

## بررسی ارتباط بین تعدادی از صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک کلزا با نشانگرهای مولکولی در شرایط تنش خشکی

حسن زالی<sup>۱\*</sup>، امید سفالیان<sup>۲</sup>، طاهره حسنلو<sup>۲</sup>، مهرشاد زین العابدینی<sup>۴</sup>، علی اصغری<sup>۲</sup>

۱. استادیار، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، داراب

۲. دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۳. استادیار، بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۴. استادیار، بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۰۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۲۵

### چکیده

به منظور شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش مرتبط با تعدادی صفات و شاخص‌های فیزیولوژیک ۲۲ ژنوتیپ کلزا تحت شرایط تنش خشکی، از ۳۶ نشانگر ریزماهورهای که با QTLهای کنترل‌کننده صفات مورفولوژیک در شرایط تنش خشکی پیوسته بودند، استفاده شد. به منظور شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات فیزیولوژیک از مدل‌های ارتباطی GLM و MLM استفاده شد. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی در بین نشانگرها از ۰/۰۴۳ (CB10502) تا ۰/۳۹۸ (CB10234) متغیر بود. متوسط میزان شاخص PIC برابر با ۰/۲۱۲ بود. بر اساس ۳۶ نشانگر ریزماهورهای مورد استفاده در این تحقیق، ساختار ژنتیکی جمعیت به ۸ زیر جمعیت فرعی تقسیم گردید که نتایج حاصل از رسم بارپلات نیز تأییدکننده آن بود. در تجزیه ارتباط با استفاده از مدل‌های GLM و MLM به ترتیب ۶ و ۱۶ مکان نشانگری معنی‌دار در شرایط بدون تنش با صفات مورد بررسی شناسایی شد. در شرایط تنش خشکی، با استفاده از مدل‌های GLM و MLM به ترتیب ۴۲ و ۴۶ مکان نشانگری مرتبط با صفات مورد بررسی مشخص شد. در این مطالعه، نشانگرهای BRMS-036، SR94102، BRAS100، CB1059b، BRMS-024، BRMS-096، BRMS-30، MR013c و Pmr52 بیشترین ارتباط معنی‌دار را با صفات فیزیولوژیکی در شرایط تنش خشکی داشتند؛ بنابراین این احتمال وجود دارد که این نشانگرها بتوانند کاندیدای مناسب و امیدوارکننده در برنامه‌های به‌نژادی تحمل به تنش خشکی مثل انتخاب به کمک نشانگر در کلزا باشد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ارتباط، تنش خشکی، مدل‌های GLM و MLM.

### مقدمه

گیاه کلزا با داشتن اسیدهای چرب با ارزش و پروتئین‌های حاوی اسیدهای آمینه مورد نیاز بدن انسان و با داشتن ۳۹-۴۰ درصد روغن و ۳۵-۳۹ درصد پروتئین، یکی از مهم‌ترین گیاهان صنعتی بشمار می‌رود (Flakelar et al., 2015). کلزا (*B. napus* L.) (2n = 38) ژنوم AACC یک آمفی دیپلوئید مرکب از کلم (*B. oleracea* L.) (2n=18) ژنوم AA و شلغم روغنی [*B. campestris* L.] یا (*B. rapa* L.) است (Kimber and Mc Gregor, 1995). گونه‌های براسیکای روغنی یعنی *B. napus*، *B. juncea* و *campestris* سومین منبع مهم روغن نباتی خوراکی در جهان بعد از نخل روغنی و سویا هستند (Zada et al., 2013).

تنش خشکی یکی از شایع‌ترین تنش‌های محیطی است که محدودکننده رشد و عملکرد گیاهان می‌باشد و در اثر

تنش خشکی، مدل‌های GLM و MLM.

تجزیه ارتباط به‌منظور شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت، ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ افراد مورد مطالعه بررسی می‌شود (Mohammadi et al., 2002). روش تجزیه ارتباطی، امکان شناسایی اولیه و سریع ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی را میسر می‌سازد. در تجزیه ارتباط، از عدم تعادل پیوستگی موجود در جمعیت‌های طبیعی و مجموعه‌های ذخایر توارثی استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر نیز کاربرد زیادی در گیاهان برای مکان‌یابی QTLها و ژن‌های کاندیدا پیدا کرده است (Gupta et al., 2005). در بعضی از تحقیقات از عدم تعادل پیوستگی و تجزیه ارتباط به‌طور معادل استفاده می‌شود ولی عدم تعادل پیوستگی عبارت از ارتباط غیر تصادفی بین دو نشانگر یا دو ژن و یا یک نشانگر و یک ژن است؛ اما تجزیه ارتباط به ارتباط معنی‌دار بین یک صفت و نشانگر مولکولی اطلاق می‌شود. به عبارتی تجزیه ارتباط یکی از چند کاربرد عدم تعادل پیوستگی است (Jannink and Walsh, 2002). نیل و ساوالاین (Neale and Savolainen, 2004) نشان دادند که مکان‌های ژنی انتخاب‌شده به کمک روش تجزیه ارتباطی دارای مزایای مهمی از قبیل داشتن سطوح مناسب از تنوع نوکلئوتیدی و همچنین امکان ارزیابی دقیق فنوتیپ نتاج است که می‌توانند در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر مورد استفاده قرار گیرند. یکی از اهداف تجزیه ارتباط، شناسایی نشانگرهای مرتبط بر مبنای عدم تعادل پیوستگی در مجموعه‌ای از افراد یا جمعیت است. برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفت مورد اندازه‌گیری، می‌توان از مدل‌های خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مخلوط (MLM) استفاده نمود. چنانچه از مدل GLM برای تعیین ارتباط نشانگر صفت استفاده شود، فقط ماتریس Q که نشان‌دهنده ساختار جمعیت است در محاسبات وارد می‌شود و روابط خویشاوندی بین افراد در نظر گرفته نمی‌شود (Hardy and Vekemans, 2002). در مدل MLM از ماتریس K که نشان‌دهنده روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت است، استفاده می‌شود و سپس ارتباط بین نشانگر و صفت به همراه احتمال اشتباه نوع اول محاسبه می‌شود (Yu et al., 2006).

پیچیدگی کنترل ژنتیکی تحمل به تنش خشکی به‌نژادگران را به استفاده از روش‌های مولکولی در کنار روش‌های سنتی برای بهبود این صفت سوق می‌دهد. شناسایی QTLهای کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به خشکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی از جمله روش‌های به‌نژادی

بارندگی ناکافی یا تغییر الگوهای بارش اتفاق می‌افتد و تقریباً هر ساله حدود ۲۵ درصد از تولید محصولات کشاورزی را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد (Ghanbari et al., 2013). گیاهان جهت مقابله با تنش‌های محیطی مانند خشکی چندین سازوکار عمده را بکار می‌گیرند (Zali et al., 2015). از جمله این سازوکارها می‌توان به تجمع ترکیبات اسمزی متفاوت (Moradi et al., 2016) اشاره کرد. از جمله ترکیبات اسمزی که در شرایط تنش خشکی در سلول‌های گیاهی تجمع پیدا می‌کند، می‌توان به قندها اشاره کرد (Rampino et al., 2006; Zali et al., 2016). قندهای محلول به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی، ثبات دهنده غشاهای سلولی و حفظ‌کننده تورژسانس سلول‌ها، عمل می‌کنند. در گیاهانی که قندهای محلول در پاسخ به تنش خشکی تجمع می‌یابند، تنظیم اسمزی بهتر صورت می‌گیرد (Slama et al., 2007).

آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسماهای گیاهی و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات است (Donini et al., 1998). نشانگرهای مولکولی به‌واسطه مستقل بودن از عوامل محیطی می‌توانند جایگزین مناسبی برای ارزیابی تنوع در گیاهان و مجموعه ژرم‌پلاسماهای باشند. روش‌های مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به دلیل سهولت، هزینه پایین، سرعت و عدم نیاز به کاوشگرهای رادیواکتیو امروزه به‌طور گسترده‌ای در بررسی تنوع و فاصله ژنتیکی ارقام مختلف گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر واکنش PCR به‌عنوان ابزاری قدرتمندی برای شناسایی چندشکلی، مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده است (Jun et al., 2010).

نشانگرهای ریزماهواره، جزو نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بوده و دارای کاربردهای فراوانی در مطالعات رده‌بندی، بررسی تنوع ژنتیکی و تهیه نقشه‌های پیوستگی در گونه‌های مختلف است (Nakao Kubo, 2008). نشانگرهای SSR به‌طور گسترده‌ای در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های مختلف کلزا مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Hasan et al., 2008; Moghaieb et al., 2014; Qu et al., 2012). نشانگرهای SSR در آنالیزهای تنوع ژنتیکی، مکان‌یابی ژن، انگشت‌نگاری، آزمایش خلوص ژنتیکی، آنالیز ژرم‌پلاسما و تفسیر گونه‌ها و معرفی گونه‌های خویشاوند استفاده می‌شود (Nakao Kubo, 2008; Qu et al., 2012).

هدف از این تحقیق بررسی ارتباط بین تعدادی از صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک با نشانگرهای مولکولی SSR در شرایط نرمال آبیاری و تنش خشکی در ژنوتیپ‌های کلزا بود.

#### مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ در پژوهشکده بیوتکنولوژی و کشاورزی ایران (ABRII) انجام شد. ارقام و لاین‌های مورد بررسی شامل ۵ ژنوتیپ هیبرید و ۱۷ لاین پیشرفته امیدبخش (جدول ۱) بود که از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند.

مولکولی است که از نتایج آن پس از طی مراحل تأیید می‌توان در برنامه‌های اصلاحی مثل انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود. شناسایی معیارهای مؤثر و QTL‌های دخیل در تحمل به تنش خشکی می‌تواند باعث تسریع برنامه‌های به‌نژادی جهت توسعه ارقام متحمل به تنش گردد. ارزیابی اغلب صفات مورفوفیزیولوژیک مرتبط با تنش‌های محیطی با استفاده از روش‌های مرسوم مشکل است. از این رو تکنولوژی نشانگرهای مولکولی می‌تواند برای تحمل به تنش‌های محیطی مورد استفاده قرار گیرد (Sing and Diwivedi, 2002).

جدول ۱. نام لاین‌ها و ژنوتیپ‌های مورد بررسی و مناطق آن‌ها

Table 1. Lines and genotypes name and its origin

ژنوتیپ‌ها Genotype	نوع ژنوتیپ‌ها Genotype type	نوع ژنوتیپ‌ها	منشأ Origin	ژنوتیپ‌ها Genotype	نوع ژنوتیپ‌ها Genotype type	نوع ژنوتیپ‌ها	منشأ Origin
SLM046	Open pollinated cultivar	رقم آزادگرده افشان	Germany	L957	Pure line	لاین خالص	ایران
Oase	Hybrid cultivar	رقم هیبرید	France	L963	Pure line	لاین خالص	ایران
Karaj 1	Pure line	لاین خالص	Iran	L969	Pure line	لاین خالص	ایران
Ahmadi	Open pollinated cultivar	رقم آزادگرده افشان	Iran	L996	Pure line	لاین خالص	ایران
Okapi	Open pollinated cultivar	رقم آزادگرده افشان	France	L1003	Pure line	لاین خالص	ایران
L938	Pure line	لاین خالص	Iran	L1008	Pure line	لاین خالص	ایران
L941	Pure line	لاین خالص	Iran	L1009	Pure line	لاین خالص	ایران
L942	Pure line	لاین خالص	Iran	L1010	Pure line	لاین خالص	ایران
L944	Pure line	لاین خالص	Iran	L1011	Pure line	لاین خالص	ایران
L945	Pure line	لاین خالص	Iran	L1012	Pure line	لاین خالص	ایران
L955	Pure line	لاین خالص	Iran	L1013	Pure line	لاین خالص	ایران

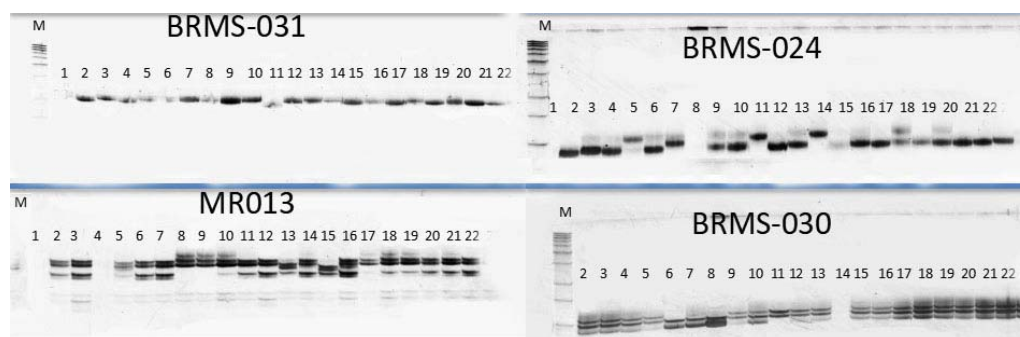
مشخص شد (Ashraf and Mehood, 1990). در داخل هر گلدان ۱۰ بذر در عمق حدود ۱ سانتی‌متری خاک کاشته شد و بعد از مرحله ۲ برگی بوته‌ها تنک شدند و در هر گلدان ۲ بوته باقی گذاشته شد. گلدان‌ها تا قبل از اعمال تنش خشکی هر روز وزن و رطوبت خاک در حدود ۹۰-۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه نگه داشته شد. ۴۵ روز بعد از کاشت گیاهان و در مرحله رشد رویشی، تیمار خشکی اعمال شد. در این تحقیق روش وزنی معیار تعیین مقدار رطوبت خاک بود. بدین ترتیب که بعد از قطع آبیاری، رطوبت خاک در گلدان‌های تنش در حدود ظرفیت زراعی ۴۰-۵۰ درصد و برای گلدان‌های شاهد در حدود ظرفیت زراعی ۹۰-۱۰۰ درصد نگه‌داری شدند. برای این منظور گلدان‌ها، روزی یک‌بار در بعدازظهر با ترازوی دقیق

آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در ۲ سطح تیمار آبی خاک شامل ۹۰-۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) و ۴۰-۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تیمار تنش خشکی) به روش وزنی انجام شد (Ashraf and Mehood, 1990). در این تحقیق به منظور اعمال تنش و تنظیم دقیق و یکنواخت رطوبت گلدان‌ها از گلدان‌های متوسط پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و ظرفیت ۲/۵ کیلوگرم خاک سبک استفاده شد. خاک مورد استفاده شامل یک قسمت خاک مزرعه، یک قسمت ماسه و یک قسمت خاک برگ و کود حیوانی الک شده بود. در هر گلدان ۲/۵ کیلوگرم خاک خشک ریخته شد و مقدار ظرفیت زراعی گلدان‌ها جهت آبیاری دقیق

غلظت U10، ۰/۹ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی-مولار، ۱/۲ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۲۵ میلی-مولار، ۱/۵ میکرولیتر بافر با غلظت X10، ۰/۲ میکرولیتر تک پلیمرز با غلظت U5 و ۶/۲ میکرولیتر آب دو بار استریل بود. چرخه حرارتی استفاده شده شامل یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی که ۱۰ چرخه اول سیکل حرارتی به صورت Touch Down برنامه-ریزی شده بود. به این صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۸-۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و در هر چرخه دور اول با کاهش یک درجه دما، به دمای اتصال واقعی رسید. در ۲۵ چرخه بعد دمای اتصال (بسته به دمای اتصال آغازگر متفاوت بود) و زمان آن نیز ثابت و ۳۰ ثانیه بود. در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشته‌سازی به ترتیب ۳۰ و ۹۴ درجه بود. همچنین دمای بسط رشته نیز به ترتیب ۱ دقیقه و ۷۲ درجه بود. محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید واسرشته ساز ۶ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره انجام شد (شکل ۱).

وزن و مقدار رطوبت خاک تنظیم می‌شد. تنش خشکی به مدت ۳۰ روز اعمال شد و بعد از آن نمونه برداری انجام گرفت. در پایان اعمال تنش، صفاتی از قبیل محتوای نسبی آب (RWC)، وزن خشک اندام هوای، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، محتوای کاروتنوئید، محتوای قندهای محلول و نشاسته در شرایط بدون تنش و تنش آبی اندازه‌گیری شد. استخراج کلروفیل و کاروتنوئید برگ مرجع با استفاده از استن ۸۰ درصد و اندازه‌گیری آن با استفاده از روش تغییر یافته آرنون (Arnon, 1949) انجام شد. اندازه‌گیری قندهای محلول کل و نشاسته به روش فنل اسیدسولفوریک بر اساس روش تغییر یافته اشلیگل (Sheligl, 1986) و روش اسپکتروفتومتری انجام شد.

استخراج DNA به روش دلاپورتا تغییر یافته (Dellaporta et al., 1983) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی نیز با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و روش طیف‌سنجی نانودراپ تعیین گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی در حجم ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس به میزان ۱/۵ میکرولیتر با



شکل ۱. تصویر ژل پلی‌اکریل‌امید مربوط به نشانگرهای BRMS-031، BRMS-024، MR103 و BRMS-30  
 Fig. 1. Image of polyacrylamide gel for BRMA-031, BRMS-024, MR103 and BRMS-30

نام ژنوتیپ‌ها و لاین‌ها (Genotypes and lines name):

1 :SLM046 , 2 :Oase , 3 :Karaj1 , 4 :Ahmadi , 5 :Okapi , 6 :L938 , 7 :L941 , 8 :L942 , 9 :L944 , 10 :L945 , 11 :L955 , 12 :L957 , 13 :L963 , 14 :L969 , 15 :L996 , 16 :L1003 , 17 :L1008 , 18 :L1009 , 19 :L1010 , 20 :L1011 , 21 :L1012 , 22 :L1013

وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و وزن خشک کل در شرایط تنش خشکی بودند (جدول ۲).  
 الگوهای نواری بر روی ژل پلی‌اکریل‌امید بر اساس هم-ردیفی نوارها، صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار)

۳۶ نشانگر ریزماهوره مورد استفاده در این پژوهش شامل نشانگرهایی می‌باشند که در مطالعات گزارش شده توسط لی و همکاران (Li et al., 2014) معرفی شدند. در واقع این نشانگرها مرتبط با QTL‌های کنترل کننده صفات ارتفاع بوته،

کاذب بین نشانگر- صفت، با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج مربوط به نوارهای حاصل از تکثیر نشانگرهای SSR در جدول ۲ نشان داده شده است. از تعداد ۳۶ نشانگر مورداستفاده، ۱۶۴ نوار حاصل شد که از این تعداد ۱۵۷ نوار چند شکل بودند. متوسط درصد چندشکلی برای نشانگرهای مورد مطالعه برابر با ۹۶/۲۹ درصد بود. تعداد کل نوارهای تکثیر شده برای هر نشانگر از ۲ تا ۱۰ نوار متغیر بود و به‌طور متوسط ۴/۴۹ نوار به ازای هر نشانگر تکثیر شد. نشانگر Na12-B05 با تعداد ۱۰ نوار چند شکل بیش‌ترین چندشکلی را نشان دادند (جدول ۲).

مطابق با نتایج، محدوده‌ی PIC از ۰/۰۲۹ تا ۰/۳۹۸ متغیر بود که بیش‌ترین میزان PIC، مربوط به آغازگرهای CB10234، CB10143، SR94102، NA10-E02 و BRMS-030 و کم‌ترین آن مربوط به آغازگرهای CB10502، OI10-B02، CB1003 و FITO133 بود. متوسط میزان شاخص PIC برابر با ۰/۲۰۸ بود (جدول ۲).

نتایج آزمون مانتل (Mantel, 1967) نشان داد میزان همبستگی برای شرایط تنش و بدون تنش به ترتیب ۰/۰۲۴ و ۰/۰۶ بود که با توجه به این آزمون همبستگی بین صفات فیزیولوژیک و ماتریس داده‌های مولکولی معنی‌دار نبود (شکل ۲). با توجه به این‌که صفات فیزیولوژیک مربوط به بخش‌های رمزکننده ژنوم هستند، اما قطعات DNA تکثیر شده در نشانگرهای SSR هم مربوط به بخش‌های رمزکننده و هم مربوط به بخش‌های غیر رمزکننده ژنوم است و از طرف دیگر این صفات تحت تأثیر شرایط محیطی نیز قرار می‌گیرند. در نتیجه عدم وجود همبستگی بالا بین نشانگرهای مولکولی و صفات فیزیولوژیکی دور از انتظار نبود. هم‌چنین، سمگان (Semgan, 2002) بیان کرد نشانگرهای مولکولی نسبت به صفات زراعی درصد بیش‌تری از ژنوم، از جمله نواحی کد کننده و غیر کد کننده را پوشش می‌دهند و این‌که نشانگرهای مولکولی برخلاف صفات زراعی و فیزیولوژیکی در معرض انتخاب مصنوعی قرار نمی‌گیرند بنابراین این عدم همبستگی مورد انتظار است.

امتیازدهی شدند. میزان اطلاعات چندشکلی<sup>۱</sup> از طریق فرمول (۱) صورت گرفت (Powell et al., 1996):

$$PIC = \sum [2p_i (1 - p_i)] / n \quad [1]$$

که در آن،  $p_i$  فراوانی نوار  $i$ ام تقسیم‌بر تعداد ژنوتیپ‌ها و  $n$  تعداد نوارهای ایجاد شده بود. شاخص PIC با استفاده از نرم‌افزار GenAlex (Anderson et al., 1993) محاسبه شد.

به‌منظور تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط، تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از روش Bayesian و نرم‌افزار Structure انجام شد (Powell et al., 1996). این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. در این تحقیق، بین ۱ تا ۱۰ زیرجمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها ۱۰ تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰ اجرا در زمان ۲ و ۱۰۰۰۰۰ جایگشت<sup>۳</sup> استفاده شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار  $K$  (تعداد واقعی زیرجمعیت) یک ماتریس به نام  $Qst$  را به دست می‌دهد. این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. تعداد واقعی زیرجمعیت بر اساس روش ایوانو و همکاران (Evanno et al., 2005) تعیین شد. این روش بر آماره  $\Delta K$  استوار است که شیب تابع احتمالی را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد  $K$  فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. به‌منظور بررسی میزان ارتباط داده‌های مولکولی و صفات فیزیولوژیک، آزمون مانتل (Mantel, 1967) با استفاده از ماتریس فاصله اقلیدسی در هر دو سطح تنش و بدون تنش انجام شد. شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورد بررسی، بر اساس مدل خطی عمودی (GLM) وابسته به ماتریس  $Q$  (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت) و مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به ماتریس  $Q + K$  (ماتریس ضرایب ساختار + ماتریس روابط خویشاوندی) جهت جلوگیری از ارتباط

<sup>3</sup>- Permutation

<sup>1</sup>- Polymorphism information content (PIC)

<sup>2</sup>- Burn in time

## جدول ۲. شاخص‌های مختلف تنوع ژنتیکی نشانگرهای مورد بررسی در ۲۲ ژنوتیپ کلزا

Table 2. Genetic diversity different indices of primers under study in 22 canola genotypes

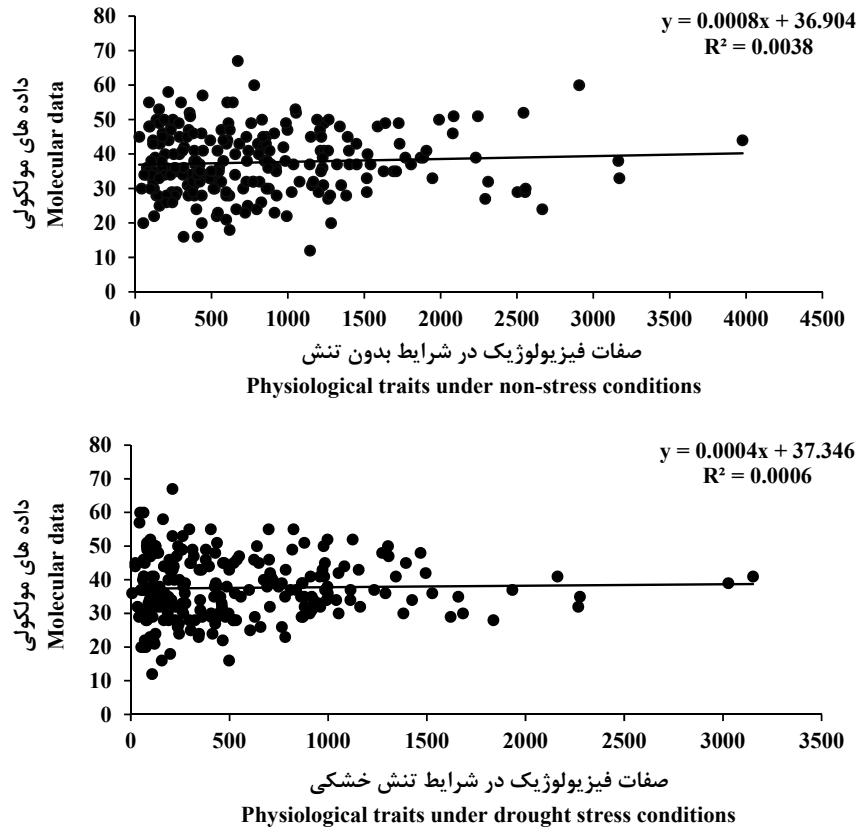
نشانگر Marker	توالی جلو رونده Forward sequence	توالی معکوس Reverse sequence	گروه کروموزومی group.Chr	تعداد	تعداد	PIC
				نوار No. of band	چند شکل No. of polymorp hic band	
OH10-B02	CACGAACGCGAGAGAGAGAG	TGCATAAGCTCGAAGAGACG	C5	3	2	0.029
BRAS041	CCAGACTCCGATAAAAACC	ATGCAAGCTTAGACAGAGATT	A1	3	3	0.295
BRAS084	ATTGGTTCTGACCTTTTCTC	TTTTCCTCATCGTACCAC	A1	2	2	0.242
CB10234	CTGATGGACTAGGACCCC	TCTGTTGTTTCTCTCGCC	C6	6	6	0.238
CB10597	AAGCGCGCATAACTACAC	AACACTGCCTTTCCCT	A1	3	3	0.398
Na10E02b	TCGCGCATGTAATCAAAATC	TGTGACGCATCCGATCATA	A5	3	3	0.154
BRMS-036	GGTCCATTCTTTTTGTCATCTG	CATGGCAAGGGTAACAAACAT	A7	7	7	0.289
BRAS074a	AATTTAAACCTCATTTTCTTC	ACCTCATTGTGTCTGAT	A1	3	3	0.139
Na12-A08a	AACACTTGCAACTTCAATTTCC	CATTGGTTGGTGAATTGACAG	A3	5	5	0.264
OH12-F11a	AAGGACTCATCGTCAATCC	GTGTCAGTGGCTACAGAGAC	A1	3	3	0.264
CB10526	ACTCGGCGTTAGAGAAT	TTCTTCTTCCACCACCA	C6	4	4	0.124
Na10-C01f	GGAAACTAGGGTTTTCCCTTC	TTTTGTCCCACTGGGTTTTTC	C3	8	5	0.117
CB10003b	AAATGGGTCACAGCCGAGAA	ACGGTGCCGAATCTCAACG	C3	4	2	0.083
OH11-H06	TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC	TTCTTCACTTACAGGCACG	C9	3	3	0.216
FITO133	AACACAACCACCAAC	AATGGCAAAGTTATTCTACCC	C3	2	2	0.087
SR94102	ATCCCAAACCTACCCTCAC	AGGATGAGCAAAGGAAAGCA	C2	5	5	0.322
sORF73b	CGTGGGCAAGCTTAGATTA	CGTTCAAGAAGACACAGATCAAA	C5	6	6	0.290
BRAS100	CTCCCACCGCTTACCTCT	GGCTACCACCACCACTCGC	A1	6	6	0.141
CB10159b	CACAGCTTACCAATCG	GATCACCTCTGCACCAT	A1	9	9	0.189
CB10081c	GGCTTTAGCACTGTGATCCT	TTGGGAGAGAAAACATATA	A1	6	6	0.254
Na14-096	TCCCGTTCGCTAAGATATTG	TTCCCTTTATTGAGCAAGCTG	A3	3	3	0.108
BRAS072a	CACTAACCTTCTTGCTACCGT	GCCATCTACACATTTATCCC	A5	6	6	0.216
CB10143	CATGGGAGGCTGTCTAAA	TTGACCACATACGGTTTTTC	C2	2	2	0.374
NA10-E02b	TCGCGCATGTAATCAAAATC	TGTGACGCATCCGATCATA	A5	2	2	0.314
BRMS030	GGTCCATTCTTTTTGTCATCTG	CATGGCAAGGGTAACAAACAT	A5	6	5	0.166
BRMS-031	TGCCACCAATGACAATGACACTATC	GATGCACTGGGACCCTTACATTT	A1	3	3	0.165
BRMS-024	TGAATTGAAAGGCATAAGCA	CAGCTCCACCACTTATTCT	A1	3	3	0.165
BRMS-096	AGTCGAGATCTCGTTCGTCTCCC	TGAAGAAGGATTGAAGCTGTTGTTG	A1	3	3	0.128
BRMS-030	TCAGCCTACCAACGAGTCATAA	AAGGTCTCATACGATGGGAGTG	C5	3	3	0.304
CB10502	GGTGAGCTTCTTCTTCC	TTGAAGAGTGGGGATTCA	C6	2	2	0.043
CB10010	ACCCTGTTCTTCTACTAT	TTATCTTTGAATGAGCATCT	C6	8	8	0.138
MR013c	CGTACTCCGCTGATACTTT	TCAGAATCGCGACTGTAGTCT	A9	6	6	0.288
Pmr52	TCGACATGGATTCTACAAA	GAACCTGCAAGCTGCAATTA	C2	3	3	0.139
Na12-B05	CAAATATCCGTCATCGGAGC	CCTGCGGGATATTGAAGACC	A8	10	10	0.261
CB10504	CATTGGCATAGGAACAGG	GGTGTCCCAACTGTGTA	C8	6	6	0.282
NA14-E08a	GCGGATTATGATGACGCAG	TTACTATCCCCTTCCGCAC	C4	7	7	0.277

PIC: Polymorphism data contain

PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی

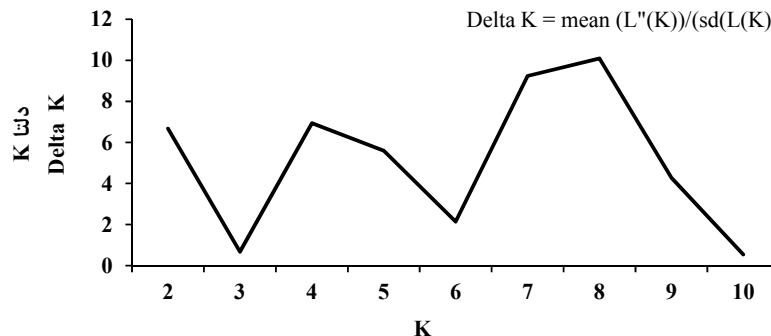
در داخل هر کلاستر دارای احتمال عضویت بیش از ۰/۷ و به احتمال بیش از ۷۰ درصد به کلاستر خود تعلق دارند (Tondelli et al., 2013). در این تحقیق با توجه به این که مقدار حداکثر  $K\Delta$  در  $K=8$  به دست آمده (شکل ۳) است بنابراین ۸ زیر جمعیت احتمالی شناسایی در این تحقیق شناسایی شد. با توجه به نمودارهای رنگی اختلاط ژنتیکی زیادی در بین بسیاری از نمونه‌ها مشاهده شد (شکل ۴). وجود اختلاط در جمعیت‌های مورد بررسی ممکن است به دلیل وجود جریان ژنی به ارقام اصلاحی طی انجام برنامه‌های اصلاحی باشد.

به منظور تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلف، تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از روش بی‌زین (Piquemal et al., 2005) انجام شد (شکل ۴). در شکل ۴، هر فرد و کد مربوط به آن به وسیله یک ستون رنگی عمودی نشان داده می‌شود که وجود بیش از یک رنگ، معرف ساختار مختلط ژنتیکی آن فرد یا نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بین این نمونه با زیرجمعیت‌های دیگر و اختلاط ژنتیکی آن فرد است. در این حالت آن فرد به گروهی تعلق می‌گیرد که بیش-ترین پهنای رنگی آن کلاستر را دارا باشد. در کل ژنوتیپ‌های



شکل ۲. آزمون ماتنل با استفاده از ماتریس شباهت حاصل از داده‌های مولکولی و ماتریس فاصله حاصل از صفات فیزیولوژیکی در سطوح بدون تنش و تنش خشکی در ۲۲ ژنوتیپ کلزا

Fig. 2. Mantel test using a similarity matrix derived from molecular data and distance matrix from physiological traits at drought stress levels in 22 canola genotypes



شکل ۳. نمودار منحنی  $\Delta K$  جهت تعیین مقدار مطلوب K

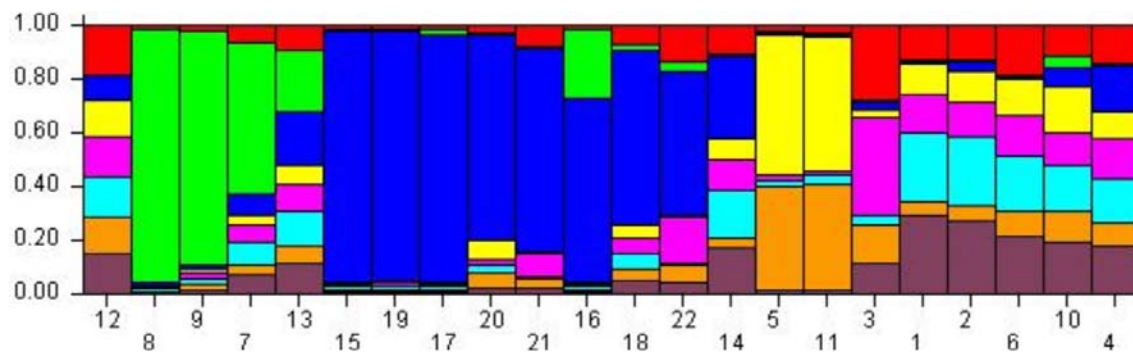
Fig. 3. Graph of  $\Delta K$  curve to determine the optimal value K

مولکولی ۱ درصد ( $P < 0.01$ ) و ۵ درصد ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد (Tabkhkar et al., 2018; Lou et al., 2015). در مجموع بر اساس نتایج حاصل از مدل GLM و MLM به ترتیب ۶ و ۱۶ مکان ژنی، ارتباط معنی‌دار با صفات

بهم‌نظور شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با صفات موردبررسی در شرایط تنش خشکی و بدون تنش از دو مدل GLM و MLM استفاده شد. لازم به ذکر است که حداقل سطح معنی‌داری برای تجزیه ارتباط بین صفات و نشانگرهای

خشکی بیش‌تر از شرایط بدون تنش بود (جدول ۳ و ۴). از آنجایی‌که در این پژوهش نشانگرهای مولکولی با توجه به ارتباط آن‌ها با QTL‌های صفات متحمل به خشکی انتخاب شده‌اند این میزان ارتباط دور از انتظار نبود.

موردبررسی در شرایط بدون تنش (شاهد) نشان دادند. در شرایط تنش خشکی با استفاده از دو مدل GLM و MLM به ترتیب ۴۲ و ۴۶ مکان ژنی شناسایی شد که با صفات موردبررسی ارتباط معنی‌داری داشتند (جدول ۳). نتایج نشان داد که تعداد نشانگرهای معنی‌دار با صفات در شرایط تنش



شکل ۴. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس ساختار ژنتیکی جمعیت با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE  
Fig. 4. Genotypes clustering based on population genetic structure using the software STRUCTURE

نام ژنوتیپ‌ها و لاین‌ها (Genotypes and lines names):

1 :SLM046 .2 :Oase .3 :Karaj1 .4 :Ahmadi .5 :Okapi .6 :L938 .7 :L941 .8 :L942 .9 :L944 .10 :L945 .11 :L955 .12 :L957 .13 :L963 .14 :L969 .15 :L996 .16 :L1003 .17 :L1008 .18 :L1009 .19 :L1010 .20 :L1011 .21 :L1012 .22 :L1013

مورد مطالعه در نواحی کد کننده صفات فیزیولوژیک حضور دارند (جدول ۳ و ۴).

در این تحقیق ۱۶ نشانگر شامل OI10-B02, CB10526, BRAS074a, Na10E02B, BRAS084, FITO133, OL11-H06, CB10003b, Na10-C01f, NA10-E02b, CB10143, BRAS072a, Na14-096, BRMS-031, CB10010, CB10502, BRMS-031 صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک ارتباط معنی‌داری نشان ندادند. نشانگرهای BRMS-, CB10597, BRAS041, MR013c, CB10081c, Sorf73b, 036, Na12-B05, MR013c, CB10081c, Sorf73b و NA14-E08a با صفات مورد بررسی در شرایط بدون تنش مرتبط بودند. همچنین نشانگرهای BRMS-, CB10597, BRMS-, CB1059b, BRAS100, SR94102, 036, 024, BRMS-30, BRMS-096, MR013c, BRMS-30 و Pmr52 با صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک ارتباط معنی‌داری در شرایط تنش خشکی نشان دادند. تنها دو نشانگر BRMS- 036 و MR013c مرتبط با تعدادی از صفات در هر دو شرایط تنش و بدون تنش مشاهده شد. نشانگر MR013c در هر دو

با توجه به پایداری نتایج در مدل MLM، در این پژوهش نتایج مدل MLM در ارتباط با صفات، مورد بحث قرار گرفت. بر اساس مدل MLM، 3 مکان نشانگری برای RWC، یک مکان نشانگری برای مقدار ماده خشک، 2 مکان نشانگری برای کلروفیل a، یک مکان نشانگری برای کلروفیل b، 2 مکان نشانگری برای محتوای کلروفیل کل، 2 مکان نشانگری برای محتوای کاروتنوئید، یک مکان نشانگری برای قندهای محلول و 4 مکان نشانگری برای محتوای نشاسته در شرایط بدون-تنش شناسایی شد (جدول ۳). در شرایط تنش خشکی تعداد نشانگرهای مرتبط با RWC، مقدار ماده خشک، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، محتوای کاروتنوئید، محتوای قند و نشاسته به ترتیب ۴، ۵، ۸، ۶، ۷، ۱ و ۸ نشانگر بود (جدول ۴). نتایج مدل MLM نشان داد که از میان نشانگرهای مورد بررسی ۹ نشانگر با مکان‌های نشانگری مختلف در شرایط بدون تنش و ۱۲ نشانگر با مکان‌های نشانگری مختلف در شرایط تنش خشکی با صفات مورد بررسی مرتبط بودند؛ بنابراین می‌توان گفت این نشانگرها بیش از سایر نشانگرهای



BRMS-030, SR94102, BRMS-096, CB10159b و BRMS024 با صفات کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و محتوای کاروتنوئید در شرایط تنش خشکی مرتبط بودند که نشان‌دهنده اثر پلیوتروپی این نشانگرها و احتمالاً پیوستگی مکان‌های ژنومی کنترل‌کننده این صفات در شرایط تنش است. محتوای قند محلول در شرایط تنش خشکی تنها با نشانگر Na12-A08a در ارتباط بود (جدول ۴). احتمالاً ژن‌های مربوط به این صفات، ژن‌های نزدیک به هم در مکان کروموزومی باشند و ممکن است در فراهم آوردن اطلاعات اولیه در خصوص انتخاب غیرمستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید باشند.

شرایط تنش و بدون تنش با RWC مرتبط بود ولی مکان نشانگری آن متفاوت بود (جدول ۳ و ۴). نشانگر SR94102 با مقدار ماده خشک، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، محتوای کاروتنوئید و محتوای نشاسته در شرایط تنش خشکی مرتبط بودند که نشان‌دهنده اثر پلیوتروپی این نشانگر و احتمالاً پیوستگی مکان‌های ژنومی کنترل‌کننده این صفات در شرایط تنش است. مکان‌های نشانگری BRAS100-3، BRAS100-5، MR013c-4 و Pmr52-3 مرتبط با RWC و محتوای نشاسته بود. مکان نشانگری BRMS-036-4 با محتوای کلروفیل a و کل ارتباط معنی‌داری را در شرایط تنش نشان دادند. نشانگرهای

جدول ۳. نتایج تجزیه ارتباطی بین صفات فیزیولوژیک با نشانگرهای مولکولی در ۲۲ ژنوتیپ کلزا در شرایط بدون تنش (شاهد) با استفاده از مدل‌های GLM و MLM

Table 3. Results of association analysis among physiological traits with molecular markers in 22 canola genotypes under non-stress (control) conditions using GLM and MLM models

صفات Traits	نشانگر Marker	مدل GLM GLM model		مدل MLM MLM model	
		P-value	R <sup>2</sup>	F-value	P-value
RWC	sORF73b-4	0.0001	0.50	30.58	0.0001
	MR013c-2	0.0004	0.46	18.96	0.0009
	sORF73b-6	0.0015	0.41	16.69	0.0015
DM	BRMS-036-4	0.0201	0.07	7.71	0.0168
Chl-a	NA14-E08a-1	0.0464	0.22	12.45	0.0042
	BRAS041-2	0.0772	0.18	11.47	0.0054
Chl-b	CB10597-1	0.0181	0.29	7.48	0.0181
Chl-t	NA14-E08a-1	0.046	0.22	11.26	0.0057
	BRAS041-2	0.0824	0.17	10.03	0.0081
Car	BRAS041-2	0.1232	0.13	7.39	0.0187
	NA14-E08a-1	0.0736	0.17	7.39	0.0187
Sugar	MR013c-2	0.0204	0.20	7.31	0.0191
Starch	CB10081c-4	0.0462	0.13	10.89	0.0063
	CB10504-1	0.0275	0.15	10.10	0.0079
	CB10504-4	0.0275	0.15	10.10	0.0079
	Na12-B05-9	0.0425	0.13	8.79	0.0118

RWC: محتوای آب نسبی؛ DM: ماده خشک؛ Chl-a: محتوای کلروفیل a؛ Chl-b: محتوای کلروفیل b؛ Chl-t: محتوای کلروفیل کل؛ Car: محتوای کاروتنوئید؛ Sugar: محتوای قندهای محلول؛ Starch: محتوای نشاسته

RWC: Relative water contain; DM: Dry matter; Chl-a: Chlorophyll-a contain; Chl-b: Chlorophyll-b contain; Chl-t: Total chlorophyll contain; Car: Carotenoid contain; Sugar: Soluble sugars contain; Starch: Starch contain

جدول ۴. نتایج تجزیه ارتباطی بین صفات فیزیولوژیک با نشانگرهای مولکولی در ۲۲ ژنوتیپ کلزا در شرایط تنش خشکی با استفاده از مدل‌های GLM و MLM

Table 4. Results of association analysis among physiological traits with molecular markers in 22 canola genotypes under drought stress conditions using GLM and MLM models

صفات Traits	نشانگر Marker	مدل GLM GLM model		مدل MLM MLM model	
		P-value	R <sup>2</sup>	F-value	P-value
RWC	BRAS100-3	0.0157	0.21	9.46	0.0096
	BRAS100-5	0.0157	0.21	9.46	0.0096
	MR013c-4	0.0157	0.21	9.46	0.0096
	Pmr52-3	0.0157	0.21	9.46	0.0096
DM	BRMS030-2	0.0024	0.30	14.57	0.0025
	SR94102-2	0.0034	0.29	13.29	0.0034
	MR013c-5	0.0064	0.26	10.85	0.0064
	SR94102-1	0.0074	0.25	10.35	0.0074
	OH12-F11a-2	0.0159	0.22	7.86	0.0159
Chl-a	BRMS-030-3	0.0043	0.19	12.29	0.0043
	BRMS-096-1	0.0039	0.20	10.86	0.0064
	BRMS-024-1	0.006	0.18	10.66	0.0068
	SR94102-2	0.0335	0.12	9.89	0.0084
	CB10159b-6	0.008	0.18	9.32	0.0100
	CB10159b-9	0.0106	0.17	9.15	0.0106
	BRMS-036-4	0.0168	0.15	7.84	0.0160
	CB10159b-8	0.0097	0.17	7.59	0.0175
Chl-b	BRMS-096-1	0.0035	0.14	11.88	0.0048
	BRMS-030-3	0.0098	0.11	9.41	0.0098
	BRMS-024-1	0.0118	0.11	8.80	0.0118
	CB10159b-6	0.0157	0.10	7.31	0.0192
	MR013c-2	0.0196	0.10	7.24	0.0196
	SR94102-2	0.0573	0.07	7.17	0.0201
Chl-t	BRMS-030-3	0.0049	0.17	11.81	0.0049
	BRMS-096-1	0.0035	0.18	11.38	0.0055
	BRMS-024-1	0.0067	0.17	10.40	0.0073
	SR94102-2	0.0368	0.11	9.44	0.0097
	CB10159b-6	0.0089	0.16	8.92	0.0113
	CB10159b-9	0.0118	0.15	8.78	0.0118
	BRMS-036-4	0.018	0.13	7.72	0.0167
Car	BRMS-096-1	0.0020	0.21	13.67	0.0031
	BRMS-030-3	0.0082	0.17	10.01	0.0082
	SR94102-2	0.0359	0.12	9.60	0.0092
	BRMS-024-1	0.0102	0.16	9.20	0.0104
	CB10159b-8	0.0101	0.16	7.65	0.0171
	CB10159b-6	0.0157	0.15	7.52	0.0179
	CB10159b-9	0.0187	0.14	7.38	0.0187
Sugar	Na12-A08a-3	0.0090	0.07	9.67	0.009
Starch	NA14-E08a-1	0.0036	0.16	13.05	0.0036
	BRAS100-3	0.0069	0.14	10.61	0.0069
	BRAS100-5	0.0069	0.14	10.61	0.0069
	MR013c-4	0.0069	0.14	10.61	0.0069
	Pmr52-3	0.0069	0.14	10.61	0.0069
	BRAS041-2	0.0085	0.14	9.86	0.0085
	SR94102-2	0.0155	0.12	7.94	0.0155
	CB10234-6	0.0187	0.12	7.39	0.0187

RWC: محتوای آب نسبی؛ DM: ماده خشک؛ Chl-a: محتوای کلروفیل a؛ Chl-b: محتوای کلروفیل b؛ Chl-t: محتوای کلروفیل کل؛ Car: محتوای کاروتنوئید؛ Sugar: محتوای قندهای محلول؛ Starch: محتوای نشاسته

RWC: Relative water contain; DM: Dry matter; Chl-a: Chlorophyll-a contain; Chl-b: Chlorophyll-b contain; Chl-t: Total chlorophyll contain; Car: Carotenoeid contain; Sugar: Soluble sugars contain; Starch: Starch contain

بتوان از این مکان‌های ریزماهوره در برنامه‌های اصلاحی برای شناسایی والدین مناسب جهت تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و ارقام هیبرید استفاده کرد. جون و همکاران (Jun et al., 2010) در مطالعه‌ای که به بررسی مکان‌یابی ارتباطی درصد روغن بذری در گونه *B. napus* و مقایسه آن با مکان‌یابی صفات کمی شناسایی شده در نقشه‌های لینکاژی پرداختند و بیان کردند که بیش از نیمی از مکان‌های ژنتیکی که با نشانگرهای مرتبط همبستگی داشتند در فواصل مکان‌های ژنی صفات کمی که قبلاً در نقشه‌های لینکاژی شناسایی شده‌اند قرار گرفتند که نشان از کارایی تجزیه ارتباطی است. هونسدورف و همکاران (Honsdorf et al., 2010) در مطالعه مکان‌یابی ارتباطی صفات کیفی، مورفولوژیک و فنولوژیک کلزای پاییزه بیان کردند که مکان‌یابی ارتباطی می‌تواند روشی جایگزین برای نقشه‌یابی ژنتیکی در جمعیت‌های در حال تفرق باشد؛ بنابراین تجزیه مکان‌یابی ارتباطی می‌تواند روشی کارآمد، کم‌هزینه و سریع در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی و فیزیولوژیک باشد.

در این مطالعه، نشانگرهای SR94102, BRMS-036, BRMS-096, BRMS-024, CB1059b, BRAS100, BRMS-30, MR013c و Pmr52 بیش‌ترین ارتباط معنی‌دار را با صفات فیزیولوژیک در شرایط تنش خشکی داشتند؛ بنابراین این احتمال وجود دارد که این نشانگرها بتوانند کاندیدای مناسب و امیدوارکننده در برنامه‌های به‌نژادی تحمل به تنش خشکی مثل انتخاب به کمک نشانگر در کلزا باشد. احتمالاً ژن‌های مربوط به این صفات، ژن‌های نزدیک به هم در مکان کروموزومی باشند و ممکن است در فراهم آوردن اطلاعات اولیه در خصوص انتخاب غیرمستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید باشند.

علاوه بر آن می‌توان نوار نشانگرهای مرتبط با صفات مهم فیزیولوژی را که  $R^2$  بالا دارند از روی ژل جدا و همسانه‌سازی کرد سپس توالی شناسایی شده را در پایگاه‌های اطلاعاتی با توالی‌های موجود هم‌ردیف (Alignment) کرد. با توجه به اینکه همه‌ی مکان‌های مورد بررسی بر روی شاخص‌ها و صفات فیزیولوژیک مورد مطالعه مؤثر بودند بنابراین احتمال دارد

#### منابع

- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D., Sorrells, M.E., 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*. 36, 181-186.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24, 1-15
- Ashraf, M., Mehood, S., 1990. Response of four Brassica species to drought stress. *Environmental and Experimental Botany*. 30, 93-100.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular ecology*. 14, 2611-2620.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1, 19-21.
- Donini, P., Stephenson, P., Bryan, G.Y., Kobner, R.M.D., 1998. The potential of microsatellite for high throughput genetic diversity assessment in wheat barley. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 45, 415-421.
- Flakelar, C.L., Luckett, D.J., Howitt, J.A., Dorana, G., Prenzler, P.D., 2015. Canola (*Brassica napus*) oil from Australian cultivars shows promising levels of tocopherols and carotenoids, along with good oxidative stability. *Journal of Food Composition and Analysis*. 42, 179-186.
- Ghanbari, A.A., Mousavi, S.H., MousapourGorji, A., Rao, I., 2013. Effect of water stress on leaves and seed of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Turkish Journal of Field Crops*. 18, 73-77.
- Gupta, P.K., Rustgi, S., Kulwal, P.L., 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*. 57, 461-48.
- Hardy, O.J., Vekemans, X. 2002. Spagedi: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*. 2, 618-620.
- Hasan, M., Friedt, W., Pons-Kühnemann, J., Freitag, N.M., Link, K., Snowdon, R.J., 2008. Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape

- (*Brassica napus* ssp. *napus*). Theoretical and Applied Genetics. 116, 1035-1049.
- Honsdorf, N., Becker, H.C., Ecke, W., 2010. Association mapping for phenological, morphological, and quality traits in canola quality winter rapeseed (*Brassica napus* L.). Genome. 53, 899-907.
- Jannink J.L., Walsh, B., 2002. Association mapping in plant populations. In: Kang, M.S. (ed.), Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding. CAB International, 59-68.
- Jun, Z., Congcong, J., Zhengying, C., Ruiyuan, L., Yan, L., Sheng, C., Jinling, M., 2010. Association mapping of seed oil content in *Brassica napus* and comparison with quantitative trait loci identified from linkage mapping. Genome. 53, 908-916.
- Kimber, D.S., Mc Gregor, D.I., 1995. The species and their origin, cultivation and world production. In: Kimber, D., McGregor D.I. (eds.), Brassica Oilseeds: Production and Utilization. CABI Publishing, Wallingford, UK, 1-9.
- Li, Z., Mei, Sh., Mei, Zh., Liu, X., Fu, T., Zhou, G., Tu, J., 2014. Mapping of QTL associated with waterlogging tolerance and drought resistance during the seedling stage in oilseed rape (*Brassica napus*). Euphytica. 197, 341-353.
- Lou, Y., Hu, L., Chen, L., Sun, X., Yang, Y., Liu, H., Xu, Q., 2015. Association analysis of simple sequence repeats (SSR) markers with agronomic traits in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Plos One. 10(7), 1-13.
- Mantel, N.A., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research. 27, 209-220.
- Moghaieb, R.E.A., Mohammed, F.H.K., Youssief, S.S., 2014. Genetic diversity among some canola cultivars as revealed by RAPD, SSR and AFLP analyses. Biotechnology. 4, 403-410.
- Mohammadi, S.A., Prasanna, B. M. Cudan, C., Singh, N.N., 2002. A microsatellite marker based study of chromosomal regions and gene effects on yield and yield components in maize. Cellular and Molecular Biology Letters. 7, 599-606.
- Moradi, F., Esmaeilzadeh Moghadam, M., Zali, H., 2016. Production and Remobilization Soluble Carbohydrates in Wheat. Research Achievements for Field and Horticulture Crops. 4(2), 141-162 [In Persian with English Summary]
- Nakao Kubo, M.H., 2008. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers in the. Aquatic Botany. 2164-2168.
- Neale, D.B., Savolainen, O., 2004. Association genetic of complex traits in conifers. Trend Plant Science. 9, 325-330.
- Piquemal, J., Cinquin, E., Couton, F., Rondeau, C., Seignoret, E., Doucet, I., Perret, D., Villegier, M.J. Vincourt, P., Blanchard, P., 2005. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. Theoretical and Applied Genetics. 111, 1514-1523.
- Powell, W., Morgante, M., Ander, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingy, S., Rafalaski, A., 1996. The comparison of RFLP, APD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. Journal of Molecular Breeding. 2, 225-238.
- Qu, C., Hasan, M., Lu, K., Liu, L., Liu, X., Xie, J., Wang, M., Lu, J., Odat, N., Wang, R., Chen, L., Tang, Z., Li, J., 2012. Genetic diversity and relationship analysis of the Brassica napus germplasm using simple sequence repeat (SSR) markers. African Journal of Biotechnology. 11(27), 6923-6933.
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, J., Perrotta, C., 2006. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. Plant, Cell and Environment. 29, 2143-2152.
- Semgan, K., 2002. Genetic relationships among ten endod types as revealed by a combination of morphological, RAPD and AFLP markers. Hereditas. 137, 149-156.
- Sheligl, H.Q., 1986. Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht chlorella lincht. Planta Journal. 47-51.
- Singh, S.P., Diwivedi. V.K., 2002. Character association and path analysis in wheat (*Triticum aestivum* L.). Agricultural Science Digest. 22, 225-547.
- Slama, I., Ghnaya, T., Hessini, K., Messedi, D., Savoure, A., Abdelly, C., 2007. Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in Sesuvium portulacastrum.

- Environmental and Experimental Botany. 61, 10-17.
- Tabkhkar, N., Rabiei, B., Samizadeh Lahiji, H., Hosseini Chaleshtori, M. 2018. Genetic variation and association analysis of the SSR markers linked to the major drought yield QTLs of rice. *Biochem Genet.* 56(4), 356-374. doi:10.1007/s10528-018-9849-6.
- Tondelli, A., Xu, X., Moragues, M., Sharma, R., Schnaithmann, F., Ingvarlsen, Ch., Manninen, O., Comadran, J., Russell, J., Waugh, R., 2013. Structural and temporal variation in genetic diversity of European spring two-row barley cultivars and association mapping of quantitative traits. *The Plant Genome.* 6(2), 1-14.
- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., Nielsen, D.M., Holland, J.B., Kresovich, S., Buckler, E.S., 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics.* 38, 203-208.
- Zada, M., Zakir, N. Rabbani, M.A. Shinwari, Z.K., 2013. Assessment of genetic variation in Ethiopian mustard (*Brassica Carinata* Braun) germplasm using multivariate techniques. *Pakistanian Journal of Botony.* 45, 583-593.
- Zali, H., Sofalian, O., Hasanloo, T., Asgharii, A., Zeinalabedini, M., 2016. Drought stress effect on physiological parameter and amino acids accumulations in canola. *Journal of Crop Breeding.* 8, 191-203 [In Persian with English Summery].
- Zali, H., Sofalian, O., Hasanloo, T., Asgharii, A., Zeinalabedini, M., 2015. The influence of drought stress on nutrients uptake and physiological responses in rapeseed (*Brassica napus* L.) lines. *Journal of Pure and Applied Microbiology.* 9(2), 425-436.

