در بوته

در پژوهش حاضر ژنوتیپ‌های مراکش ۱۲۶۵ و بلاروس ۸۷۷ به ترتیب بیشترین ($3/20$ گرم) و ژنوتیپ بلاروس ۸۷۷ کمترین میزان عملکرد دانه در بوته ($0/48$ گرم) را داشتند. میانگین این صفت در ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر $1/33$ گرم در بوته بود. ضریب تنوع ژنتیکی برای این صفت نسبتاً بالا و برابر $18/52$ درصد بود (جدول ۴-۲) که می‌توان از آن برای انتخاب ژنوتیپ‌هایی با عملکرد دانه بیشتر استفاده نمود. گول و همکاران (۲۰۱۶)، در بررسی میزان عملکرد ۱۱ ژنوتیپ بزرک در منطقه سیند پاکستان، دامنه‌ی تغییرات این صفت را از $0/48$ تا $1/28$ گرم گزارش نمودند.

۴-۲-۹ صفات شاخص برداشت و وزن دانه در کپسول و عملکرد دانه در هکتار

متوسط میزان شاخص برداشت ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش معادل ۲۶/۳۲ درصد بود. بیشترین و کمترین میزان این صفت به ترتیب به ژنوتیپ‌های هند ۲۱۴ و ایران ۲۵ تعلق داشت. ضریب تنوع ژنتیکی این صفت برابر ۲۰/۰۲ درصد بود (جدول ۴-۲). ژنوتیپ‌های مراکش ۱۲۶۵ و پرتغال ۱۰۹۹ به ترتیب با مقادیری معادل ۰/۰۴ و ۰/۰۲ گرم بیشترین و کمترین میزان صفت وزن دانه در کپسول را با میانگین ۰/۰۲۸ گرم داشتند (جدول ۴-۲). عملکرد دانه در هکتار به‌طور متوسط ۱۱۹۱/۳۳ کیلوگرم در هکتار بود. بیشترین میزان این صفت (۲۸۶۹ کیلوگرم در هکتار) به ژنوتیپ مجارستان ۷۶۲ و کمترین میزان این صفت (۵۷۳ کیلوگرم در هکتار) به ژنوتیپ ائیوپی ۳۱۲ تعلق داشت (جدول ۴-۲). سعیدی (۱۳۸۰) در بررسی تنوع ژنتیکی صفات زراعی و پتانسیل تولید ژنوتیپ‌های با کیفیت روغن خوراکی و صنعتی، متوسط عملکرد دانه در هکتار را به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های با کیفیت روغن خوراکی و صنعتی معادل ۱۶۶۲ و ۱۷۴۲ کیلوگرم در هکتار گزارش نمودند.

۴-۳ همبستگی بین صفات

ضریب همبستگی میزان ارتباط بین متغیرهای مختلف را بیان می‌کند. تعیین ارتباط بین متغیرها در کشف روابط بین صفات، جهت بهبود عملکرد و دیگر خصوصیات اقتصادی در گیاهان کاربرد دارد (چادھاری و همکاران، ۲۰۱۶). در این مطالعه همبستگی بین صفت روز تا گلدهی با صفات روز تا رسیدگی و تعداد شاخه در بوته مثبت و معنی‌دار بود. آدوگنا و لایوسچانگ (۲۰۰۳) و ردی و همکاران (۲۰۱۳) نتایج مشابهی را گزارش نمودند. صفت روز تا رسیدگی همبستگی مثبت و معنی‌داری با صفت تعداد شاخه در بوته داشت (جدول ۴-۳). همبستگی مثبت و معنی‌دار بین این دو صفت در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (خندان و سعیدی (۱۳۸۳); ردی و همکاران (۲۰۱۳)). صفت تعداد شاخه در بوته با صفات تعداد

کیسول در بوته و عملکرد دانه در بوته همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد (جدول ۴-۳). این نتیجه با نتایج کوپر و همکاران (۲۰۰۶)، گورا و رائو (۲۰۱۱) و تریگ و همکاران (۲۰۱۴) در یک راستا می‌باشد. نتیجه حاصله، گویای این نکته است، که با توجه به رشد محدود گیاه بزرک، افزایش تعداد شاخه در بوته، منجر به تولید تعداد کیسول بیشتری در هر بوته و نهایتاً افزایش عملکرد دانه در بوته شده است.

همبستگی صفت عملکرد بیولوژیک با دو صفت تعداد کیسول در بوته و عملکرد دانه در بوته مثبت و معنی‌دار بود (جدول ۴-۳). کانوار و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی همبستگی صفات زراعی در ۳۶ ژنوتیپ بزرک، همبستگی مثبت و معنی‌دار بین صفت عملکرد بیولوژیک با دو صفت تعداد کیسول در بوته و عملکرد دانه در بوته گزارش نمودند. همچنین این نتایج با نتایج پژوهش پال و همکاران (۲۰۱۵) نیز مطابقت داشت. صفت قطر کیسول با صفت تعداد کیسول در بوته همبستگی منفی و معنی‌داری داشت (جدول ۴-۳). همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین صفت تعداد دانه در کیسول با صفات شاخص برداشت و وزن دانه در کیسول وجود داشت (جدول ۴-۳). مطالعات چادهاری و همکاران (۲۰۱۶) و بیدخوانی‌نژاد و همکاران (۱۳۹۳) نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری بین دو صفت تعداد دانه در کیسول و شاخص برداشت را نشان داد.

تعداد کیسول در بوته مهم‌ترین جزء عملکرد دانه در بوته بزرک است، پس می‌توان این صفت را به عنوان معیاری خوبی جهت افزایش عملکرد دانه در نظر گرفت (سعیدی ۱۳۸۰). در پژوهش حاضر، بین صفت تعداد کیسول در بوته و صفات عملکرد دانه در بوته، وزن صدانه، شاخص برداشت و عملکرد دانه در هکتار همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت (جدول ۴-۳). این همبستگی، بیان‌کننده‌ی اثر مستقیم تعداد کیسول در بوته روی عملکرد دانه در بوته و هکتار و همچنین شاخص برداشت است. این نتیجه با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت داشت (سعیدی و خدام باشی (۱۳۸۵); پتیل و همکاران (۱۹۸۱); لیتچ و ساهی (۱۹۹۹)).

جدول ۴-۱: نتایج تجزیه واریانس ۱۴ صفت زراعی - مورفولوژیک مورد مطالعه

میانگین مربعات														منابع تغییرات	درجه آزادی
وزن دانه در کیسول	عملکرد در هکتار	شاخص برداشت	عملکرد دانه در بوته	وزن صد دانه	تعداد کیسول در بوته	تعداد دانه در کیسول	قطر کیسول	عملکرد بیولوژیک	تعداد شاخه در بوته	ارتفاع	روز تا رسیدگی	روز تا گلدهی	روز تا ۵۰٪ سبز شدن		
۰/۰۲	۸۲۱۹/۵	۲۶/۳	۱/۵	۰/۱۱	۱۶/۵	۲/۸	۶/۷	۳/۵	۹/۶	۴۰/۸	۶۳/۸	۲۵/۶	۱۰/۵	۱	تکرار
۰/۱**	۱۰۰۰۰/۶**	۵۹/۱**	۸/۶**	۴/۳**	۱۸/۸**	۰/۹*	۸/۵**	۹/۶**	۵/۶*	۳۵/۶**	۷۰/۳**	۵۱/۴**	۱۹/۹**	۲۵	ژنوتیپ
۰/۰۳	۱۲۵/۶	۱/۹	۳/۵	۰/۸	۰/۵	۰/۰۶	۲/۲	۰/۷	۱/۶	۰/۹	۲/۱	۰/۶	۱/۵	۲۵	خطا

ns، * و ** به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۴-۲: میانگین، LSD و درصد ضریب تنوع ژنتیکی ۱۴ صفت مورفولوژیک و زراعی در ژنوتیپ‌های بزرگ مورد مطالعه

ردیف	ژنوتیپ	روز تا ۵۰ درصد سبز شدن	روز تا گلدهی	روز تا رسیدگی	ارتفاع بوته	تعداد شاخه در بوته	عملکرد بیولوژیک	قطر کپسول	تعداد دانه در کپسول	تعداد کپسول در بوته	وزن صد دانه	عملکرد دانه در بوته	شاخص برداشت	عملکرد در هکتار	وزن دانه در کپسول
۱	ایران ۲۵	۱۵	۷۲	۱۰۴	۳۳/۷۰	۴/۶۰	۴/۰۵	۴/۴۷	۶/۵۲	۳۵/۵۰	۰/۳۰	۱/۵۸	۳۹/۱۳	۱۹۹۴/۲۴	۰/۰۲
۲	روسیه ۱۴۰۴	۱۱	۶۳	۱۰۵	۵۱/۹۵	۴/۹۰	۵/۵۵	۴/۷۶	۷/۶۳	۳۸/۵۶	۰/۴۲	۲	۳۶/۰۷	۱۳۷۶/۰۰	۰/۰۳
۳	بلاروس ۸۷۷	۱۴	۵۹	۹۹	۴۰/۵۵	۲/۸۰	۲/۰۱	۶/۰۷	۶/۹۰	۸/۹۱	۰/۳۴	۰/۴۸	۲۳/۹۳	۱۰۰۲/۹۱	۰/۰۳
۴	آرژانتین ۷۹۴	۱۰	۶۳	۱۰۶	۴۰/۲۵	۴/۶۴	۶/۸۱	۶/۳۰	۸/۵۴	۲۹/۲۰	۰/۴۳	۱/۶۴	۴۲/۰۲	۹۰۰/۳۲	۰/۰۳
۵	شیلی ۱۱۷۱	۱۱	۶۴	۱۰۶	۵۵/۱۰	۴/۷۰	۳/۵۳	۵/۷۲	۸/۷۴	۱۷/۳۳	۰/۳۰	۰/۹۰	۲۵/۵۲	۷۴۱/۳۸	۰/۰۳
۶	آلمان ۲۰۹۶	۱۲	۶۷	۱۰۴	۵۰/۳۵	۳/۳۰	۳/۵۶	۶/۱۰	۶/۳۳	۱۴/۳۶	۰/۴۹	۰/۷۶	۲۱/۳۶	۷۰۴/۰۶	۰/۰۳
۷	سوئیس ۱۰۵۱	۱۵	۶۳	۱۰۲	۳۵/۸۵	۴/۷۰	۳/۵۳	۶/۳۰	۶/۹۶	۲۶/۸۶	۰/۲۹	۱/۱۶	۳۲/۸۲	۷۸۱/۳۴	۰/۰۲
۸	ترکیه ۱۲۳۸	۱۰	۶۳	۱۰۸	۵۱/۳۰	۶/۳۰	۵/۹۷	۵/۷۳	۶/۵۷	۳۴/۵۹	۰/۴۰	۱/۹۵	۳۲/۵۹	۱۳۶۳/۱۹	۰/۰۳
۹	هند ۲۱۴	۱۲	۷۱	۱۰۸	۵۱/۲۰	۶/۴۵	۴/۸۴	۵/۸۷	۵/۶۶	۱۳/۶۹	۰/۳۳	۰/۵۹	۱۲/۲۷	۶۳۶/۱۷	۰/۰۲
۱۰	ایرلند ۷۶۱	۱۳	۷۱	۱۰۳	۶۰/۳۵	۴/۸۰	۳/۶۰	۵/۳۱	۷/۸۷	۱۵/۶۸	۰/۲۹	۰/۷۲	۲۰/۱۱	۱۰۴۷/۹۲	۰/۰۲
۱۱	اریتره ۱۲۰۸	۱۰	۶۸	۱۰۸	۶۱/۹۵	۳/۳۶	۷/۴۶	۶/۷۱	۴/۶۰	۲۰/۷۹	۰/۴۵	۰/۹۹	۲۳/۲۴	۱۹۳۰/۶۰	۰/۰۳
۱۲	پرتغال ۱۰۹۹	۱۷	۷۳	۱۰۶	۴۹/۶۰	۶/۹۰	۶/۹۳	۶/۳۴	۳/۹۲	۲۳/۴۴	۰/۴۰	۱	۱۴/۴۹	۸۶۸/۳۳	۰/۰۲
۱۳	آلمان ۱۰۱۱	۱۳	۷۴	۱۰۸	۵۳	۸/۱۵	۵/۴۳	۶/۰۵	۷/۰۴	۲۸/۳۰	۰/۳۱	۱/۵۳	۲۸/۱۵	۱۵۷۱/۶۰	۰/۰۳
۱۴	آرژانتین ۱۱۵۵	۱۳	۷۲	۱۰۷	۳۰/۶۰	۹/۱۰	۵/۰۶	۵/۸۱	۶/۶۶	۳۳/۱۱	۰/۳۶	۱/۷۹	۵۳/۳۳	۱۳۹۷/۹۷	۰/۰۳
۱۵	اروگوئه ۱۶۵	۲۰	۶۳	۱۰۳	۴۰/۵۵	۵/۲۰	۵/۲۰	۵/۷۷	۶/۳۱	۳۳/۰۵	۰/۴۲	۱/۶۲	۳۱/۱۷	۷۱۹/۷۷	۰/۰۳

ادامه جدول ۲-۴

وزن دانه در کپسول	عملکرد درهکنار	شاخص برداشت	عملکرد دانه در بوته	وزن صد دانه	تعداد کپسول در بوته	تعداد دانه در کپسول	قطر کپسول	عملکرد بیولوژیک	تعداد شاخه در بوته	ارتفاع بوته	روز تا رسیدگی	روز تا گلدهی	روز تا ۵۰ درصد سبز شدن	ژنوتیپ	ردیف
۰/۰۳	۱۰۴۰/۳۳	۲۵/۶۹	۱/۳۵	۰/۳۳	۲۶/۰۴	۷/۴۰	۵/۶۹	۵/۲۷	۶	۵۷/۵۰	۱۰۵	۷۲	۱۳	مجارستان ۲۵۹	۱۶
۰/۰۳	۶۲۵/۷۴	۲۴/۱۳	۱/۷۷	۰/۳۴	۵۳/۳۷	۶/۷۲	۵/۸۹	۷/۳۳	۸/۷۰	۵۱/۱۵	۱۰۷	۷۷	۱۷	کانادا ۸۹۹	۱۷
۰/۰۳	۲۶۳۱/۴۴	۳۱/۸۶	۰/۷۰	۰/۳۳	۱۲/۷۷	۷/۷۵	۶/۴۲	۲/۲۰	۲/۷۹	۴۶/۶۰	۱۰۷	۶۳	۱۲	یوگسلاوی ۲۳۰	۱۸
۰/۰۳	۵۷۲/۵۴	۲۳/۳۳	۱/۲۸	۰/۳۶	۲۳/۷۶	۶/۸۰	۵/۴۷	۵/۵۰	۹/۸۰	۴۳/۲۰	۱۰۳	۶۸	۱۷	ایران ۹۶۰	۲۰
۰/۰۲	۲۸۶۸/۸۰	۲۴/۳۵	۲/۵۶	۰/۳۰	۶۰/۹۹	۶/۴۰	۴/۴۱	۱۰/۵۲	۶/۸۶	۵۷/۳۶	۱۰۹	۷۰	۱۷	اتیوپی ۳۱۲	۲۱
۰/۰۲	۸۶۴/۰۶	۲۲/۱۳	۰/۸۶	۰/۴۴	۱۹/۰۴	۶/۸۲	۵/۹۷	۴/۶۶	۳/۱۷	۵۵/۵۰	۱۰۸	۶۶	۱۰	مجارستان ۷۶۲	۲۲
۰/۰۲	۷۳۰/۱۴	۲۲/۷۷	۰/۹۲	۰/۳۹	۲۰/۳۴	۴/۸۲	۵/۵۲	۴/۰۳	۵/۸۰	۵۱/۶۰	۱۰۶	۷۴	۱۵	اروگوئه ۱۱۸۲	۲۳
۰/۰۴	۱۷۰/۱/۷۸	۳۲/۰۵	۳/۰۳	۰/۴۷	۴۵/۸۹	۷/۹۰	۶/۰۵	۹/۴۵	۵/۲۰	۵۶/۱۰	۱۰۶	۶۱	۱۳	گواتمالا ۶۳۳	۲۴
۰/۰۳	۱۲۴۵/۴۱	۲۵/۷۹	۰/۶۶	۰/۴۱	۱۲/۴۷	۷/۶۷	۵/۳۵	۲/۵۶	۹/۱۰	۳۹/۴۵	۱۰۲	۸۵	۱۳	مراکش ۱۲۶۵	۲۵
۰/۰۳	۱۰۴۴/۹۷	۳۱/۷۹	۱/۴۷	۰/۳۳	۲۹/۲۰	۸/۴۳	۵/۶۶	۴/۶۷	۳/۹۰	۴۹/۰۵	۱۲۳	۶۳	۱۳	ایران ۶۶	۲۶
۰/۰۰۵	۹۲۱/۸۵	۸/۶۷	۰/۳۵	۰/۰۵	۷/۸۳	۱/۱۰	۰/۵۱	۱/۰۸	۱/۸۱	۱۳/۹۹	۶/۵۳	۸/۳۳	۲/۰۶	LSD(0.05)	-
۰/۰۲	۱۱۹۹/۳۳	۲۵/۰۲	۱/۱۱	۰/۳۷	۲۱/۲۹	۶/۶۹	۵/۸۴	۴/۴۸	۵/۳۵	۴۷/۵۴	۱۰۴/۲۴	۶۷/۸۲	۱۵/۱۲	میانگین صفت	-
۱۰/۹۰	۲۶	۲۰	۱۸/۵	۸/۵	۲۱/۲	۹/۵	۵/۱	۱۳/۹	۱۹/۶	۱۷	۳/۶	۷/۱	۷/۹	ضریب تنوع	-

ژنتیکی (/)

جدول ۳-۴: ضرایب همبستگی پیرسون بین صفات مورفولوژیک - زراعی ژنوتیپ‌های بزرگ مورد بررسی

وزن دانه	عملکرد در هکتار	شاخص برداشت	عملکرد دانه در بوته	وزن صد دانه	تعداد کپسول در بوته	تعداد دانه در کپسول	قطر کپسول	عملکرد بیولوژیک	تعداد شاخه در بوته	ارتفاع بوته	روز تا رسیدگی	روز تا گلدهی	روز تا ۵۰ درصد سبز شدن	صفت
														روز تا ۵۰ درصد سبز شدن
													۱	۱
												۱	۰/۲۲ ^{ns}	۲
											۱	۰/۶۵ ^{**}	-۰/۲۱ ^{ns}	۳
										۱	-۰/۰۳ ^{ns}	-۰/۰۹ ^{ns}	-۰/۲۴ ^{ns}	۴
									۱	-۰/۲۵ ^{ns}	۰/۳۹ [*]	۰/۶۵ ^{**}	۰/۳۵ ^{ns}	۵
								۱	۰/۳۷ ^{ns}	۰/۲۳ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۶ ^{ns}	۰/۲۶ ^{ns}	۶
							۱	-۰/۲۳ ^{ns}	۰/۲۷ ^{ns}	-۰/۰۰۶ ^{ns}	-۰/۱۷ ^{ns}	۰/۲۰ ^{ns}	۰/۲۱ ^{ns}	۷
						۱	-۰/۱۹ ^{ns}	-۰/۱ ^{ns}	۰/۱۲ ^{ns}	-۰/۰۷ ^{ns}	-۰/۰۱ ^{ns}	-۰/۳۰ ^{ns}	-۰/۳۲ ^{ns}	۸

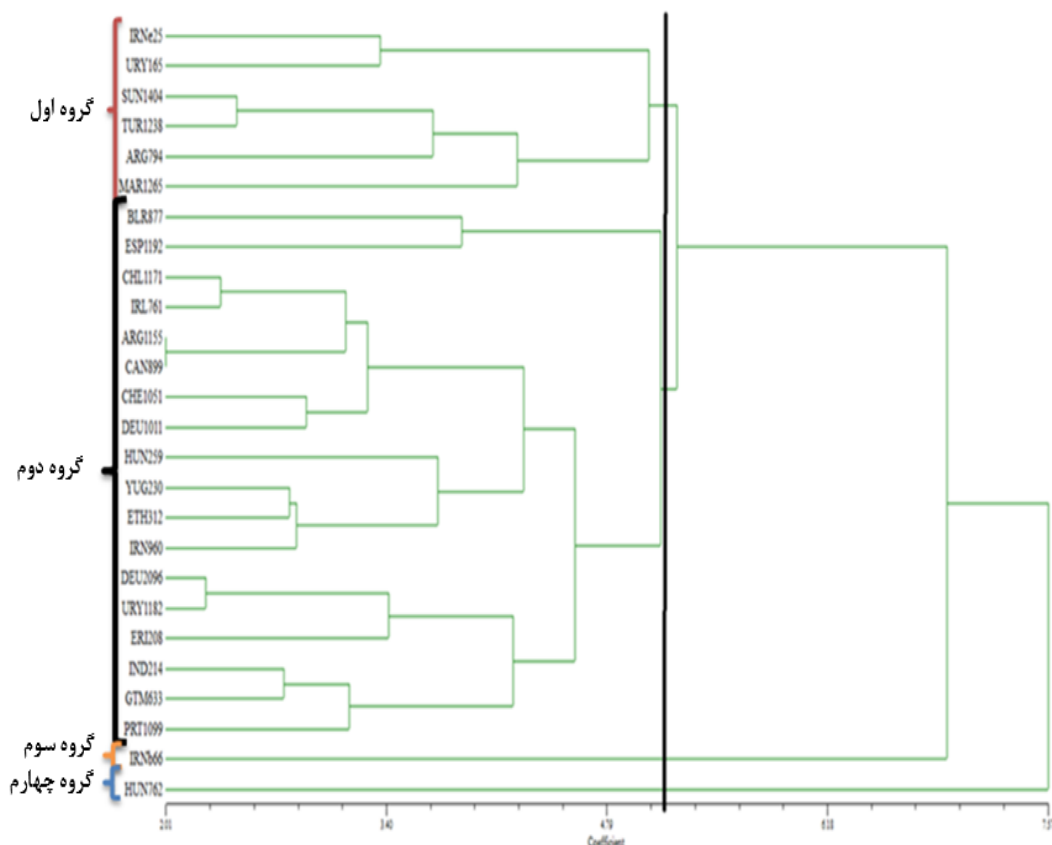
ادامه جدول ۳-۴

وزن دانه	عملکرد در هکتار	شاخص برداشت	عملکرد دانه در بوته	وزن صد دانه	تعداد کپسول در بوته	تعداد دانه در کپسول	قطر کپسول	عملکرد بیولوژیک	تعداد شاخه در بوته	ارتفاع بوته	روز تا رسیدگی	روز تا گلدهی	روز تا ۵۰ درصد سبز شدن	صفت
					۱	-۰/۰۴ ^{ns}	-۰/۴۶*	۰/۸۲**	۰/۲۵*	۰/۰۵ ^{ns}	-۰/۰۳ ^{ns}	-۰/۰۸ ^{ns}	-۰/۲۲ ^{ns}	تعداد کپسول در بوته
				۱	۰/۲۰*	۰/۱۴ ^{ns}	-۰/۱۰ ^{ns}	۰/۱۸ ^{ns}	۰/۱۲ ^{ns}	-۰/۰۱ ^{ns}	۰/۱۵ ^{ns}	-۰/۱۲ ^{ns}	۰/۱۷ ^{ns}	وزن صد دانه
			۱	۰/۱۳ ^{ns}	۰/۹۴**	۰/۱۸ ^{ns}	-۰/۲۴ ^{ns}	۰/۸۲**	۰/۲۶*	۰/۰۳ ^{ns}	-۰/۰۳ ^{ns}	۰/۱۷ ^{ns}	۰/۱۷ ^{ns}	عملکرد دانه در بوته
		۱	۰/۴۸*	۰/۱۱ ^{ns}	۰/۴۳*	۰/۴۰*	-۰/۱۹ ^{ns}	-۰/۰۶ ^{ns}	۰/۱ ^{ns}	-۰/۳۵ ^{ns}	-۰/۰۷ ^{ns}	۰/۲۸ ^{ns}	-۰/۰۴ ^{ns}	شاخص برداشت
	۱	۰/۴۱*	۰/۳۵ ^{ns}	-۰/۱۷ ^{ns}	۰/۴۲*	۰/۰۴ ^{ns}	۰/۲۱ ^{ns}	۰/۱۹ ^{ns}	۰/۱۷ ^{ns}	۰/۰۶ ^{ns}	۰/۲۵ ^{ns}	-۰/۰۴ ^{ns}	۰/۱۲ ^{ns}	عملکرد در هکتار
۱	۰/۰۶ ^{ns}	۰/۳۸*	۰/۳۵ ^{ns}	۰/۴۱*	۰/۰۷ ^{ns}	۰/۵۵**	۰/۱۷ ^{ns}	۰/۰۷ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۲۸ ^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	-۰/۲۹ ^{ns}	-۰/۳۳ ^{ns}	وزن دانه در کپسول

^{ns} و * و ** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

۴-۴ تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها براساس صفات زراعی - مورفولوژیک

به منظور کمی کردن تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها براساس خصوصیات زراعی، تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ماتریس اقلیدسی به روش UPGMA انجام شد که دندروگرام حاصل در شکل ۴-۲ نشان داده شده است. ژنوتیپ‌ها از نظر صفات زراعی - مورفولوژیک براساس بزرگتر بودن فواصل ژنتیکی بین گروهی نسبت به فواصل ژنتیکی درون گروهی در چهار گروه متمایز گروه‌بندی شدند (شکل ۴-۲ و جدول ۴-۴).



شکل ۴-۲: نمودار حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ماتریس فاصله اقلیدسی بر اساس

۱۴ صفت زراعی-مورفولوژیک

جدول ۴-۴: نتایج واریانس فواصل ژنتیکی بین گروهی و درون گروهی صفات زراعی - مورفولوژیک

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات
فواصل ژنتیکی درون گروهی	فواصل ژنتیکی بین گروهی		
۱۵/۳	۱۲۵/۲۰	۱	تکرار
۲۷/۴۱۰ *	۲۲۶/۰۷۶**	۱۰	ژنوتیپ
۴/۶۳	۱۰/۳۰	۱۰	خطا

ns, *, ** به ترتیب عدم اختلاف معنی دار و معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

بیشترین ضریب عدم تشابه (کمترین تشابه ۹/۳۹ درصد) بین ژنوتیپ‌های مجارستان ۷۶۲ و ایران ۶۶ بود و کمترین ضریب عدم تشابه (بیشترین تشابه ۹۷/۹۸ درصد) بین ژنوتیپ‌های آرژانتین ۱۱۵۵ و کانادا ۸۹۹۱ به دست آمد.

جدول ۴-۵: مقایسه میانگین صفات زراعی گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای

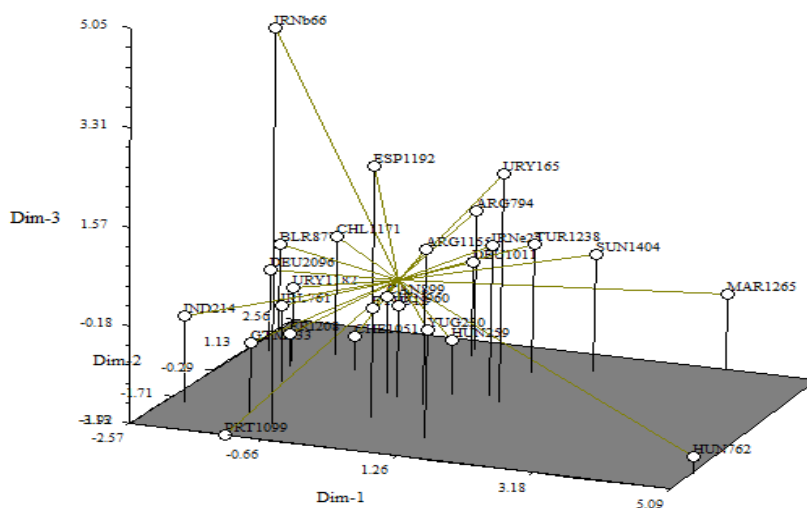
IV	III	II	I	صفت
۱۷	۱۳	۱۳/۸۰	۱۲	روز تا ۵۰٪ سبز شدن
۷۰	۸۵	۶۸	۶۸	روز تا گلدهی
۱۰۹	۱۲۳	۱۰۵	۶۵/۶۶	روز تا رسیدگی
۵۷	۳۹	۵۸/۷۸	۴۴	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)
۷	۹	۵/۴۳	۵/۷۸	تعداد شاخه در بوته
۱۱	۳	۴/۶۶	۶/۰۷	عملکرد بیولوژیک
۴	۵	۵/۹۴	۵/۶۸	قطر کپسول (میلی‌متر)
۶	۸	۶/۶۵	۷/۳۶	تعداد دانه در کپسول
۶۱	۱۲	۲۱/۹۵	۳۶/۱۴	تعداد کپسول در بوته
۰/۲۹	۰/۴۰	۰/۳۶	۰/۳۹	وزن ۱۰۰ دانه (گرم)
۳	۱	۱/۰۸	۱/۹۹	عملکرد دانه در بوته (گرم)
۲۴	۲۶	۲۴/۱۷	۳۳/۲۰	شاخص برداشت (درصد)
۲۸۶۹	۱۲۳۴	۱۰۰۶/۵۶	۱۴۵۵/۵۸	عملکرد در هکتار (کیلوگرم)
۰/۰۲۱	۰/۰۳۲	۰/۰۲۷	۰/۰۳۳	وزن دانه در کپسول

براساس گروه‌بندی حاصل از تجزیه‌ای خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های ایران ۲۵، روسیه ۱۴۰۴، آرژانتین ۷۹۴، ترکیه ۱۲۳۸، اروگوئه ۱۶۵ و مراکش ۱۲۶۵ در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۴-۲). براساس نتایج مقایسه میانگین گروه‌ها، این گروه بیشترین شاخص برداشت و وزن دانه در کپسول را دارا بودند (جدول ۴-۵). تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها شامل مجارستان ۲۵۹، بلاروس ۸۷۷، کانادا ۸۹۹، یوگوسلاوی ۲۳۰، شیلی ۱۱۷۱، اسپانیا ۱۱۹۲، آلمان ۲۰۹۶، ایران ۹۶۰، سوئیس ۱۰۵۱، اتیوپی ۳۱۲، هند ۲۱۴، اروگوئه ۱۱۸۲، ایرلند ۷۶۱، گواتمالا ۶۳۳، اریتره ۱۲۰۸، پرتغال ۱۰۹۹، آرژانتین ۱۱۵۵ و آلمان ۱۰۱۱ در گروه دوم جای گرفتند. ژنوتیپ‌های این گروه، دارای بیشترین ارتفاع بوته و کمترین عملکرد دانه در هکتار از بین کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در پژوهش حاضر بودند (جدول ۴-۵). عملکرد کمتر این گروه نسبت به سایر گروه‌ها احتمالاً می‌توان به افزایش ارتفاع بوته‌ها و خوابیدگی در ژنوتیپ‌های این گروه نسبت داد. سایر ژنوتیپ‌های این گروه از لحاظ میزان صفات زراعی - مورفولوژیکی از حد میانگین برخوردار بودند. دو ژنوتیپ ایران ۶۶ و مجارستان ۷۶۲ به‌طور جداگانه، به ترتیب در گروه‌های سوم و چهارم گروه‌بندی شدند. ژنوتیپ ایران ۶۶ با دارا بودن حداکثر تعداد روز تا گلدهی، تعداد شاخه در بوته، تعداد دانه در کپسول و وزن صد دانه، با این حال دارای کمترین میزان تعداد کپسول در بوته، عملکرد دانه در بوته بود (شکل ۴-۲). در بررسی روابط بین عملکرد دانه در بوته و اجزای آن، تعداد کپسول در بوته بیشترین اثر مستقیم بر عملکرد دانه در بوته دارد (سعیدی، ۱۳۸۰). ژنوتیپ پر عملکرد مجارستان ۷۶۲ با برخورداری از بیشترین میزان عملکرد بیولوژیک، تعداد کپسول در بوته و بالاترین عملکرد دانه در بوته و عملکرد دانه در هکتار جدا از بقیه ژنوتیپ‌ها در گروه چهارم جای گرفت، در نتیجه، در برنامه‌های به‌نژادی با هدف افزایش عملکرد دانه ژنوتیپ مجارستان ۷۶۲ حائز اهمیت است.

۴-۵ نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات زراعی - مورفولوژیک

اصولاً اگر تعداد متغیرهای مورد اندازه‌گیری زیاد باشد، تفسیر آن مشکل و سخت خواهد بود. در نتیجه محققین به دنبال روش‌هایی هستند که کاهش داده‌ها را انجام دهد، به طوری که این مجموعه کاهش یافته بیشترین واریانس داده‌ها را توجیه کند. برای رسیدن به این هدف از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شد.

براساس نتایج به دست آمده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، سه مؤلفه اول، دوم و سوم در مجموع ۷۷/۰۳ درصد از واریانس کل را توجیه نموده‌اند (جدول ۴-۶). نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در شکل ۴-۳ نشان داده شده است. چهار گروه حاصل از دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس تجزیه خوشه‌ای، در شکل ۴-۳ کاملاً قابل تشخیص می‌باشند، که این مسأله مؤید قطع نمودار تجزیه خوشه‌ای از محل مناسب و دسته‌بندی صحیح ژنوتیپ‌ها می‌باشد.



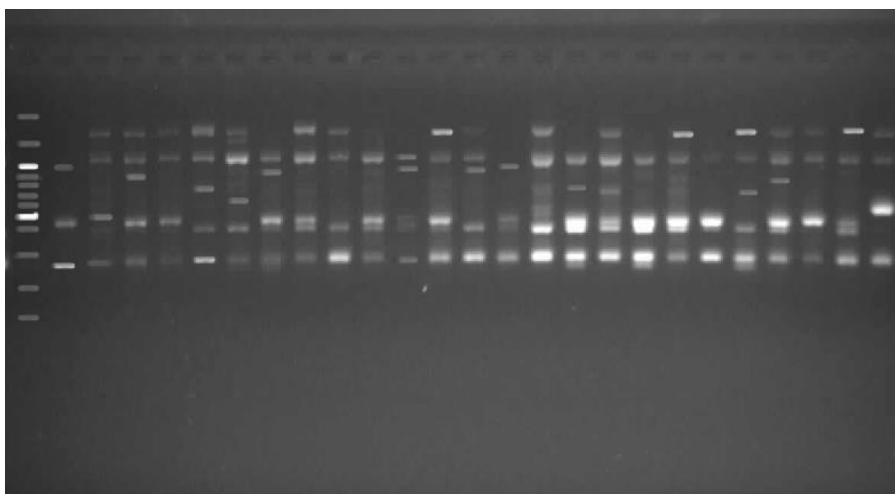
شکل ۴-۳: نمودار پراکنش گروه‌ها بر مبنای سه مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ۱۴ صفت زراعی - مورفولوژیک

جدول ۴-۶: نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات زراعی-مورفولوژیک

مؤلفه‌ها	مقادیر ویژه	درصد مقادیر ویژه	درصد تجمعی
۱	۸۷/۷۸	۳۳/۰۸	۳۳/۰۸
۲	۶۹/۰۹	۲۵/۷۴	۵۸/۸۲
۳	۴۶/۲۴	۱۸/۲۱	۷۷/۰۳

۴-۶ بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ISSR

۲۴ نشانگر ISSR جهت تکثیر DNA ی ۲۶ ژنوتیپ مختلف بزرگ مورد استفاده قرار گرفت. از بین ۲۴ نشانگر آزمون شده در این پژوهش، تعداد ۲۱ نشانگر بر اساس تولید باندهای چندشکل با وضوح قابل قبول، گزینش شدند (جدول ۴-۶). در شکل ۴-۰۴ نمونه‌ای از ژل حاوی قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از نشانگر PCT1 نشان داده شده است.



شکل ۴-۴: قطعات DNA تکثیر یافته با نشانگر PCT1 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. از سمت چپ به راست به ترتیب: سایز مارکر 100 bp plus، ژنوتیپ‌های: ایران ۲۵، روسیه ۱۴۰۴، بلاروس ۸۷۷، آرژانتین ۷۹۴، شیلی ۱۱۷۱، آلمان ۲۰۹۶، سوئیس ۱۰۵۱، ترکیه ۱۲۳۸، هند ۲۱۴، ایرلند ۷۶۱، اریتره ۱۲۰۸، آلمان ۱۰۱۱، پرتغال ۱۰۹۹، آرژانتین ۱۱۵۵، اروگوئه ۱۶۵، مجارستان ۲۵۹، کانادا ۸۹۹، یوگسلاوی ۲۳۰، اسپانیا ۱۱۹۲، ایران ۹۶۰، اتیوپی ۳۱۲، مجارستان ۷۶۲، اروگوئه ۱۱۸۲، گواتمالا ۶۳۳، مراکش ۱۲۶۵، ایران ۶۶

۲۱ نشانگر، در مجموع ۲۵۸ باند تولید نمودند. از این تعداد قطعه DNA تکثیر شده، ۴۰ باند تک‌شکل بودند در حالی که ۲۱۸ باند باقی‌مانده، در یک یا چند ژنوتیپ چندشکلی نشان دادند (جدول ۴-۷). ابتدا باندهای تک‌شکل از محاسبات حذف گردیدند و سپس نتایج براساس باندهای چندشکل به دست آمدند. میانگین اندازه قطعات تکثیر شده از ۲۷۰ جفت‌باز در نشانگر IP4 تا ۱۷۰۰ جفت‌باز در نشانگر PCT5 متغیر بود و میانگین تعداد باندهای تکثیر شده برای هر نشانگر ۱۲/۲۸ باند بود. نشانگرهای UBC811 و UBC815 با ۱۸ باند بیشترین تعداد باند و نشانگر PCT6 با ۷ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند. میانگین درصد چند شکلی حاصل از تکثیر کل نشانگرها ۸۳/۲۳ درصد و متوسط مکان‌های چندشکل برای هر نشانگر ۱۰/۳۸ مکان بود (جدول ۴-۷). ۵۰ ژنوتیپ *L.usitatissimum* و *L.pale* توسط ۲۴ نشانگر ISSR در مطالعه اوزال و همکارانش (۲۰۱۰)، در مجموع ۳۱۱ قطعه تکثیر کردند که ۲۹۸ قطعه چندشکل بودند، تعداد قطعات چند شکل حاصله بین ۳ تا ۱۸ و با میانگین ۱۲/۴ قطعه بود. راجووید و همکارانش (۲۰۱۰) در بررسی تنوع ژنتیکی ۷۰ ژنوتیپ بزرگ هندی با استفاده از ۲۰ نشانگر ISSR، ۱۳۶ باند تولید نمودند که ۸۷ باند چندشکل بودند، متوسط باندهای تکثیر شده و متوسط مکان چندشکل به ترتیب ۱۱/۳ و ۷/۲۵ مکان بود. درصد چندشکلی حاصله از نشانگرهای مختلف بین ۱۱/۱ تا ۸۱/۸ درصد با میانگین ۶۳/۹ درصد بود.

بر اساس نتایج حاصله میانگین شاخص شانون ۰/۶۵ محاسبه شد که بیشترین مقدار آن به نشانگر 3PCT5L با میزان ۰/۶۹ و کمترین مقدار به نشانگر UBC810 با میزان ۰/۵۵ تعلق داشت. شاخص تنوع ژنی Nei (h) میانگینی معادل ۰/۴۶ داشت که بیشترین شاخص Nei به نشانگر 3PCT5L با میزان ۰/۴۹ و کمترین میزان شاخص تنوع ژنی به نشانگر UBC810 با اندازه‌ای برابر ۰/۳۶ تعلق داشت. لیوو و همکارانش (۲۰۱۵) در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۴ زردآلوی مغز شیرین با استفاده از ۹ نشانگر ISSR، گزارش کردند که شاخص تنوع ژنی (Nei) با میانگین ۰/۲۷ و دامنه تغییرات ۰/۱۸ و ۰/۳۵ متغیر بود

(جدول ۴-۶). در مطالعه ای دیگر شعبانیان و همکارانش (۱۳۹۳) به بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲۵ ژنوتیپ بلوط ایرانی با استفاده از ۱۸ نشانگر ISSR پرداختند، که در آن مطالعه متوسط تنوع ژنی (Nei) با میانگین ۰/۳۰ گزارش گردید. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) محاسبه شده ۱/۸۶ آلل برای هر نشانگر بود که نشانگرهای 3PCT5L و IP5 با میزان ۱/۹۹ آلل بیشترین و نشانگر UBC810 با میزان ۱/۵۸ آلل کمترین تعداد آلل مؤثر را داشتند (جدول ۴-۷). ژو و همکارانش (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی بین ۱۰ ژنوتیپ (*Rehmannia glutinosa*) را با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار دادند، و متوسط تعداد آلل‌های مؤثر ۱/۴۰ آلل گزارش نمودند.

متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) ۰/۴۴ بود. نشانگر 3PCT5L با میزان ۰/۴۹ بیشترین میزان و نشانگر UBC810 با ۰/۲۹ کمترین میزان (PIC) را داشتند (جدول ۴-۷). راجووید و همکارانش (۲۰۱۰) DNA ۷۰ ژنوتیپ بزرگ هندی را با ۱۲ نشانگر ISSR تکثیر کردند. در این پژوهش متوسط اطلاعات چندشکل (PIC) ژنوتیپ‌ها در دامنه‌ای از ۰/۰۳ (کمترین میزان) تا ۰/۴۹ (بیشترین میزان) با میانگین ۰/۱۸ قرار داشت. همچنین قندهاری و همکارانش (۱۳۹۲) در بررسی تنوع ژنتیکی سه جمعیت شمشاد با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR متوسط میزان (PIC) نشانگرها را ۰/۳۶ به‌دست آوردند.

هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، نسبت برآورد شده‌ی افراد هتروزیگوس برای هر جایگاه ژنی که به صورت تصادفی انتخاب شده‌اند می‌باشد. یک جایگاه ژنی اگر دارای هتروزیگوسیتی بیشتر از ۰/۱ باشد، چندشکل است و اگر این مقدار بیشتر از ۰/۷ باشد، به شدت چندشکل می‌باشد. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) در این مطالعه برابر با ۰/۴۴ بود و نشانگر 3PCT1 با ۰/۴۹ بیشترین میزان (He) و نشانگر IP3 با ۰/۱۸ کمترین میزان (He) را دارا بودند. کشاورز خوب و همکارانش (۱۳۹۴) در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ رقم انگور با استفاده از ۶ نشانگر ISSR، هتروزیگوسیتی مورد انتظاری با میانگین ۰/۳۷ را گزارش نمودند.

جدول ۴-۷: نتایج حاصل از نشانگرهای ISSR مورد استفاده در مطالعه ژنوتیپها

ردیف	نشانگر	کل باندها	باندهای چندشکلی	درصد چندشکلی (%)	آل موثر (Ne)	PIC	شاخص شانون (SI)	شاخص تنوع ژنی (Nei)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)	
۱	PCT1	۱۰	۷	۷۰	۱/۸۲	۰/۳۸	۰/۶۴	۰/۴۵	۰/۳۶۱	
۲	PCT2	۱۱	۸	۷۲	۱/۸۹	۰/۴۹	۰/۶۶	۰/۴۷	۰/۴۵۶	
۳	PCT3	۱۱	۶	۵۴	۱/۸۹	۰/۴۷	۰/۶۶	۰/۴۷	۰/۴۷۵	
۴	PCT4	۱۳	۹	۶۹	۱/۷۴	۰/۴۸	۰/۶۱	۰/۴۲	۰/۴۷۶	
۵	PCT5	۱۱	۹	۸۱	۱/۹۵	۰/۴۷	۰/۶۸	۰/۴۸	۰/۴۹۱	
۶	PCT6	۱۱	۱۱	۱۰۰	۱/۸۲	۰/۴۳	۰/۶۴	۰/۴۵	۰/۴۹۶	
۷	3PCT1	۱۴	۱۴	۱۰۰	۱/۷۴	۰/۴۴	۰/۶۱	۰/۴۲	۰/۴۹۹	
۸	3PCT2	۱۳	۱۰	۷۶	۱/۹۶	۰/۴۹	۰/۶۸	۰/۴۹	۰/۴۳۰	
۹	3PCT5L	۱۵	۱۵	۱۰۰	۱/۹۹	۰/۴۹	۰/۶۹	۰/۵۰	۰/۴۱۴	
۱۰	IP2	۱۱	۸	۷۲	۱/۸۹	۰/۳۸	۰/۶۶	۰/۴۷	۰/۴۷۸	
۱۱	IP3	۱۲	۱۱	۹۱	۱/۸۲	۰/۴۹	۰/۶۴	۰/۴۵	۰/۱۸۰	
۱۲	IP4	۱۶	۱۲	۷۵	۱/۸۲	۰/۴۶	۰/۶۴	۰/۴۵	۰/۴۳۳	
۱۳	IP5	۱۰	۹	۹۰	۱/۹۹	۰/۴۵	۰/۶۹	۰/۵۰	۰/۴۹۲	
۱۴	PCT6	۱۳	۱۳	۱۰۰	۱/۸۲	۰/۴۹	۰/۶۴	۰/۴۵	۰/۴۸۸	
۱۵	3PCT6	۸	۷	۸۷	۱/۹۵	۰/۴۰	۰/۶۸	۰/۴۸	۰/۳۱۰	
۱۶	PCT6a	۷	۶	۸۵	۱/۷۴	۰/۳۶	۰/۶۱	۰/۴۳	۰/۴۹۶	
۱۷	UBC807	۱۰	۸	۸۱	۱/۸۲	۰/۲۹	۰/۶۴	۰/۴۵	۰/۴۹۸	
۱۸	UBC808	۱۳	۱۰	۷۶	۱/۸۲	۰/۴۰	۰/۶۴	۰/۴۵	۰/۴۳۷	
۱۹	UBC810	۱۳	۹	۶۹	۱/۵۸	۰/۴۱	۰/۵۵	۰/۳۷	۰/۴۹۶	
۲۰	UBC811	۱۸	۱۸	۱۰۰	۱/۹۵	۰/۴۹	۰/۶۸	۰/۴۸	۰/۴۸۰	
۲۱	UBC815	۱۸	۱۸	۱۰۰	۱/۹۶	۰/۴۹	۰/۶۸	۰/۴۹	۰/۴۳۰	
		۲۱۸	۲۵۸							
		کل								
		۱۲/۲۸	۱۰/۳۸	۸۳/۲۳	۱/۸۶	۰/۴۴	۰/۶۵	۰/۴۶	۰/۴۳۳	
		میانگین								

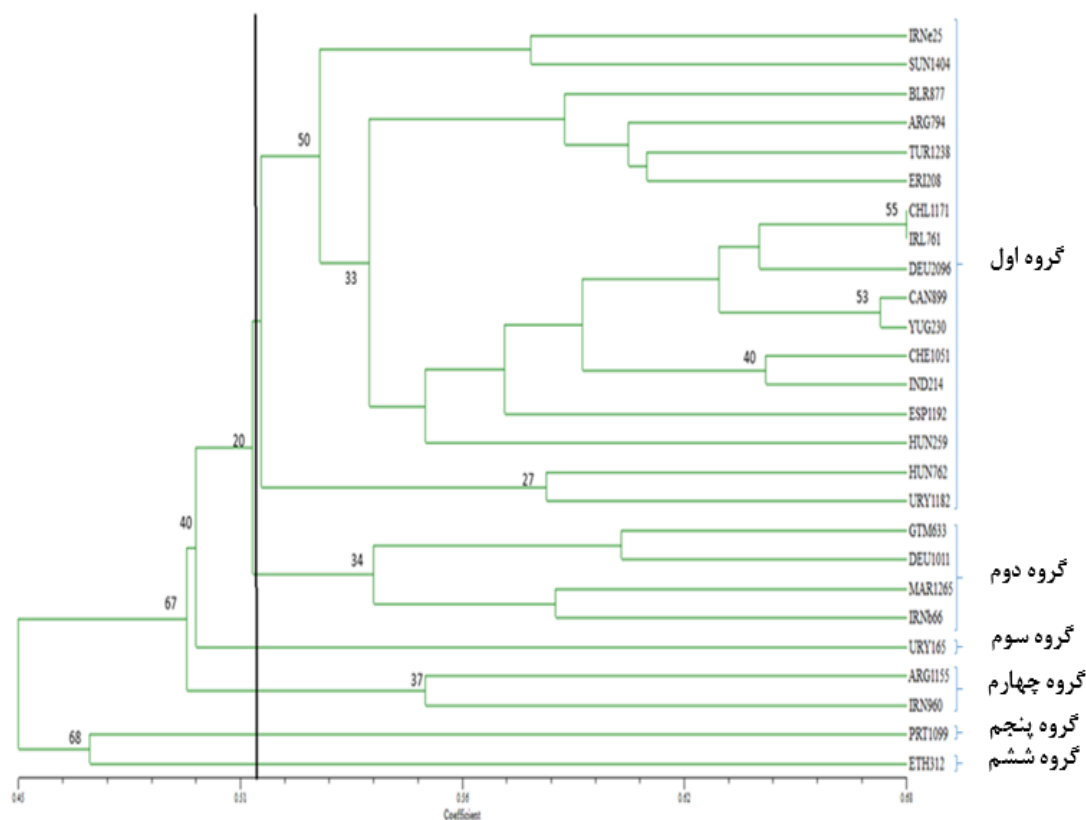
۷-۴ گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نتایج نشانگرهای ISSR

به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های صفر و یک حاصل از امتیازدهی باندهای تولید شده توسط نشانگرهای ISSR، سه ضریب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده برای ژنوتیپ‌ها محاسبه شد. بر اساس آزمون نیکوئی برازش به دست آمده، ضریب تشابه جاکارد با بیشترین میزان همبستگی کوفنتیک ($r=0/80$) برازش بهتری به داده‌های حاصل از تکثیر ژنوتیپ‌ها داد و به عنوان مناسب‌ترین ضریب تشابه برای ترسیم دندروگرام انتخاب گردید. وینسرووا و وینسر (۲۰۰۴) و همچنین راجووید و همکاران (۲۰۱۰) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام بزرک با استفاده از نشانگرهای ISSR، مناسب‌ترین ضریب تشابه را ضریب تشابه جاکارد را گزارش نمودند.

ضریب تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها در دامنه‌ای از ۰/۳۴ تا ۰/۶۸ متغیر بود. بیشترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های شیلی ۱۱۷۱ و ایرلند ۷۶۱ با (ضریب تشابه = ۰/۶۸) و کمترین میزان شباهت بین ژنوتیپ‌های پرتغال ۱۰۹۹ و اروگوئه ۱۶۵ (ضریب تشابه = ۰/۳۵) مشاهده شد.

بر اساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تجزیه‌ای خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها به شش گروه مشخص گروه‌بندی شدند و نمودار حاصل با الگوریتم UPGMA ترسیم شد و تعداد مطلوب خوشه به روش Bootstrap تعیین گردید (شکل ۴-۵). در گروه یک ژنوتیپ‌های ایران ۲۵، روسیه ۱۴۰۴، بلاروس ۸۷۷، آرژانتین ۷۹۴، شیلی ۱۱۷۱، آلمان ۲۰۹۶، سوئیس ۱۰۵۱، ترکیه ۱۲۳۸، هند ۲۱۴، ایرلند ۷۶۱، اریتره ۱۲۰۸، مجارستان ۲۵۹، کانادا ۸۹۹، یوگسلاوی ۲۳۰، اسپانیا ۱۱۹۲، مجارستان ۷۶۲، اروگوئه ۱۱۸۲ قرار گرفتند. گروه دو شامل ژنوتیپ‌های گواتمالا ۶۳۳، مراکش ۱۲۶۵، ایران ۶۶، آلمان ۱۰۱۱ بودند. ژنوتیپ‌های ایران ۹۶۰ و آرژانتین ۱۱۵۵ نیز به‌طور مشترک در گروه سوم قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های اروگوئه ۱۶۵، پرتغال ۱۰۹۹ و انیویی ۳۱۲ به ترتیب در گروه‌های چهارم، پنجم و ششم قرار گرفتند. فو (۲۰۰۵) در بررسی ژنوتیپ‌های

بزرگ موجود در مراکز بزرگ شامل شبه قاره هند، آفریقا، خاور نزدیک و مدیترانه (اروپا) با استفاده از نشانگر RAPD مشاهده کرد که ژنوتیپ‌های شبه قاره هند از ژنوتیپ‌های مناطق دیگر متمایز بودند، اما در این پژوهش، ژنوتیپ‌های هر منطقه در گروه‌های مختلف قرار داشتند که این می‌تواند بیانگر وجود تنوع ژنتیکی زیاد در هر منطقه جغرافیایی و عدم تمرکز منابع ژنتیکی با ویژگی‌های خاص در هر ناحیه است.



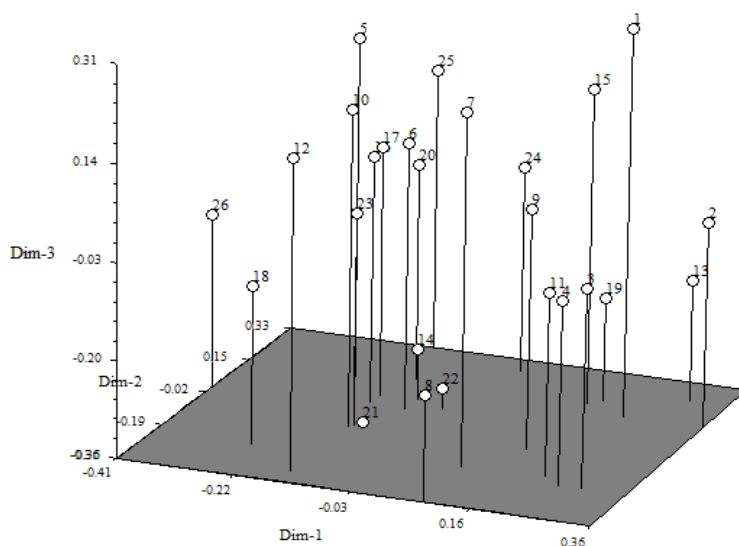
شکل ۴-۵: نمودار حاصل از تجزیه‌ای خوشه‌ای با الگوریتم UPGMA با استفاده از ماتریس تشابه داده‌های مولکولی ISSR

۴-۸ نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های مولکولی

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCoA)، تبدیلی در فضای برداری است که بیشتر برای کاهش ابعاد مجموعه‌ی داده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و در سال ۱۹۰۱ توسط پیرسون ارائه شد. این آنالیز شامل تجزیه به مقادیر ویژه‌ی ماتریس کوواریانس می‌باشد. این تکنیک براساس داده‌های مولکولی در آنالیز تنوع ژنتیکی نیز کاربرد دارد و می‌توان از آن برای نمایش سه بعدی پراکنش افراد استفاده کرد. تجمع افراد در یک ناحیه از نمودار نشان دهنده‌ی تشابه ژنتیکی افراد می‌باشد. همچنین این آنالیز در مطالعات مولکولی نشان‌دهنده‌ی نحوه توزیع نشانگرهای مورد استفاده در سطح ژنوم می‌باشد. براساس نتایج به دست آمده، درصد مقادیر ویژه‌ی سه مؤلفه‌ی اول یا PCoA1، PCoA2 و PCoA3 به ترتیب ۸/۲۴، ۶/۹۴ و ۶/۶۱ (مجموعاً ۲۱/۸۱ درصد) از واریانس کل بود. با توجه به مقادیر پایین به دست آمده، چنین استنباط می‌شود نشانگرهای مورد استفاده دارای توزیع نسبتاً مناسبی در سطح ژنوم بوده و در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف مورد مطالعه، مناسب عمل کرده‌اند (جدول ۴-۸). در شکل (۴-۶) نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های مولکولی نشانگرهای ISSR نشان داده شده است. نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تا حدودی گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد و توانست ژنوتیپ‌ها را تفکیک کند. با توجه به اینکه بیش از ۲۱ درصد تغییرات مولکولی توسط سه مؤلفه اول توجیه نمی‌شوند، این امر سبب عدم تطابق کامل نتایج گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌شود. شایان ذکر است که کم بودن درصد توجیه تغییرات مولکولی در تجزیه‌های چندمتغیره مانند تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌تواند ناشی از توزیع مناسب نشانگرهای مولکولی در سراسر ژنوم و در نتیجه عدم کفایت سه مؤلفه اول برای توجیه حداکثر تغییرات مولکولی باشد. از طرف دیگر توزیع مناسب نشانگرها در سراسر ژنوم به مفهوم ارزیابی دقیق‌تر و بهتر تنوع مولکولی به دلیل نمونه‌برداری مناسب از کل ژنوم است (فاضلی و چیقامیزرا، ۲۰۱۱؛ محمدی و پارسانا، ۲۰۰۳).

جدول ۴-۸: نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشانگرهای ISSR

مؤلفه ها	مقادیر ویژه	درصد مقادیر ویژه	درصد تجمعی
۱	۱/۰۲	۸/۲۴	۸/۲۴
۲	۰/۸۴	۶/۹۴	۱۵/۱۹
۳	۰/۸۰	۶/۶۱	۲۱/۸۱



شکل ۴-۶: نمای حاصل از ترسیم سه مؤلفه اول بدست آمده در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های ISSR

۱. ایران ۲۵، ۲. روسیه ۱۴۰۴، ۳. بلاروس ۸۷۷، ۴. آرژانتین ۷۹۴، ۵. شیلی ۱۱۷۱، ۶. آلمان ۲۰۹۶، ۷. سوئیس ۱۰۵۱، ۸. ترکیه ۱۲۳۸، ۹. هند ۲۱۴، ۱۰. ایرلند ۷۶۱، ۱۱. اریتره ۱۲۰۸، ۱۲. پرتغال ۱۰۹۹، ۱۳. آرژانتین ۱۱۵۵، ۱۴. اروگوئه ۱۶۵، ۱۵. مجارستان ۲۵۹، ۱۶. کانادا ۸۹۹، ۱۷. یوگسلاوی ۲۳۰، ۱۸. اسپانیا ۱۱۹۲، ۱۹. ایران ۹۶۰، ۲۰. تیویپی ۳۱۲، ۲۱. مجارستان ۷۶۲، ۲۲. اروگوئه ۱۱۸۲، ۲۳. گواتمالا ۶۳۳، ۲۴. مراکش ۱۲۶۵، ۲۵. ایران ۶۶، ۲۶. آلمان ۱۰۱۱

۹-۴ نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام صفات زراعی - مورفولوژیک و داده‌های

مولکولی

نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام بین باندهای چندشکل ۲۱ نشانگر ISSR و ۱۴ صفات زراعی - مورفولوژیک نشان داد که برخی از نشانگرهای ISSR همبستگی معنی‌داری با این صفات دارند (جدول ۴-۹). ۱۵ نشانگر (بیشترین تعداد نشانگر) قطعاتی با ضریب ارتباط مختلف به صفت روز تا ۵۰ درصد سبز شدن تولید نمودند، و در حالی که تنها ۵ نشانگر (کمترین تعداد نشانگر) موفق به تکثیر قطعات مرتبط با صفت تعداد کپسول در بوته تعلق شدند (جدول ۴-۱۰). صفات شاخص برداشت و عملکرد دانه در بوته به ترتیب از بیشترین (۲۷ باند آگاهی‌بخش) و کمترین (۸ باند آگاهی‌بخش) تعداد قطعه‌ی تکثیر شده‌ی مرتبط برخوردار بودند (۴-۱۱).

۹-۴-۱ صفت تعداد روز تا ۵۰ درصد سبز شدن

۱۵ نشانگر ISSR ذکر شده در جدول ۴-۱۰ با تکثیر ۲۶ باند آگاهی‌بخش (جدول ۴-۱۱) توانستند در مجموع با داشتن ضریب تبیین تصحیح شده‌ای معادل ۸۳ درصد تغییرات صفت روز تا ۵۰ درصد سبز شدن را توجیه کنند. از ۲۶ نشانگر وابسته به صفت روز تا ۵۰ درصد سبز شدن، باند آگاهی‌بخش UBC811 با اندازه ۳۰۰ جفت‌باز دارای بیشترین R^2 جزء به میزان ۳۹ درصد بود.

۹-۴-۲ صفت تعداد روز تا گلدهی

صفت تعداد روز تا گلدهی همبستگی معنی‌داری را با ۲۴ باند آگاهی‌بخش تکثیر شده (جدول ۴-۱۱) توسط ۱۲ نشانگر ISSR (جدول ۴-۱۰) نشان داد، که R^2 تصحیح شده توسط این نشانگرها ۸۵ درصد بود. در بین نشانگرهای وابسته به این صفت، بیشترین مقدار R^2 جزء به نشانگر (باند آگاهی‌بخش) PCT1 با

اندازه ۱۶۰۰ جفت‌باز با میزان ۳۳ درصد تعلق داشت. شرفی و مجیدی (۱۳۹۳) در مطالعه‌ی ارتباط صفات مورفولوژیک با نشانگرهای SSR گونه‌های جنس براسیکا، ارتباط ۱۳ نشانگر با میزان R^2 تصحیح شده‌ای معادل ۹۸ درصد را گزارش نمودند.

۴-۹-۳ صفت تعداد روز تا رسیدگی

۸ نشانگر (PCT1 ,PCT4 ,3PCT1 ,IP5 ,3PCT6 ,UBC808 ,UBC810 ,UBC811) با R^2 معادل ۸۳ درصد، تغییرات صفت روز تا رسیدگی را تبیین نمودند (جدول ۴-۱۰). از میان ۱۸ باند آگاهی بخش تکثیر شده توسط این ۸ نشانگر، نشانگر PCT1 با R^2 جزء ۶۷ درصد و اندازه ۱۶۰۰ جفت‌باز بیشترین ارتباط را با این صفت نسبت به سایر باندهای وابسته نشان داد (جدول ۴-۱۱). روی و همکاران (۲۰۰۶) نیز در بررسی ارتباط ۱۴ صفت مورفولوژیک گندم نان با ۲۰ نشانگر SSR، ارتباط ۱۲ نشانگر (R^2 معادل ۱۶ درصد) با صفت روز تا رسیدگی را گزارش نمودند.

۴-۹-۴ صفت ارتفاع بوته

در این مطالعه، صفت ارتفاع بوته با ۱۷ باند آگاهی‌بخش تکثیر شده توسط ۱۲ نشانگر ($R^2=۸۱$) درصد) ارتباط معنی‌داری داشت (جداول ۴-۱۰ و ۴-۱۱). باند آگاهی‌بخش UBC808 با اندازه ۵۰۰ جفت‌باز، بیشترین ضریب تبیین تصحیح‌شده (۳۸ درصد) را نشان داد. عبدالهی مندولکانی و عزیزی (۱۳۹۳) ارتباط ۴ نشانگر با صفت ارتفاع بوته ($R^2=۴۳$ درصد) در یونجه زراعی گزارش نمودند و شرفی و مجیدی (۱۳۹۳) نیز ۳ نشانگر مرتبط با این صفت را در گیاه کلزا یافتند (ضریب تبیین برابر ۶۵ درصد) ولی هونس‌دورف و همکاران (۲۰۱۰) ارتباطی بین نشانگرهای AFLP با صفت ارتفاع بوته در کلزای زمستانه نیافتند.

۴-۹-۵ صفت تعداد شاخه در بوته

۱۲ نشانگر ذکر شده در جدول ۴-۱۰ با ضریب تبیین تصحیح شده‌ی معادل ۸۱ درصد مجموع تغییرات صفت تعداد شاخه در بوته را توجیه نمودند. این صفت با ۱۹ باند آگاهی‌بخش تکثیر شده توسط ۱۲ نشانگر همبستگی نشان داد (جدول ۴-۱۱). نشانگر 3PCT6 با اندازه ۸۰۰ جفت‌باز و ضریب تبیین تصحیح شده‌ی معادل ۲۴ درصد بیشترین ارتباط را داشت. شرفی و مجیدی (۱۳۹۳) ارتباط ۴ نشانگر SSR با صفت تعداد شاخه در بوته ($R^2=۸۷$ کل درصد) را گزارش نمودند.

۴-۹-۶ صفت عملکرد بیولوژیک

نتایج تجزیه رگرسیون، ارتباط ۱۰ نشانگر را با صفت عملکرد بیولوژیک نشان داد. این نشانگرها با ضریب تبیین تصحیح شده‌ی معادل ۶۷ درصد مجموع تغییرات این صفت را توجیه نمودند (جدول ۴-۱۰). ۱۰ نشانگر، ۱۷ باند آگاهی‌بخش تکثیر نمودند، که در این بین، باند 3PCT2 با اندازه ۱۷۰۰ و ضریب تبیین تصحیح شده‌ی ۳۴ درصد بیشترین ارتباط را نشان داد (جدول ۴-۱۱).

۴-۹-۷ صفت قطر کپسول

صفت قطر کپسول همبستگی معنی‌داری را با ۱۵ باند آگاهی‌بخش تکثیر شده (جدول ۴-۱۱) توسط ۱۰ نشانگر ISSR (جدول ۴-۱۰) نشان داد، که مجموع R^2 تصحیح شده توسط آن‌ها ۷۶ درصد بود. در بین نشانگرهای وابسته به این صفت، بیشترین مقدار R^2 جزء به نشانگر (باند آگاهی‌بخش) PCT1 با اندازه ۱۵۰۰ جفت‌باز با میزان ۲۱ درصد تعلق داشت.

۸-۹-۴ صفت تعداد دانه در کپسول

۱۴ نشانگر ذکر شده در جدول ۴-۱۰ با ضریب تبیین تصحیح شده‌ی معادل ۹۰ درصد مجموع تغییرات صفت تعداد دانه در کپسول را توجیه نمودند. این صفت با ۲۵ باند آگاهی بخش تکثیر شده توسط ۱۴ نشانگر همبستگی نشان داد (جدول ۴-۱۱). نشانگر UBC811 با اندازه‌ی ۳۵۰ جفت باز و ضریب تبیین تصحیح شده‌ای معادل ۳۹ درصد بیشترین ارتباط را داشت. شرفی و مجیدی (۱۳۹۳) ارتباط ۵ نشانگر SSR با صفت تعداد دانه در غلاف گیاه کلزا ($R^2=۹۲$ کل درصد) را گزارش نمودند. عبدالهی مندولکانی و همکاران (۱۳۸۹) نیز ارتباط ۶ نشانگر ریزماهواره با صفت تعداد دانه در غلاف بادام زمینی را شناسایی کردند ($R^2=۶۸$ کل درصد)

۹-۹-۴ صفت تعداد کپسول در بوته

کمترین تعداد ارتباط نشانگر با صفت در این پژوهش به صفت تعداد کپسول در بوته تعلق داشت. به طوریکه تنها ۵ نشانگر (PCT5, PCT6, 3PCT2, 3PCT5L, IP5) با R^2 معادل ۷۴ درصد کل تغییرات صفت تعداد کپسول در بوته را تبیین نمودند (جدول ۴-۱۰). از میان ۱۲ باند آگاهی بخش تکثیر شده توسط این ۵ نشانگر، نشانگر 3PCT2 با R^2 جزء ۳۸ درصد و اندازه ۱۷۰۰ جفت باز بیشترین ارتباط را با این صفت نسبت به سایر باندهای وابسته نشان داد (جدول ۴-۱۱). در نتایج حاصل از پژوهش شرفی و مجیدی (۱۳۹۳) و عبدالهی مندولکانی و همکاران (۱۳۸۹) نیز صفت تعداد کپسول در بوته کمترین تعداد ارتباط با نشانگرهای مورد مطالعه را داشتند (به ترتیب ۲ نشانگر و ۵ نشانگر).

۱۰-۹-۴ صفت وزن صد دانه

در این پژوهش صفت وزن صد دانه با ۱۳ نشانگر ارتباط نشان داد، این نشانگرها ضریب تبیین

تصحیح شده‌ای برابر با ۸۶ درصد داشتند (جدول ۴-۱۰). نشانگرهای مذکور ۱۷ نشانگر آگاهی‌بخش تکثیر نمودند که از این میان نشانگر PCT5 با اندازه ۴۵۰ جفت‌باز و R^2 معادل ۴۰ درصد بیشتر میزان ارتباط را داشت (جدول ۴-۱۱). سوتوسردا و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی ارتباط نشانگر مولکولی SSR و صفات زراعی بزرگ کانادایی، ارتباط ۵ نشانگر با R^2 برابر با ۳۰ درصد برای صفت وزن هزار دانه را گزارش نمود.

۴-۹-۱۱ صفت عملکرد دانه در بوته

صفت عملکرد دانه در بوته با ۸ نشانگر که در مجموع ۶۴ درصد از تغییرات این صفت را تبیین نمودند، مرتبط بود. در بین ۸ نشانگر آگاهی‌بخش وابسته به این صفت، نشانگر IP5 با اندازه ۸۰۰ جفت‌باز از بالاترین میزان ضریب تبیین جزء (۳۰ درصد) برخوردار بود (جدول ۴-۱۰ و ۴-۱۱). شرفی و مجیدی (۱۳۹۳) ارتباط ۱۱ نشانگر SRR را با صفت عملکرد دانه در بوته کلزا را گزارش نمودند ($R^2=۹۵$ کل درصد). عبدالهی مندولکانی و همکاران (۱۳۸۹) نیز ارتباطی میان این صفت با ۵ نشانگر ریزماهواره در بادام زمینی به دست آوردند.

۴-۹-۱۲ صفت شاخص برداشت

صفت شاخص برداشت همبستگی معنی‌داری را با ۲۷ باند آگاهی‌بخش تکثیر شده (جدول ۴-۱۱) توسط ۱۴ نشانگر ISSR ذکر شده در جدول ۴-۱۰ نشان داد، مجموع R^2 تصحیح شده توسط این نشانگرها برابر با ۶۱ درصد بود. از میان ۲۷ نشانگر وابسته به این صفت، بیشترین مقدار R^2 جزء به نشانگر (باند آگاهی‌بخش) UBC808 با اندازه‌ی ۵۰۰ جفت‌باز با میزان ۲۷ درصد تعلق داشت. شرفی و مجیدی (۱۳۹۳) ارتباط ۳ نشانگر SRR با ضریب تبیینی معادل ۸۳ درصد با صفت شاخص برداشت در کلزا را گزارش نمودند.

۴-۹-۱۳ صفت عملکرد دانه در هکتار

نتایج تجزیه رگرسیون، ارتباط ۱۱ نشانگر را با صفت عملکرد دانه در هکتار نشان داد. این نشانگرها با ضریب تبیین تصحیح شده‌ای معادل ۷۷ درصد، مجموع تغییرات این صفت را توجیه نمودند (جدول ۴-۱۰). ۱۱ نشانگر، ۱۵ باند آگاهی بخش تکثیر نمودند، که باند PCT1 با اندازه ۴۵۰ جفت‌باز و ضریب تبیین تصحیح شده‌ی ۳۵ درصد بیشترین ارتباط را نشان داد (جدول ۴-۱۱).

۴-۹-۱۴ صفت وزن دانه در کپسول

۱۲ نشانگر (UBC808 ,PCT6a ,3PCT6 ,PCT6 ,IP4 ,IP3 ,IP2 ,3PCT1 ,PCT3 ,PCT2 ,3PCT5L ,UBC811) با R^2 معادل ۸۰ درصد، مجموع تغییرات صفت وزن دانه در کپسول را تبیین نمودند (جدول ۴-۱۰). از میان ۱۷ باند آگاهی بخش تکثیر شده توسط این ۱۲ نشانگر، نشانگر 3PCT1 با R^2 جزء ۲۲ درصد و اندازه ۹۰۰ جفت‌باز بیشترین ارتباط را با این صفت نسبت به سایر باندهای وابسته نشان داد (جدول ۴-۱۱).

جدول ۴-۹: جزئیات تجزیه واریانس رگرسیون گام به گام ۲۱۸ باند چندشکل نشانگر ISSR و ۱۴ صفت زراعی - مورفولوژیک

ISSR compelet	df	ISSR informative	df	منبع واریانس	صفت
۲۰/۴۹*	۱۱	۲۵/۸۱**	۱	X (رگرسیون)	تعداد روز تا ۵۰٪ سبزشدن
۰/۳۷	۱۴	۰/۶۳	۲۴	Y (خطا)	
۲۸/۷۷**	۱۲	۳۰/۲۸**	۱	X (رگرسیون)	تعداد روز تا گلدهی
۳/۲۸	۱۳	۵/۶۹	۲۴	Y (خطا)	
۱۳/۹۶**	۷	۱۶/۷۷**	۱	X (رگرسیون)	تعداد روز تا رسیدگی
۰/۲۳	۱۸	۰/۳۴	۲۴	Y (خطا)	
۴۳/۵۶*	۱۳	۶۱/۶۳**	۱	X (رگرسیون)	ارتفاع
۶/۸۸	۱۲	۱۰/۲۳	۲۴	Y (خطا)	
۵/۶۹**	۱۲	۶/۴۷**	۱	X (رگرسیون)	تعداد شاخه در بوته
۰/۳۶	۱۳	۰/۷۸	۲۴	Y (خطا)	
۲۵/۰۱**	۱۰	۴۲/۴۶**	۱	X (رگرسیون)	عملکرد بیولوژیک
۶/۲۴	۱۵	۹/۴۰	۲۴	Y (خطا)	
۸/۴۸**	۱۱	۱۰/۹۰**	۱	X (رگرسیون)	قطر کپسول
۲/۴۳	۱۴	۶/۶۳	۲۴	Y (خطا)	
۲۶/۰۴**	۱۱	۳۱/۶۷**	۱	X (رگرسیون)	تعداد دانه در کپسول
۲/۵۲	۱۴	۴/۹۹	۲۴	Y (خطا)	
۲۳/۷۲**	۵	۴۰/۵۶**	۱	X (رگرسیون)	تعداد کپسول در بوته
۱۲/۹۰	۲۰	۱۵/۷۵	۲۴	Y (خطا)	
۲۸/۶۵**	۱۲	۳۴/۲۸**	۱	X (رگرسیون)	وزن صدانه
۶/۱۲	۱۳	۹/۷۰	۲۴	Y (خطا)	
۴۲/۶۴**	۸	۵۶/۴۶*	۱	X (رگرسیون)	عملکرد دانه در بوته
۱۴/۲۸	۱۷	۲۵/۲۰	۲۴	Y (خطا)	
۳۳/۲۷ ^{ns}	۱۲	۴۶/۷۶**	۱	X (رگرسیون)	شاخص برداشت
۴/۳۸	۱۳	۶/۵۰	۲۴	Y (خطا)	
۲۶۹/۶۸**	۱۱	۴۲۵/۵۰**	۱	X (رگرسیون)	عملکرد در هکتار
۲۹/۲۷	۱۴	۳۴/۳۸	۲۴	Y (خطا)	
۱۳/۶۲**	۱۰	۱۵/۵۹*	۱	X (رگرسیون)	وزن دانه در کپسول
۴/۱۰	۱۵	۶/۸۰	۲۴	Y (خطا)	

ISSR informative: میانگین مربعات نشانگری که بیشترین R^2 برای صفت مورد نظر را دارد.

ISSR compelet: میانگین مربعات مجموع کل نشانگرها برای صفت مورد نظر.

^{ns}، * و ** به ترتیب عدم اختلاف معنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۵ و یک درصد.

جدول ۴-۱۰: فهرست نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات مختلف و درصد ضریب تبیین آن‌ها

صفت	نشانگرها	R ² تصحیح شده (%)
روز تا ۵۰٪ سبز شدن	PCT1,PCT3,PCT4,PCT6,3PCT1,3PCT2,3PCT5L,IP2,IP4,3PCT6,PCT6a,UBC807,UBC808,UBC811,UBC815	۸۳
روز تا گلدهی	PCT1,PCT3,PCT4, 3PCT1,3PCT2, IP2,IP5, 3PCT6, UBC808, UBC810,UBC811,UBC815	۸۵
روز تا رسیدگی	PCT1, PCT4, 3PCT1, ,IP5, 3PCT6, UBC808, UBC810,UBC811	۸۳
ارتفاع بوته	PCT1, PCT4, 3PCT2,3PCT5L,IP4,IP5,3PCT6,PCT6a, UBC808,UBC810,UBC811,UBC815	۸۱
تعداد شاخه در بوته	PCT1, PCT4, PCT6, 3PCT1,3PCT2, 3PCT5L,IP2,IP4,IP5,3PCT6,UBC808,UBC811	۸۱
عملکرد بیولوژیک	PCT1,PCT5,PCT6,3PCT1,3PCT2,3PCT5L,IP3 ,IP5,UBC811,UBC815	۶۷
قطر کپسول	PCT1,PCT2,PCT4,PCT6,3PCT5L,IP2,IP4,3PCT6,PCT6a,UBC810	۷۶
تعداد دانه در کپسول	PCT4,PCT5,PCT6, 3PCT1,3PCT2, IP2,IP3,IP4,IP5, PCT6,3PCT6,PCT6a,UBC808,UBC810,UBC811	۹۰
تعداد کپسول در بوته	PCT5,PCT6,3PCT2,3PCT5L,IP5	۷۴
وزن ۱۰۰ دانه	PCT2,PCT5,3PCT1,3PCT2,3PCT5L,IP2,IP3,IP4,IP5, 3PCT6,PCT6a,UBC807,UBC811	۸۶
عملکرد دانه در بوته	PCT2,PCT3,PCT5,PCT6,3PCT2,3PCT5L,IP4, IP5	۶۴
شاخص برداشت	PCT3,PCT4, PCT5,PCT6,3PCT2,3PCT5L, IP2,IP3,IP4,PCT6,PCT6a,UBC808,UBC811,UBC815	۶۱
عملکرد در هکتار	PCT1,PCT2,PCT4, PCT5, 3PCT5L, IP4, IP5,3PCT6, PCT6a,UBC808, UBC815	۷۷
وزن دانه در کپسول	PCT2,PCT3, 3PCT1, ,3PCT5L, IP2,IP3,IP4,PCT6, 3PCT6, PCT6a,UBC808, UBC811	۸۰

جدول ۴-۱۱: نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام باندهای چندشکل نشانگر ISSR با صفات زراعی - مورفولوژیک

سطح احتمال <i>P</i> value	R ² جزء تصحیح شده(%)	طول باند(جفت باز)	نشانه‌های آگاهی بخش	صفت
۰/۰۹۶	۰/۱۱۰	۸۰۰	PCT3	روز تا ۵۰ درصد سبز شدن
۰/۰۴۳	۰/۱۵۹	۱۶۰۰	PCT4	
۰/۰۴۷	۰/۱۵۳	۵۵۰	PCT6	
۰/۰۳۵	۰/۱۵۱	۱۱۰۰	PCT6	
۰/۰۷۳	۰/۰۹۶	۴۰۰	PCT6	
۰/۰۲۰	۰/۱۸۱	۵۰۰	IP2	
۰/۰۱۸	۰/۲۰۹	۳۸۰	IP4	
۰/۰۱۵	۰/۱۸۲	۵۰۰	IP4	
۰/۰۴۶	۰/۱۵۵	۸۰۰	3PCT6	
۰/۰۴۲	۰/۱۴۱	۵۵۰	3PCT6	
۰/۰۳۴	۰/۱۷۳	۴۹۰	PCT6a	
۰/۰۸۰	۰/۱۰۴	۴۲۰	PCT6a	
۰/۰۱۱	۰/۲۳۸	۶۰۰	UBC807	
۰/۰۰۰۶	۰/۳۹۰	۳۰۰	UBC811	
۰/۰۴۲	۰/۱۰۱	۴۰۰	UBC811	
۰/۰۲۶	۰/۱۰۳	۹۰۰	UBC811	
۰/۰۲۲	۰/۱۹۹	۳۵۰	UBC815	
۰/۰۹۱	۰/۱۱۴	۱۲۰۰	3PCT1	
۰/۰۴۵	۰/۱۴۳	۲۵۰	3PCT1	
۰/۰۳۳	۰/۱۲۹	۹۰۰	3PCT1	
۰/۰۷۰	۰/۰۸۰	۱۱۰۰	3PCT1	
۰/۰۰۲	۰/۳۱۶	۴۰۰	3PCT5L	
۰/۰۲۰	۰/۱۴۴	۴۸۰	3PCT5L	
۰/۰۵۳	۰/۰۸۶	۵۰۰	3PCT5L	
۰/۰۸۰	۰/۱۲۲	۹۰۰	PCT1	
۰/۰۲۲	۰/۱۹۹	۴۰۰	3PCT2	

سطح احتمال <i>P</i> value	R ² جزء تصحیح شده(%)	طول باند(جفت باز)	نشانه‌های آگاهی بخش	صفت
.۰۰۵۵	.۰۰۸۵	۱۸۰۰	PCT1	روز تا گلدهی
.۰۰۰۱	.۰۳۳۰	۱۶۰۰	PCT1	
.۰۰۳۴	.۰۱۱۹	۱۶۵۰	PCT1	
.۰۰۸۵	.۰۱۱۸	۱۱۰۰	PCT3	
.۰۰۹۹	.۰۱۰۰	۷۰۰	PCT3	
.۰۰۱۰	.۰۲۴۴	۶۰۰	PCT4	
.۰۰۱۹	.۰۲۰۸	۳۰۰	3PCT1	
.۰۰۶۲	.۰۱۳۷	۱۴۰۰	3PCT2	
.۰۰۹۴	.۰۱۰۰	۲۷۰	3PCT2	
.۰۰۰۲	.۰۳۲۲	۱۶۰۰	IP5	
.۰۰۰۹	.۰۱۷۷	۸۰۰	IP5	
.۰۰۴۸	.۰۰۸۲	۳۸۰	IP5	
.۰۰۲۳	.۰۱۹۵	۴۰۰	3PCT6	
.۰۰۱۲	.۰۲۳۵	۵۲۰	UBC807	
.۰۰۸۱	.۰۰۹۶	۶۰۰	UBC807	
.۰۰۱۲	.۰۲۳۵	۵۰۰	UBC808	
.۰۰۸۱	.۰۰۹۶	۴۱۰	UBC808	
.۰۰۰۱	.۰۳۱۷	۷۰۰	UBC810	
.۰۰۱۲	.۰۲۳۳	۹۰۰	UBC811	
.۰۰۴۲	.۰۱۲۸	۸۲۰	UBC811	
.۰۰۹۵	.۰۰۷۷۰	۳۸۰	UBC811	
.۰۰۸۸	.۰۰۷۴۰	۴۰۰	UBC811	
.۰۰۲۲	.۰۱۹۹	۳۵۰	UBC815	
.۰۰۰۷	.۰۲۶۳	۱۲۰۰	IP2	
<.۰۰۰۰۱	.۰۶۷۰	۱۶۰۰	PCT1	روز تا رسیدگی
.۰۰۶۳	.۰۰۴۶	۹۰۰	PCT1	
.۰۰۰۳	.۰۱۱۰	۱۲۵۰	PCT2	
.۰۰۱۵	.۰۱۹۲	۷۸۰	PCT2	
.۰۰۱۱	.۰۲۳۷	۸۰۰	PCT4	
.۰۰۷۶	.۰۰۹۹	۵۵۰	PCT4	
.۰۰۷۳	.۰۰۸۰	۳۸۰	3PCT1	

سطح احتمال <i>P</i> value	R ² جزء تصحیح شده (%)	طول باند (جفت باز)	نشانه‌های آگاهی بخش	صفت
۰/۰۰۱	۰/۳۷۰	۱۶۰۰	IP5	
۰/۰۶۲	۰/۰۸۰	۳۸۰	IP5	
۰/۰۰۰۲	۰/۲۵۰	۵۰۰	IP5	
۰/۰۵۹	۰/۰۴۰	۷۰۰	IP5	
۰/۰۷۹	۰/۱۲۲	۴۰۰	3PCT6	
۰/۰۳۵	۰/۲۹۰	۵۴۰	3PCT6	
۰/۰۴۳	۰/۱۵۹	۵۰۰	UBC808	
<۰/۰۰۰۱	۰/۶۲۰	۷۰۰	UBC810	
۰/۰۰۸	۰/۰۸۷	۳۰۰	UBC810	
۰/۰۵۹	۰/۰۳۶	۳۲۰	UBC810	
۰/۰۰۹	۰/۲۵۱	۹۰۰	UBC811	
۰/۰۹۷	۰/۱۱۰	۹۰۰	PCT1	ارتفاع بوته
۰/۰۱۴	۰/۲۲۳	۶۸۰	PCT4	
۰/۰۶۹	۰/۱۳۱	۴۵۰	PCT6	
۰/۰۳۲	۰/۱۷۷	۳۳۰	3PCT2	
۰/۰۵۱	۰/۱۴۸	۲۰۰۰	3PCT5L	
۰/۰۸۹	۰/۱۰۲	۱۲۰۰	3PCT5L	
۰/۰۲۵	۰/۱۹۲	۴۲۰	IP4	
۰/۰۳۰	۰/۱۸۱	۴۰۰	3PCT6	
۰/۰۲۶	۰/۱۶۱	۴۳۰	3PCT6	
۰/۰۳۱	۰/۱۷۸	۵۵۰	PCT6a	
۰/۰۱۰	۰/۳۸۰	۵۰۰	UBC808	
۰/۰۶۱	۰/۰۸۸	۴۶۰	UBC808	
۰/۰۸۲	۰/۱۲۰	۶۳۰	UBC810	
۰/۰۱۰	۰/۲۴۲	۲۵۰	UBC811	
۰/۰۶۸	۰/۱۰۴	۲۱۰	UBC811	
۰/۰۹۸	۰/۰۷۷	۳۰۰	UBC811	
۰/۰۱۳	۰/۲۳۰	۱۸۰	UBC815	

سطح احتمال <i>P</i> value	R ² جزء تصحیح شده (/.)	طول باند(جفت باز)	نشانه‌های آگاهی بخش	صفت
۰/۰۵۳	۰/۱۴۷	۱۷۰۰	PCT1	تعداد شاخه در بوته
۰/۰۲۳	۰/۱۹۵	۱۶۰۰	PCT6	
۰/۰۳۹	۰/۱۶۵	۳۰۰	PCT6	
۰/۰۱۷	۰/۱۸۴	۴۰۰	PCT6	
۰/۰۱۸	۰/۲۱۰	۵۲۰	3PCT1	
۰/۰۶۳	۰/۱۳۶	۱۴۰۰	3PCT2	
۰/۰۵۲	۰/۱۳۳	۱۵۵۰	3PCT2	
۰/۰۲۳	۰/۱۹۶	۴۸۰	3PCT5L	
۰/۰۵۴	۰/۱۲۱	۱۰۰۰	3PCT5L	
۰/۰۸۹	۰/۰۸۵	۲۲۰	3PCT5L	
۰/۰۸۰	۰/۱۲۱	۱۲۰۰	IP2	
۰/۰۱۱	۰/۲۳۸	۴۲۰	IP4	
۰/۰۲۴	۰/۱۹۳	۱۶۰۰	IP5	
۰/۰۰۹	۰/۲۴۰	۸۰۰	3PCT6	
۰/۰۸۳	۰/۱۱۹	۷۰۰	UBC808	
۰/۰۹۵	۰/۱۰۲	۴۰۰	UBC808	
۰/۰۱۵	۰/۲۲۰	۹۰۰	UBC811	
۰/۰۷۳	۰/۱۰۰	۲۳۰	UBC811	
۰/۰۹۳	۰/۰۸۰	۳۶۰	UBC811	
۰/۰۷۵	۰/۱۲۶	۱۳۰۰	PCT2	عملکرد بیولوژیک
۰/۰۲۰	۰/۲۰۴	۱۲۰۰	PCT5	
۰/۰۲۳	۰/۱۶۱	۸۰۰	PCT5	
۰/۰۱۲	۰/۲۳۲	۳۰۰	PCT6	
۰/۰۸۶	۰/۱۱۷	۳۰۰	3PCT1	
۰/۰۳۷	۰/۱۵۴	۹۰۰	3PCT1	
۰/۰۰۱	۰/۳۴۰	۱۷۰۰	3PCT2	
۰/۰۵۱	۰/۱۴۸	۱۰۰۰	3PCT5L	
۰/۰۳۶	۰/۱۵۱	۴۸۰	3PCT5L	
۰/۰۰۹	۰/۲۴۹	۸۰۰	IP5	
۰/۰۸۸	۰/۰۹۰	۱۴۰۰	IP5	
۰/۰۰۴	۰/۲۰۹	۱۶۰۰	IP5	

سطح احتمال <i>P</i> value	R ² جزء تصحیح شده(./)	طول باند(جفت باز)	نشانه‌های آگاهی بخش	صفت
۰/۰۷۳	۰/۱۲۷	۴۰۰	IP3	
۰/۰۹۲	۰/۰۵۸	۳۸۰	IP5	
۰/۰۸۹	۰/۱۱۵	۹۰۰	UBC811	
۰/۰۵۷	۰/۱۴۲	۱۶۰	UBC815	
۰/۰۴۰	۰/۱۳۶	۳۹۰	UBC8115	
۰/۰۰۳	۰/۲۴۰	۱۵۰۰	PCT1	قطر کپسول
۰/۰۸۷	۰/۰۸۵	۵۸۰	PCT1	
۰/۰۱۶	۰/۲۱۸	۶۹۰	PCT2	
۰/۰۱۵	۰/۲۱۹	۲۸۰۰	PCT4	
۰/۰۲۰	۰/۱۶۴	۱۳۰۰	PCT4	
۰/۰۶۸	۰/۱۳۱	۴۸۰	PCT6	
۰/۰۳۸	۰/۱۶۶	۱۰۰۰	3PCT5L	
۰/۰۲۸	۰/۱۵۹	۴۸۰	3PCT5L	
۰/۰۲۱	۰/۲۰۰	۵۰۰	IP2	
۰/۰۳۵	۰/۱۷۱	۶۹۰	IP4	
۰/۰۱۰	۰/۲۱۱	۸۵۰	IP4	
۰/۰۲۷	۰/۱۸۶	۱۶۰۰	IP5	
۰/۰۶۴	۰/۱۳۵	۴۵۰	3PCT6	
۰/۰۳۲	۰/۱۷۷	۴۲۰	PCT6a	
۰/۰۶۳	۰/۱۳۵	۶۰۰	UBC810	
۰/۰۴۹	۰/۱۵۱	۱۲۰۰	PCT5	تعداد کپسول در بوته
۰/۰۰۳	۰/۲۷۳	۸۰۰	PCT5	
۰/۰۷۴	۰/۰۷۹	۶۰۰	PCT5	
۰/۰۱۱	۰/۲۳۷	۳۰۰	PCT6	
۰/۰۰۵	۰/۳۸۰	۱۷۰۰	3PCT2	
۰/۰۰۶	۰/۲۷۳	۱۰۰۰	3PCT5L	
۰/۰۱۶	۰/۱۶۴	۴۸۰	3PCT5L	
۰/۰۴۱	۰/۰۹۸	۱۵۰۰	3PCT5L	
۰/۰۰۷	۰/۲۶۳	۸۰۰	IP5	

سطح احتمال P value	R ² جزء تصحیح شده(./)	طول باند(جفت باز)	نشانه‌های آگاهی بخش	صفت
۰/۰۹۸	۰/۰۸۴	۱۴۰۰	IP5	
۰/۰۰۳	۰/۲۱۶	۳۸۰	IP5	
۰/۰۵۱	۰/۰۷۳	۱۶۰۰	IP5	
۰/۰۴۱	۰/۱۶۲	۶۰۰	PCT4	تعداد دانه در کیسول
۰/۰۷۶	۰/۱۰۹	۵۵۰	PCT4	
۰/۰۸۱	۰/۱۲۱	۴۸۰	PCT5	
۰/۰۴۴	۰/۱۵۷	۴۵۰	PCT6	
۰/۰۷۹	۰/۱۰۷	۴۰۰	PCT6	
۰/۰۳۱	۰/۱۷۹	۱۱۰۰	3PCT1	
۰/۰۲۵	۰/۱۹۲	۱۴۰۰	3PCT2	
۰/۰۰۷	۰/۲۶۴	۸۰۰	IP2	
۰/۰۰۷	۰/۲۶۴	۲۸۰	IP3	
۰/۰۰۷	۰/۲۶۴	۴۹۰	IP4	
۰/۰۲۸	۰/۱۸۳	۸۰۰	IP5	
۰/۰۳۴	۰/۱۴۷	۷۰۰	IP5	
۰/۰۳۵	۰/۱۲۴	۱۴۰۰	IP5	
۰/۰۰۰۷	۰/۳۸۶	۸۰۰	PCT6	
۰/۰۰۳	۰/۱۹۵	۴۰۰	PCT6	
۰/۰۴۷	۰/۱۵۳	۴۹۰	3PCT6	
۰/۰۰۷	۰/۲۶۴	۹۰۰	PCT6a	
۰/۰۱۲	۰/۱۷۷	۸۰۰	PCT6a	
۰/۰۰۷	۰/۲۶۴	۶۵۰	UBC808	
۰/۰۴۶	۰/۱۵۵	۶۰۰	UBC810	
۰/۰۸۹	۰/۱۰۱	۶۳۰	UBC810	
۰/۰۶۴	۰/۱۰۹	۷۵۰	UBC810	
۰/۰۰۰۶	۰/۳۹۰	۳۵۰	UBC811	
۰/۰۱۶	۰/۱۳۵	۱۸۰	UBC811	
۰/۰۹۵	۰/۰۵۶	۲۳۰	UBC811	
۰/۰۳۶	۰/۱۶۹	۲۸۰۰	PCT2	وزن صد دانه
۰/۰۰۰۵	۰/۴۰	۴۵۰	PCT5	

سطح احتمال P value	R^2 جزء تصحیح شده (%)	طول باند (جفت باز)	نشانه‌های آگاهی بخش	صفت
۰/۰۳۲	۰/۱۰۹	۸۸۰	PCT5	
۰/۰۲۰	۰/۲۰۲	۳۵۰	3PCT1	
۰/۰۷۵	۰/۱۰۴	۱۱۰۰	3PCT1	
۰/۰۰۰۷	۰/۳۸۳	۱۴۰۰	3PCT2	
۰/۰۷۳	۰/۱۲۷	۲۲۰	3PCT5L	
۰/۰۷۷	۰/۱۲۴	۵۰۰	IP2	
۰/۰۳۴	۰/۱۷۳	۲۴۰	IP3	
۰/۰۹۳	۰/۱۱۲	۵۶۰	IP4	
۰/۰۲۲	۰/۱۹۸	۴۲۰	IP5	
۰/۰۴۶	۰/۱۲۹	۳۸۰	IP5	
۰/۰۵۵	۰/۱۴۴	۴۵۰	3PCT6	
۰/۰۱۵	۰/۲۲۲	۴۹۰	PCT6a	
۰/۰۲۷	۰/۱۵۱	۱۱۰۰	PCT6a	
۰/۰۸۶	۰/۱۱۷	۶۰۰	UBC807	
۰/۰۵۱	۰/۱۴۹	۱۰۵۰	UBC811	
۰/۰۴۹	۰/۱۵۱	۴۰۰	PCT2	عملکرد دانه در بوته
۰/۰۶۷	۰/۱۳۲	۵۱۰	PCT3	
۰/۰۶۱	۰/۱۳۷	۸۰۰	PCT5	
۰/۰۰۶	۰/۲۴۱	۱۲۰۰	PCT5	
۰/۰۹۰	۰/۰۷۷	۶۰۰	PCT5	
۰/۰۲۷	۰/۱۸۵	۳۰۰	PCT6	
۰/۰۵۳	۰/۱۴۰	۳۶۰	IP4	
۰/۰۰۳	۰/۳۰	۸۰۰	IP5	
۰/۰۲۵	۰/۱۹۰	۱۰۰۰	PCT3	شاخص برداشت
۰/۰۴۲	۰/۱۶۰	۶۰۰	PCT4	
۰/۰۹۴	۰/۱۱۱	۸۰۰	PCT5	
۰/۰۱۱	۰/۲۳۷	۴۰۰	PCT6	
۰/۰۴۰	۰/۱۶۴	۲۳۰	3PCT2	
۰/۰۷۱	۰/۱۱۲	۱۶۰۰	3PCT2	
۰/۰۱۵	۰/۲۲۱	۴۵۰	3PCT5L	
۰/۰۳۳	۰/۱۴۱	۱۵۰۰	3PCT5L	

سطح احتمال P value	R ² جزء تصحیح شده(./)	طول باند(جفت باز)	نشانه‌های آگاهی بخش	صفت
۰/۰۴۷	۰/۱۰۶	۶۰۰	3PCT5L	
۰/۰۰۶	۰/۱۵۸	۴۸۰	3PCT5L	
۰/۰۴۶	۰/۱۵۵	۱۲۰۰	IP2	
۰/۰۱۰	۰/۲۱۳	۹۰۰	IP2	
۰/۰۲۴	۰/۱۳۱	۵۰۰	IP2	
۰/۰۵۹	۰/۱۳۹	۲۸۰	IP3	
۰/۰۵۳	۰/۱۴۷	۳۰۰	IP4	
۰/۰۷۹	۰/۱۰۸	۴۹۰	IP4	
۰/۰۳۰	۰/۱۸۰	۲۷۰	PCT6	
۰/۰۴۰	۰/۱۳۹	۶۰۰	PCT6	
۰/۰۵۹	۰/۱۳۹	۹۰۰	PCT6a	
۰/۰۸۵	۰/۱۰۶	۱۱۰۰	PCT6a	
۰/۰۱۱	۰/۲۷۰	۵۰۰	UBC808	
۰/۰۳۹	۰/۱۲۵	۴۱۰	UBC808	
۰/۰۳۳	۰/۱۱۳	۶۲۰	UBC808	
۰/۰۴۶	۰/۱۵۵	۸۲۰	UBC811	
۰/۰۲۹	۰/۱۶۱	۳۸۰	UBC811	
۰/۰۲۹	۰/۱۸۳	۲۹۰	UBC815	
۰/۰۶۰	۰/۱۱۸	۵۷۰	UBC815	
۰/۰۰۱	۰/۳۵۰	۴۵۰	PCT1	عملکرد در هکتار
۰/۰۳۷	۰/۱۶۸	۲۸۰۰	PCT2	
۰/۰۳۵	۰/۱۴۸	۲۵۰۰	PCT2	
۰/۰۵۸	۰/۱۰۵	۱۳۰۰	PCT2	
۰/۰۲۲	۰/۱۹۹	۸۰۰	PCT4	
۰/۰۹۷	۰/۱۱۰	۱۲۰۰	PCT5	
۰/۰۲۰	۰/۲۰۴	۱۰۰۰	3PCT5L	
۰/۰۵۹	۰/۱۱۶	۴۵۰	3PCT5L	
۰/۰۴۰	۰/۱۶۲	۸۵۰	IP4	
۰/۰۰۷	۰/۲۶۰	۳۸۰	IP3	
۰/۰۶۰	۰/۱۳۹	۵۵۰	3PCT6	
۰/۸۳۱	۰/۱۰۸	۴۰۰	3PCT6	

P سطح احتمال value	R ² جزء تصحیح شده(./)	طول باند(جفت باز)	نشانه‌های آگاهی بخش	صفت
۰/۰۹۳	۰/۱۱۲	۴۹۰	PCT6a	وزن دانه در کپسول
۰/۰۸۸	۰/۱۱۶	۷۰۰	UBC808	
۰/۰۴۴	۰/۱۵۸	۸۰۰	UBC815	
۰/۰۳۰	۰/۱۸۱	۹۰۰	PCT2	
۰/۰۱۹	۰/۲۰۸	۱۳۵۰	PCT3	
۰/۰۱۴	۰/۲۲۰	۹۰۰	3PCT1	
۰/۰۸۹	۰/۱۱۵	۹۶۰	3PCT5L	
۰/۰۷۴	۰/۱۲۶	۹۰۰	IP2	
۰/۰۷۴	۰/۱۲۶	۲۸۰	IP3	
۰/۰۴۴	۰/۱۵۸	۴۲۰	IP4	
۰/۰۸۹	۰/۱۰۰	۳۸۰	IP4	
۰/۰۱۶	۰/۱۷۴	۳۰۰	IP4	
۰/۰۱۹	۰/۲۰۸	۱۳۰۰	PCT6	
۰/۰۱۹	۰/۱۷۱	۲۷۰	PCT6	
۰/۰۵۰	۰/۱۴۹	۴۰۰	3PCT6	
۰/۰۷۴	۰/۱۲۶	۹۰۰	PCT6a	
۰/۰۵۵	۰/۱۴۴	۵۰۰	UBC808	
۰/۰۲۷	۰/۱۸۷	۳۸۰	UBC811	
۰/۰۵۸	۰/۱۱۹	۸۲۰	UBC811	
۰/۰۳۳	۰/۱۳۱	۲۳۰	UBC811	

۴-۱۰ بحث

نتایج تجزیه رگرسیون حاکی از آنست که برخی باندهای تکثیر شده توسط ۲۱ نشانگر ISSR با صفات زراعی - مورفولوژیک مورد مطالعه همبستگی داشتند. ژنوتیپ‌های بزرگ مورد مطالعه دارای تنوع بالایی از نظر خصوصیات زراعی - مورفولوژیک و مولکولی می‌باشند که، این تنوع بالا امکان ردیابی رابطی بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی را از طریق تجزیه رگرسیون گام به گام فراهم می‌کند. اکثر قطعات تکثیر شده توسط نشانگرهای ISSR با صفات زراعی - مورفولوژیک مورد مطالعه همبستگی نشان دادند. احتمالاً محل قرارگیری این باندهای آگاهی‌بخش در اطراف مناطقی از ژنوم می‌باشد که کدکننده ژن‌های مربوط به صفات مورد مطالعه است. به عنوان مثال صفت تعداد دانه در کپسول با ضریب تبیینی معادل ۹۸ درصد با ۲۵ باند آگاهی‌بخش تکثیر شده توسط ۱۴ نشانگر IP2, IP3, UBC810, UBC808, PCT4, PCT5, PCT6, 3PCT1, 3PCT2, PCT6a, IP4, IP5, 3PCT6 مرتبط بود که می‌توان از این نشانگرها جهت اشباع نقشه‌های لینکاژی و تعیین جایگاه این صفت، بهره برد (ورک و همکاران، ۱۹۹۶). از طرف دیگر ارتباط یک نشانگر با بیش از یک صفت می‌تواند ناشی از آثار پلیوتروپیک QTL‌های مرتبط با هم در صفات مختلف باشد و آثار پلیوتروپیک زمانی رخ می‌دهد که یک ژن بتواند به‌طور هم‌زمان در بروز چندین صفت تاثیر داشته باشد. سوتوسردا و همکاران (۲۰۱۴) نیز به نقش آثار پلیوتروپیک ژن‌ها در کنترل عملکرد و اجزای عملکرد دانه در بزرگ اشاره نمودند. لی و همکاران (۲۰۱۱) نتایج مشابهی را در بررسی ارتباط بین عملکرد ۲۰۳ رقم برنج با ۱۵۵ نشانگر SSR به‌دست آوردند. QTL‌های مرتبط با همدیگر که صفات مختلف را کنترل می‌کنند، می‌توانند به ایجاد یک نشانگر واحد منجر شوند که با بیش از یک صفت همبستگی داشته باشد. عبدالهی مندولکانی و عزیزی (۲۰۱۵) هم در بررسی ارتباط بین ۱۶ نشانگر ISSR با ۱۳ صفت زراعی - مورفولوژیک یونجه، ۷ نشانگر مرتبط با صفت

میزان کلروفیل را در این گیاه گزارش نمودند.

کوپر و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه‌ی تعیین ارتباط عملکرد و اجزای عملکرد ۱۱ رقم بزرک روغنی طی دو سال، همبستگی معنی‌داری بین دو صفت تعداد کپسول در بوته و وزن صدانه گزارش نمودند. نتایج مطالعه‌ی سعیدی و خدام‌باشی (۲۰۰۷) نیز بر وجود همبستگی معنی‌دار بین این دو صفت اشاره داشت. با توجه به همبستگی معنی‌دار بین این دو صفت در مطالعه حاضر، و با عنایت به اینکه در بین نشانگرهای مورد استفاده، سه نشانگر IP5, 3PCT5, PCT5 به‌طور مشترک با دو صفت تعداد کپسول در بوته و وزن صدانه همبستگی معنی‌داری نشان دادند، می‌توان استنباط کرد که ارتباط معنی‌دار بین نشانگرهای مذکور با این دو صفت به‌خوبی نتایج همبستگی معنی‌دار گزارش شده بین این دو صفت را تایید می‌کند، همچنین می‌توان گفت این سه نشانگر بیش از سایر نشانگرها مورد مطالعه در نواحی کدکننده دو صفت تعداد کپسول در بوته و وزن صدانه حضور داشته‌اند. احتمالاً ژن‌های مربوط به این صفات، ژن‌های نزدیک به هم در مکان‌های کروموزومی باشند و ممکن است در فراهم آوردن اطلاعات اولیه در خصوص انتخاب غیر مستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید باشند.

براساس نتایج حاصله، قطعه ۱۲۰۰ جفت‌بازی تکثیر شده توسط نشانگر 3PCT5L با صفات تعداد شاخه در بوته، تعداد کپسول در بوته، قطر کپسول و عملکرد دانه در بوته مرتبط بود. عملکرد دانه صفتی پیچیده، کمی و برآیندی از عوامل مختلف تاثیرگذار بر تولید می‌باشد و تظاهر فنوتیپی آن، علاوه بر ژنوتیپ، تحت تاثیر محیط و آثار متقابل ژنوتیپ و محیط قرار می‌گیرد. اگرچه درک ارتباط یک مکان ژنی با چنین صفتی دشوار است. با این حال نظر به مورفولوژی گیاه بزرک که گیاهی رشد محدود بوده و کپسول‌ها در انتهای شاخه تشکیل می‌شوند و تعداد شاخه‌ی بیشتر در این گیاه با تولید تعداد کپسول بیشتر در آن همراه می‌باشد و نیز با عنایت به اینکه هر دوی این صفات و نیز صفت قطر کپسول از اجزای

عملکرد این گیاه محسوب می‌شوند، در نتیجه، احتمالاً استفاده از نشانگر آگاهی‌بخش مذکور بتواند راهکار مؤثری در افزایش بازده ناشی از انتخاب برای عملکرد دانه از طریق صفات مذکور در گیاه بزرک باشد. این نتایج با یافته‌های کوپر و همکاران (۲۰۰۶)، بیدخوانی نژاد و همکاران (۱۳۹۳) و سعیدی و همکاران (۲۰۰۳) مبنی بر تأثیر دار اجزای عملکرد مانند صفت تعداد شاخه در بوته، تعداد کپسول در بوته و قطر کپسول بر عملکرد دانه‌ی این گیاه مطابقت داشت.

۴-۱۱ نتیجه‌گیری

۲۱ نشانگر ISSR گزینش شده در این پژوهش در مجموع ۸۳/۲۳ درصد چندشکلی را در بین ژنوتیپ‌های بزرک ارزیابی شده، تعیین نمودند. درصد چندشکلی نسبتاً بالای به دست آمده بیانگر وجود تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و قابلیت نشانگرهای ISSR مورد استفاده در شناسایی تنوع موجود می‌باشد. از بین نشانگرهای مورد بررسی، نشانگرهای PCT6، UBC811، UBC815، IP3، PCT2، 3PCT2 و 3PCT5L بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC = ۰/۴۹) را نشان دادند. بنابراین می‌توان بیان نمود که این نشانگرها، مناسب‌ترین نشانگرها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های بزرک مورد مطالعه می‌باشند.

با توجه به اثبات تنوع نسبتاً بالایی صفات زراعی-مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی ISSR، امکان تعیین میزان ارتباط این نشانگرها و صفات مورد بررسی فراهم شد. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون، در مجموع از میان ۲۱ نشانگر مورد مطالعه در پژوهش حاضر، نشانگرهای 3PCT2، 3PCT5L، IP5، 3PCT6، UBC811، UBC808 مقدار قابل توجهی از تغییرات صفات مورد بررسی را توجیه نمودند، که می‌توانند در مطالعات بعدی در لیست نشانگرهای مورد استفاده در تعیین جایگاه صفات کمی در این گیاه مورد استفاده قرار گیرند. در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق جهت نقشه‌یابی، در اختیار نبودن زمان کافی و نبود پیوستگی مناسب بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی از جمله مهمترین محدودیت‌ها در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی می‌باشد. مسلماً اطلاعات نشانگری به‌دست‌آمده در این تحقیق، جهت انتخاب نشانگرهای مناسب در تهیه نقشه‌های پیوستگی گیاه بزرک مفید خواهد بود. نتایج مطالعه حاضر و پژوهش‌های یاد شده نشان می‌دهد که در صورت استفاده از تعداد بیشتر نشانگر، امید شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش دارای همبستگی بالاتر با صفات مهم زراعی-

مورفولوژیک، به خصوص عملکرد و اجزای عملکرد، در گیاهانی مانند بزرک که مطالعه‌ی چندانی روی آن صورت نگرفته است، افزایش می‌یابد. همچنین با توالی‌یابی باندهای آگاهی‌بخش دارای ضریب تبیین بالا در توجیه هر یک از صفات گیاهی و پس از تأیید هم‌ردیفی آن در پایگاه‌های اطلاعاتی داده‌های ژنومی و طراحی نشانگرهای اختصاصی می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی انتخاب به کمک نشانگر در این گیاه بهره برد.

۴-۱۲ پیشنهادات

- نتایج مطالعه حاضر نشان داد چنانچه از نشانگرهای بیشتری استفاده شود می توان به شناسایی نشانگرهای که دارای همبستگی بالا با صفات مرتبط با عملکرد و اجزای عملکرد باشند امید داشت و از آنها در پژوهش هایی دیگر استفاده نمود.

- کاربرد سایر نشانگرهای مولکولی همانند SSR، RFLP، STS و SNP امکان شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش بیشتر همبسته با صفات مورد مطالعه را فراهم می کند.

- تهیه ژرم پلاسِم بزرگتر یافتن نشانگرهای پیوسته با صفات عملکرد و اجزای عملکرد را ایجاد می کند. لازم است نشانگرهای شناسایی شده در این مطالعه در جمعیت های بزرگتر و جمعیت های در حال تفرق مورد آزمون قرار داد تا از پیوستگی آنها با صفات مربوطه اطمینان به عمل آید و بدین ترتیب کارایی استفاده از این نشانگرهای آگاهی بخش در برنامه های اصلاحی افزایش یابد.

- نشانگرهای شناسایی شده در این مطالعه که با صفات مورد مطالعه همبستگی نشان داده اند می - توانند در برنامه های اصلاحی گزینش به کمک نشانگر به کار روند. به این صورت که می توان قطعات DNA چندشکل دارای ضریب همبستگی بالا را به عنوان نشانگر آگاهی بخش برای صفت مورد مطالعه را از روی ژل جدا کرد و همسانه سازی نمود. سپس توالی شناسایی شده را در پایگاه اطلاعاتی NCBI با توالی موجود هم ردیف (Alignment) نمود و ژن های کاندید که شباهت بالایی به نشانگرهای آگاهی بخش مورد نظر داشتند را مشخص نمود. همچنین می توان از روی توالی به دست آمده، پرایمرهای SCAR را طراحی نمود و در گزینش به کمک نشانگر در برنامه های اصلاحی بهره برد.

منابع

منابع

۱. آقا علی، ز.، درویش زاده، ر. و گودرزی، ف. (۱۳۹۵). "تجزیه ارتباط صفات مورفولوژیک در کرچک (*Ricinus communis L.*) با استفاده از نشانگرهای ISSR". **تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران**، دوره ۲۴، شماره ۱، ص ۷۹-۹۱.
۲. ابراهیمی، ا.، نقوی، م.ر.، سبک دست نودهی، م و مرادی سراب شلی، ا. (۱۳۹۰). "تجزیه ارتباطی صفات زراعی با نشانگرهای ریزماهواره در جوهای بومی ایران". **مجله ژنتیک نوین**، دوره ۶، شماره ۱، ص ۳۵-۴۳.
۳. بیدخوانی نژاد، ف.، محمدی میریک، ع. ا. و دشتی، ح. (۱۳۹۳). "ارزیابی دو زیرگونه بزرگ (*Linum usitatissimum L.*) در مناطق مختلف جغرافیایی از نظر میزان و تنوع ژنتیکی برای عملکرد دانه و اجزای آن". **علوم گیاهان زراعی ایران**، دوره ۵۴، شماره ۵، ص ۶۰۳-۶۱۱.
۴. خندان، ع. و سعیدی، ق. (۱۳۸۳). "بررسی خصوصیات زراعی، تنوع ژنتیکی و روابط بین صفات در لاینهای حاصل از توده بومی بزرگ در اصفهان". **مجله علوم کشاورزی ایران**، دوره ۳۵، شماره ۱، ص ۱۵۵-۱۶۶.
۵. سعیدی، ق. (۱۳۸۰). "بررسی تنوع ژنتیکی عملکرد دانه و دیگر ویژگیهای زراعی در ژنوتیپهای بزرگ با کیفیت روغن خوراکی و صنعتی در اصفهان". **مجله علوم آب و خاک-علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی**، دوره ۵، شماره ۴، ص ۱۱۹-۱۰۷.
۶. سعیدی، ق. و خدامباشی، م. (۱۳۸۵). "ارزیابی صفات زراعی برخی ژنوتیپهای بزرگ با کیفیت روغن خوراکی در دو تاریخ کاشت در شهرکرد". **مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی**، دوره ۱۰، شماره ۴، ص ۳۰۹-۳۲۰.
۷. شرفی، ی. و مجیدی، م.م. (۱۳۹۳). "تجزیه ارتباطی صفات مورفولوژیک با نشانگرهای ریز ماهواره در گونه های جنس براسیکا". **مجله ژنتیک نوین**، دوره ۹، شماره ۲، ص ۱۸۸-۱۷۹.
۸. شعبانیان، ن.، علیخانی، ل.، بدخشان، ه. و رحمانی، م.ش. (۱۳۹۳). بررسی تنوع در جمعیت های بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) جنگل های زاگرس شمالی بر اساس نشانگرهای ریخت شناسی و مولکولی ISSR و IRAP. **مجله جنگل ایران، انجمن جنگلبانی ایران**، دوره ۶، شماره ۳، ص ۳۲۱-۳۳۸.
۹. عبدالهی مندولکانی، ب. و عزیزی، ح. (۱۳۹۳). "شناسایی نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات مورفولوژیک در جمعیت های یونجه زراعی (*Medicago sativa L.*)". **مجله پژوهش های سلولی و مولکولی**، دوره ۲۷، شماره ۲، ص ۲۶۰-۲۶۸.
۱۰. عبدالهی مندولکانی، ب.، اعلمی، ع. و اصفهانی، م. (۱۳۸۹). "تجزیه ارتباط برای صفات مورفولوژیک در بادام زمینی (*Arachis hypogea L.*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره". **مجله علوم زراعی ایران**،

دوره ۱۲، شماره ۴، ص ۵۱۹-۵۱۰

۱۱. قندهاری، و.، احمدی خواه، ا.ا. و پیام نور، و. (۱۳۹۲). "بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شمشاد در شمال ایران با نشانگرهای ISSR". **تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران**، دوره ۲۱، شماره ۱، ص ۱-۱۲

۱۲. کشاورز خوب، م. ق.، قرنچیک، ش.، معصومی اصل، ا. و عبدالهی مندولکانی، ب. (۱۳۹۴). "بررسی تنوع و روابط ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های انگور (*Vitis vinifera* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR". **مجله بیوتکنولوژی کشاورزی**، دوره ۷، شماره ۴، ص ۱۲۹-۱۴۲

۱۳. محمدزاده، م.، فتاحی مقدم، م.، زمانی، ذ. و خدیوی خوب، ع. (۱۳۹۳). "مطالعه ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مهم میوه در فندق با استفاده از آنالیز رگرسیونی چندمتغیره". **مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)**، دوره ۵، شماره ۳، ص ۲۹۹-۲۸۹.

14. Adugna, W. and Labuschagne, M. T. (2003). "Association of linseed characters and its variability in different environments". **The Journal of Agricultural Science**, 140, 3, pp 285-296.
15. Anne, C. (2006). "Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects", **Genetica**, 127, pp 101-120.
16. Aranzana, M. J., Kim, S., Zhao, K., Bakker, E., Horton, M., Jakob, K. and Toomajian, C. (2005). "Genome-wide association mapping in Arabidopsis identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes". **PLoS Genet**, 1, 5, pp 60.
17. Basaki, T., Choukan, R., Khayam-Nekouei, S. M., Mardi, M., Majidi, E., Faraji, S. and Zeinolabedini, M. (2011). "Association analysis for morphological traits in pomegranate (*Punica granatum* L.) using microsatellite markers". **Middle-East Journal of Scientific Research**, 9, 3, pp 410-41. (In Farsi)
18. Berglund, D. R., Janick, J. and Whipkey, A. (2002). "Flax: new uses and demands. In *Trends in new crops and new uses. Proceedings of the Fifth National Symposium, Atlanta, Georgia*,. pp. 358-360. ASHS press.
19. Bernardo, R. (2008). "Molecular markers and selection for complex traits in plants: Learning from the last 20 years." **Crop Science**, 48, pp 1649-1664.
20. Bickel, C.L., Gadani, S., Lukacs, M. and Cullis, C.A. (2011) "SSR markers developed for genetic mapping in flax (*Linum usitatissimum* L.)". **Research and Reports in Biology** , 2, pp 23-29.
21. Blair, M. W., Panaud, O. and McCouch, S. R. (1999) "Inter-simple sequence repeat

- (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L)". **Theoretical and Applied Genetics**. 98, pp 780-792.
22. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms". **American Journal of Human Genetics**. 32, pp 314-331.
23. Brady, S. M. and Provart, N. J. (2007) "Extreme Breeding: Leveraging Genomics for Crop Improvement." **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 87, pp 925-929.
24. Breseghello, F. and Sorrells, M. E. (2006). "Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants". **Crop Science**. 46, pp 1323–1330.
25. Carrasco, B., Retamales, J. B., Quiroz, K., Garriga, M., Caligari, P. D. S. and Garcia-Gonzales, R. (2013). "Inter Simple Sequence Repeat markers associated with flowering time duration in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*)". **Journal of Agricultural Science and Technology**, 15, 6, pp 1195-1207.
26. Chauhan, P. and Kumar, P. (2015). "Molecular markers: application in plant improvement programme" **International Journal of Applied And Pure Science and Agriculture** , 1,7 , pp 74-90.
27. Chaudhary, .M., Rahul, V.P., Singh, V. and Chauhan, M. P. (2016). "correlation and path coefficient analysis for yield and yield related traits in linseed (*Linum usitatissimum* L.)". **Thebioscan**, 11, 2, pp 939-942.
28. Copur, O., Gur, M. A., Karakus, M. and Demirel, U. (2006). "Determination of correlation and path analysis among yield components and seed yield in oil flax varieties (*Linum usitatissimum* L.)". **Journal of Biology Science**, 6, pp 738-743.
29. Cloutier, S., Niu, Z., Datla, R. and Duguid, S. (2009) "Development and analysis of EST-SSRs for flax (*Linum usitatissimum* L.)". **Theoretical and Applied Genetics**, 119, pp 53-63.
30. Darvasi, A., Weinreb, A., Minke, V., Weller, J. I. and Soller, M. (1993). "Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map". **Genetics** ,134, pp 943–951.
31. Deng, X., Long, S., He, D, Li, X., Wang, Y., Hao, D., Qiu, C. and Chen, X. (2011) "Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from flax (*Linum usitatissimum* L.)". **African Journal of Biotechnology**, 10, pp 734-739

32. Deng, X., Long, S., He, D., Li, X., Wang, Y., Liu, J. and Chen, X. (2010). "Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Linum usitatissimum*". **Journal of plant research**, 123, 1, pp 119-123.
33. Diederichsen, A. (2001). "Comparison of genetic diversity of flax (*Linum usitatissimum* L.) between Canadian cultivars and a world collection". **Plant Breeding**, 120, 4, pp 360-362.
34. Diederichsen, A. and Fu, Y. B. (2006). "Phenotypic and molecular (RAPD) differentiation of four infraspecific groups of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L. *subsp. usitatissimum*)". **Genetic resources and crop evolution**, 53, 1, pp 77-90.
35. Ding, J., Ruan, C. J., Guan, Y., Shan, J. Y., Li, H. and Bao, Y. H. (2016). "Characterization and identification of ISSR markers associated with oil content in sea buckthorn berries". **Genetics and molecular research**, 15,3, pp 1-11.
36. Ersoz, E. S., Yu, J. and Buckler, E. S. (2009). "Applications of linkage disequilibrium and association mapping in maize". In **Molecular genetic approaches to maize improvement**, 63, pp. 173-195.
37. Everaert, I., De Riek, J., De Loose, M., Van waes, J. and Van Bockstaele, E. (2001). "Most similar variety grouping for distinctness evaluation of flax and linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties by means of AFLP and morphological data". **Plant varieties & seeds**, 14, 2, pp 69-87.
38. Falconer, D.S. and Mackay, T.F.C. (1996) Introduction to quantitative genetics, 4th edn. Longman, London.
39. FAOSTAT Data. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Statistical Databases. <http://faostat.fao.org>.
40. Fazary, N. T. A. A. and Younis, P. Y. M. (2015). "Seed properties and fatty acid composition of flaxseed oil (*Linum usitatissimum* L.)". **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 4, 11, pp 69-99.
41. Fazeli, F. and Cheghamirza, K. (2011). Investigation of genetic diversity in iranian landrace chickpea bulks using ISSR marker. **Modern Genetic**, 6 (2), 97-104. (In Farsi)
42. Fisher, RA. (1934) "The amount of information supplied by records of families as a function of the linkage in the population sampled", **Annals of Eugenics**. 6, pp 66-70

43. Fisher, P.J., Gardner, R.C. and Richardson, T.E. (1996), "Single locus microsatellites isolated using 5' anchored PCR", **Nucleic Acids Research**, 24, pp 4369–4371.
44. Flint-Garcia, S. A., Thornsberry, J. M. and IV, B. (2003). "Structure of linkage disequilibrium in plants". **Annual review of plant biology**, 54, 1, pp 357-374.
45. Flint-Garcia, S. A., Thuillet, A. C., Yu, J., Pressoir, G., Romero, S. M., Mitchell, S. E. and Buckler, E. S. (2005). "Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection". **The Plant Journal**, 44, 6, pp 1054-1064.
46. Forcada, C. F., Oraguzie, N., Igartua, E., Moreno, M. Á. and Gogorcena, Y. (2013). "Population structure and marker–trait associations for pomological traits in peach and nectarine cultivars". **Tree genetics & genomes**, 9, 2, pp 331-349.
47. Fu, Y. B., Peterson, G., Diederichsen, A. and Richards, K. W. (2002). "RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L." **Genetic Resources and Crop Evolution**, 49, 3, pp 253-259.
48. Fu, Y. B., Diederichsen, A., Richards, K. W. and Peterson, G. (2002). "Genetic diversity within a range of cultivars and landraces of flax (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by RAPDs". **Genetic Resources and Crop Evolution**, 49, 2, pp 167-174.
49. Fu, Y. B., Rowland, G. G., Duguid, S. D. and Richards, K. W. (2003). "RAPD analysis of 54 North American flax cultivars". **Crop Science**, 43, 4, pp 1510-1515.
50. Ganopoulos, I. V., Kazantzis, K., Chatzicharisis, I., Karayiannis, I. and Tsaftaris, A. S. (2011). "Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers". **Euphytica**, 181,2, pp 237-251.
51. Gauraha, D. and S. S. Rao. (2011). "Association analysis for yield and its characters in linseed (*Linum usitatissimum* L.)." **Journal of Agricultural Science Research**, 2, 2, pp 258-260.
52. Gaut, B.S. and A.D. Long. (2003). "The lowdown on linkage disequilibrium". **Plant Cell**, 15, pp 1502–1506.
53. Gomez, K. and Gomez, A.A. (1984). "**Statistical procedures for agricultural research, 2th ED**". John Wiley, New York, USA.
54. Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P. and Sambrook, J. (1975). "Physical mapping of temperature sensitive *mutants of adenovirus*". **Cold Spring Harbor Symposia on**

Quantitative Biology, 39, pp 439-446.

55. Gul, S., Rajper, A. A., Kalhor, F. A., Kalhor, S. A., Ali, A., Shah, F. A. and Ahmed, M. (2016). "Screening Selected Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Genotypes for Yield Performance in Sindh, Pakistan". **Natural Science**, 8, 2, pp 53.
56. Gupta, P., Rustgi, S. and Kulwal, P. (2005). "Linkage Disequilibrium and Association Studies in Higher Plants: Present Status and Future Prospects". **Plant Molecular Biology**, 57, pp 461-485.
57. Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J. and Owen, J.L. (1994). "Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats", **Theoretical and Applied Genetics**, 89, pp.998–1006.
58. Hall, D., Tegström, C. and Ingvarsson, P. K. (2010). "Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants". *Briefings in Functional Genomics*, elp048.
59. Hansen, M., Kraft, T., Ganestam, S., SAeLL, T. and Nilsson, N. O. (2001). Linkage disequilibrium mapping of the bolting gene in sea beet using AFLP markers. **Genetical Research**, 77,1, pp 61-66.
60. Hastbacka, J., de la Chapelle, A., Kaitila, I., Sistonen, P., Weaver, A. and Lander, E. (1992). "Linkage disequilibrium mapping in isolated founder populations: diastrophic dysplasia in Finland". **Nature genetics**, 2, 3, pp 204-211.
61. Hayes, B. (2007). "**QTL mapping, MAS, and genomic selection.**" A short-course. Animal Breeding & Genetics Department of Animal Science. *Iowa State University*, 1, 1, 25.
62. Hayes, B., Visscher, P.M., McPartlan, H.C. and Goddard, M.E. (2003). "Novel Multi locus Measure of Linkage Disequilibrium to Estimate Past Effective Population Size". **Genome Research**, 13, pp 635-641.
63. Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A. and Nienhuis, J. (1986). "Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms". **Theoretical and applied genetics**, 72, 6, pp 761-769.
64. Hickey, M. (1988). **100 families of Flowering Plants**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
65. Holland, J.B. (2007). "Genetic architecture of complex traits in plants". **Current Opinion in Plant Biology**, 10, pp 156–161.

- 66.Honsdorf, N., Becker, H. C. and Ecke, W. (2010). "Association mapping for phenological, morphological, and quality traits in canola quality winter rapeseed (*Brassica napus* L.)". **Genome**, 53, 11, pp 899-907.
- 67.Iruela, M., Rubio, J., Cubero, J. I., Gil, J. and Millan, T. (2002). "Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers". **Theoretical and Applied Genetics**, 104,4 , pp 643-651.
- 68.Ipek, M., Seker, M., Ipek, A. and Gul, M. K. (2015). "Identification of molecular markers associated with fruit traits in olive and assessment of olive core collection with AFLP markers and fruit traits". **Genetics and Molecular Research**, 14, 1, pp 2762-2774.
- 69.Jaccard, P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone. **New Phytologist** 11, 2, pp 37-50.
- 70.Jhala, A. J. and Hall, L. M. (2010). "Flax (*Linum usitatissimum* L.) current uses and future applications". **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 4, 9, pp 4304-4312.
- 71.Joshi, S. P., Gupta, V. S., Aggarwal, R. K., Ranjekar, P. K. and Brar, D. S. (2000). "Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*". **Theoretical and Applied Genetics**, 100, 8, pp 1311-1320.
- 72.Jothi, M.P. (2008) Genetic diversity, Course notes, University of Putra Malaysia.
- 73.Jung, M., Ching, A., Bhatramakki, D., Dolan, M., Tingey, S., Morgante, M. and Rafalski, A. (2004). "Linkage disequilibrium and sequence diversity in a 500-kbp region around the *adh1* locus in elite maize germplasm". **Theoretical and Applied Genetics**, 109, 4, pp 681-689.
- 74.Jun, T. H., Van, K., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Walker, D. R. (2008). "Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean". **Euphytica**, 162, 2, pp 179-191.
- 75.Kale, S. M., Pardeshi, V. C., Kadoo, N. Y., Ghorpade, P. B., Jana, M. M. and Gupta, V. S. (2012). "Development of genomic simple sequence repeat markers for linseed using next-generation sequencing technology". **Molecular breeding**, 30, 1, pp 597-606.
- 76.Kannan, B., Senapathy, S., Bhasker Raj, A. G., Chandra, S., Muthiah, A., Dhanapal, A. P. and Hash, C. T. (2014). "Association Analysis of SSR markers with phenology,

grain, and stover-yield related Traits in pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) R. Br.)". **The scientific world journal**, pp 1-14.

77. Kanwar, R. R., Saxena, R.R. and Ekka, R.E. (2013). "Correlation and path coefficient analysis of some quantitative traits in linseed (*Linum usitatissimum* L.)." **International Journal of Plant Sciences**, 8, 2, pp 395-397.
78. Khaled, A. G. A., Motawea, M. H. and Said, A. A. (2015). "Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions". **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 13, 2, pp 243-252.
79. Leitch, M. H. and Sahi, F. (1999). "The effect of plant spacing on growth and development in linseed". **Annals of applied biology**, 135, 2, pp 529-534.
80. Long, A. D., Mullaney, S. L., Reid, L. A., Fry, J. D., Langley, C. H. and Mackay, T. F. (1995). "High resolution mapping of genetic factors affecting abdominal bristle number in *Drosophila melanogaster*". **Genetics**, 139, 3, pp 1273-1291.
81. Li, Y. H., Smulders, M. J., Chang, R. Z. and Qiu, L. J. (2011). "Genetic diversity and association mapping in a collection of selected Chinese soybean accessions based on SSR marker analysis". **Conservation Genetics**, 12, 5, pp 1145-1157.
82. Li, X., Yan, W., Agrama, H., Jia, L., Shen, X., Jackson, A. and Wu, D. (2011). "Mapping QTLs for improving grain yield using the USDA rice mini-core collection". **Planta**, 234, 2, pp 347-361.
83. Liu, M. P., Du, H. Y., Zhu, G. P., Fu, D. L. and Tana, W. Y. (2015). "Genetic diversity analysis of sweet kernel apricot in China based on SSR and ISSR markers". **Genetics and molecular research: GMR**, 14, 3, pp 9722-9729.
84. Ludvikova, M. and Griga, M. (2015). "Transgenic Flax/Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Expectations and Reality." **Journal of Genetics**, 51, pp 123-141.
85. Lynch, M. and Walsh, B. (1998). **Genetics and analysis of quantitative traits**. Vol. 1. Sunderland, MA: Sinauer.
86. Mackay, T. F. C. (2001) "Quantitative trait loci in *Drosophila*". **Nature Reviews Genetics**, 2, pp 11-20.
87. Mackay, I. and Powell, W. (2007). "Methods for linkage disequilibrium mapping in crops". **Trends in plant science**, 12, 2, pp 57-63.

88. Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant- salient statistical tools and consideration. **Crop Science**, 43, 1235-1248.
89. Månsby, E., Díaz, O. V. and Von Bothmer, R. (2000). "Preliminary study of genetic diversity in Swedish flax (*Linum usitatissimum* L.)". **Genetic Resources and Crop Evolution**, 47, 4 , pp 417-424.
90. Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z. and Vilgalys, R. (1993). "Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of (*Cryptococcus neoformans*)." **Journal of Clinical Microbiology**, 31, 9, pp 2274-2280.
91. Mondini, L., Noorani, A. A. and Pagnotta, M. (2009). "Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools." **Diversity**, 1, pp19-35.
92. Moose, S. P. and Mumm, R.H. (2008). "Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement". **Plant Physiology**, 147, pp 969–977.
93. Morris, D. H. (2007). **Flax: A health and nutrition primer**. Flax Council of Canada
94. Muravenko, O. V., Lemesh, V. A., Samatadze, T. E., Amosova, A. V., Grushetskaya, Z. E., Popov, K. V. and Zelenin, A. V. (2003). "Genome comparisons with chromosomal and molecular markers for three closely related flax species and their hybrids". **Russian Journal of Genetics**, 39,4 , pp 414-421.
95. Muravenko, O. V., Bolsheva, N. L., Yurkevich, O. Y., Nosova, I. V., Rachinskaya, O. A., Samatadze, T. E. and Zelenin, A. V. (2010). "Karyogenomics of species of the genus *Linum* L." **Russian Journal of Genetics**, 46, 10, pp 1182-1185.
96. Nagaoka, T. and Ogihara, Y. (1997). "Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers". **Theoretical and applied genetics**, 94, 5, pp 597-602.
97. Neale, D. B. and Savolainen, O. (2004). "Association genetics of complex traits in conifers". **Trends in plant science**, 9, 7, pp 325-330.
98. Oh, T. J., Gorman, M. and Cullis, C. A. (2000). "RFLP and RAPD mapping in flax (*Linum usitatissimum* L.)". **Theoretical and applied genetics**, 101, 4, pp 590-593.
99. Olson, J. M., Witte, J. S. and Elston, R. C. (1999). "Tutorial in biostatistics genetic mapping of complex traits". **Statistics in Medicine**, 18, pp 2961-2981.
100. Palaisa, K. A., Morgante, M., Williams, M. and Rafalski, A. (2003). "Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene

- synthase loci." **The Plant Cell**, 15, 8, pp 1795-1806.
101. Paran, I. and Michelmore, R. W. (1993). "Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce". **Theoretical and Applied Genetics**, 85, 8, pp 985-993.
102. Patil, V. D., Chopde, P. R. and Makne, V. G. (1981). "Studies on interrelationships between yield and yield components in intervarietal crosses of linseed (*Linum usitatissimum* L.)." **Acta-Agronomica-Hungarica**, 35, pp 129-132.
103. Paul, S., Bhateria, S. and Kumari, A. (2015). "Genetic variability and interrelationships of seed yield and yield components in linseed (*Linum usitatissimum* L.)." **SABRAO Journal of Breeding & Genetics**, 47, 4, pp 375-383.
104. Potter, R.H. and Jones, M.G.K. (1991). "**Molecular analysis of genetic stability. In: Dodds JH (eds) In vitro methods for conservation of plant genetic resources**". Chapman and Hall. London pp 71-91.
105. Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000). "Inference of population structure using multilocus genotype data". **Genetics**, 155, 2, pp 945-959.
106. Rabiei, B. (2003). Ph.D thesis, "QTL Analysis for traits controlling seed in Iranian Rice varieties". Agriculture College, University of Tehran. (In Farsi)
107. Rachinskaya, O. A., Lemesh, V. A., Muravenko, O. V., Yurkevich, O. Y., Guzenko, E. V., Bol'sheva, N. L. and Shostak, N. G. (2011). "Genetic polymorphism of flax *Linum usitatissimum* based on the use of molecular cytogenetic markers". **Russian journal of genetics**, 47, 1, pp 56-65.
108. Rajwade, A.V., Arora, R.S., Kadoo, N.Y., Harsulkar, A.M., Ghorpade, P.B. and Gupta, V.S. (2010). "Relatedness of Indian flax genotypes (*Linum usitatissimum* L.): an inter-simple sequence repeat (ISSR) primer assay". **Molecular Biotechnology**, 45, pp 161-170.
109. Reddy, M. P., Sarla, N. and Siddiq, E. A. (2002). "Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding". **Euphytica**, 128, 1, pp 9-17.
110. Reddy, M. P., Reddy, B. R., Arsul, B. T. and Maheshwari, J. J. (2013). "Character association and path coefficient studies in linseed". **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2, 9, pp 250-254.
111. Risch, N. and Merikangas, K. (1996). "The future of genetic studies of complex human diseases". **Science**, 273, 5281, pp 1516-1517.

112. Rodriguez-Leyva, D., Bassett, C. M., McCullough, R. and Pierce, G. N. (2010). "The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid." **Canadian Journal of Cardiology**, 26, 9, pp 489-496.
113. Rohlf, F.J. (2000) NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software Setauket, New York
114. Roldain-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T.J., Coll., R., van Eijk, M.J.T. and De Loose, M. (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium* sp.) varieties, 2. AFLP characterization. **Molecular Breeding**, 6, 593-602.
115. Roose-Amsaleg, C., Cariou-Pham, E., Vautrin, D., Tavernier, R. and Solignac, M. (2006). "Polymorphic microsatellite loci in (*Linum usitatissimum* L.)". **Molecular Ecology Notes**, 6, pp 796-799.
116. Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J. and Bousquet, J. (1992). "Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*". **Theoretical and Applied Genetics**, 85, 2-3, pp 173-180.
117. Roy, J.K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H.S., et al. (2006). "Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat". **Current Science**, 90, pp 5-10.
118. SAS Institute. (2002). *SAS user's guide: statistics* (Vol. 2). Sas Inst.
119. Semagn, K., Bjørnstad, Å., and Ndjioudjop, M. N. (2006). "An overview of molecular marker methods for plants". **African journal of biotechnology**, 5, 25.
120. Singh, A., Rai, P. K., Kumar, A., Marker, S. and Yadav, P. K. (2015). "Study on variability, heritability and correlation coefficient among linseed (*Linum usitatissimum* L.) genotypes", **Advances in Applied Science Research**, 6, 10, pp 14-17
121. Shafiei-Astani, B., Ong, A. H. K., Valdiani, A., Tan, S. G., Yien, C. Y. S., Ahmady, F. and Kuar, T. (2015). "Molecular genetic variation and structure of Southeast Asian crocodile (*Tomistoma schlegelii*): Comparative potentials of SSRs versus ISSRs." **Gene**, 571, 1, pp 107-116.
122. Shen, J., Ding, X., Liu, D., Ding, G., He, J., Li, X. and Chu, B. (2006). "Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo". **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 29, 3, pp 420-422.
123. Slatkin, M. (2008). "Linkage disequilibrium-understanding the evolutionary past

- and mapping the medical future". **Nature Reviews Genetics**, 9, 6, pp 477-485.
124. Smith, J. S. C. and Smith, O. S. (1992). "Fingerprinting crop varieties". **Advances in agronomy**, 47, pp 85-140.
125. Smýkal, P., Bačová-Kertessová, N., Kalendar, R., Corander, J., Schulman, A. H. and Pavelek, M. (2011). "Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers". **Theoretical and Applied Genetics**, 122, 7, pp 1385-1397.
126. Sokal, R. R. and Michner, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ, Kans. **Science Bulletin**. 38, pp 1409-1438.
127. Soto-Cerda, B. J., Carrasco, R. A., Aravena, G. A., Urbina, H. A. and Navarro, C. S. (2011). "Identifying novel polymorphic microsatellites from cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) following data mining". **Plant Molecular Biology Reporter**, 29, 3, pp 753-759.
128. Soto-Cerda, B. J., Duguid, S., Booker, H., Rowland, G., Diederichsen, A. and Cloutier, S. (2014). "Association mapping of seed quality traits using the Canadian flax (*Linum usitatissimum* L.) core collection". **Theoretical and Applied Genetics**, 127, 4, pp 881-896.
129. Soto-Cerda, B. J., Duguid, S., Booker, H., Rowland, G., Diederichsen, A. and Cloutier, S. (2014). "Genomic regions underlying agronomic traits in linseed (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by association mapping". **Journal of integrative plant biology**, 56, 1, pp 75-87.
130. Spielmeier, W., Green, A. G., Bittisnich, D., Mendham, N. and Lagudah, E. S. (1998). "Identification of quantitative trait loci contributing to Fusarium wilt resistance on an AFLP linkage map of flax (*Linum usitatissimum* L)". **Theoretical and applied genetics**, 97, 4, pp 633-641.
131. Statistics Canada, 2006. Production data of field and specialty crops. Accessed: February 17, 2007. <http://www40.statcan.ca/101/cst01/prim11b.htm>
132. Steven, D. and Ehrlich, N. M. D. (2009). "Solutions Acupuncture, a private practice specializing in complementary and alternative medicine, Phoenix, AZ". Review provided by VeriMed Healthcare Network
133. Tanksley, S. D. (1993). "Mapping genes". **Annual Review of Genetics**. 27, pp 205-233.
134. Tanksley, S. D. and Orton, T. J. (1983). "Isozymic variation and plant

breeders, *Isozymes in plant genetics and breeding*", Elsevier science, Amsterdam, the Netherlands, part A, 381-400

135. Tariq, M. A., Hussain, T., Ahmad, I., Saghir, M., Batool, M. and Safdar, M. (2014). "Association analysis in linseed (*Linum usitatissimum* L.)". **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, 4, 6, pp 60-62.
136. Templeton, A. R. (1999). "Uses of evolutionary theory in the human genome project." **Annual Review of Ecology and Systematics**, 30, pp 23-49.
137. Tian, F., Stevens, N. M. and Buckler, E. S. (2009). "Tracking footprints of maize domestication and evidence for a massive selective sweep on chromosome 10" . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106, pp 9979-9986.
138. Tsumura, Y., Ohba, K. and Strauss, S. H. (1996). " Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*)". **Theoretical and Applied Genetics**. 92, pp 40-45.
139. Uysal, H., Fu, Y. B., Kurt, O., Peterson, G. W., Diederichsen, A. and Kusters, P. (2010). "Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and its wild progenitor pale flax (*Linum bienne* Mill.) as revealed by ISSR markers". **Genetic resources and crop evolution**, 57, 7, pp 1109-1119.
140. Virk, P.S., Ford-Lloyd, B.V., Jackson, M.T. and Pooni, H. S. (1996). "Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers". **Hereditas**. 76, pp 296–304.
141. Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R. and Kruglyak, L. (1998). " Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome." **Science**, 280, 5366, pp 1077-1082.
142. Wang, X., Yang, R., Feng, S., Hou, X., Zhang, Y., Li, Y. and Ren, Y. (2012). "Genetic variation in *Rheum palmatum* and *Rheum tanguticum* (Polygonaceae), two medicinally and endemic species in China using ISSR markers". **Plos one**, 7, 12, e51667.
143. Wiesnerová, D. and Wiesner, I. (2004). "ISSR-based clustering of cultivated flax germplasm is statistically correlated to thousand seed mass". **Molecular Biotechnology**, 26, 3, pp 207-214.
144. Wiesner, I., Wiesnerova, D. and Tejklova, E. (2001). "Effect of anchor and core sequence in microsatellite primers on flax fingerprinting patterns". **The Journal of Agricultural Science**, 137,1, pp 37-44.

145. Wilson, L. M., Whitt, S. R., Ibáñez, A. M., Rocheford, T. R., Goodman, M. M. and Buckler, E. S. (2004). "Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association". **The Plant Cell**, 16, 10, pp 2719-2733.
146. Wolfe, A. D. and Liston, A. (1998). "Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology". In **Molecular systematics of plants II**, pp 43-86, Springer US.
147. Wu, R., Zeng, Z. B., McKeand, S. E. and O Malley, D. M. (2000). "The case for molecular mapping in forest tree breeding". **Plant Breeding Reviews**, 19, pp 41-68.
148. Wu, K. S., Jones, R., Danneberger, L. and Scolnik, P. A. (1994). "Detection of microsatellite polymorphisms without cloning". **Nucleic Acids Research**, 22, 15, pp 3257-3258.
149. Xu, Y. and Crouch, J. H. (2008). "Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice". **Crop Science**, 48, 2, pp 391-407.
150. Yan, J., Shah, T., Warburton, M. L., Buckler, E. S., McMullen, M. D. and Crouch, J. (2009). "Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers". **PloS one**, 4, 12, e8451.
151. Yang, J., Benyamin, B., McEvoy, B. P., Gordon, S., Henders, A. K., Nyholt, D. R. and Goddard, M. E. (2010). "Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height". **Nature genetics**, 42, 7, pp 565-569.
152. Yang, X., Yan, J., Shah, T., Warburton, M. L., Li, Q., Li, L. and Xu, S. (2010). "Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection". **Theoretical and Applied Genetics**, 121, 3, pp 417-431.
153. Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., Ye, Z.H. and Mao, J.X. (1997) POPGENE: the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
154. Young, N. D., Menancio-Hautea, D., Fatokun, C. A. and Danesh, D. (1992). "RFLP technology, crop improvement, and international agriculture". **Biotechnology: Enhancing research on tropical crops in Africa**, pp 221-230.
155. Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W. H., Bi, I. V., Yamasaki, M., Doebley, J. F. and Kresovich, S. (2006). "A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness". **Nature genetics**, 38, 2, pp 203-208.
156. Yu, J. and Buckler, E. S. (2006). "Genetic association mapping and genome organization of maize". **Current Opinion in Biotechnology**, 17, 2, pp 155-160.

157. Yu, K.F., Deynze, A.V. and Pauls, K.P., (1993). "Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: Glick BR, Thompson JE (eds) Methods in plant molecular biology and biotechnology". CRC Press, Boca Raton- Ann Arbor-London-Tokyo, 360 pp.
158. Zeng, L., Meredith Jr, W. R., Gutiérrez, O. A. and Boykin, D. L. (2009). "Identification of associations between SSR markers and fiber traits in an exotic germplasm derived from multiple crosses among *Gossypium* tetraploid species". **Theoretical and applied genetics**, 119, 1, pp 93-103.
159. Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). "Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification". **Genomics**, 20, 2, pp 176-183.
160. Zhang, P., Liu, X., Tong, H., Lu, Y. and Li, J. (2014). "Association mapping for important agronomic traits in core collection of rice (*Oryza sativa* L.) with SSR markers". **PloS one**, 9,10, e111508.
161. Zhou, Y. Q., Jing, J. Z., Li, Z. Y., Zhang, B. H. and Jia, J. F. (2004). "Assessment of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* germplasm detected by RAPDs and ISSRs". **Hereditas**, 26, 6, pp 922-928.
162. Zhu, C., Gore, M., Buckler, E. S. and Yu, J. (2008). "Status and prospects of association mapping in plants". **The plant genome**, 1, 1, pp 5-20.

Abstract

The investigation explored the associations among 14 agro-morphological traits and 21 ISSR amplified informative bands in a germplasm collection of 26 linseed by multiple linear regression analysis (MLR). Out of 258 ISSR amplified bands, 218 bands were polymorphic. The average number of polymorphic bands was 10.38 for each primer. The polymorphic information content (PIC) of the primers varied in the range of 0.29 and 0.49. The primers PCT6, UBC811, UBC815, IP3, PCT2, 3PCT5L, and 3PCT2 exhibited the highest PIC. There were significant relationships between some of the polymorphic bands and at least one of the 14 studied traits. The primers 3PCT2, 3PCT5L, IP5, 3PCT6, and UBC811 amplified more fragments related to various traits than other primers. The fragment generated by 3PCT5L with the size of 1200 bp was correlated with the number of branches and capsules per plant, capsule diameter, and seed yield per plant. This can be associated with the pleiotropic impacts of this locus in controlling yield and some of its components. The amplified fragments with high coefficients of determination for each agro-morphological trait can be used, in addition to the mapping of the traits, in marker-assisted breeding programs after converting to SCAR marker, to select the best parents for the production of hybrids of linseed for which little genetic information is available.

Key words: Association analysis, Coefficient of determination, ISSR, Linseed, Stepwise regression



**Association analysis of agro-morphological traits in *Linum usitatissimum*
L. using ISSR markers**

By :

Zahra Fathi

Supervisor:

Dr. M. Parsaeian

Advisors:

Dr.A.A.Mohammadi Mirak

Dr.Sh.Gharanjik

June 2017

