

شناسایی نشانگرهای AFLP مرتبط با صفات تحمل به تنش غرقابی در جو

راویه حیدری^۱، عاطفه صبوری^{۱*}، حسین صبوری^۲، حسین علی فلاحي^۳، احمدرضا دادرس^۴

^۱ به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان.

^۲ دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس.

^۳ عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان.

^۴ دانشجوی دکتری اصلاح نباتات گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۱/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۳/۳۰

چکیده

با توجه به اهمیت پژوهش‌های مرتبط با تنش‌های غیرزیستی، پژوهش حاضر در راستای شناسایی نشانگرهای مولکولی که ارتباط معنی‌داری با صفات مرتبط با تحمل به تنش غرقابی در جو دارند، انجام گرفت. این بررسی با استفاده از نشانگرهای AFLP و ۴۰ ژنوتیپ جو صورت پذیرفت. به طور کلی ۲۲ متغیر شامل هشت صفت در هر دو شرایط نرمال و تنش غرقابی از جمله وزن خشک اندام هوایی، طول، حجم، وزن تر، وزن خشک، سطح، قطر و چگالی سطح ریشه به همراه شش شاخص تحمل به تنش (SSI، STI، GMP، TOL، YI و YSI) ارزیابی شد. هفت ترکیب آغازگری *EcoRI* و *MseI* در کل تعداد ۲۴۵ نوار تولید نمودند که از این تعداد، ۲۲۷ نوار چندشکل بودند و به طور متوسط ۹۲/۳۷ درصد چندشکلی داشتند. سه ترکیب E90-M160، E100-M160 و E90-M150 نسبت به سایر ترکیبات مقادیر بالاتری از شاخص‌های تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص دادند و در تمایز ژنوتیپ‌ها مؤثرتر بودند. تجزیه ارتباط با استفاده از ماتریس ساختار جمعیت و با مدل‌های آماری GLM و MLM، با استفاده از نرم‌افزار TASSEL برای ۲۲ متغیر انجام شد. مدل MLM در سطح احتمال پنج درصد، ۸۷ نشانگر را مرتبط با صفات ارزیابی شده شناسایی نمود. مطابق نتایج تجزیه ارتباط در شرایط نرمال بالاترین ضریب تبیین به نشانگر E100-M160-27 با توجیه ۳۲ درصد از تغییرات قطر ریشه و برای شاخص‌های تحمل و تحت تنش غرقابی به ترتیب به نشانگر E80-M150-1 با ۲۴ درصد توجیه تغییرات شاخص GMP و نشانگر E100-M150-22 با تبیین ۲۴ درصد از تغییرات فنوتیپی وزن خشک اندام هوایی اختصاص داشت.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ارتباط، ساختار جمعیت، تنش غرقابی، نشانگرهای AFLP

مقدمه

توسعه ریشه و بخش هوایی گیاه می‌گردد (Brisson et al., 2002). بنابراین مطالعه بر روی خصوصیات ریشه می‌تواند در شناسایی ارقام مقاوم‌تر جو و همچنین جایگاه‌های کنترل کننده صفات درگیر در تحمل ارقام جو به تنش غرقابی بسیار کارا باشد. شناسایی جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمی پس از توسعه فناوری نشانگرهای مولکولی DNA، در بسیاری از گیاهان تاکنون توانسته اطلاعات ژنتیکی بسیار ارزشمندی در ارتباط با عوامل دخیل در کنترل صفات پیچیده در اختیار محققین قرار دهد (Gomez et al., 2011). اما در بسیاری از این مطالعات، QTL‌های شناسایی شده فاصله ژنتیکی زیادی با نشانگرهای هم‌جوار خود داشته‌اند که این موضوع به عوامل زیادی از جمله اشباع نبودن نقشه پیوستگی و تفرق پایین افراد در جمعیت‌های مصنوعی مورد مطالعه بر می‌گردد و در نتیجه این امر برنامه‌های ژنتیکی و اصلاحی بعدی همانند انتخاب به کمک نشانگر یا همسانه‌سازی ژن بر اساس نقشه را دچار مشکل می‌کند (Bresghehlo and Sorells, 2006). از سوی دیگر در مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی، اغلب از جمعیت‌های مصنوعی حاصل از تلاقی دو والد هموزیگوت استفاده می‌شود و نوترکیبی در چرخه‌های میوزی طی فرآیند تولید جمعیت‌های در حال تفرق مانند F2، هاپلوئیدهای مضاعف، تلاقی برگشتی و لاین‌های اینبرد نوترکیب، درجه ارتباط یک QTL معین و نشانگرهای دور از آن کاهش می‌یابد و بنابراین،

جو (*Hordeum vulgare* L.) بعد از گندم، برنج و ذرت جزء مهم‌ترین غلات در تأمین غذای مردم جهان می‌باشد. بیشترین اهمیت گیاه جو به خاطر توانایی رشد و تولید آن در محیط‌های خشک، دمای پایین و شور می‌باشد (Baum et al., 2003). از سوی دیگر جو به عنوان یک گیاه مدل در پژوهش‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی محسوب می‌شود که این قابلیت آن به خصوصیات از جمله داشتن تنوع ژنتیکی و مورفو-فیزیولوژیکی بالا، در دسترس بودن نقشه ژنتیکی قابل استناد، یکساله بودن، چرخه زندگی کوتاه و قابلیت تلاقی با گونه‌های درون خزانه-های ژنی اولیه بر می‌گردد (Tomas, 2002). جو (*Hordeum vulgare* L.) به‌عنوان چهارمین غله مهم دنیا علی‌رغم تحمل نسبتاً مطلوب به تنش خشکی و شوری، نسبت به تنش غرقابی به ویژه در استان‌های مستعد بارندگی، مقاومت چندانی نداشته و مورد خسارت جدی قرار می‌گیرد (Emam, 2007). با توجه به اینکه مشکل تنش غرقابی، تقریباً یک میلیون هکتار از اراضی زیر کشت ایران را تهدید می‌کند (Ghobadi et al., 2006) لذا مطالعه در زمینه به‌نژادی تنش غرقابی در جو از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. عامل اصلی تنش برای گیاه در خاک‌های غرقاب، کمبود اکسیژن است (Brisson et al., 2002; Malekahmadi et al., 2005). کاهش اکسیژن قابل دسترس در شرایط غرقابی باعث کاهش

شرایط شور و یخ زدگی اشاره نمود. دستاورد این پژوهش‌ها شناسایی ۱۷۵ و ۱۷۷ آلل نشانگر Bmag749 از مجموع نشانگرهای SSR استفاده شده در این پژوهش و دارای ارتباط معنی‌دار آماری با صفت عملکرد دانه در شرایط شور و شاهد (Eleuch *et al.*, 2008) و همچنین ردیابی ۶۲ آلل از ۳۸ جفت نشانگر ریزماهوره پیوسته به ۱۲ صفت مرتبط با یخ زدگی از جمله درصد آب طوقه، LT50، وزن تر و خشک گیاهچه و میزان اتلاف آب نسبی (Gangkhanlou *et al.*, 2012) بود. علاوه بر این می‌توان به پژوهشی بر روی ۵۵ ژنوتیپ گندم با استفاده از ۲۰ جفت آغازگر ریزماهوره، دو جفت آغازگر SAMPL و ۸ جفت ترکیب آغازگر AFLP که جمعا ۵۱۹ نشانگر چندشکل تولید کرده بودند، اشاره نمود که منجر به شناسایی ۱۳۱ آلل ریزماهوره، ۴۳ نشانگر SAMPL و ۱۶۶ نشانگر AFLP شد که دارای ارتباط معنی‌دار با ۱۴ صفت زراعی بودند (Roy *et al.*, 2006). نظر به اهمیت تحقیقات ژنتیکی در ارتباط با تنش غرقابی در جو پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۴۰ ژنوتیپ جو با استفاده از نشانگرهای AFLP و تجزیه ارتباط آنها به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته به صفات مرتبط با تنش غرقابی طراحی شد و به انجام رسید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی پژوهش حاضر شامل ۴۰ ژنوتیپ جو بود که از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع

با توجه به وجود فقط یک چرخه میوزی در تولید جمعیت‌هایی مانند F2، هاپلوئیدهای مضاعف، تلاقی برگشتی، احتمال خطای نوع اول در آنها در شناسایی مکان‌های کنترل کننده صفات بالا خواهد رفت. هر چند که در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب وجود چرخه میوزی کافی، میزان عدم تعادل بین مکان‌هایی با پیوستگی ضعیف و خطای نوع اول را کاهش می‌دهد ولی میزان کاهش، به اندازه تلاقی تصادفی نیست. همچنین برای تولید چنین جمعیت‌هایی نیاز به زمان طولانی در مقایسه F2، هاپلوئیدهای مضاعف و تلاقی برگشتی است. از طرفی دیگر، تولید جمعیت‌های مصنوعی به علت عدم امکان انجام تلاقی لازم در تعدادی از گونه‌ها مثل انسان و یا گیاهان دگرگشن مثل درختان عملی نیست یا بسیار مشکل است (Gupta *et al.*, 2005). برای غلبه بر این محدودیت‌ها در سال‌های اخیر روش مکان‌یابی ارتباط یا تجزیه ارتباط معرفی شده است که نه تنها امکان مکان‌یابی دقیق 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 تهیه جمعیت در حال تفرق که نیاز به زمان زیادی دارد نمی‌باشد، ولی بهتر است از داده‌های فنوتیپی چندساله استفاده شود (Bresghehlo and Sorells, 2006). در علوم گیاهی این روش همچنان رو به گسترش است. در این ارتباط می‌توان به مطالعاتی بر روی جو در

طبیعی استان گلستان تهیه شد. در جدول ۱ نام یا شجره آنها آورده شده است.

جدول ۱- نام و شجره ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه در پژوهش حاضر.

Table 1- Name and pedigree of barley genotypes in this study.

شماره ژنوتیپ Number Genotype	نام یا شجره Name or pedigree	شماره ژنوتیپ Number Genotype	نام یا شجره Name or pedigree
1	Youssef	21	EB-86-6
2	Izeh	22	EB-86-4
3	N B 17	23	EB-86-3
4	N B 5	24	EB-85-5
5	L4 Shori	25	EB-87-20
6	Nimroz	26	EB-88-1
7	Kavir	27	EB-88-3
8	Prodogtive	28	EB-88-4
9	Bahman	29	EB-88-5
10	36 Motadel	30	EB-88-7
11	31 Motadel	31	EB-88-10
12	28 Garm	32	EB-88-14
13	24 Garm	33	EB-88-16
14	21 Garm	34	EB-88-19
15	EC-84-10	35	Bomi
16	45 Motadel	36	Rihane
17	EC-82-11	37	Arass
18	EC-81-13	38	Goharjow
19	MB-82-12	39	Karoon
20	EB-86-14	40	EB-88-2

ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و پوشش پلاستیکی ضخیم ایجاد شد و در زمان اعمال تنش یعنی زمانی که ۹۰ درصد گیاهان به مرحله سه برگی رسیدند، حوضچه‌ها به میزانی که سطح خاک گلدان‌ها در حالت غرقاب قرار گیرد، از آب اشباع گردید. پس از به پایان رسیدن مدت تنش، صفات مربوط به ریشه شامل طول ریشه اصلی^۱ (TL)، حجم ریشه^۲ (RV)؛ وزن تر ریشه^۳ (RFW) و وزن خشک ریشه^۴ (RDW) (پس از قرار دادن ریشه‌ها

این آزمایش به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو عامل ژنوتیپ و تنش غرقابی (صفر، ۱۰، ۲۰ روز) با سه تکرار (هر تکرار شامل ۳ گلدان و هر گلدان شامل سه گیاه بود) در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان با عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۳ دقیقه شرقی از نصف النهار گرینویچ به صورت گلدانی اجرا شد. به منظور اعمال تیمارهای غرقابی، حوضچه‌هایی به ابعاد ۹۰ در ۲۵۰ سانتی‌متر با استفاده از دیوارهای بلوکی به

¹ . Taproot length

² . Root volume

³ . Root fresh weight

⁴ . Root dry weight

مرحله دمایی مختلف تکثیر شدند. فرآورده‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید شش درصد تفکیک و به روش نترات نقره رنگ آمیزی شدند. در نهایت هم امتیازدهی نوارها به صورت صفر و یک به ترتیب برای عدم حضور و حضور نوارها انجام گرفت.

تجزیه‌های آماری

بعد از امتیازدهی نوارها، آماره‌های تنوع ژنتیکی شامل محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از رابطه

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

که در آن PIC_i ، نشانگر آم، f_i فراوانی قطعه نشانگر آم هنگام وجود و $(1-f_i)$ فراوانی قطعه نشانگر آم در حالت عدم وجود نوار است (Roldain-Ruiz *et al.*, 2000)، با استفاده از نرم افزار Excel و سایر آماره‌ها مانند تعداد آلل‌های موثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون (Shannon and Weaver, 1963) با استفاده از نرم افزار PopGene (Yeh *et al.*, 1997) محاسبه گردیدند.

به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. به علاوه سطح ریشه^۱ (RA) (Alizadeh, 2006) و قطر ریشه^۲ (RD) (Schenk and Barber, 1979) و چگالی سطح ریشه^۳ (RSD) (Hajabbasi, 2001) با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

$$^{\circ}/^{\circ} (\text{حجم ریشه} \times \pi \times \text{طول ریشه}) = 2 \times \text{سطح ریشه}$$

$$^{\circ}/^{\circ} ((\text{طول ریشه} \times \pi) / \text{وزن تر ریشه} \times 4) = \text{قطر ریشه}$$

$$(\text{طول ریشه} \times \text{قطر ریشه} \times \pi) = \text{چگالی سطح ریشه}$$

استخراج DNA و انجام AFLP

پس از اندازه‌گیری صفات، نمونه‌های برگگی از گیاهان در شرایط نرمال به منظور استخراج DNA تهیه شد. استخراج DNA به روش CTAB (Saghai Maroof *et al.*, 1994) انجام شد و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و به همراه فاز لامبدا تعیین شد.

روش AFLP مطابق روش وس و همکاران (Vos *et al.*, 1995) با استفاده از آنزیم‌های محدودگر *MseI* و *EcoRI* انجام شد. در مرحله پیش تکثیر، نمونه‌ها با آغازگرهای *EcoRI* و *MseI* دارای یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' تکثیر یافتند و محصولات پس از رقیق‌سازی به نسبت ۵:۱ با هفت ترکیب آغازگری (جدول ۲) دارای ۲ نوکلئوتید انتخابی دیگر در انتهای ۳' تحت چرخه حرارتی Touch down شامل سه

1. Root area

2. Root diameter

3. Root surface area density

جدول ۲- ترکیبات آغازگری مورد استفاده در تجزیه AFLP.

Table 2- Primer combination used for AFLP analysis.

آغازگرهای <i>EcoRI</i>		آغازگرهای <i>MseI</i>	
<i>EcoRI</i> Primer		<i>MseI</i> Primer	
نام	توالی DNA	نام	توالی DNA
Name	Sequencing DNA	Name	Sequencing DNA
E060	GACTGCGTACCAATTCAAG	M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA
E070	GACTGCGTACCAATTCAAT	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT
E080	GACTGCGTACCAATTACG		
E090	GACTGCGTACCAATTCACT		
E100	GACTGCGTACCAATTCAAGT		
E110	GACTGCGTACCAATTTCATC		

بدین صورت که از دو ستون خلاصه شده K و LnP(D) برای محاسبات استفاده گردید و برای هر K، میانگین L(K) و انحراف معیار (Stdev) تکرارها محاسبه گردید. بعد از آن تفاضل میانگین تکرارها برای گروه‌های مجاور به صورت گروه بالاتر منهای گروه پایین‌تر و به نام L'(K) تعیین و سپس تفاضل L'(K) برای گروه‌های مجاور و به نام L''(K) محاسبه گردید که در نهایت از این محاسبات ΔK تعیین شد. در صورتی که نمودار دو طرفه K و ΔK رسم گردد، نقطه اوج منحنی همان تعداد بهینه K خواهد بود. جدول ۵ آماره-های محاسبه شده برای تعیین مقدار K برای ژنوتیپ‌های جو را نشان می‌دهد و شکل ۱ نمودار دو طرفه برای تعیین بهینه K را نشان می‌دهد. در این شکل مقدار K و ΔK از نتایج مربوط به شبیه سازی در نرم‌افزار STRUCTURE استخراج گردید. مقدار بهینه K نقطه اوج منحنی است که با توجه به نمودار، بهترین K در این

برای انجام تجزیه ساختار و تفکیک کل جمعیت به زیر جمعیت‌های متمایز از لحاظ ساختار ژنتیکی از نرم افزار 2.3.4 STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) استفاده شد و ماتریس صفر و یک حاصل از نشانگرهای AFLP وارد نرم‌افزار شد. از آنجائی-که در مورد ساختار جمعیت اطلاعات قبلی در دست نبود تعداد بهینه K با شبیه‌سازی محاسبه گردید. K تعداد زیر جمعیت‌های مورد مطالعه در جمعیت مورد نظر با استفاده از نرم افزار STRUCTURE می‌باشد. در حقیقت تعیین تعداد زیر جمعیت‌های ساختار ژنتیکی برای انجام تجزیه‌های آماری مهم مثل تجزیه ارتباط برای تعیین نشانگرهای معنی‌دار واقعی مرتبط با صفات اهمیت زیادی دارد. برای این منظور برای جمعیت مورد استفاده تعداد K از ۲ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و برای محاسبه تعداد زیرجمعیت (K) از روش (Evanno *et al.*, 2005) استفاده شد.

عوامل را کم می‌کند و ارتباطات معنی‌دار شناسایی شده بین نشانگر و صفت از اطمینان و اعتبار بیشتری برخوردارند (Agrama et al., 2007).

نتایج و بحث

آماره‌های تنوع ژنتیکی برای ترکیبات آغازگری بکاررفته در جدول ۴ آورده شده است. نشانگرهای AFLP در کل تعداد ۲۴۵ نوار تولید نمودند که از این تعداد، ۲۲۷ نوار چندشکل بودند. متوسط درصد چندشکلی ترکیبات آغازگری ۹۲/۳۷ درصد بود. با توجه به درصد بالای چندشکلی بدست آمده در پژوهش حاضر می‌توان انتظار داشت این نشانگرها بتوانند به عنوان یک ابزار قدرتمند در شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌های جو عمل نمایند. (Zhang et al., 2006) اظهار داشتند که دسترسی به نرخ بالایی از چندشکلی، ارزیابی کارا و سودمندی را در بررسی‌های مربوط به تنوع ژنتیکی به دست می‌دهد. بنابراین می‌توان از نشانگر AFLP به عنوان یک ابزار قدرتمند در برنامه‌های اصلاحی گیاهان زراعی بمانند جو استفاده نمود.

مطالعه ۳ می‌باشد. در واقع تجزیه ساختار نشان داد که تعداد خوشه‌هایی که پارامتر ΔK را به حداکثر خود می‌رساند برابر ۳ می‌باشد. انتساب افراد به زیرجمعیت‌ها نیز مطابق روش (Spataro et al. 2011) انجام شد و برای هر فرد در هر گروه درصد عضویت محاسبه شد. مطابق این روش یک ژنوتیپ هنگامی می‌تواند به انتساب یک گروه درآید که درصد عضویت آن ۰/۷ یا بیشتر از آن باشد و در صورتی که درصد عضویت کمتر از ۰/۶۹ باشد به عنوان ژنوتیپ مخلوط در نظر گرفته می‌شود. در بررسی حاضر پس از تعیین تعداد K، ماتریس دودمان افراد یا Q بر اساس آن تشکیل گردید و برای انجام تجزیه ارتباط وارد نرم‌افزار TASSEL 4.1.32 (Bradbury et al., 2007) گردید. تجزیه ارتباط با نرم‌افزار TASSEL با استفاده از سه مدل (جدول ۳) انجام گرفت.

این نرم‌افزار امکان انجام تمام آزمون‌های مرتبط با مدل‌ها و رویه‌هایی مانند GLM^1 و MLM^2 را فراهم می‌کند. رویه GLM رویه‌ای است که بدون دخالت ساختار جمعیت، ارتباط بین نشانگر و صفات اندازه‌گیری شده را به ما می‌دهد نمی‌تواند خیلی مورد اعتماد باشد و کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. اخیراً بیشتر از رویه MLM برای درک ارتباط بین نشانگر و صفت استفاده می‌شود چون در پیدا کردن ارتباط، هم ماتریس‌های ساختار جمعیت و هم خویشاوندی بین افراد را دخالت می‌دهد و اثرات ناشی از این

¹. General Linear Model.

². Mixed Linear Model.

جدول ۳- سه مدل آماری استفاده شده برای انجام تجزیه ارتباط نشانگرهای AFLP و صفات فنوتیپی.

Table 3: The three used statistical models for doing of association analysis of AFLP markers and phenotypic traits.

مدل	مجموعه داده مورد استفاده
Model	Used data set
1: GLM ^a	Phenotype + AFLP
2: GLM	Phenotype + AFLP + Q ^b
5: MLM ^c	Phenotype + AFLP + K ^d + Q

a: GLM: General linear model = مدل خطی عمومی،

b: Q: Population structure data or Inferred ancestry of individuals = داده‌های ساختار جمعیت یا اصل و نسب استنباط شده از افراد،

c: MLM: Mixed linear model = مدل خطی مخلوط،

d: K: Kinship data derived from general similarity in genetic background arising from shared kinship = داده‌های خویشاوندی حاصل از مشابهت کلی افراد از لحاظ زمینه ژنتیکی ناشی از خویشاوندی

تا ۰/۴۰ متغیر است و ترکیبات آغازگری E90-M160 و E100-M160 به ترتیب بیشترین میزان تنوع نی را دارا بودند. ترکیب E80-M160 کمترین میزان تنوع نی را در بین کلیه ترکیبات نشان داد. میانگین تنوع نی نیز ۰/۳۵ برآورد گردید. بررسی کلی آماره‌های تنوع ژنتیکی نشان داد که از بین هفت ترکیب آغازگری AFLP، سه ترکیب E90-M160، E100-M160 و E90-M150 نسبت به سایر ترکیبات AFLP مقادیر بالاتری را به خود اختصاص دادند و در حقیقت می‌توان اذعان داشت در تمایز ژنوتیپ‌ها نقش بارزتری ایفا نمودند.

از معیارهای دیگر برای ارزیابی کارایی نشانگر در تعیین چندشکلی، شاخص شانون است که مقدار آن برای ترکیبات E90-M150، E90-M160 و E100-M160 به ترتیب ۰/۵۶، ۰/۵۹ و ۰/۵۹ بدست آمد که با نتایج PIC هم‌خوانی داشت. تعداد آلل‌های مؤثر در بین نشانگرهای مطالعه شده متفاوت بود. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر در کل ۱/۵۸ بدست آمد و از ۱/۳۵ تا ۱/۷۴ متغیر بود. بیشترین تعداد آلل مؤثر برای ترکیبات E90-M160 و E100-M160 شناسایی شد. یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین کل ژنوتیپ‌ها، شاخص ژنتیکی نی است. برآورد شاخص نی نشان داد میزان تنوع از ۰/۲۵

جدول ۴- آماره‌های تنوع ژنتیکی برای ۷ ترکیب آغازگری AFLP.

Table 4- Statistical of genetic diversity for 7 primer combination in this study.

ترکیب آغازگری Primer combination	نوارهای چندشکل Poly. Bands	کل نوارها Total. Bands	درصد چندشکلی (%) Poly. Percentag	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC	تعداد آلل‌های موثر Effective Allel Number	ضریب تنوع نی Nei gene diversity	شاخص شانون Shannon index
E80-M150	28	30	93.33	0.29	1.56	0.34	0.52
E90-M150	38	40	95	0.42	1.68	0.38	0.56
E100-M150	32	35	91.42	0.31	1.56	0.33	0.50
E110-M150	27	32	84.37	0.41	1.58	0.33	0.53
E80-M160	29	33	87.87	0.30	1.35	0.25	0.42
E90-M160	37	38	97.36	0.40	1.74	0.40	0.59
E100-M160	36	37	97.29	0.42	1.71	0.40	0.59
کل	227	245	646.46	2.55	11.08	2.45	3.71
میانگین	32.42	35	92.37	0.36	1.58	0.35	0.53

تجزیه ساختار ژنتیکی

تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم افزار STRUCTURE، امکان شکستن کل جمعیت به زیرجمعیت‌هایی با ساختارهای متفاوت محتمل را فراهم می‌سازد. زیرجمعیت‌های تشکیل شده از لحاظ ژنتیکی متمایز از هم می‌باشند و چنانچه ژنوتیپ‌هایی به صورت اختلاط یافته باشند، پس از انجام این تجزیه قابل تشخیص خواهند بود (Dadras, 2012). بر طبق نتایج نرم‌افزار STRUCTURE، K و ΔK که برترتیب تعداد زیرگروه‌ها و میزان تغییرات آنها با توجه به شبیه سازی‌های انجام شده در نرم‌افزار می‌باشد، استخراج و نمودار دو بعدی آن رسم شد. شکل ۱ نمودار دو طرفه برای تعیین بهینه K را نشان می‌دهد که با توجه به نمودار بهترین K در این مطالعه که در واقع نقطه اوج منحنی است،

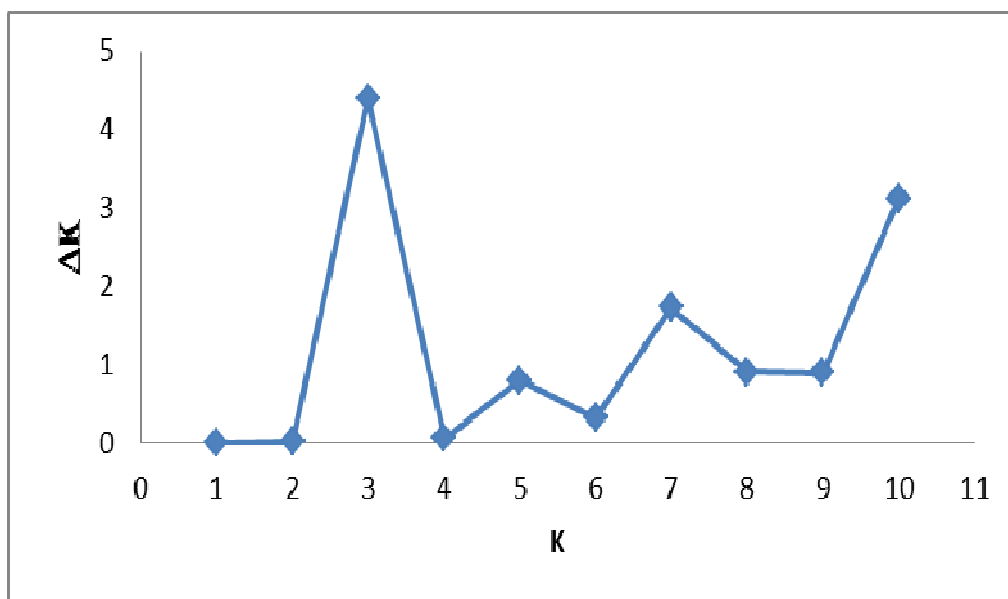
۳ می‌باشد. در واقع تجزیه ساختار نشان داد که تعداد خوشه‌هایی که پارامتر ΔK را به حداکثر خود می‌رساند برابر ۳ می‌باشد. جدول ۶ درصد عضویت ۴۰ ژنوتیپ جو را نشان می‌دهد. براین اساس ۱۳ ژنوتیپ شامل ۴، ۵، ۸، ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ متناسب به گروه ۱ شدند و تعداد ۱۷ ژنوتیپ شامل ۱، ۲، ۳۵، ۳۶، ۱۷، ۱۹، ۲۳، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳ و ۳۴ به عضویت گروه ۲ و ۴ ژنوتیپ ۳۷، ۳۸، ۳۹ و ۴۰ به عضویت گروه ۳ درآمدند. ۶ ژنوتیپ ۳، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۴ هم جزو ژنوتیپ‌های مخلوط بودند. بدین معنی که چون درصد عضویت کمتر از ۰/۶۹ داشتند بنابراین نتوانستند به هیچ کدام از گروه‌ها متناسب گردند. بار پلات ساختار جمعیت مستخرج از STRUCTURE در شکل ۲ آورده شده است.

جدول ۵- آماره‌های محاسبه شده برای مقدار بهینه K با استفاده از نرم افزار STRUCTURE.

Table 5- statistics calculated for optimum K using the software STRUCTURE.

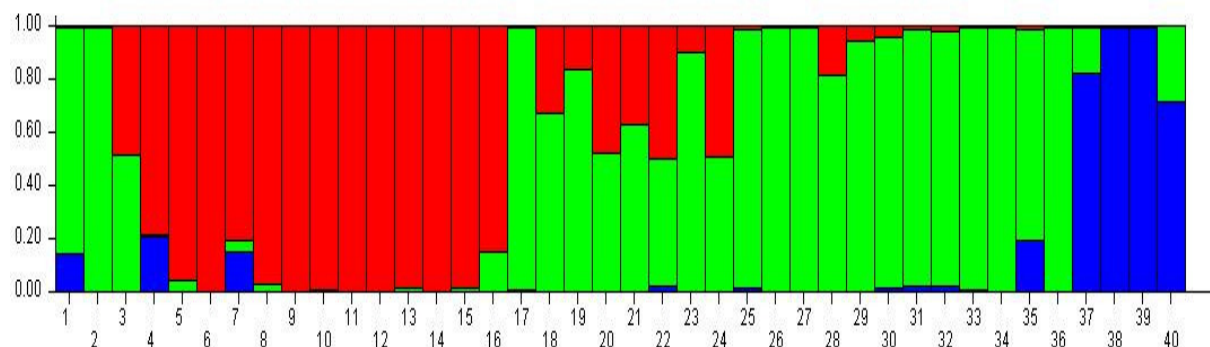
ΔK^d	$L''(K)^c$	$L'(K)^b$	Stdev	$L(K)^a$	K
0	-	-	12.34	-4790.5	1
0.02	-1.6	315.42	73.91	-4475.07	2
4.39	-202.9	313.82	46.19	-4161.24	3
0.06	-8.4	110.92	120.44	-4050.31	4
0.80	-90.75	102.52	113.28	-3947.79	5
0.32	28.4	11.77	87.74	-3936.01	6
1.72	-92.57	40.17	53.60	-3895.84	7
0.90	-137.25	-52.4	151.51	-3948.24	8
0.89	417.74	-189.65	466.65	-4137.9	9
3.11	-228.08	228.08	73.21	-3909.81	10

a میانگین $\ln P(D)$ تکرارها برای هر K. b $L(K)_n - L(K)_{n-1}$ c $L'(K)_n - L'(K)_{n-1}$ d $|L''(K)|/Stdev$



شکل ۱- نمودار دو طرفه برای تعیین تعداد بهینه K.

Figure 1- Bilateral chart to determine the optimal number K.



شکل ۲- بار پلات ساختار جمعیت مستخرج از STRUCTURE و ۲۲۷ نشانگر AFLP که در سه بخش رنگی تقسیم شده است. نام ژنوتیپ‌ها با شماره آنها در جدول ۱ آورده شده است.

Fig 2: Bar plot of population structure as inferred by STRUCTURE and 227 AFLP markers data set, partitioned into K coloured segments (K=3). The genotypes names with their numbers exist in the table 1.

جدول ۶- درصد عضویت ژنوتیپ‌ها براساس نتایج مستخرج از نرم افزار STRUCTURE.

Table6- Member percentage of genotype taken based on the results of STRUCTURE software.

شماره Number	ژنوتیپ Genotype	درصد			شماره Number	ژنوتیپ Genotype	درصد		
		عضویت گروه 1 Member percentage of group 1	عضویت گروه 2 Member percentage of group 2	عضویت گروه 3 Member percentage of group 3			عضویت گروه 1 Member percentage of group 1	عضویت گروه 2 Member percentage of group 2	عضویت گروه 3 Member percentage of group 3
1	Youssef	0.003	0.854	0.143	21	EB-86-6	0.367	0.632	0.001
2	Izeh	0.005	0.992	0.002	22	EB-86-4	0.494	0.478	0.029
3	N B 17	0.485	0.511	0.004	23	EB-86-3	0.098	0.902	0
4	N B 5	0.78	0.007	0.213	24	EB-85-5	0.492	0.507	0.001
5	L4 Shori	0.954	0.043	0.001	25	EB-87-20	0.008	0.972	0.02
6	Nimroz	0.998	0.001	0.001	26	EB-88-1	0.003	0.996	0
7	Kavir	0.803	0.041	0.156	27	EB-88-3	0.004	0.995	0.001
8	Prodogtive	0.968	0.031	0.001	28	EB-88-4	0.179	0.821	0
9	Bahman	0.998	0.001	0.001	29	EB-88-5	0.059	0.937	0.008
10	36 Motadel	0.987	0.001	0.012	30	EB-88-7	0.04	0.942	0.018
11	31 Motadel	0.996	0	0.003	31	EB-88-10	0.01	0.968	0.022
12	28 Garm	0.997	0.001	0.001	32	EB-88-14	0.018	0.96	0.023
13	24 Garm	0.985	0.008	0.007	33	EB-88-16	0.006	0.983	0.012
14	21 Garm	0.993	0.005	0.002	34	EB-88-19	0.003	0.994	0.003
15	EC-84-10	0.981	0.018	0.001	35	Bomi	0.012	0.789	0.2
16	45 Motadel	0.847	0.152	0	36	Rihane	0.001	0.999	0.001
17	EC-82-11	0.005	0.986	0.009	37	Arass	0.001	0.171	0.827
18	EC-81-13	0.322	0.671	0.007	38	Goharjow	0.004	0	0.995
19	MB-82-12	0.164	0.832	0.004	39	Karoon	0	0.001	0.999
20	EB-86-14	0.475	0.523	0.002	40	EB-88-2	0	0.297	0.72

ساختار جمعیت با نرم افزار STRUCTURE با استفاده از داده‌های ۶۴ نشانگر SSR توانست توده‌های اسپانیایی را به‌خوبی از سایر توده‌های

در مطالعه‌ای که بر روی ۲۲۵ توده جو (شامل ۱۷۵ توده SBCC) با استفاده از ۷۳ نشانگر SSR در طول ژنوم جو انجام شد، تجزیه

نشانگرهای دارای ارتباط معنی دار شناسایی شده با استفاده از مدل MLM در سطح پنج درصد نیز آورده شده است. مدل MLM در این سطح توانست ۸۷ نشانگر معنی دار را مرتبط با ۲۲ متغیر مورد بررسی شناسایی نماید. بدیهی است تعداد زیادی از این نشانگرها با استفاده از مدل‌های GLM نیز تعیین شده بودند. در جدول ۷ برای نشانگرهای معنی دار سطح معنی داری به همراه ضریب تبیین نشانگر آورده شده است.

در شرایط نرمال بالاترین ضریب تبیین به نشانگر E100M16027 با توجیه ۳۲ درصد از تغییرات قطر ریشه با مدل MLM در سطح پنج درصد اختصاص داشت.

نشانگر E80-M150-1 نیز مرتبط با سه صفت حجم ریشه، وزن تر و وزن خشک ریشه شناسایی شد. باید خاطر نشان نمود شناسایی نشانگرهای مرتبط با چندین صفت مهم می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی بسیار کاربردی باشد.

مدل MLM در سطح پنج درصد برای شش شاخص تحمل مورد بررسی، ۱۸ نشانگر معنی دار را شناسایی نمود. بالاترین درصد توجیه تغییرات فنوتیپی به نشانگر E80-M150-1 با ۲۴ درصد توجیه تغییرات GMP اختصاص داشت.

اروپایی تفکیک کند. پژوهش آنها نشان داد که اعمال اثر ساختار جمعیت در تجزیه ارتباط باعث کاهش تعداد ارتباط معنی دار می‌شود یعنی بخشی از ارتباطات واقعی بین صفت و نشانگر که ناشی از ساختار جمعیت نیست را نشان می‌دهد. اگر چه تعداد نشانگرهای معنی دار در این پژوهش کم بود، اما باز هم تعدادی نشانگر قوی پیوسته به QTLهای ممکن وجود داشت و این نشانگرها شناسایی شدند (Casas et al., 2006).

تجزیه ارتباط

تجزیه ارتباط با استفاده از نرم افزار TASSEL اجرا شد. در این بررسی، از سه مدل آماری برای تجزیه ارتباط استفاده شد که در جدول ۳ نشان داده شده است. در کل برای ۲۲ متغیر که شامل هشت صفت اندازه‌گیری شده در شرایط نرمال و متوسط شرایط تنش و همچنین شش شاخص تحمل به تنش، تعداد ۹۱ نشانگر ارتباط معنی داری را با این صفات در سطح یک درصد نشان دادند (جدول ۷).

از این تعداد ۱۵ و ۵۵ نشانگر بترتیب به صفات اندازه‌گیری شده در شرایط نرمال و متوسط شرایط تنش و ۲۱ نشانگر به شاخص‌های تحمل اختصاص داشت. در این جدول

جدول ۷- نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرهای AFLP و صفات مختلف در شرایط نرمال، تنش غرقابی و شاخص‌های تحمل با سه مدل آماری.

Table 7- The results of association analysis between AFLP markers and different traits in normal and flooding stress with tolerance index using three statistical models.

صفت Trait	نشانگر Marker	نشانگرهای معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد Significant markers in 1% probability level				نشانگرهای معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد Significant markers in 5% probability level		
		مدل ۱ Model 1		مدل ۲ Model 2		مدل ۳ Model 3		
		سطح احتمال Prob	R ²	سطح احتمال Prob	R ²	نشانگر Marker	سطح احتمال Prob	R ²
YN1*	E80M15022	0.0011	0.55	0.0023	0.42	E100M15011	0.01625	0.23
	E90M16037	0.0024	0.41	0.0018	0.36	E90M16037	0.00898	0.27
	E100M16024			0.0084	0.27			
YN2	E100M15028	0.0044	0.37	0.004	0.40	E100M15026	0.02824	0.21
	E100M15032	0.0044	0.37	0.004	0.40	E80M1501	0.04552	0.18
YN3						E80M16014	0.04977	0.11
						E100M16022	0.0233	0.22
						E80M1501	0.02761	0.21
YN4	E90M16035	0.0041	0.37	0.0084	0.35	E90M16035	0.01978	0.23
	E90M16037	0.0032	0.39	0.0054	0.38	E90M16037	0.00582	0.32
						E80M1501	0.018	0.24
						E90M15020	0.03851	0.12
						E80M1608	0.01253	0.18
						E110M1501	0.04361	0.11
						E80M1601	0.01622	0.17
						E80M16016	0.01964	0.16
						E80M16017	0.01622	0.17
YN5	E90M16023	0.002	0.42	0.0059	0.31	E90M16023	0.02285	0.22
						E100M15011	0.043	0.18
						E100M15028	0.04595	0.18
						E110M1505	0.0385	0.12
						E110M15013	0.03942	0.12
YN6	E90M1508	0.0039	0.48	0.003	0.52	E110M15022	0.02786	0.14
	E90M15015	0.009	0.42			E100M16012	0.0268	0.26
	E90M15016	0.0067	0.44	0.0091	0.45	E100M16027	0.0126	0.32
	E90M15020			0.0083	0.46	E100M16033	0.0204	0.28
	E100M15010	0.007	0.34			E90M15037	0.0437	0.18
YN7	E90M16023	0.0034	0.39			E100M1609	0.04099	0.18
						E80M1501	0.04245	0.18
						E80M16014	0.03748	0.12
						E100M1506	0.02148	0.22
YN8						E110M15013	0.02608	0.14
						E110M15010	0.02005	0.15
						E90M16023	0.03048	0.19
						E100M15019	0.0337	0.19
						E110M1509	0.03611	0.12
SSI	E100M15028	0.0000	0.78	0.0000	0.78	E100M15032	0.04428	0.18
	E100M15032	0.0000	0.78	0.0000	0.78	E110M15025	0.04264	0.12
	E90M15013			0.0064	0.44			
GMP	E100M15026			0.0032	0.41	E110M15022	0.03727	0.12
						E80M1501	0.01702	0.24
						E90M16013	0.03311	0.20
						E90M16037	0.04414	0.18
					E100M16034	0.0346	0.20	

STI	E100M15026			0.0028	0.42	E100M15026	0.03278	0.20
						E90M16013	0.02603	0.21
						E90M16037	0.04038	0.19
						E100M16034	0.03688	0.19
TOL	E100M15028	0.0042	0.37	0.0015	0.40	E100M15026	0.04496	0.18
	E100M15032	0.0042	0.37	0.0015	0.40	E100M1602	0.03751	0.198
	E90M16016	0.0076	0.33					
	E90M15013			0.0081	0.40			
YI	E110M15014	0.0000	0.55	0.0012	0.35	E110M15014	0.04658	0.11287
	E90M1607	0.0083	0.33			E90M15027	0.03718	0.19247
	E100M1605	0.0056	0.35					
	E100M1606	0.0000	0.49	0.0096	0.25			
	E100M1607	0.0056	0.35					
	E100M16015	0.001	0.46					
	E110M15015			0.0036	0.30			
	E90M16024			0.0043	0.29			
YSI	E100M15028	0.0000	0.78	0.0000	0.78	E100M15032	0.04428	0.18249
	E100M15032	0.0000	0.78	0.0000	0.78	E110M15025	0.04265	0.11812
	E90M15013			0.0064	0.44	E110M15014	0.04858	0.11146
YS1**	E80M15011	0.0049	0.46	0.0000	0.78	E90M16035	0.04863	0.16503
						E80M1502	0.03879	0.17855
						E80M1504	0.0232	0.20996
						E80M1505	0.04411	0.17084
						E80M1506	0.03228	0.18966
YS2	E110M15014	0.0000	0.55	0.0012	0.35	E110M15014	0.04693	0.11247
	E90M1607	0.0084	0.33			E90M15027	0.03706	0.19266
	E100M1605	0.0056	0.35					
	E100M1606	0.0000	0.49	0.0096	0.25			
	E100M1607	0.0055	0.35					
	E100M16015	0.001	0.46					
	E110M15015			0.0036	0.30			
	E90M16024			0.0043	0.29			
YS3	E100M16036			0.0084	0.26			
	E90M15036	0.0026	0.50			E110M15014	0.02064	0.15496
	E110M1504	0.0034	0.39			E110M15015	0.0114	0.2477
	E110M15014	0.0000	0.66	0.0000	0.46	E90M15027	0.04307	0.18215
	E90M1607	0.0000	0.48	0.0067	0.28	E90M16016	0.03358	0.19803
	E90M16015	0.0048	0.36					
	E100M1604	0.0022	0.41					
	E100M1605	0.0036	0.38					
	E100M1606	0.0000	0.51	0.0059	0.28			
	E100M1607	0.01	0.31					
YS4	E100M16015	0.0000	0.49	0.0057	0.28			
	E90M16024			0.0048	0.29			
	E110M1504	0.0014	0.44			E110M1504	0.01398	0.17775
	E110M15014	0.0027	0.40	0.0082	0.28	E80M16015	0.04782	0.11178
	E90M1607	0.0027	0.40			E90M16030	0.04473	0.18108
	E90M16010	0.0025	0.41			E110M15022	0.02043	0.15667
	E90M16015	0.0012	0.45			E90M16016	0.0252	0.21818
						E90M16018	0.03471	0.19732
						E90M16022	0.03305	0.2005
						E90M16037	0.0357	0.19551

(continue of Table 7)

ادامه جدول ۷

YS5	E110M15014	0.0024	0.41			E90M15027	0.02699	0.21461
	E100M1606	0.0079	0.33			E110M15022	0.04087	0.12033
	E80M15011			0.0057	0.42			
YS6	E90M15029	0.0036	0.48			E90M15029	0.04066	0.18825
	E90M15032	0.0036	0.48			E110M15014	0.03443	0.12945
	E90M15035	0.006	0.45			E110M15022	0.02868	0.13914
	E90M15036	0.0012	0.54			E100M16034	0.03717	0.19403
	E100M1506	0.0068	0.34			E90M15015	0.04643	0.17975
	E110M1506	0.0059	0.35			E90M16016	0.04124	0.18735
	E110M15014	0.0000	0.64	1.93E-04	0.45	E100M16016	0.02929	0.20954
	E110M15021	0.0052	0.36					
	E110M15022	0.0035	0.39					
	E90M1604	0.0082	0.33					
	E90M1607	0.0019	0.42	0.0043	0.31			
	E90M16024	0.0045	0.37	0.0011	0.38			
	E100M1604	0.0000	0.52	0.0058	0.29			
	E100M1605	0.0000	0.50	0.0094	0.27			
	E100M1606	0.0000	0.60	0.0011	0.37			
	E100M1607	0.0015	0.44	0.0076	0.28			
	E100M16015	0.0000	0.61	0.0000	0.38			
	E110M15015			0.0024	0.34			
	E90M16020			0.0043	0.31			
	E100M16034			0.0039	0.31			
E110M1504	0.0048	0.36						
E110M15014	0.0000	0.50	0.002	0.38				
E90M1607	0.0069	0.34						
E100M1606	0.0061	0.35						
E80M15011			0.0053	0.42				
YS7						E110M15022	0.02518	0.14579
						E90M1509	0.03894	0.19055
YS8	E80M16020			0.0045	0.40	E80M16020	0.04679	0.11098
						E100M15019	0.04137	0.18291
						E100M15022	0.01773	0.23745

*: صفات اندازه گیری شده در شرایط نرمال YN1: طول ریشه، YN2: حجم ریشه، YN3: وزن تر ریشه، YN4: وزن خشک ریشه، YN5: سطح ریشه، YN6: قطر ریشه، YN7: چگالی ریشه، YN8: وزن خشک اندام هوایی. **: صفات اندازه گیری شده در متوسط شرایط تنش YS1: طول ریشه، YS2: حجم ریشه، YS3: وزن تر ریشه، YS4: وزن خشک ریشه، YS5: سطح ریشه، YS6: قطر ریشه، YS7: چگالی ریشه، YS8: وزن خشک اندام هوایی.

*: Evaluated traits in normal condition. YN1: Root length, YN2: Root volume, YN3: Root fresh weight, YN4: Root dry weight, YN5: Root surface, YN6: Root diameter, YN7: Root density, YN8: Shoot dry weight.

** : Evaluated traits in stress condition. YS1: Root length, YS2: Root volume, YS3: Root fresh weight, YS4: Root dry weight, YS5: Root surface, YS6: Root diameter, YS7: Root density, YS8: Shoot dry weight.

داری را با استفاده از مدل MLM در سطح پنج درصد نشان دادند. نشانگر E100-M150-22 با تبیین ۲۴ درصد از تغییرات فنوتیپی وزن خشک اندام هوایی بالاترین درصد ضریب تبیین را در بین نشانگرها به خود اختصاص داد. نشانگر

برخی از نشانگرها مثل E100M15032، E110-M150-14 و E110-M150-25 به بیش از یک شاخص مرتبط بودند که با توجه به وجود همبستگی بین شاخص‌ها، این نتیجه دور از انتظار نبود. برای صفات اندازه گیری شده در متوسط شرایط تنش نیز تعداد ۳۳ نشانگر ارتباط معنی-

می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی بسیار کاربردی باشند (Roy *et al.*, 2010). در بررسی دیگری که به منظور شناسایی نواحی مؤثر در محتوای بتا-گلوکان در دانه ۸۹ توده جو با منشا لاتویان و ۲۲ توده با منشا هالس با استفاده از ۱۲۷۳ نشانگر SNP انجام شد، با استفاده از مدل MLM همراه با ماتریس‌های K و Q، تعداد سه نشانگر 1_0673، 2_0880 و 1_1445 بر روی کروموزوم 7H شناسایی شد که ارتباط معنی‌داری را با محتوای بتا-گلوکان داشتند از آنجایی که محتوای بتا-گلوکان از مهم‌ترین ترکیبات برای تعیین کیفیت دانه جو است با شناسایی نشانگرهای مرتبط با این ترکیب می‌توان در جهت بهبود میزان و افزایش میزان این ترکیب گام برداشت (Mezaka *et al.*, 2011).

در بررسی که به منظور شناسایی جایگاه صفات کمی و تجزیه ارتباط در ۱۵۵ ذرت اینبرد با ۱۵۳۶ SNP انجام شد، نشان داد که استفاده از مدل MLM ۱/۱۵، ۱/۱۵ و ۱/۶۶ درصد SNPها ارتباط معنی‌دار با تمامی محتوای توکوفرول در دانه ذرت، ارتفاع گیاه و طول دانه در سطح یک درصد داشتند. همچنین این تحقیق نشان داد که برای تمامی صفات استفاده از مدل مبتنی بر K و مدل مبتنی بر Q به تنهایی عملکرد خوبی ندارند اما استفاده از مدل مبتنی بر K و Q بطور مشترک در مدل MLM نتایج بهتر و مؤثرتری را در بردارد (Yang *et al.*, 2010).

E110M15014 با سه صفت در شرایط تنش مرتبط بود.

در بررسی که بر روی توتون به منظور شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با مقاومت به سه بیماری معمول توتون از نشانگرهای AFLP و ۹۲ نمونه مختلف *N. tabacum* استفاده شد که در کل هفت نشانگر به ترتیب دو، سه و دو نشانگر مرتبط با مقاومت به بیماری پوسیدگی سیاه ریشه (Black root rot)، کپک آبی (Blue mold) و ویروس Y سیب زمینی (Potato Virus Y) شناسایی شدند. همچنین آنها تعدادی از این نشانگرها را به SCAR تغییر داده و سپس در جمعیت لاین‌های اینبرد نو ترکیب و هاپلوئید مضاعف به تأیید رساندند. این نشانگرها قادر بودند نمونه‌های بیمار و سالم را از هم تفکیک نمایند (Julio *et al.*, 2006).

در مطالعه‌ای که بر روی جو که ۱۴ صفت زراعی بر روی ۵۵ ژنوتیپ الیت انجام شد، تجزیه ارتباط با استفاده از ۵۱۹ نوار چندشکل مشتق از ۲۰ نشانگر SSR، دو نشانگر SAMPLE و هشت نشانگر AFLP انجام شد و نتایج پژوهش آنها نشان داد در کل بترتیب ۱۳۱، ۴۳ و ۱۶۶ نشانگر SSR، SAMPLE و AFLP حداقل با یکی از ۱۴ صفت ارتباط معنی‌داری دارند. از بین این تعداد، با در نظر گرفتن هر دو مدل GLM و MLM در بررسی آنها، تعداد ۵۱ نشانگر به عنوان نشانگرهای مثبت و آگاهی بخش شناسایی شدند و در نهایت اظهار داشتند این نشانگرهای معنی‌دار پس از تأیید و اعتبارسنجی

نتیجه گیری کلی

E80-M150-1 که مرتبط با چندین صفت بودند، می‌توانند مقدمه‌ای بر انجام تحقیقات دقیق‌تر در نواحی کاندید شناسایی شده در ژنوم باشند. تبدیل نشانگرهای AFLP به نشانگرهای اختصاصی SCAR یا نواحی تکثیری با توالی مشخص پس از تأیید پیوستگی نشانگر AFLP به مکان ژنی کنترل کننده صفت، راهکار عملی و کاربردی است که انتظار می‌رود که برای نشانگرهای مهم شناسایی شده در این تحقیق نیز مورد استفاده قرار گیرد.

در کل با توجه به بالا بودن آماره‌های نوع ژنتیکی در ترکیبات آغازگری E90-M160، E100-M160 و E90-M150 می‌توان به کارایی بالای این ترکیبات اذعان داشت و از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی دیگر به عنوان ترکیبات مناسب و کارا استفاده نمود. تجزیه ارتباط با استفاده مدل MLM توانست ۸۷ نشانگر معنی‌دار مرتبط با ۲۲ متغیر مورد بررسی را شناسایی نماید. تشخیص نشانگرهایی مانند E90-M160-37 و

منابع

- Alizadeh A (2006). Soil, water-plant relationship. Astone of Ghodse of Razavi. 472 p.
- Agrama HA, Eizenga GC, Yan W (2007). Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Molecular Breeding* 19: 341-356.
- Baum M, Grando S, Backes G, Jahoor A, Sabbagh A, Ceccarelli S (2003). QTLs for agronomic traits in the mediterranean environment identified in recombinant inbred lines of the cross 'Arta' x *H. spontaneum* 41-1. *Theoretical and Applied Genetics*. 107: 1215-1225.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES (2007). TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics Applications Note*. 2633-2635.
- Breseghele F, Sorrells ME (2006). Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science*. 46: 1323-1330.
- Brisson N, Rebiere B, Zimmer D, Renalt D (2002). Response of the root system of winter wheat crop to water logging. *Plant and Soil*. 243: 43-55.
- Casas AM, Kopahnke D, Habekub A, Schwizer G, Gracia MP, Lasa JM, Ciudad FJ, Codesal P, Moralejo MA, Molina-Cano JL, Igartua E, Ordon F (2006). Marker-trait association for disease resistance in the Spanish barley core collection. *Eucarpia, Lleida*. 141-145.
- Dadras AR (2012). Evaluation of genetic diversity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars using AFLP molecular markers. Iran, Shah Bahonar University of Kerman. M. Sc. Thesis.
- Emam Y (2007). Cereal production. Shiraz Univ. Press, third Edition. 190p.
- Eleuch L, Jilal A, Grando S, Ceccarelli S, Schmising MK, Tsujimoto H, Hajer A, Daaloul A, Baum M (2008). Genetic diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of barley germplasm using simple sequence repeat markers. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50(8): 1005-1015.
- Evanno G, Reganut E, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611-2620.

- Julio E, Verrier JL, Dorlhac de Borne F (2006). Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 335-346.
- Gangkhanlou A, Mohammadi SA, Moghaddam M, Ghasemi Golazani K, Shakiba M, Yosefi A (2012). Genetic diversity in barley as revealed by microsatellite markers and association of these markers by traits related to freezing tolerance. *Seed and Plant Improvement Journal*. 28(1): 101-114.
- Ghobadi ME, Nadian H, Bakhshandeh A, Fathi Gh, Gharineh MH, Ghobadi M (2006). Study of root growth, biological yield and grain yield of wheat genotypes under waterlogging stress during different growth stages. *Seed and Plant Improvement Journal*. 22(4): 513-527.
- Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005). Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*. 57: 461-485.
- Gomez C, Alvarez M, Mosquera T (2011). Association mapping, a method to detect quantitative trait loci: statistical bases. *Agronomia Colombiana*. 29(3): 367-376.
- Hajabbasi MA (2001). Tillage effects on soil compactness and wheat root morphology. *J. Agric. Science and Technology*. 3: 67-77.
- Malekahmadi F, Kalantari KhM, Torkzadeh M (2005). The effect of flooding stress on induction of oxidative stress and concentration of mineral element in pepper (*Caosicum annum*) plants. *Iranian Journal of Biology*. 18 (2): 110-119.
- Mezaka L, Bleidere M, Legzdina L, Rostoks N (2011). Whole genome association mapping identifies naked grain locus *NUD* as determinant of β -glucan content in barley. *Zemdirbyste-Agriculture*. 98(3): 283-292.
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000). Association mapping in structured populations. *The American Society of Human Genetics*. 67: 170-181.
- Roldain-Ruiz I, Calsyn E, Gilliland TJ, Coll R, Van Eijk MJT, De Loose M (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties, 2 AFLP characterization. *Molecular Breeding*. 6: 593-602.
- Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan SH, Gupta PK (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science*. 5: 683-689.
- Roy JK, Smith KP, Muehlbauer GJ, Chao S, Close TJ, Steffenson BJ (2010). Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. *Molecular Breeding*. 26: 243-256.
- Saghai Maroof, MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley species diversity, chromosomal location, and population dynamics, *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. 91: 5466-5570.
- Schenk MK, Barber SA (1979). Root characteristics of corn genotypes as related to P Uptake. *Agronomy Journal*. 71: 921-927.
- Shannon CE, Weaver W (1963). *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, Ill.
- Spataro G, Tiranti B, Arcaleni P, Bellucci E, Attene G, Papa R, Spagnoletti Zeuli P, Negri V (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 122: 1281-1291.
- Thomas W (2002). Molecular marker-assisted versus conventional selection in barley breeding. In: Slafer G, Molina- Cano JL, Savin R, Araus JL, Ramagosa I (eds) *Barley science: recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality*. Food Products Press, New York, pp 177-203.

- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TVD, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 4407-4414.
- Yang X, Yan J, Shah T, Warburton ML, Li Q, Li L, Gao Y, Chai Y, Fu Z, Zhou Y, Xu S, Bai G, Meng Y, Zheng Y, Li J (2010). Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection. *Theoretical and Applied Genetics*.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TJB, Ye ZH, Mao JX (1997). POPGENE, The user-friendly shareware for population genetic analysis. Edmonton, Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.
- Zhang HY, Liu XZ, Li TS, Yang YM (2006). Genetic diversity among flue-culcerd tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) revealed by amplified fragment length polymorphism. *Botanical Studies*. 47: 223-229.

Identification of AFLP markers related to tolerance to flooding stress in barleyHeydari R.¹, Sabouri A.^{*1}, Sabouri H.², Fallahi H.A.³, Dadras A.R.⁴

¹ MSc student of Plant Breeding and Assistant professor of Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

² Associate professor Department of Plant Production, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University., Golestan, Iran.

³ Assistant professor of Agriculture Research Center of Golestan-Agric. Res. Golestan, Iran.

⁴ PhD student of Plant Breeding of Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

Abstract

According to the importance of studies of abiotic stress, present study was done in order to identify of molecular markers with significant association to flooding stress tolerance in barley. This study carried out using of AFLP markers and 40 barley genotypes. Generally 22 variables in both normal and flooded, eight characters including shoot dry weight, length, volume, wet weight, dry weight, leaf area, root diameter and density tolerance was assessed with six indicators (SSI, STI, GMP, TOL, YI and YSI). Seven primer combinations of *EcoRI* and *MseI* a total of 245 bands were produced, of which, 227 bands were polymorphic and had an average of 92.37 percent polymorphism. Three combinations E90-M160, E100-M160 and E90-M150 had higher values of genetic variation compared to other combinations and were more effective in distinguish of genotypes. Association analysis was performed using structure matrix and statistical models of GLM and MLM by using of TASSEL software for 22 variables. The MLM model in 5 percent probability level identified 87 markers related to evaluated traits. According to the results of association analysis in normal condition the highest of coefficient of determination was for E100M16027 with explanation of 32 percent of root diameter variation and for tolerance indices and stress condition the highest coefficient of determination were for E80M1501 and E100M15022 with 24 percent explanation of variation of GMP index and shoot dry weight respectively.

Keywords: *Assosiation analysis, Population structure, Flooding stress, AFLP Markers.*

* Corresponding Author: Sabouri A. Tel: 09113411496

E-mail: a.sabouri@guilan.ac.ir