Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵
صفحه ۳۸۹ - ۳۷۷

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

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

زینب روئین*[۱]، معظم حسن‌پور اصیل[۲]، عاطفه صبوری[۲]

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

Roein Z*[1], HassanpourAsil M[2], Sabouri A[2]

1- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Ilam University
2- Professor, Assistant Professor, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan

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

(تاریخ دریافت: ۹٤/٦/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/٦/۲۸)

چکیده

فعالیت‌های فیزیولوژیک و تغییرات بیوشیمیایی بعد از برداشت گل‌های بریدنی هم‌چنان ادامه دارد. این شرایط سبب کاهش ماندگاری و تسریع فرایند پیری گل می‌شود. با هدف شناسایی نشانگرهای AFLP مرتبط با پیری گل داوودی از تجزیه ارتباط استفاده شد. ارتباط بین صفات بیوشیمیایی و نشانگرهای ملکولی با استفاده از ۲۵ ترکیب آغازگری (*Eco*RI و *Mse*I) و ٤٤ ژنوتیپ گل داوودی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری (r=۰/۳۰٤) بین غلظت پروتئین و پراکسیداسیون لیپید به‌عنوان شاخص‌های پیری، وجود دارد. بررسی تجزیه ارتباط در مدل MLM برای پنج متغیر سبب شناسایی ۱٤۳ نشانگر معنی‌دار و مرتبط با صفات بیوشیمیایی شد، در حالی‌که در مدل GLM، ٤۱۹ نشانگر مرتبط با صفات مذکور شناسایی شد. بیش‌ترین تعداد نشانگر معنی‌دار برای میزان مالون‌دی‌آلدئید (٤۹ نشانگر) و کم‌ترین تعداد نشانگر (۱٤ نشانگر) برای پیری گلبرگ داوودی مشاهده شد. قوی‌ترین ارتباط (٤۷ درصد)، بین میزان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و نشانگر M-CAC/E-AGA13 برقرار بود. از طرف دیگر بیش از ۳۲ درصد از تغییرات مربوط به پیری گلبرگ توسط نشانگر M-CTT/E-AAC35 بیان شد. هم‌چنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط دارند. بنابراین نشانگرهای آگاهی‌بخش حاوی اطلاعات مفید مانند M-CTG/E-ACC16، M-CAA/E-AAG40 و M-CTG/E-AGA3 که همبستگی معنی‌داری با چندین صفت دارند، در صورت تائید در سایر آزمایش‌ها، می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی برای افزایش ماندگاری گل داوودی استفاده شوند.**

واژه‌های کلیدی

آنزیم
پیری گلبرگ
داوودی
نشانگر آگاهی‌بخش
همبستگی

Archive of SID

مقدمه

همانند سایر محصولات فسادپذیر باغبانی، ماندگاری گیاهان زینتی نیز تحت تأثیر عامل‌های فیزیکی، محیطی و بیولوژیک است. انتخاب مواد گیاهی مناسب و رعایت عوامل مؤثر پس از برداشت، نقش مهمی در ماندگاری مطلوب با حداقل ضایعات را دارد. پیری یکی از تغییرات رو به زوال است که منجر به مرگ سلول، بافت، اندام و در نهایت تمام گیاه می‌شود. این فرآیند ژنتیکی در کنترل ژن‌هاست که به‌وسیله عامل‌های محیطی در طول رشد و نمو گیاه مدیریت می‌شود (Elanchezhian and Srivastava 2001). پیری در برگ و گلبرگ به‌وسیله علایم قابل مشاهده مانند زردی برگ، ریزش، پژمردگی و پلاسیدگی گلبرگ که تعیین‌کننده کیفیت و ارزش زینتی گیاه است مشخص می‌شود. اما این نشانه‌ها در مراحل پایانی و بعد از تغییرات ساختاری، ملکولی و بیوشیمیایی ظاهر می‌شوند (Battelli et al. 2011; Lerslerwong et al. 2009). گل داوودی یکی از پرکاربردترین گیاهان زینتی است. آنچه مهم به‌نظر می‌رسد اهمیت شناخت تغییرات فیزیولوژیک است که در طی پیری در گل به‌عنوان اندام نهایی برای ارزیابی اتفاق می‌افتد. شناسایی این رفتارهای فیزیولوژیک در زمان پیری و پس از برداشت برای انتخاب ژنوتیپ برتر مهم به‌نظر می‌رسد. تنوع ژنوتیپی یک فرصت مناسب برای توسعه گیاهان با ماندگاری طولانی است.

از طرف دیگر، درک دامنه تنوع و ساختار ژنتیکی از خزانه ژنی، معیاری برای مدیریت و استفاده مؤثر از منابع ژرم‌پلاسم است. تکنولوژی‌های نوین ژنتیک به‌ویژه توالی‌یابی DNA، منجر به توسعه روش‌های جدید اندازه‌گیری شباهت و تفاوت ژنتیکی در گونه‌ها و جمعیت‌های گیاهی شده‌است (Xu 2010). از جمله اهداف متخصصین ژنتیک گیاهی و به‌نژادگران تبیین تنوع فنوتیپی است که با تغییرات در توالی DNA ارتباط دارد (Myles et al. 2009). در این راستا استفاده از تجزیه ارتباط به‌عنوان یک رهیافت برای آشکارسازی ارتباط بین صفت و نشانگر می‌تواند مکمل مناسبی برای مطالعات اصلاح کلاسیک باشد. تجزیه ارتباط به‌طور موفقیت‌آمیزی در محصولات مختلف برای شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با انواع صفات به‌کار گرفته شده‌است (Berger et al. 2013). از جمله روش‌های ملکولی تجزیه صفات کمی با استفاده از نشانگرهای DNA، تجزیه ارتباط می‌باشد. این روش می‌تواند راه حل سودمندی برای آشکارسازی ارتباط بین صفت و نشانگر باشد، اما اطلاعات اندکی از کاربرد این تکنیک برای جمعیت‌های در حال اصلاح گیاهی وجود دارد. با روش‌های مناسب آماری، تجزیه ارتباط می‌تواند به گونه‌ای صحیح و معتبر برای جمعیت-های گیاهی انجام شود. با این روش امکان مکان‌یابی دقیق و مطمئن ژن‌ها و مکان‌های کنترل کننده صفات کمی فراهم می‌شود (Breseghello and Sorrells 2006). به عبارت دیگر تجزیه ارتباط روشی جایگزین برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و پیچیده در مجموعه ژرم‌پلاسم است، به‌طوری‌که قبل از استفاده از ژرم‌پلاسم در برنامه‌های به‌نژادی اطلاعات مناسبی را در اختیار به‌نژادگر قرار می‌دهد (Hwang 2008). برای طبقه‌بندی جمعیت‌ها در ابتدا تنها از مدل خطی عمومی یا GLM[1] استفاده می‌شد که بر ارتباط‌های ساختاری، کنترل ژنومی و روابط خویشاوندی استوار است. اما با گذشت زمان مدل خطی مخلوط یا MLM[2] به‌عنوان یک روش بهبود یافته برای محاسبه هم‌زمان ساختار جمعیت و ارتباط بین افراد جمعیت معرفی شد (Zhang et al. 2010). حاصل تجزیه ساختار جمعیت یک ماتریس Q است که میزان شباهت نسبی ژنوتیپ‌ها در زیر گروه‌ها را مشخص می‌کند. روش Q به‌صورت خطی عمومی یا مدل GLM اجرا می‌شود. مجموع داده‌های این روش شامل داده‌های ملکولی، داده‌های صفات مورد ارزیابی و ماتریس Q حاصل از تجزیه ساختار جمعیت است. برای فراهم کردن تحلیل‌های بیش‌تری از ساختار جمعیت، ماتریس Kinship ارائه شد (Hardy and Vekemans 2002). بنابراین تعیین ساختار با استفاده از ماتریس Kinship دقت تخمین فاصله ژنتیکی بین افراد را افزایش می‌دهد (Hwang 2008). روش Q+K در مقایسه با مدل‌های خطی رایج در تجزیه ارتباط روش برتری است، زیرا هر دو اطلاعات حاصل از K (ضریب خویشاوندی افراد) و Q (ضرایب ساختار جمعیت) را با هم تلفیق می‌کند، به‌طوری‌که به‌صورت خطی مختلط یا MLM قابل اجراست (Yu et al. 2006; Wang et al. 2012). مجموع داده‌های این روش شامل داده‌های ملکولی، داده‌های

[1] General linear model
[2] Multiple linear model

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

در پژوهشی برای بررسی ارتباط ۱۹ نشانگر SRAP و ۱۸ صفت مهم فنوتیپی از ۵۸ رقم داوودی استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که شش مکان در نشانگرهای SRAP ارتباط معنی‌داری با پنج صفت کمی مربوط به گل و برگ دارند. به‌طوری‌که مقدار تبیین فنوتیپی مکان‌ها بین ۰/۰۷٤ تا ۰/٤۸ بود (Li et al. 2012).

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

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

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد ارزیابی شامل ٤٤ ژنوتیپ داوودی از ایستگاه ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی شهرستان محلات تهیه شدند. لازم به یادآوری است که ژنوتیپ‌های مذکور از نوع اسپری با کاربرد گلدانی و باغچه‌ای بودند. این بررسی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد به‌گونه‌ای که هر ژنوتیپ به‌عنوان یک تیمار و هر گلدان حاوی یک گل به‌عنوان تکرار در نظر گرفته شد. به‌منظور فراهم کردن شرایط رشد مناسب، قلمه‌های ریشه‌دار شده به مدت سه هفته تحت شرایط روز بلند (تیر ماه) و دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس برای القا و نمو گل شرایط روز کوتاه با ۹ ساعت روشنایی (با استفاده از لامپ‌های سدیمی) مهیا شد. برای مقایسه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از لحاظ رفتار فیزیولوژیک گل داوودی بعد از برداشت و در طی پیری، گل‌ها با گلچه‌های زبانه‌ای کاملاً باز برداشت شدند. چهار عدد گل از هر بوته برداشت و بدون ساقه گل در لوله‌های آزمایشی محتوی آب‌مقطر قرار گرفت. سپس گل‌ها در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد و نور ۱۵ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه نگهداری شدند. برای ارزیابی صفات مورد نظر، نمونه‌برداری در سه مرحله باز شدن کامل گلچه‌های زبانه‌ای (۱)، باز شدن کامل گلچه‌های لوله‌ای (۲) و پایان ماندگاری گل (۳) انجام شد (Wang et al. 2013). برای اندازه‌گیری پروتئین کل در گلچه‌های زبانه‌ای در سه مرحله مذکور از روش برادفورد (Bradford 1976) استفاده شد. جهت اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی از روش Heath and Packer (1968) استفاده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Luck (1974) استفاده شد. تجزیه آب اکسیژنه با کاهش جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر همراه است که از طریق همین کاهش جذب، فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد. از طرف دیگر، سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (Giannopolitis and Ries 1977) نیز انجام شد. آغاز پیری گل به‌صورت تعداد روز از برداشت گل (باز شدن گل) تا زمانی‌که یک یا دو گلچه زبانه‌ای بیرونی پژمرده شوند، محاسبه شد (Lv et al. 2011). مراحل استخراج DNA با روش CTAB (Saghai-Maroof et al. 1984) انجام پذیرفت. روش AFLP بر اساس

www.SID.ir

Archive of SID

روش Vos et al. (1995) انجام شد. مطابق جدول ۱، از ۲۵ ترکیب آغازگری مبتنی بر دو آنزیم برشی *Eco*RI و *Mse*I برای تحقیق حاضر استفاده شد (Roein et al. 2014).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از میانگین صفات مورد ارزیابی برای محاسبه همبستگی پیرسون استفاده شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ (IBM Corp 2012) انجام شد. برای برآورد تعداد جمعیت‌های ژنتیکی در ٤٤ ژنوتیپ مورد بررسی از نرم‌افزار Structure نسخه 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) استفاده شد. برای مطالعه رابطه بین ویژگی‌های بیوشیمیایی و ملکولی ژنوتیپ‌های گل داوودی از روش تجزیه ارتباط با نرم‌افزار TASSEL نسخه 3.1 (Bradbury et al. 2007) استفاده شد.

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

آغازگر انتخابی	کد	توالی
MseI +3		
MseI+ CAC	M-CAC	5′-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3′
MseI+ CAG	M-CAG	5′-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3′
MseI+ CAA	M-CAA	5′-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3′
MseI+ CTT	M-CTT	5′-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3′
MseI+ CTG	M-CTG	5′-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3′
EcoRI+3		
EcoRI+ ACA	E-ACA	5′-GTAGACTGCGTACCAATTCACA-3′
EcoRI+ AAC	E-AAC	5′-GTAGACTGCGTACCAATTCAAC-3′
EcoRI + AAG	E-AAG	5′-GTAGACTGCGTACCAATTCAAG-3′
EcoRI+ AGA	E-AGA	5′-GTAGACTGCGTACCAATTCAGA-3′
EcoRI+ ACC	E-ACC	5′-GTAGACTGCGTACCAATTCACC-3′
EcoRI+ ACG	E-ACG	5′-GTAGACTGCGTACCAATTCACG-3′
EcoRI+ AA	E-AA	5′-GTAGACTGCGTACCAATTCAA-3′

جدول ۲- آماره‌های توصیفی مرتبط با صفات بیوشیمیایی مورد مطالعه

صفت	واحد	حداقل	حداکثر	میانگین	دامنه تغییرات
پروتئین (۱)*	میلی‌گرم بر گرم وزن تر	۲/۱۲	۲۲	۱۵/۲۸	۲۰/۲٦
پروتئین (۲)	–	۰/٦۷	۱٦/٦۸	۹/۲۹	۱٦/۰۱
پروتئین (۳)	–	۱/۱	۱۷/۱۵	۳/۷۹	۱٦/۰۵
مالون‌دی‌آلدئید (۱)	نانومول بر گرم وزن تر	۰/۱	۲/۸۱	۱/۱۹	۲/۷۱
مالون‌دی‌آلدئید (۲)	–	۱/۰۳	۵/٤۵	۲/۱۱	٤/٤۲
مالون‌دی‌آلدئید (۳)	–	۱	۹/۷۱	۳/۱۲	۸/۷۱
سوپراکسیددیسموتاز (۱)	واحد آنزیمی بر گرم وزن تر	۱٤	۲۰/۹۵	۱۷/۷۳	٦/۸۵
سوپراکسیددیسموتاز (۲)	–	۱٦/۷	۱۸/۸۳	۱۷/۵۸	۲/۱۳
سوپراکسیددیسموتاز (۳)	–	۱٤/۲۰	۱۹/۰۸	۱۷/٤۱	٤/۸۸
کاتالاز (۱)	واحد آنزیمی بر گرم وزن تر	۵۷/۳٤	٤۹۱/۹	۱۹٦/۸۵	٤۳٤/٦۳
کاتالاز (۲)	–	۱۲٦/۱۵	۹۲٤/۳	٤۵٦/۸٦	۷۹۸/۱٦
کاتالاز (۳)	–	۸۰/۲۸	۱۳۰۲/۷۵	۵۰٤/۹۱	۱۲۲۲/٤۷
پیری	روز	۱۰	٤۰	۱۹/٤۵	۳۰

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

نتایج و بحث

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

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

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

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

وجود داشت. این موضوع از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا انتخاب ژنوتیپ‌هایی که در بروز نشانه‌های پیری تأخیر دارند، امکان انتخاب و تولید ارقام با ماندگاری بالا را فراهم می‌سازد. نتایج حاصل از برآورد ضرایب همبستگی ساده بین صفات نشان داد که بین غلظت پروتئین در مرحله سوم نمونه‌برداری و پراکسیداسیون لیپید در مرحله دوم نمونه‌برداری همبستگی مثبت و معنی‌داری (r=۰/۳۰٤**) وجود داشت (جدول ۳). رابطه مثبت و معنی‌دار بین آغاز پیری با فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله سوم نمونه‌برداری (r=۰/۲٥٤**) مشاهده شد. هر چند نتیجه ضریب همبستگی از لحاظ آماری معنی‌دار است، اما این صفت دارای ضریب تبیین پایین است و سهم اندکی در بیان تغییرات پیری گل دارد. لذا تنها نمی‌توان به مقادیر کم ولی معنی‌دار همبستگی بین صفات اعتماد کرد و باید گزینش بر اساس صفت مذکور با احتیاط بیش‌تری انجام شود. با استفاده از نرم‌افزار Structure بهترین تعداد خوشه (K) بر اساس احتمال لگاریتمی مستخرج از داده‌ها بدست آمد. کلاستربندی بیزین[1] از ۲٥ ترکیب آغازگری حاصل از این پژوهش نشان داد که بالاترین دلتا K برای ٤٤ ژنوتیپ در K=٤ حاصل می‌شود (Roein et al. 2014). بر همین اساس برای تجزیه نهایی K=٤ به‌عنوان بهترین گروه‌بندی انتخاب شد. نتایج شاخص‌های تنوع نشانگرهای AFLP و همچنین ساختار جمعیت در پژوهش قبلی آورده شده است (Roein et al. 2014).

[1] Bayesian

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

	پروتئین (۱)	پروتئین (۲)	پروتئین (۳)	مالون‌دی‌آلدئید (۱)	مالون‌دی‌آلدئید (۲)	مالون‌دی‌آلدئید (۳)	سوپراکسیددیسموتاز (۱)	سوپراکسیددیسموتاز (۲)	سوپراکسیددیسموتاز (۳)	کاتالاز (۱)	کاتالاز (۲)	کاتالاز (۳)	پیری
پروتئین (۱)*	۱												
پروتئین (۲)	۰/٤۱٥**	۱											
پروتئین (۳)	-۰/۱۰۰	۰/٤۷۹**	۱										
مالون‌دی‌آلدئید (۱)	-۰/۰٥۳	۰/۱٤۲	۰/۱۰۳	۱									
مالون‌دی‌آلدئید (۲)	-۰/۰۲۱	۰/۲۰۰*	۰/۳۰٤**	۰/۳٥٤**	۱								
مالون‌دی‌آلدئید (۳)	۰/۱۲۹	۰/۲۲۸*	۰/۱۷۲	۰/۱٤۷	۰/٤٥٥**	۱							
سوپراکسیددیسموتاز (۱)	۰/۰۹۱	۰/۱۸۷	۰/۱۰۸	-۰/۱۰۹	۰/۰۳۷	۰/۰۰٥	۱						
سوپراکسیددیسموتاز (۲)	۰/۲۰٥*	۰/۰٤۲	۰/۱۱۲	۰/۰٥۳	-۰/۰۸۹	۰/۰۲۷	۰/۳۸۰**	۱					
سوپراکسیددیسموتاز (۳)	۰/۱۰۸	۰/۰۸۳	۰/۰٥۱	-۰/۰۸۷	-۰/۰٤۷	۰/۱۱	۰/۱۷۸	۰/۳۹٦**	۱				
کاتالاز (۱)	-۰/۰٦٦	۰/۰۹٤	۰/۰۹۹	-۰/۱۹۱*	-۰ /۱۲۳	۰/۰۸٥	-۰/۰۹۹	-۰/۱٥۷	۰/۰٥۳	۱			
کاتالاز (۲)	-۰/۱۹٥	-۰/۰۹٦	۰/۰٦۲	-۰/۱۰٤	-۰/۰۱۱	-۰/۰۹۹	-۰/۲۲۳*	-۰/۲۰٦*	-۰/۰۳٤	۰/٤۱٤**	۱		
کاتالاز (۳)	۰/۰٦۳	۰/۱۲۸	۰/۲٦۷**	۰/۱۱۹	۰/۱٤٤	-۰/۲۳۲*	-۰/۰۰٦	۰/۰٤۰	۰/۰۸۷	-۰/۱۸٦*	-۰/۱۰۳	۱	
پیری	-۰/۰۲۰	۰/۰۳۸	۰/۰۱٦	۰/۲۲۳*	۰/۱٤۹	۰/۰۳٦	-۰/۱٥۲	۰/۰۰٥	۰/۱٥٦	۰/۰٤۰	۰/۱۳۱	۰/۲٥٤**	۱

* اعداد (۱)، (۲) و (۳) نشان‌دهنده مراحل مختلف نمونه‌برداری است.

جدول ٤- تعداد نشانگرهای معنی‌دار و مرتبط با صفات بیوشیمیایی پس از برداشت ژنوتیپ‌های گل داوودی در مدل‌های GLM و MLM

صفت	تعداد نشانگر (Q)	تعداد نشانگر(Q+K)
* پروتئین (۱)	۱۱۳	۱۷
پروتئین (۲)	۱۹	۹
پروتئین (۳)	۳۱	۸
مالون‌دی‌آلدئید (۱)	۲٦	۱٤
مالون‌دی‌آلدئید (۲)	۲۷	۱٤
مالون‌دی‌آلدئید (۳)	۳۳	۲۱
سوپراکسیددیسموتاز (۱)	٤۷	۱۹
سوپراکسیددیسموتاز (۲)	۱۰	٤
سوپراکسیددیسموتاز (۳)	۱۳	۳
کاتالاز (۱)	۱۸	۸
کاتالاز (۲)	۲۳	۷
کاتالاز (۳)	۳۱	٥
پیری	۲۸	۱٤
مجموع نشانگرها	٤۱۹	۱٤۳

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

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

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

اطلاعات ارئه شده در جدول ٤ تعداد نشانگرهای مرتبط و معنی-دار در دو مدل GLM (Q) و MLM (Q+K) در صفات مختلف بیوشمیایی را نشان می‌دهد. در اکثر صفات مورد بررسی در مدل GLM تعداد نشانگرهای بیش‌تری با صفات ارتباط معنی‌داری نشان دادند، اما در خروجی مدل MLM، تعداد نشانگرهای مرتبط با صفات مذکور نسبت به مدل GLM کاهش یافت. دلیل این امر، همبستگی بین نشانگرهایی است که در مدل MLM برآورد شده-اند، به‌طوری‌که این مدل نشانگرهای غیر همبسته یا نشانگرهایی با همبستگی کاذب را حذف می‌کند (Zhao et al. 2007). لازم به ذکر است که حداقل سطح معنی‌داری برای تجزیه ارتباط بین صفات و نشانگرها در این پژوهش یک درصد ($P<0.01$) در نظر گرفته شد. در مجموع در این بررسی برای دو مدل GLM و MLM، به‌ترتیب ٤١٩ و ١٤٣ نشانگر شناسایی شد که با صفات بیوشیمیایی ارتباط معنی‌دار (در سطح احتمال یک درصد) داشتند. با توجه به پایداری نتایج در مدل MLM، در این پژوهش نتایج این مدل در ارتباط با صفات مختلف بیوشیمیایی مورد بحث قرار می‌گیرد.

پروتئین

در مجموع ٣٤ نشانگر برای مراحل مختلف اندازه‌گیری پروتئین شناسایی شد که سهم هر کدام از این مراحل در میزان نشانگر مرتبط و معنی‌دار متفاوت بود. اطلاعات مربوط به این نشانگرها در جدول ۵ آورده شده‌است.

الف- پروتئین (۱): در مجموع ۱۷ نشانگر معنی‌دار و مرتبط با میزان پروتئین در مرحله اول نمونه‌برداری به‌دست آمد. مهم‌ترین نشانگر، M-CAA/E-AGA39 بود که ۳۳ درصد از تغییرات واریانس فنوتیپی این صفت را بر عهده داشت. بعد از آن، نشانگر M-CAA/E-AGA23 توانست ۳۱ درصد از تغییرات فنوتیپی را شرح دهد. لازم به یادآوری است که به جز دو نشانگر M-CTG/E-AAG8 و M-CTG/E-ACC16 که به‌ترتیب با میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مرحله یک و دو ارتباط

www.SID.ir

Archive of SID

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

ب- پروتئین (۲): مطابق با نتایج به‌دست آمده، نه نشانگر مرتبط با میزان پروتئین در مرحله دو شناسایی شد که نشانگر M-CAC/E-AAC49 با ضریب تبیین ۲۹ درصد و بیشترین سطح معنی‌داری (P=۹/۵۵E-۰٤) به‌عنوان مؤثرترین نشانگر برای توضیح تغییرات میزان پروتئین در مرحله دو شناخته شد. عدم وجود ارتباط مشترک بین نه نشانگر مرتبط با پروتئین در مرحله دو با سایر صفات فیزیولوژیک نشان می‌دهد که این نشانگرها تنها به این صفت اختصاص دارند.

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

مالون‌دی‌آلدئید

بر اساس نتایج به‌دست آمده که در جدول ۵ نیز ارایه شده است در مجموع ٤۹ نشانگر مرتبط با میزان مالون‌دی‌آلدئید شناسایی شدند. سهم هر کدام از مراحل در برقراری ارتباط با نشانگرها متفاوت بود که در زیر به‌صورت جداگانه مورد بررسی قرار می‌گیرند.

الف- مالون‌دی‌آلدئید (۱): تعداد ١٤ نشانگر معنی‌دار و مرتبط با میزان مالون‌دی‌آلدئید در مرحله یک شناسایی شد. نشانگر M-CTT/E-AAG47 با توجیه ۲۸ درصد از تغییرات مربوط به میزان مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان بارزترین نشانگر مؤثر بر این صفت در نظر گرفته شد. بین نشانگرهای مرتبط با میزان مالون‌دی‌آلدئید و سایر صفات بیوشیمیایی مورد ارزیابی ارتباط معنی‌دار وجود داشت. بر این اساس، نشانگر M-CTG/E-AGA3 با میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله یک و نشانگر M-CAA/E-AAG40 با پیری گل ارتباط مشترک و معنی‌دار داشت. همان‌طورکه در جدول همبستگی (جدول ۳) مشاهده می‌شود، میزان مالون دی‌آلدئید در مرحله یک با دو صفت مذکور همبستگی معنی داری را نشان داد.

ب- مالون‌دی‌آلدئید (۲): همانند مرحله قبل، برای این مرحله نیز تعداد ١٤ نشانگر شناسایی شد (جدول ۵). اصلی‌ترین نشانگر، نشانگر M-CAC/E-ACG87 بود که ٣٦ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را بیان می‌نماید. همان‌طورکه قبلاً اشاره شد نشانگر M-CAC/E-AAG18 با میزان مالون‌دی‌آلدئید در مرحله یک ارتباط مشترک دارد. بر اساس اطلاعات ارایه شده در جدول پنج، سه نشانگر M-CAC/E-ACG87، M-CAA/E-ACA85 و M-CAA/E-AGA78 به‌طور مشترک با میزان مالون‌دی‌آلدئید در مرحله سه ارتباط داشتند.

پ- مالون‌دی‌آلدئید (۳): از بین مراحل مختلف اندازه‌گیری مالون-دی‌آلدئید، بیش‌ترین تعداد نشانگر یعنی ۲۱ نشانگر برای میزان مالون‌دی‌آلدئید در مرحله سه شناسایی شد. بیش‌ترین درصد تبیین و توجیه به نشانگر M-CAA/E-AGA78 با ۳۲ درصد تعلق داشت. همان‌طورکه پیش‌تر نیز بیان شد، نشانگر M-CAA/E-AGA78 همراه با دو نشانگر M-CAC/E-ACG87 و M-CAA/E-ACA85 با میزان مالون‌دی‌آلدئید در مرحله دو ارتباط مشترک و معنی‌دار داشت. علاوه بر آن نشانگر M-CAG/E-AAG88 ارتباط معنی‌داری با میزان فعالیت کاتالاز در مرحله سه دارد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

بر اساس نتایج به‌دست آمده که در جدول ۵ نیز ارائه شده‌است در مجموع ٢٦ نشانگر مرتبط با میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز شناسایی شد. سهم هر کدام از مراحل در برقراری ارتباط با نشانگرها متفاوت بود که در زیر به‌صورت جداگانه مورد بررسی قرار می‌گیرند.

الف- آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (۱): تعداد ۱۹ نشانگر با میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مرحله یک مرتبط بودند که از بین آن‌ها نشانگر M-CAC/E-AGA13 با توجیه ٤٧ درصد از تغییرات فنوتیپی به‌عنوان مؤثرترین نشانگر در نظر گرفته شد. دو نشانگر M-CAC/E-AGA5 و M-CAC/E-AGA63 با توضیح ۳۹ درصد از واریانس فنوتیپی در رتبه بعدی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در بین نشانگرهای شناسایی شده تنها نشانگر M-CTG/E-AAG8 با میزان پروتئین در مرحله یک ارتباط مشترک و معنی‌دار داشت.

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

آنزیم کاتالاز

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

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

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

پ- آنزیم کاتالاز (۳): ارتباط بین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله سه توسط پنج نشانگر قابل درک است. نشانگر M-CTG/E-AA43 به خاطر ضریب تبیین حدود ۲۱ درصد که بالاتر از بقیه نشانگرها بود به‌عنوان نشانگر مؤثر صفت شناسایی شد. نشانگر M-CAG/E-AAG88 از ارتباط مشترکی با صفت میزان مالون‌دی‌آلدئید در مرحله سه برخوردار بود.

پیری گل

مطابق با نتایج و آنچه در جدول ۵ ارائه شده‌است، ۱۴ نشانگر مرتبط با پیری گل به‌دست آمد. از بین این تعداد نشانگر، می‌توان به نشانگر M-CTT/E-AAC35 با ضریب تبیین ۳۲ درصد اشاره کرد که به‌عنوان مهم‌ترین نشانگر در بیان پیری گل به حساب می‌آید. لازم به ذکر است که ضریب تبیین سایر نشانگرها کم‌تر از ۳۰ درصد بود. در این پژوهش ارتباط معنی‌دار بین نشانگر M-CAA/E-AAG40 و میزان مالون‌دی‌آلدئید در مرحله یک مشاهده شد. نکته جالب توجه و قابل ذکر این‌که همبستگی مثبت و معنی‌دار بین پیری گل با میزان مالون‌دی‌آلدئید در مرحله یک ($r=۰/۲۲۳^{*}$) وجود داشت.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر اولین پژوهشی است که به تجزیه ارتباط ژنوتیپ‌های داوودی ایران با نشانگرهای ملکولی (نشانگر AFLP) می‌پردازد. بررسی حاضر نشان داد که ژنوتیپ‌های داوودی مورد بررسی دارای تنوع بالایی از نظر ماندگاری و رفتارهای بیوشیمیایی در زمان پیری هستند. از طرف دیگر، مقایسه دو مدل GLM و MLM نشان داد که در مدل MLM، تعداد نشانگرهای مرتبط با صفات کاهش یافت. این امر می‌تواند ناشی از توانایی این مدل در شناسایی و حذف نشانگرهایی با همبستگی کاذب باشد. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان بیان کرد که نشانگرهای M-CAC/E-AGA13، M-CAC/E-AGA5 و M-CAC/E-AGA63 بیش از سایر نشانگرها پیوسته به ژن‌های کنترل کننده میزان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مرحله یک بودند و به همین دلیل تغییرات بیش‌تری از صفت مورد بررسی را نشان دادند. نتایج نشان می‌دهد که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط دارند. بر این اساس و با توجه به همبستگی فنوتیپی ساده معنی‌دار بین صفات مورد مطالعه، به نظر می‌رسد این امر ناشی از پلیوتروپی[1] یا پیوستگی بین ژن‌های کنترل کننده این صفات باشد. بنابراین، شناسایی نشانگرهایی با اطلاعات مفید مانند M-CTG/E-ACC16، M-CAA/E-AAG40 و M-CTG/E-AGA3 که

[1] Pleiotropy

www.SID.ir

Archive of SID

همبستگی معنی‌دار با چند صفت دارند می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی داوودی به کار روند. علاوه بر آن در تهیه نقشه‌های پیوستگی اطلاعات نشانگری به‌دست آمده از این تحقیق جهت انتخاب آغازگرهای مناسب، مفید خواهد بود. هم‌چنین می‌توان نوار نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده که ضریب تبیین بالایی دارند را پس از تأیید ارتباط آن‌ها با صفات مورد بررسی با تهیه نشانگرهای SCAR از روی ژل جدا و همسانه‌سازی نمود. تحقیق حاضر می تواند شروعی باشد برای انتخاب نشانگر مناسب و صفات مطلوب مانند تاخیر در پیری یا ماندگاری، تا با انتخاب بر اساس آن‌ها بتوان به نتیجه بهتری برای به‌نژادی رسید.

منابع

Battelli R, Lombardi L, Rogers HJ, Picciarelli P, Lorenzi R and Ceccarelli N (2011) Changes in ultrastructure, protease and caspase-like activities during flower senescence in *Lilium longiflorum*. Plant Science 180: 716-725.

Berger GL, Liu S, Hall MD, Brooks WS, Chao S, Muehlbauer GJ, Baik BK, Steffenson B and Griffey CA (2013) Marker-trait associations in Virginia Tech winter barley identified using genome-wide mapping. Theoretical and Applied Genetics 126: 693-710.

Blears MJ, De Grandis SA, Lee H and Trevors JT (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 21: 99-114.

Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y and Buckler ES (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23: 2633-2635.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.

Breseghello F and Sorrells ME (2006) Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. Crop Science 46: 1323-1330.

Elanchezhian R and Srivastava GC (2001) Physiological responses of chrysanthemum petals during senescence. Biologia plantarum 44: 411-415.

Fu YB and Williams DJ (2008) AFLP variation in 25 *Avena* species. Theoretical and Applied Genetics 117: 333-342.

Giannopolitis CN and Ries SK (1977) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. Plant physiology 59: 309-314.

Hardy OJ and Vekemans X (2002) Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Molecular ecology notes 2: 618-620.

Heath R and Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid per- oxidation. Archives of biochemistry and biophysics 196: 385-395.

Hwang EY (2008) Association analysis in soybean. Ph.D. Thesis. University of Maryland, College Park.

IBM Corp. Released (2012) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Kraakman ATW, Martinez F, Mussiraliev B, van Eeuwijk FA and Niks RE (2006) Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. Molecular Breeding 17: 41-58.

Lerslerwong L, Ketsa S and van Doorn WG (2009) Protein degradation and peptidase activity during petal senescence in *Dendrobium* cv. Khao Sanan. Postharvest Biology and Technology 52: 84-90.

Li RW, Chen W and Dai SL (2012) The Association Analysis of Phenotypic Traits with SRAP Markers in Chrysanthemum. Scientia Agricultura Sinica 45: 1355-1364.

Luck H (1974) Methods in Enzymatic Analysis II (ed.) Bergmeyer. (Publ.) Academic Press, New York. 885.

Lv G, Tang D, Chen F, Sun Y, Fang W, Guan Z, Liu Z and Chen S (2011) The anatomy and physiology of spray cut chrysanthemum pedicels, and expression of a caffeic acid 3-O-methyltransferase homologue. Postharvest Biology and Technology 60: 244-250.

Meudt HM and Clarke AC (2007) Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. Trends in Plant Science 12: 106-117.

Myles S, Peiffer J, Brown P, Ersoz E, Zhang Z, Costich D and Buckler E (2009) Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. The Plant Cell 21: 2194-2202.

Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data, Genetics 155: 945-959.

Roein Z, Hassanpour Asil M, Sabouri A and Dadras AR (2014) Genetic structure of *Chrysanthemum* genotypes from Iran assessed by AFLP markers and phenotypic traits. Plant Systematics and Evolution 300: 493-503.

Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA and Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences 81: 8014-8018.

Stich B, Maurer HP, Melchinger AE, Frisch M, Heckenberger M, Rouppe van der Voort J, Peleman J,

www.SID.ir

Archive of SID

Srensen AP and Reif JC (2006) Comparison of linkage disequilibrium in elite Europer Voort ean maize inbred lines using AFLP and SSR markers. Molecular Breeding 17: 217-226.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, delee TV, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M and Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research 23: 4407-4414.

Wang M, Jiang N, Jia T, Leach L, Cockram J, Waugh R, Ramsay L, Thomas B and Lu Z (2012) Genome-wide association mapping of agronomic and morphologic traits in highly structured populations of barley cultivars. Theoretical and Applied Genetics 124: 233-246.

Wang T, Zhu Z, Guo Q and Mao P (2013). Variation in major flavonoids glycosides and caffeoylquinic acids during florescence of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. 'Hangju' genotypes. Biochemical Systematics and Ecology 47: 74-79.

Wu FB, Zhang GP and Dominy P (2003) Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. Environmental and Experimental Botany 50: 67-78.

Wu J, Jenkins JN, McCarty JC, Zhong M and Swindle M (2007) AFLP marker associations with agronomic and fiber traits in cotton. Euphytica 153: 153-163.

Xu Y (2010) Molecular Plant Breeding. CAB International.

Yin D, Chen S, Chen F, Guan Z and Fang W (2009) Morphological and physiological responses of two *chrysanthemum* cultivars differing in their tolerance to water logging. Environmental and Experimental Botany 67: 87-93.

Yordanova RY, Christov KN and Popova LP (2004) Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. Environmental and Experimental Botany 51: 93-101.

Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh Bi I, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB, Kresovich S and Buckler ES (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nature genetics 38: 203-208.

Zhang F, Chen S, Chen F, Fang W and Li F (2010) A preliminary genetic linkage map off chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers. Scientia Horticulturae 125: 422-428.

Zhang F, Chen S, Chen F, Fang W, Chen Y and Li F (2011) SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*). Molecular Breeding 27: 11-23.

Zhao K, Aranzana MJ, Kim S, Lister C, Shindo C, Tang C, Toomajian C, Zheng H, Dean C, Marjoram P and Nordborg M (2007) An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. PLoS Genetics 3: 71-82.

www.SID.ir

Archive of SID

Modern Genetics Journal
Vol 11, Number 3, Autumn 2016, Quaternary

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

Roein Z[*1], HassanpourAsil M[2], Sabouri A[2]

1. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Ilam University
2. Professor, Assistant Professor, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan
* Corresponding Author, Email: z.roein@ ilam.ac.ir

ABSTRACT

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

Key Words

Chrysanthemum, Correlation, Enzyme, Informative markers, Petal senescence

www.SID.ir