

تجزیه ارتباط مکان‌های ژنی کنترل‌کننده برخی از صفات مهم مورفولوژیک توتون با استفاده از نشانگرهای AFLP در وضعیت تنش اسمزی

احمدرضا دادرسی^{۱*}، حسین صبوری^۲ و عاطفه صبوری^۳
۱ و ۳. به ترتیب دانشجوی دکتری اصلاح نباتات و استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، ایران
۲. دانشیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۱/۳۰)

چکیده

شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی به‌ویژه در وضعیت تنش از موضوع‌های مهم حوزه به‌نژادی است. مواد گیاهی در این پژوهش، جمعیتی طبیعی شامل ۷۲ ژنوتیپ توتون بود که به منظور اعمال تنش اسمزی از مانتول با غلظت ۰/۳۳ مولار و ایجاد فشار اسمزی ۸- بار در مرحله پنج‌برگی به مدت ۱۰ روز استفاده شد؛ و ژنوتیپ هر یک با استفاده از ۲۱ ترکیب آغازگری از بین ۳۵ ترکیب AFLP تعیین شد. تجزیه ساختار بر روی داده‌های ژنتیکی، تعداد K بهینه یا تعداد زیرمجموعه جمعیت آزمایشی را ۲ برآورد کرد. پس از بررسی هشت صفت شامل وزن خشک کل، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک برگ‌ها، طول بلندترین ریشه، وزن خشک کل ریشه‌ها، طول بلندترین برگ، طول بلندترین ساقه و نسبت وزن خشک ریشه‌ها به وزن خشک اندام هوایی برای تجزیه ارتباط و شناسایی نشانگرهای پیوسته به مکان‌های کنترل‌کننده این صفات از پنج مدل آماری در نرم‌افزار TASSEL استفاده شد. این مدل‌ها شامل GLM و MLM با استفاده از مجموعه داده‌های فنوتیپی، ژنوتیپی، داده‌های ساختار جمعیت (Q)، مؤلفه‌های اصلی (PC) و داده‌های خویشاوندی حاصل از تشابه کلی آنها از لحاظ زمینه ژنتیکی ناشی از خویشاوندی (K) بود. برای هر هشت صفت نشانگرهای پیوسته مشترک در هر پنج مدل و همچنین نشانگرهایی با بیشترین تغییرات فنوتیپی صفات، شناسایی و بررسی شدند. برای وزن خشک کل گیاه نشانگر E110-M160-3، برای وزن خشک ریشه‌ها نشانگر E080-M150-4 و برای وزن خشک اندام هوایی نشانگر E080-M140-23 با داشتن بیشترین ضریب تبیین (به ترتیب با ضریب تبیین ۱۹/۹، ۲۳ و ۱۴/۹ درصد) مهمترین نشانگرها شناسایی شدند. در مجموع تعداد نشانگرهای معنادار در مدل GLM بیشتر از مدل MLM بود. با توجه به نتایج، پیش‌بینی می‌شود استفاده از نشانگرهای AFLP ردیابی‌شده در این پژوهش در صورت تأیید و پس از اختصاصی شدن، با اطمینان زیادی در برنامه‌های انتخاب به‌کمک نشانگر امکان‌پذیر باشد.

واژه‌های کلیدی: انتخاب به کمک نشانگر، تجزیه ارتباطی، ساختار جمعیت، مانتول، TASSEL

مقدمه

می‌شود (Hasani *et al.*, 2008; Chang & Chou 1975). در این راستا اصلاح هدفمند گیاهان برای محیط‌های خشک ممکن است به افزایش معناداری در عملکرد گیاهان منجر شود. البته این موضوع مستلزم تحقیقات پایه‌ای و درست و به‌کارگیری روش‌های جدید و مولکولی در کنار روش‌های سنتی است.

مقابله با خشکی یکی از بزرگ‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصولات گیاهی است که جایگاه ویژه‌ای در تحقیقات به‌نژادی دارد. در توتون با توجه به بررسی‌های انجام‌گرفته بعد از بیماری، عامل محدودکننده بعدی خشکی است که سبب کاهش عملکرد و کیفیت

برنامه‌های مکان‌یابی ژنی است. فناوری نشانگرهای DNA، ابزاری برای افزایش کارایی برنامه‌های به‌نژادی است. نشانگر AFLP (Amplified fragment length polymorphism) یا چندشکلی طولی قطعات تکثیری از مهم‌ترین نشانگرهای DNA است که تکرارپذیری بالایی دارد. این روش، تفاوت در مکان‌های برشی را آشکار می‌کند و به‌دلیل بی‌نیازی به اطلاعات اولیه درباره ژنوم آزمایشی و نیز سرعت و درجه اطمینان بالا، امروزه به وفور در تحقیقات ژنتیکی از جمله مکان‌یابی صفات کمی استفاده می‌شود (Guo *et al.*, 2005). این نشانگرها اگرچه اختصاصی نیستند، به‌دلیل داشتن مزایایی از جمله دستیابی به اطلاعات زیاد ژنتیکی با تفکیک الکتروفورزی هر ترکیب آغازگری، تکرارپذیری زیاد و قابلیت تبدیل به نشانگرهای اختصاصی SCAR (Sequence characterized amplified region) یا نواحی تکثیری با توالی مشخص، علاوه بر اینکه در مطالعات تنوع ژنتیکی کاربرد بسیار زیادی دارند (Zhang *et al.*, 2008) امروزه در مکان‌یابی ژن‌ها نیز بسیار استفاده می‌شوند. برای نمونه در توتون (2006a) Julio *et al.* با هدف شناسایی QTL‌های مرتبط با چندین صفت زراعی، کیفیت برگ، ترکیب‌های شیمیایی و خصوصیات دود، از ۱۱۴ لاین اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی بین لاین‌های اینبرد 'ITB32' *N. tabacum* و '4K78' *N. tabacum* و نشانگرهای AFLP، JSSR، SSAP و SCAR برای تشکیل نقشه پیوستگی استفاده کردند. آنها براساس ۱۳۸ نشانگر، نقشه پیوستگی را تشکیل دادند و توانستند ۷۵ QTL کنترل‌کننده صفات را در طول ژنوم شناسایی کنند که ۴۱-۸ درصد از تغییرات صفات را توجیه کردند.

تجزیه ارتباط در گیاهان بسیاری استفاده شده است. Hamza *et al.* (2004) در پژوهشی ۱۷ نشانگر ریزماهواره برای بررسی تنوع ژنتیک ۲۶ گونه جو و تعیین ارتباط این نشانگرها با برخی صفات مورفولوژیک استفاده کردند. آنها نشان دادند همبستگی مثبت و معناداری بین برخی از نشانگرها و داده‌های مورفولوژیکی وجود دارد. در پژوهشی دیگر بر روی ۵۵ ژنوتیپ گندم، تجزیه ارتباط نشان داد ۱۳۱ آلل ریزماهواره، ۴۳ نشانگر SAMPL و ۱۶۶ نشانگر AFLP ارتباط معناداری با ۱۴

بررسی صفات مرتبط با تنش خشکی به‌دلیل پیچیده بودن توارث بسیار مشکل است. یکی از برنامه‌های کاربردی در مطالعه صفات کمی در دهه اخیر، مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی یا QTL mapping است. به‌طور کلی روش‌های به‌کاررفته در شناسایی و مکان‌یابی جایگاه صفات کمی به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند.

تجزیه پیوستگی

تجزیه ارتباط

در تجزیه ارتباط، رابطه بین ژنوتیپ و فنوتیپ گیاه مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت با استفاده از نامتعادل بودن پیوستگی موجود در جمعیت‌های طبیعی و مجموعه‌های ژرم‌پلاسم بررسی می‌شود (Mohammadi, 2008).

تاکنون تحقیقات بیشماری درباره تجزیه پیوستگی اجرا شده است، اما زمان‌بر بودن تولید جمعیت‌های مصنوعی و اطلاعات ژنتیکی محدود موجود در جمعیت‌های در حال جدایی تولیدشده در مقایسه با اطلاعات جامع‌تر و متنوع‌تر موجود در جمعیت‌های طبیعی سبب شده است تجزیه ارتباط در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای را در تحقیقات به‌نژادی به خود اختصاص دهد (Abdurakhmonov & Abdurakarimov, 2008).

اگرچه خزانه ژنتیکی محصولات گیاهی که اکنون استفاده می‌شوند به دلیل اهلی شدن بسیار محدود شده است، استفاده از خویشاوندان وحشی با توجه به تنوع ژنتیکی زیاد، به‌عنوان مخازن غنی از تنوع ژنتیکی مفید خواهد بود. برای نمونه بازیابی ژن‌های مرتبط با صفات مهم و اقتصادی مانند عملکرد یا مقاومت به بیماری‌ها و تنش‌های غیرزیستی همچون خشکی که ممکن است در روند اصلاح نباتات از دست رفته باشند، با استفاده از گونه‌های وحشی امکان‌پذیر است، همچنین در حل مشکل به‌نژادگران برای شناسایی ژن‌های مناسب و ورود آنها در جمعیت‌های اصلاحی مفید خواهد بود (Abdurakhmonov & Abdurakarimov 2008; Fufa *et al.*, 2005). بنابراین امروزه لزوم استفاده از جمعیت‌های طبیعی در برنامه‌های به‌نژادی بیش از پیش احساس می‌شود. استفاده از نشانگرهای DNA لازمه اجرای

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش ۷۲ ژنوتیپ توتون بررسی شد که ۱۷ ژنوتیپ از دسته بارلی و ۵۵ ژنوتیپ از دسته ویرجینیای گرمخانه‌ای بودند. بذرهاي ژنوتیپ‌های نامبرده از مرکز تحقیقات توتون رشت تهیه و سپس در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه گنبد به صورت خزانه شناور کشت شد. خزانه شناور از دو بخش اصلی بستر آبی (Water bed) و بستر شناور (Float bed) تشکیل شده است. بستر آبی شامل محلول غذایی حاوی قارچ‌کش بود که داخل حوضچه‌ای به ارتفاع حدود ۲۰ سانتی‌متر و ابعاد دلخواه قرار داشت. بستر شناور شامل سینی‌های استیروفومی حفره‌دار حاوی بستر کشت و بذر بود. در این پژوهش از نسبت ۷۰ درصد پرلیت و ۳۰ درصد کود دامی پوسیده شده به جای بستر کشت استفاده شد (Hartley et al., 2001). برای اعمال تنش اسمتیک از مانیتول با غلظت ۰/۳۳ مولار استفاده و محلولی با فشار اسمزی در سطح ۸- بار تهیه شد که برای عامل تنش خشکی در مرحله پنج‌برگی به کار رفت. سپس گیاهچه‌ها ۱۰ روز در این محیط قرار گرفتند و سپس صفات وزن خشک کل گیاه، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک برگ‌ها، طول ریشه، وزن خشک کل ریشه، طول بلندترین برگ و طول ساقه و نسبت وزن خشک ریشه‌ها به وزن خشک اندام هوایی در ۷۲ ژنوتیپ با پنج تکرار به صورت طرح کاملاً تصادفی ارزیابی شد. برای تجزیه ارتباط از میانگین تکرارهای هر ژنوتیپ استفاده شد.

تجزیه AFLP

استخراج DNA به روش CTAB (Saghai Maroof et al., 1994) از نمونه‌های برگ تازه انجام گرفت. سپس روش AFLP مطابق روش وُس و همکاران (Vos et al., 1995) بر روی نمونه‌های DNA اعمال شد. در این روش، از آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *MseI* استفاده شد. پس از هضم DNA ژنومی با استفاده از آنزیم‌های محدودگر *EcoRI* و *MseI* و اتصال سازگار سازه‌ها، در مرحله پیش‌تکثیر از آغازگرهای *EcoRI* و *MseI* واجد یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' استفاده شد. محصولات حاصل از تکثیر پیش‌انتخابی، پس از

صفت زراعی دارند. همچنین بیان کردند این نواحی ژنومی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در راستای بهبود این صفات در اختیار به‌نژادگران قرار دهند (Roy et al., 2006) در ضمن با توجه به پژوهش (Achleitner et al., 2008) بر روی ۱۱۴ گونه یولاف، با استفاده از ۷۷ نشانگر چندشکل حاصل از هشت ترکیب آغازگری، تجزیه ارتباط را برای مکان‌یابی عملکرد و اجزای عملکرد انجام دادند؛ در نهایت ۲۳ نشانگر را با پتانسیل بالا و مرتبط با صفات پیچیده برای برنامه‌های اصلاحی بعدی معرفی کردند. در توتون نیز چند پژوهش درباره مکان‌یابی QTL انجام گرفته است. از جمله پژوهشی با استفاده از نشانگرهای AFLP با ۹۲ ژنوتیپ گوناگون به منظور شناسایی نواحی مرتبط با سه بیماری معمول توتون اجرا شد. در این بررسی محققان موفق به شناسایی 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) شدند. (Julio et al., 2006b). در تحقیقات به‌نژادی مقابله با تنش خشکی، که یکی از عوامل محدودکننده تولید محصولات گیاهی است، جایگاه ویژه‌ای در تحقیقات به‌نژادی دارد. مانیتول از جمله موادی است که در محیط آزمایشگاه برای فراهم کردن تنش خشکی به گیاه استفاده می‌شود و شرایط ارزیابی در وضعیت تنش اسمتیک را فراهم می‌کند که تحقیقات بسیاری نیز در این باره انجام گرفته است (Yavari et al., 2001). درباره ارزیابی مقاومت به خشکی در گونه‌های توتون، تحقیقات بسیار اندکی به‌ویژه در ایران انجام گرفته است. با توجه به اینکه تجزیه ارتباط در چند سال اخیر در دنیا یکی از روش‌های نوین در شناسایی مکان‌های ژنومی کنترل‌کننده صفات کمی است و نظر به اینکه برای گیاهی مانند توتون که هنوز اطلاعات ژنتیکی چندانی درباره بسیاری از صفات آن وجود ندارد، در کنار اهمیت بسیار زیاد تحقیقات مرتبط با تنش خشکی، تجزیه ارتباط برای تعیین نشانگرهای پیوسته با مکان‌های کنترل‌کننده صفات مهم در تنش اسمتیک می‌تواند اطلاعات پایه‌ای بسیار مفیدی را در اختیار محققان ژنتیک و به‌نژادی قرار دهد. در نتیجه این تحقیق با اهداف نامبرده طراحی و اجرا شده است.

پس از تفکیک با استفاده از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید واسرشته‌ساز شش درصد با روش نیترات نقره (Bassam *et al.*, 1991) رنگ‌آمیزی شدند. امتیازدهی نوارها به‌صورت صفر و یک به‌ترتیب برای فقدان و حضور نوار باندی انجام گرفت.

رقیق‌سازی، با ۲۱ ترکیب برتر انتخاب‌شده از بین ۳۵ ترکیب آغازگری از لحاظ چندشکلی (با دو نوکلئوتید انتخابی دیگر در انتهای ۳') در چرخه حرارتی Touch down با سه مرحله دمایی مختلف تکثیر شدند. جدول ۱ ترکیب‌های آغازگری استفاده‌شده در تجزیه AFLP را نشان می‌دهد. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

جدول ۱. اسامی ژنوتیپ‌ها و منشأ آنها براساس (Sisson 2002) با شماره گروه انتسابی برآوردشده با استفاده از تجزیه ساختار

ردیف	ژنوتیپ	منشاء	گروه	ردیف	ژنوتیپ	منشاء	گروه
۱	Burley whites*	آلمان	۱	۳۷	Virginia Bright 88	آمریکا	۱
۲	Burley b.5	آلمان	۱	۳۸	Virginia Ree 488	آفریقای جنوبی	۱
۳	Burley pr-144	آمریکا	۲	۳۹	NOD 8	آفریقای جنوبی	۱
۴	Burley Ree103	آمریکا	۱	۴۰	TL 33	آفریقای جنوبی	Mixed
۵	Burley semparant	آمریکا	۱	۴۱	NR 23	آفریقای جنوبی	۱
۶	Burlina	آمریکا	۱	۴۲	NFBE 63	آمریکا	۱
۷	Badisher Burley E	زیمبابوه	۲	۴۳	NC.95XCH-MUTANTNO2	ایران	۱
۸	Banket A1	فرانسه	۱	۴۴	P49-4625	آمریکا	۱
۹	BB16A	آمریکا	۱	۴۵	Soth-Carolina	آمریکا	۱
۱۰	Burley 151	برزیل	Mixed	۴۶	S.392-3s	آمریکا	۱
۱۱	Burley7	برزیل	Mixed	۴۷	Virginia RP.37	آلمان	۱
۱۲	Burley 7022	آمریکا	۲	۴۸	Virginia A-mutant	جمهوری چک	۱
۱۳	Burley A1	آمریکا	۱	۴۹	Tirtash-10	ایران	۱
۱۴	Burley BB163	آمریکا	۱	۵۰	Tirtash-33	ایران	۱
۱۵	Burley Barsoma	آمریکا	۱	۵۱	Pereg R.2-228	آلمان	۱
۱۶	Burley Bursanica	آلمان	۲	۵۲	Holandisher	سوئیس	۱
۱۷	Burley Kreuzing	آلمان	۲	۵۳	Harrion Speacial	آمریکا	۱
۱۸	K.S1.E	آفریقای جنوبی	۲	۵۴	RH-211	آمریکا	۱
۱۹	Pereg234	آلمان	۲	۵۵	Look Wood	آمریکا	۱
۲۰	Perega	آفریقای جنوبی	Mixed	۵۶	Montcalm Brum	آمریکا	۱
۲۱	Chemical Mutant	استرالیا	۲	۵۷	Alida	استرالیا	۱
۲۲	Coker411	آمریکا	۲	۵۸	Pfatzter	آمریکا	۱
۲۳	Bel 71-500	آمریکا	Mixed	۵۹	Pennbel69	کانادا	۲
۲۴	Bel 71-501	آمریکا	Mixed	۶۰	Parfum-ditalie	کانادا	۱
۲۵	Bel 61-12	آمریکا	۲	۶۱	Rosecan Nela	ایتالیا	۱
۲۶	Bel 61-9	آلمان	۱	۶۲	Bererac C	فرانسه	۱
۲۷	K.E1	آفریقای جنوبی	۱	۶۳	TRUMPF	لهستان	۱
۲۸	McNair944	آمریکا	Mixed	۶۴	RXT	آمریکا	۱
۲۹	R9	ژاپن	۲	۶۵	GA.955	آمریکا	۱
۳۰	MC.I	کانادا	۱	۶۶	Coker176	بریتانیا	۲
۳۱	Deliot	بلژیک	۲	۶۷	Bel	آلمان	۱
۳۲	Virginia American	آمریکا	۱	۶۸	EX.4.PR-1	آمریکا	۱
۳۳	Virgin RP37	سوئیس	۱	۶۹	Golden gift	آمریکا	Mixed
۳۴	Hicks 55	آمریکا	۱	۷۰	Hick RG	استرالیا	۱
۳۵	Hicks Broad Leaf	برزیل	۱	۷۱	Titel(R30.N2)	ایران	Mixed
۳۶	Virginia gold	آمریکا	۱	۷۲	C319.C411(Gil181)	ایران	Mixed

* ژنوتیپ‌های ۱۷-۱ به دسته بارلی و بقیه به دسته ویرجینیا تعلق دارند.

تجزیه‌های آماری

STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2002) تشکیل شد. در این نرم‌افزار با توجه به فقدان اطلاعات قبلی درباره ساختار جمعیت، بنابراین تعداد بهینه K با شبیه‌سازی تعیین شد. برای این منظور تعداد K از ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته و شبیه‌سازی با طول دوره ۱۰۰۰۰۰ Burnin و تعداد تکرار ۱۰۰۰۰۰ MCMC انجام گرفت. پس از

برای تجزیه خوشه‌ای، پس از تشکیل ماتریس صفر و یک، انواع ماتریس‌های فاصله ژنتیکی تشکیل شد. سپس تجزیه خوشه‌ای با الگوریتم‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA5.1 و GGT، NTSYSpc-2.02 انجام گرفت. در نهایت بهترین و مناسب‌ترین دندروگرام با استفاده از ضریب کوفنتیک بالاتر و توپولوژی بهتر دندروگرام انتخاب شد. برای تجزیه ارتباط، ابتدا ماتریس ساختار ژنتیکی گونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار

فونوتیپی و ژنوتیپی با نرم‌افزار TASSEL 4.1.2 (Bradbury *et al.*, 2007) انجام گرفت. در نرم‌افزار TASSEL از پنج مدل آماری استفاده شد که این مدل‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. تفاوت این مدل‌ها در به‌کارگیری مجموعه داده‌های به‌کار رفته و همچنین نوع روش تجزیه آماری است. در کل دو روش GLM و MLM استفاده شد. مجموعه داده‌های به‌کار رفته نیز شامل ماتریس داده‌های فونوتیپی، ژنوتیپی، ماتریس Q، ماتریس حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و ماتریس K یا داده‌های خویشاوندی حاصل از تشابه کلی افراد از لحاظ زمینه ژنتیکی ناشی از خویشاوندی است که در نرم‌افزار TASSEL تشکیل شد.

شبه‌سازی برای تعیین تعداد بهینه K یا همان تعداد گروه‌ها، از روش *Evanno et al.* (2005) استفاده شد. براساس این روش تعداد خوشه‌ها برابر با ۲ برآورد شد و همه ژنوتیپ‌ها به دو گروه تقسیم‌بندی شدند. سپس درصد عضویت برای هر ژنوتیپ در هر گروه با استفاده از این نرم‌افزار محاسبه شد. مطابق روش *Spataro* (2011) *et al.* یک ژنوتیپ در صورتی به یک گروه منتسب می‌شود که درصد عضویت آن بیشتر از ۰/۷ باشد و در صورتی که درصد عضویت کمتر از ۰/۶۹ باشد، ژنوتیپ مخلوط در نظر گرفته می‌شود. در نهایت ماتریس Q یا همان داده‌های حاصل از ساختار جمعیت و شکستن آن به دو یا چند زیرمجموعه جمعیت، از نرم‌افزار STRUCTURE استخراج و تجزیه ارتباط بین داده‌های

جدول ۲. ترکیب‌های آغازگری استفاده‌شده در تجزیه AFLP

EcoRI آغازگرهای		MseI آغازگرهای	
نام	DNA توالی	نام	DNA توالی
E060	GACTGCGTACCAATTCAAG	M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC
E070	GACTGCGTACCAATTCAAT	M150	
E080	GACTGCGTACCAATTCACG	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT
E090	GACTGCGTACCAATTCAGT		
E100	GACTGCGTACCAATTCAGT		
E110	GACTGCGTACCAATTCATC		
E120	GACTGCGTACCAATTCATT		

جدول ۳. پنج مدل آماری استفاده‌شده برای تجزیه ارتباط نشانگرهای AFLP و صفات فونوتیپی

مدل	مجموعه داده استفاده‌شده
: GLM ^a ۱	Phenotype + AFLP
: GLM ^b ۲	Phenotype + AFLP + Q ^b
: GLM ^c ۳	Phenotype + AFLP + PC ^c _{1,3}
: MLM ^d ۴	Phenotype + AFLP + K ^c
: MLM ^e ۵	Phenotype + AFLP + K + Q

a مدل خطی عمومی

b داده‌های ساختار جمعیت یا اصل و نسب استنباط شده از افراد

c مؤلفه‌های اصلی

d مدل خطی مخلوط

e داده‌های خویشاوندی حاصل از تشابه کلی افراد از لحاظ زمینه ژنتیکی ناشی از خویشاوندی

ژنوتیپ‌ها آورده شده است. بر این اساس، به ترتیب گروه فرضی یک و دو شامل ۴۸ و ۱۴ ژنوتیپ هستند، ۱۰ ژنوتیپ نیز مخلوط تشخیص داده شدند. شکل ۲ گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه‌ها با ماتریس فاصله ژنتیکی جاکارد را نشان می‌دهد. در این شکل گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس تجزیه ساختار نیز با رنگ‌های مختلف نشان داده شده است. تجزیه ساختار جمعیت *Toton* *Fricano et al.* (2012) با استفاده از ۴۹ نشانگر ریزماهواره و ۳۱۲ ژنوتیپ

نتایج و بحث

از کل باندهای نشانگرهای AFLP، ۴۴۶ نوار چندشکل به‌دست آمد. میانگین تعداد نوارهای چندشکل ۱۷/۷۶ در هر ترکیب آغازگری و متوسط درصد چندشکلی ۷۷/۴۳ است.

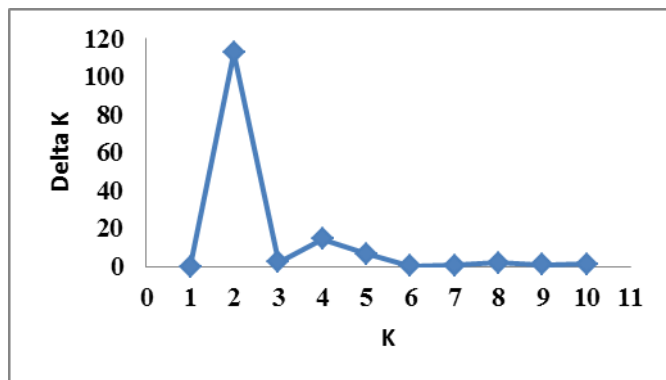
در این پژوهش، تعداد بهینه K یا تعداد گروه‌ها با تجزیه ساختار در جمعیت *Toton* آزمایشی مطابق شکل ۱، دو برآورد شد. در جدول ۱ نتایج مربوط به انتساب ژنوتیپ‌ها به دو زیرمجموعه جمعیت و مشخصات

برای صفت وزن خشک اندام هوایی، ۱۳ نشانگر پیوسته به QTLهای این صفت شناسایی شدند. از بین این نشانگرها، نشانگر E080-M140-12 در سه مدل مشترک بود. براساس سطح احتمال ۰/۰۱، دو مدل MLM حداکثر دو نشانگر را ردیابی کردند. هر دو مدل MLM نشانگر E080-M140-23 را مرتبط با صفت وزن خشک اندام هوایی در تنش اسمزی شناسایی کردند که تقریباً نزدیک ۱۵ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه کرد. این نشانگر در مدل‌های GLM ردیابی نشد. برای وزن خشک برگ‌ها ۱۱ نشانگر، نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شدند. از این تعداد دو نشانگر E080-M150-22 و E110-M160-3 در هر پنج مدل مشترک بود. همچنین پنج نشانگر ردیابی‌شده در دو مدل MLM نیز با هم مطابقت داشتند. این نشانگرها شامل E080-M150-22، E080-M150-25، E080-M150-26 و E110-M160-3 بودند. از بین این نشانگرها نیز دو نشانگر E080-M150-22 و E110-M160-3 کمترین سطح احتمال معناداری و بیشترین درصد توجیه تغییرات فنوتیپی را داشتند. درباره طول بلندترین ریشه، در مجموع ۱۹ نشانگر پیوسته به QTLهای این صفت شناسایی شد. دو نشانگر E070-M150-6 و E120-M140-1 در چهار مدل به‌طور مشترک شناسایی شدند. همچنین نشانگر E120-M140-7 در هر دو مدل MLM، نشانگر مرتبط با این صفت معرفی شد. همچنین برای وزن خشک ریشه ۲۵ نشانگر، نشانگرهای پیوسته به QTLهای کنترل‌کننده این صفت شناسایی شدند. تعداد نشانگرهای معنادار در مدل‌های GLM بسیار بیشتر از مدل‌های MLM بود. چهار نشانگر E080-M150-4، E080-M150-25، E080-M150-26 و E080-M150-27 در مجموع پنج مدل به صورت مشترک ردیابی شدند. نشانگر E080-M150-22 نیز در هر دو مدل MLM معرفی شد. تعداد نشانگرهای مرتبط با طول بلندترین برگ نیز ۱۲ عدد بودند. البته لازم به ذکر است برای این صفت و صفت طول بلندترین ساقه در دو مدل MLM در سطح احتمال ۰/۰۱ هیچ نشانگری شناسایی نشد. بنابراین نشانگرهای معنادار در سطح ۰/۰۵ در جدول ۴ ارائه شدند. بر این اساس، برای طول بلندترین برگ دو نشانگر در چهار مدل مشترک

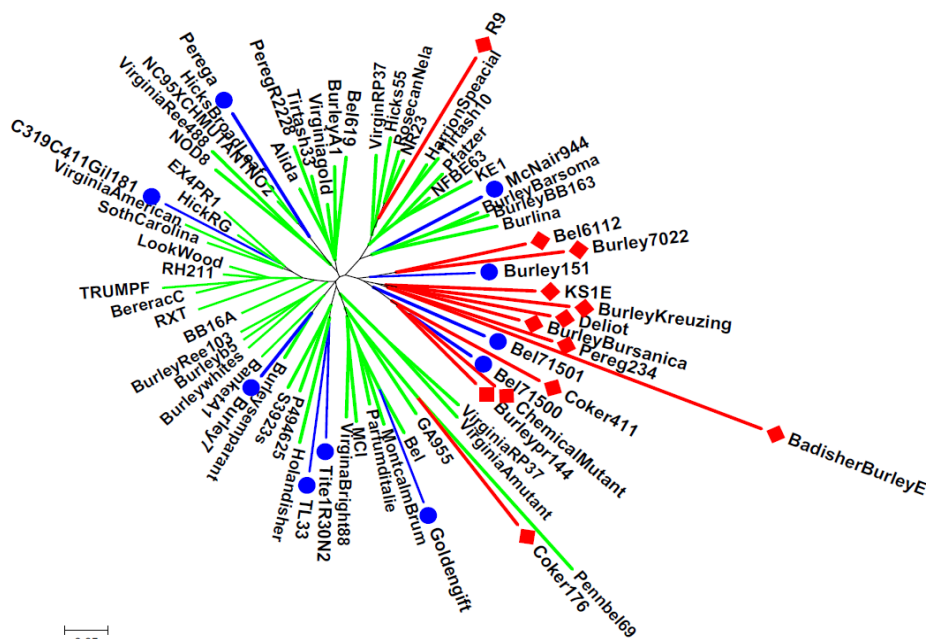
انجام گرفت. در کل تعداد آلل‌های تکثیرشده از ۴۹ نشانگر ریزماهواره، ۳۳۵ آلل بود که با میانگین نرخ ۹۹ درصد، سطح بالایی از چندشکلی را نشان دادند. آنها در پژوهش خود نامتعادل بودن پیوستگی در هفت ناحیه ژنومی را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تجزیه کردند؛ نتایج پژوهش آنها نشان داد که ساختار جمعیت به شش گروه اصلی شامل گروه بارلی، گرمخانه‌ای، شرقی، قدیمی، سیاه و سایر ژنوتیپ‌ها تفکیک‌پذیر است. در جدول ۴، نشانگرهای پیوسته به هشت صفت بررسی‌شده با استفاده از پنج مدل ارتباطی ارائه شده است. در هر مدل برای هر نشانگر، اندازه سطح معناداری و درصد توجیه فنوتیپی نشانگر شناسایی‌شده نشان داده شده‌اند. برای صفت وزن خشک کل، براساس پنج مدل در مجموع ۱۱ نشانگر مختلف نشانگرهای مثبت و آگاهی‌بخش (Informative) مرتبط با QTLهای این صفت شناسایی شدند (نشانگرهای مثبت و آگاهی‌بخش به نشانگرهایی گویند که در تجزیه ارتباط، ارتباط معناداری با صفت موردنظر نشان دهند). چنانچه پیش‌بینی می‌شد مدل GLM بدون استفاده از ماتریس ساختار Q، بیشترین تعداد نشانگر (۱۱ نشانگر) و دو مدل MLM کمترین تعداد نشانگر (۶ نشانگر) پیوسته به مناطق کنترل‌کننده این صفت را شناسایی کردند. با توجه به اینکه این مدل‌ها با در نظر گرفتن اثر ساختار جمعیت و ارتباطات خویشاوندی موجود درون جمعیت‌ها، خطای نوع اول و False positive را به حداقل می‌رسانند، بنابراین انتظار می‌رود نشانگرهای شناسایی‌شده با استفاده از مدل‌های نامبرده، اعتبار بیشتری خواهند داشت. علاوه بر این، براساس نتایج به‌دست آمده، برای بسیاری از صفات، نشانگرهایی شناسایی شدند که بین چند مدل مشترک بودند و بر اعتماد بیشتر به این نشانگرها تأکید می‌کند. برای صفت وزن کل در سطح احتمال ۰/۰۱، پنج نشانگر از ۱۱ نشانگر در هر پنج مدل مشترک بودند، این نشانگرها شامل E080-M150-25، E080-M150-26، E080-M150-27، E110-M160-2 و E110-M160-3 بودند. بین این نشانگرها نیز براساس مدل‌های MLM، بالاترین درصد توجیه فنوتیپی و کمترین سطح احتمال معناداری به نشانگر E110-M160-3 اختصاص یافت.

مدل مشترک و نشانگر E120-M140-1 در سه مدل و نشانگر E100-M150-22 در دو مدل مشترک بودند. برای صفت نسبت وزن خشک ریشه‌ها به وزن خشک اندام هوایی شش نشانگر شناسایی شد. نشانگر E090-M150-9 و نشانگر E120-M140-15 در سه مدل GLM و نشانگر E100-M140-15 در چهار مدل شامل هر دو مدل MLM و دو مدل GLM مشترک بود که احتمالاً نشان‌دهنده اهمیت این نشانگرها و وجود اعتبار بیشتر در معنادار بودن ارتباط آنها با صفت نسبت وزن خشک ریشه‌ها به وزن خشک اندام هوایی است.

بودند که عبارتند از E070-M160-5 و E110-M160-23. همچنین نشانگر E100-M140-1 در هر دو مدل MLM، نشانگر معنادار در پیوستگی با صفت طول بلندترین برگ معرفی شد. درباره طول بلندترین ساقه، در مجموع پنج مدل تعداد ۷ نشانگر پیوسته به QTL‌های این صفت شناسایی شد. در ضمن برای این دو صفت در دو مدل MLM با سطح احتمال ۰/۰۱ هیچ نشانگری شناسایی نشد. بنابراین نشانگرهای معنادار در سطح ۰/۰۵ در جدول ۴ ارائه شدند. برای طول بلندترین ساقه دو نشانگر E110-M160-23، E080-M140-23 در چهار



شکل ۱. تعیین تعداد بهینه K یا تعداد گروه‌ها براساس نتایج تجزیه ساختار در نرم‌افزار STRUCTURE. براساس این نمودار، دو گروه تعداد بهینه دارند.



شکل ۲. دندروگرام شاخه‌ای شکل ۷۲ ژنوتیپ توتون، براساس الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه‌ها و فاصله ژنتیکی جاکاردا. شاخه‌های بدون علامت، همراه با مربع و دایره به ترتیب مربوط به افراد متعلق به گروه ۱، ۲ و مخلوط حاصل از نتایج تجزیه ساختار ژنوتیپ‌ها است.

جدول ۴. سطح معناداری (P) و میزان واریانس توجیه شده (R²) توسط نشانگر AFLP شناسایی شده با استفاده از تجزیه ارتباط با پنج

مدل در نرم افزار TASSEL

مدل ۵		نشانگر	مدل ۴		نشانگر	مدل ۳		نشانگر	مدل ۲		نشانگر	مدل ۱		نشانگر	صفت	
P	R ²		P	R ²		P	R ²		P	R ²		P	R ²			
۰/۰۰۵	۰/۱۱۹	E080-M150-22	۰/۰۰۵	۰/۱۲۰	E080-M150-22	۰/۰۰۴	۰/۱۳۴	E080-M150-25	۰/۰۰۱	۰/۱۴۲	E080-M150-22	۰/۰۰۳	۰/۱۵۶	E080-M140-12	وزن خشک کل	
۰/۰۰۶	۰/۱۵۵	E080-M150-25	۰/۰۰۵	۰/۱۵۸	E080-M150-25	۰/۰۰۴	۰/۱۳۰	E080-M150-26	۰/۰۰۰	۰/۲۵۵	E080-M150-25	۰/۰۰۰	۰/۱۵۱	E080-M150-22		
۰/۰۰۷	۰/۱۵۲	E080-M150-26	۰/۰۰۶	۰/۱۵۶	E080-M150-26	۰/۰۰۵	۰/۱۳۰	E080-M150-27	۰/۰۰۰	۰/۲۵۳	E080-M150-26	۰/۰۰۰	۰/۲۵۹	E080-M150-25		
۰/۰۰۷	۰/۱۵۳	E080-M150-27	۰/۰۰۶	۰/۱۵۷	E080-M150-27	۰/۰۰۲	۰/۱۱۱	E100-M140-1	۰/۰۰۰	۰/۲۵۴	E080-M150-27	۰/۰۰۰	۰/۲۵۶	E080-M150-26		
۰/۰۰۷	۰/۱۵۱	E110-M160-2	۰/۰۰۸	۰/۱۴۷	E110-M160-2	۰/۰۰۶	۰/۱۲۴	E110-M160-2	۰/۰۰۸	۰/۱۲۹	E080-M160-9	۰/۰۰۰	۰/۲۵۵	E080-M150-27		
۰/۰۰۲	۰/۱۹۹	E110-M160-3	۰/۰۰۲	۰/۱۹۶	E110-M160-3	۰/۰۰۰	۰/۱۶۹	E110-M160-3	۰/۰۰۲	۰/۱۲۴	E100-M140-1	۰/۰۰۹	۰/۱۲۸	E080-M160-9		
						۰/۰۰۲	۰/۱۴۷	E110-M160-23	۰/۰۰۴	۰/۱۴۴	E110-M160-2	۰/۰۰۳	۰/۱۲۳	E100-M140-1		
									۰/۰۰۰	۰/۱۹۴	E110-M160-3	۰/۰۰۹	۰/۰۹۵	E100-M140-4		
									۰/۰۰۰	۰/۲۸۲	E110-M160-23	۰/۰۰۰	۰/۱۴۲	E110-M160-2		
												۰/۰۰۰	۰/۱۹۲	E110-M160-3		
												۰/۰۰۰	۰/۲۵۸	E110-M160-23		
۰/۰۰۹	۰/۱۴۴	E080-M140-12	۰/۰۰۹	۰/۱۲۲	E080-M140-23	۰/۰۰۷	۰/۱۲۲	E080-M140-12	۰/۰۰۵	۰/۱۴۱	E070-M140-1	۰/۰۰۵	۰/۱۴۳	E070-M140-1		وزن خشک آندام هوایی
۰/۰۰۸	۰/۱۴۹	E080-M140-23							۰/۰۰۰	۰/۰۹۱	E080-M150-22	۰/۰۰۱	۰/۱۷۴	E080-M140-12		
									۰/۰۰۲	۰/۱۶۱	E090-M160-8	۰/۰۰۹	۰/۰۹۳	E080-M150-22		
									۰/۰۰۰	۰/۲۳۶	E110-M160-23	۰/۰۰۸	۰/۰۹۷	E080-M150-23		
									۰/۰۰۹	۰/۱۲۷	E120-M140-1	۰/۰۰۲	۰/۱۶۸	E090-M160-8		
												۰/۰۰۰	۰/۲۴۵	E110-M160-23		
												۰/۰۰۰	۰/۱۳۵	E120-M140-1		
۰/۰۰۰	۰/۱۸۳	E080-M150-22	۰/۰۰۰	۰/۱۷۸	E080-M150-22	۰/۰۰۲	۰/۱۰۶	E080-M150-22	۰/۰۰۶	۰/۱۳۵	E080-M140-12	۰/۰۰۴	۰/۱۴۵	E080-M140-12	وزن خشک برگها	
۰/۰۰۶	۰/۱۶۱	E080-M150-25	۰/۰۰۵	۰/۱۵۹	E080-M150-25	۰/۰۰۶	۰/۱۰۰	E100-M140-1	۰/۰۰۸	۰/۱۲۷	E080-M150-4	۰/۰۰۶	۰/۱۳۶	E080-M150-4		
۰/۰۰۵	۰/۱۶۲	E080-M150-26	۰/۰۰۵	۰/۱۶۳	E080-M150-26	۰/۰۰۱	۰/۱۵۶	E110-M160-3	۰/۰۰۰	۰/۱۸۱	E080-M150-22	۰/۰۰۰	۰/۱۵۹	E080-M150-22		
۰/۰۰۵	۰/۱۶۵	E080-M150-27	۰/۰۰۴	۰/۱۶۶	E080-M150-27				۰/۰۰۰	۰/۲۲۲	E080-M150-25	۰/۰۰۰	۰/۲۱۸	E080-M150-25		
۰/۰۰۴	۰/۱۶۶	E110-M160-3	۰/۰۰۴	۰/۱۶۷	E110-M160-3				۰/۰۰۰	۰/۲۲۰	E080-M150-26	۰/۰۰۰	۰/۲۲۱	E080-M150-26		
									۰/۰۰۰	۰/۲۲۲	E080-M150-27	۰/۰۰۰	۰/۲۲۴	E080-M150-27		
									۰/۰۰۵	۰/۱۰۸	E100-M140-1	۰/۰۰۴	۰/۱۰۹	E100-M140-1		
									۰/۰۰۵	۰/۱۰۸	E100-M140-13	۰/۰۰۷۵	۰/۰۹۷	E100-M140-4		
									۰/۰۰۲	۰/۱۶۱	E110-M160-3	۰/۰۰۵	۰/۱۰۷	E100-M140-13		
									۰/۰۰۲	۰/۱۶۴	E110-M160-23	۰/۰۰۲	۰/۱۷۰	E110-M160-3		
												۰/۰۰۱	۰/۱۷۹	E110-M160-23		
۰/۰۰۸	۰/۱۴۷	E070-M150-6	۰/۰۰۷	۰/۱۴۹	E070-M150-6	۰/۰۰۸	۰/۱۱۶	E070-M150-6	۰/۰۰۸	۰/۱۳۱	E080-M140-12	۰/۰۰۷	۰/۱۳۶	E070-M150-6	طول بلندترین ریشه	
۰/۰۰۰	۰/۲۵۷	E120-M140-1	۰/۰۰۰	۰/۲۵۹	E120-M140-1	۰/۰۰۹	۰/۱۱۶	E080-M160-6	۰/۰۰۰	۰/۱۸۲	E080-M150-4	۰/۰۰۰	۰/۲۰۹	E080-M160-1		
۰/۰۰۷	۰/۱۱۰	E120-M140-7	۰/۰۰۸	۰/۱۰۶	E120-M140-7	۰/۰۰۷	۰/۰۹۰	E110-M140-14	۰/۰۰۲	۰/۱۶۷	E080-M150-22	۰/۰۰۰	۰/۱۸۴	E080-M160-2		
						۰/۰۰۰	۰/۲۱۴	E120-M140-1	۰/۰۰۲	۰/۱۶۰	E080-M150-25	۰/۰۰۹	۰/۱۲۹	E080-M160-3		
									۰/۰۰۲	۰/۱۶۷	E080-M150-26	۰/۰۰۲	۰/۱۶۳	E080-M160-4		
									۰/۰۰۰	۰/۲۲۰	E080-M150-26	۰/۰۰۰	۰/۱۸۴	E080-M160-5		
									۰/۰۰۴	۰/۱۴۸	E100-M140-1	۰/۰۰۰	۰/۲۱۸	E080-M160-6		
									۰/۰۰۷	۰/۱۳۴	E100-M140-4	۰/۰۰۳	۰/۱۵۷	E080-M160-7		
									۰/۰۰۲	۰/۱۶۹	E100-M140-13	۰/۰۰۷	۰/۱۳۶	E080-M160-9		
									۰/۰۰۰	۰/۲۷۲	E110-M160-3	۰/۰۰۱	۰/۱۸۲	E110-M160-23		
												۰/۰۰۰	۰/۲۶۹	E120-M140-1		

ادامه جدول ۴

مدل 5		نشانهگر Marker	مدل 4-4		نشانهگر Marker	مدل 3-3		نشانهگر Marker	مدل 2-2		نشانهگر Marker	مدل 1-1		نشانهگر Marker	صفت Trait
P	R ²		P	R ²		P	R ²		P	R ²		P	R ²		
۰/۰۰۰	۰/۲۳۰	E080-M150-4	۰/۰۰۰	۰/۲۳۹	E080-M150-4	۰/۰۰۰	۰/۱۴۷	E080-M150-4	۰/۰۰۳	۰/۱۴۸	E070-M140-4	۰/۰۰۷	۰/۱۳۴	E070-M140-1	وزن خشک ریشه ها
۰/۰۰۶	۰/۱۱۶	E080-M150-22	۰/۰۰۶	۰/۱۱۴	E080-M150-22	۰/۰۰۶	۰/۱۰۳	E080-M150-25	۰/۰۰۴	۰/۱۴۰	E080-M140-22	۰/۰۰۲	۰/۱۶۴	E070-M140-4	
۰/۰۰۸	۰/۱۰۵	E080-M140-23	۰/۰۰۸	۰/۱۴۷	E080-M150-25	۰/۰۰۶	۰/۱۰۵	E080-M150-26	۰/۰۰۰	۰/۲۶۰	E080-M150-4	۰/۰۰۶	۰/۱۳۸	E070-M140-6	
۰/۰۰۸	۰/۱۴۸	E080-M150-25	۰/۰۰۸	۰/۱۴۶	E080-M150-26	۰/۰۰۵	۰/۱۰۶	E080-M150-27	۰/۰۰۱	۰/۱۲۹	E080-M140-22	۰/۰۰۴	۰/۱۴۸	E080-M140-12	
۰/۰۰۸	۰/۱۴۶	E080-M150-26	۰/۰۰۸	۰/۱۴۵	E080-M150-27	۰/۰۰۷	۰/۰۷۶	E100-M140-1	۰/۰۰۵	۰/۱۰۲	E080-M150-23	۰/۰۰۰	۰/۱۹۱	E080-M140-22	
۰/۰۰۸	۰/۱۴۶	E080-M150-27	۰/۰۰۰	۰/۲۳۹	E080-M150-4	۰/۰۰۵	۰/۱۰۸	E110-M160-23	۰/۰۰۸	۰/۰۹۳	E080-M150-24	۰/۰۰۰	۰/۲۸۷	E080-M150-4	
									۰/۰۰۰	۰/۲۶۸	E080-M150-25	۰/۰۰۰	۰/۱۰۱	E080-M150-18	
									۰/۰۰۰	۰/۲۶۸	E080-M150-26	۰/۰۰۰	۰/۲۷۰	E080-M150-25	
									۰/۰۰۰	۰/۲۶۹	E080-M150-27	۰/۰۰۰	۰/۲۷۶	E080-M150-26	
									۰/۰۰۵	۰/۱۳۷	E080-M160-1	۰/۰۰۰	۰/۲۷۵	E080-M150-27	
									۰/۰۰۹	۰/۱۲۱	E080-M160-2	۰/۰۰۲	۰/۱۷۰	E080-M160-1	
									۰/۰۰۹	۰/۱۲۱	E080-M160-4	۰/۰۰۴	۰/۱۴۷	E080-M160-2	
									۰/۰۰۱	۰/۱۷۰	E080-M160-9	۰/۰۰۹	۰/۱۲۶	E080-M160-3	
									۰/۰۰۷	۰/۰۹۷	E100-M140-1	۰/۰۰۴	۰/۱۴۷	E080-M160-4	
									۰/۰۰۷	۰/۱۱۴	E100-M140-8	۰/۰۰۹	۰/۱۲۷	E080-M160-7	
									۰/۰۰۱	۰/۱۳۳	E100-M140-11	۰/۰۰۱	۰/۱۷۳	E080-M160-9	
									۰/۰۰۰	۰/۲۲۹	E110-M160-23	۰/۰۰۷	۰/۰۹۹	E100-M140-1	
									۰/۰۰۶	۰/۱۳۳	E120-M140-1	۰/۰۰۳	۰/۱۱۷	E100-M140-4	
												۰/۰۰۶	۰/۱۰۳	E100-M140-8	
												۰/۰۰۳	۰/۱۲۲	E100-M140-11	
												۰/۰۰۵	۰/۱۴۲	E100-M150-22	
												۰/۰۰۸	۰/۱۳۱	E110-M160-4	
												۰/۰۰۰	۰/۳۳۷	E110-M160-23	
۰/۰۰۰	۰/۱۸۶	E100-M140-15	۰/۰۰۰	۰/۱۹۷	E100-M140-15	۰/۰۰۴	۰/۱۴۶	E90-M150-9	۰/۰۰۵	۰/۱۴۰	E90-M150-9	۰/۰۰۳	۰/۱۵۸	E90-M150-9	نسبت وزن خشک ریشه ها به وزن خشک اندام هوایی
								E100-M140-15	۰/۰۰۰	۰/۱۸۲	E120-M140-2	۰/۰۰۸	۰/۱۳۱	E90-M150-12	
								E120-M140-2	۰/۰۰۲	۰/۱۶۴	E120-M160-12	۰/۰۰۳	۰/۱۱۵	E100-M140-12	
								E120-M160-12	۰/۰۰۳	۰/۱۵۱	E100-M160-12	۰/۰۰۲	۰/۱۳۳	E100-M140-15	
								E90-M150-9	۰/۰۰۴	۰/۱۴۶	E120-M140-2	۰/۰۰۰	۰/۱۸۴	E120-M140-2	
۰/۰۳۵	۰/۱۰۰	E070-M160-5	۰/۰۴۱	۰/۰۹۴	E070-M160-5	۰/۰۰۹	۰/۰۸۳	E080-M150-10	۰/۰۰۲	۰/۱۶۰	E070-M160-5	۰/۰۰۴	۰/۱۴۶	E070-M160-5	طول بلندترین برگ
۰/۰۳۳	۰/۰۶۷	E100-M140-1	۰/۰۳۱	۰/۰۶۸	E100-M140-1				۰/۰۰۲	۰/۱۶۰	E080-M160-1	۰/۰۰۷	۰/۱۳۵	E080-M160-1	
۰/۰۴۹	۰/۰۹۰	E110-M160-23	۰/۰۴۹	۰/۰۸۹	E110-M160-23				۰/۰۰۱	۰/۱۶۹	E080-M160-2	۰/۰۰۴	۰/۱۵۰	E080-M160-2	
									۰/۰۰۶	۰/۱۳۷	E080-M160-3	۰/۰۰۷	۰/۱۳۷	E080-M160-3	
									۰/۰۰۲	۰/۱۶۹	E080-M160-4	۰/۰۰۴	۰/۱۵۰	E080-M160-4	
									۰/۰۰۷	۰/۱۳۵	E080-M160-6	۰/۰۰۵	۰/۱۴۰	E080-M160-6	
									۰/۰۰۳	۰/۱۵۳	E080-M160-7	۰/۰۰۵	۰/۱۴۳	E080-M160-7	
									۰/۰۰۳	۰/۱۵۲	E080-M160-10	۰/۰۰۸	۰/۱۲۹	E080-M160-10	
									۰/۰۰۴	۰/۱۴۹	E090-M150-5	۰/۰۰۳	۰/۱۵۴	E090-M150-5	
									۰/۰۰۱	۰/۱۷۲	E110-M160-23	۰/۰۰۳	۰/۱۵۵	E110-M160-23	
۰/۰۱۶	۰/۱۲۵	E070-M150-6	۰/۰۱۶	۰/۱۲۴	E070-M150-6	۰/۰۰۵	۰/۱۳۵	E070-M160-1	۰/۰۰۵	۰/۱۴۴	E080-M140-23	۰/۰۰۴	۰/۱۵۱	E080-M140-23	
۰/۰۱۲	۰/۱۳۴	E080-M140-23	۰/۰۱۵	۰/۱۲۶	E080-M140-23				۰/۰۰۲	۰/۱۶۸	E110-M160-23	۰/۰۰۸	۰/۱۳۳	E100-M150-22	

ادامه جدول ۴

۰/۰۱۹	۰/۰۸۲	E080-M150-5	۰/۰۲۱	۰/۰۷۸	E080-M150-5	۰/۰۰۲	۰/۰۷۲	E110-M160-23	طول بلندترین ساقه
۰/۰۳۸	۰/۰۶۴	E080-M150-13	۰/۰۴۳	۰/۰۵۹	E080-M150-23	۰/۰۰۹	۰/۰۲۸	E120-M140-1	
۰/۰۲۱	۰/۰۱۶	E100-M150-22	۰/۰۳۸	۰/۰۹۶	E100-M150-22				
۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	E110-M160-23	۰/۰۱۶۹	۰/۰۲۲	E110-M160-23				
۰/۰۱۶	۰/۰۲۵	E120-M140-1	۰/۰۱۴	۰/۰۲۷	E120-M140-1				

بررسی آنها، ۵۱ نشانگر پیوسته به QTL های کنترل کننده حداقل یکی از صفات بررسی شده شناسایی شدند. آنها در نهایت بیان کردند این نشانگرهای معنادار پس از تأیید و اعتبارسنجی در برنامه های اصلاحی بسیار مفید خواهند بود. نظیر این پژوهش های بسیاری انجام گرفته است؛ برای نمونه در جو وحشی به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته به QTL های کنترل کننده مقاومت لکه برگی قهوه ای در مرحله گیاهچه ای (Roy *et al.*, 2010)، در تربیت کاله برای ردیابی نشانگرهای پیوسته به QTL های کنترل کننده مقاوم به آلومینیوم (Niedziela *et al.*, 2012)، در اینبرد لاین های ذرت برای شناسایی نواحی مهم ژنومی کنترل کننده ۲۶ صفت زراعی (Zhang *et al.*, 2012) و در سویا برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با محتوای پروتئین سویا (Jun *et al.*, 2008). این پژوهش با استفاده از مجموعه متنوعی از ژنوتیپ های توتون و ۲۱ ترکیب آغازگری AFLP به شناسایی نشانگرهایی منجر شد که پیوسته به مکان های ژنی کنترل کننده صفات مهم توتون در تنش اسمزی بودند. این نشانگرها در صورت تأیید ممکن است در برنامه های اصلاحی و بهبود صفات در تنش اسمزی بسیار مفید و کارا باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان از آقای دکتر مسعود اصفهانی که زحمت بازخوانی مقاله را متقبل شدند کمال سپاس و قدردانی را دارند.

در مجموع نشانگرهای شناسایی شده بسیاری از تغییرات فنوتیپی صفات ارزیابی شده را توجیه کردند. در صورت اجرای آزمایش های تکمیلی از جمله آزمایش در چند محیط و برآورد تغییرات ناشی از آثار متقابل ژنوتیپ در محیط و همچنین تأیید صحت نشانگرهای شناسایی شده، از نشانگرهای تأیید شده می توان در برنامه های اصلاحی از جمله انتخاب به کمک نشانگر بهره برد. تاکنون پژوهش هایی درباره مکان یابی صفات کمی با استفاده از تجزیه پیوستگی در توتون اجرا شده است. بررسی های Julio *et al.* (2006a) و Julio (2006b) *et al.* منجر به شناسایی QTL های کنترل کننده صفات زراعی، کیفیت برگ، ترکیب های شیمیایی و خصوصیات دود و همچنین QTL های مرتبط با مقاومت به چند بیماری شد. آنها در پژوهش خود از نشانگرهای AFLP استفاده کردند که پس از شناسایی نشانگرهای معنادار مرتبط با QTL های مهم برخی از این نشانگرها را به SCAR تغییر دادند و سپس در جمعیت لاین های اینبرد نو ترکیب و هاپلوئید مضاعف تأیید کردند. Roy *et al.* (2006) با بررسی ۱۴ صفت زراعی بر روی ۵۵ ژنوتیپ الیت گندم نان، تجزیه ارتباطی را با استفاده از ۵۱۹ نوار چندشکل مشتق از ۲۰ نشانگر SSR، دو نشانگر SAMPLE و هشت نشانگر AFLP انجام دادند. آنها از هر دو مدل آماری GLM و MLM استفاده کردند. نتایج تجزیه ارتباط در پژوهش آنها نشان داد به ترتیب ۱۳۱، ۴۳ و ۱۶۶ نشانگر SSR، SAMPLE و AFLP حداقل با یکی از ۱۴ صفت ارتباط معناداری داشتند. از بین این تعداد، با در نظر گرفتن هر دو مدل GLM و MLM در

REFERENCES

1. Abdurakhmonov, I. Y. & Abdugarimov, A. (2008). Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources (online). *Int. J. Plant Genomics*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2423417/>; consulted: November, 2011.

2. Achleitner, A., Tinker, N., Zechner, E. & Buerstmayr, H. (2008). Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits. *Theor. Appl. Genet*, 117(7), 1041-1053.
3. Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 196, 80-83.
4. Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y. & Buckler, E. S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23, 2633-2635.
5. Chang, C. S., & Chou, D. S. (1975). Studies on the mechanism of drought resistance in tobacco plant. *Bulletin of Taiwan Tobacco Research Institute*, P. 9AI.
6. Evanno, G., Reganut, E. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*, 14, 2611-2620.
7. Fricano, A., Bakaher, N., Del Corvo, M., Piffanelli, P., Donini, P., Stella, A., Ivanov, N. V. & Pozzi, C. (2012). Molecular diversity, population structure, and linkage disequilibrium in a worldwide collection of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *BMC Genetics*, 13, 1-13.
8. Fufa, H. P., Baenizger, S., Beecher, B. S., Dweikat, I., Graybosch, R. A. & Eskridge, K. M. (2005). Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. *Euphytica*, 145, 133-146.
9. Guo, Y. P., Saukel, J., Mittermayr, R. & Ehrendorfer, F. (2005). AFLP analysis demonstrates genetic divergence hybridization, and multiple polyploidizations in the evolution of Achilla (Asteraceae-Anthemideae). *New Phytol*, 166, 273-290.
10. Hamza, S., Ben Hmida, W., Rebai, A. & Harrabi, M. (2004). SSRbased genetic diversity assesment among Tunisian Winter Barley and relation sheep with morphological traits. *Euphytica*, 135, 107-118.
11. Hartley, M. D., Smith, W. D., Spears, J. F., Fisher, L. R. & Schultheis, J. R. (2001). Response of flue-cured cultivars NC71 and NC72 to seed priming: II. Influence on transplant production under variable float system environments. *Tobacco Science*, 45, 11-14.
12. Hasani, S. Pirdashti, H.A., Mesbah R., Babaeian Jeloudar N.A. (2008). Evaluation of drought tolerance indices in yield of six cultivars of virginia tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Seed and Plant*, 24(1), 129-143.
13. Julio, E. Denoyes-Rothan, B., Verrier, J. L. & Dorlhac de Borne. F. (2006a). Detection of QTLs linked to leaf and smoke properties in *Nicotiana tabacum* based on a study of 114 recombinant inbred lines. *Molecular Breeding*, 18(1), 69-91.
14. Julio, E., Verrier, J. L. & Dorlhac de Borne, F. (2006b). Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. *Theor. Appl. Genet*, 112, 335-346.
15. Jun, T. H. Van, K., Kim, M. Y., Lee, S. H. & Walker, D. R. (2008). Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica*, 62, 179-191.
16. Mohammadi, S. A. (2008). Innovative Approaches in Analysis of Plant Quantitative Traits Genetic Structure. In: proceeding of 10th Iranian Agronomy and Plant Breeding Congress. Seed and Plant Improvement Institute. Pp. 183-201.
17. Niedziela A., Bednarek, P., Cichy, T. H., Budzianowski, G., Kilian, A. & Anioł, A. (2012). Aluminum tolerance association mapping in triticale. *BMC Genomics*, 13 (67), 1-16.
18. Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
19. Roy, J. K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H. S. & Gupta, P. K. (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science*, 90, 683-689.
20. Roy, J. K. Smith, K. P., Muehlbauer, G. J., Chao, S., Close, T. J., Steffenson, B. J. (2010). Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. *Molecular Breeding*, 26, 243-256.
21. Saghai Maroof, M. A., Biyashev, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q. & Allard, R. W. (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.
22. Sisson, V. (2002). *The Nicotiana Catalogue, Compilation of International Tobacco Germplasm Holdings*, Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco (CORESTA).
23. 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. *Theor. Appl. Genet*, 122, 1281-1291.

24. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23, 4407-4414.
25. Yavari, N., Sadeghian, S. Y. & Mesbah, M. (2001). Utilisation of mannitol as drought stress agent in sugar beet seed germination and early growth stage in vitro. *Journal of Sugar Beet*, 33, 37-43. (In Farsi with English abstract).
26. Zhang, H. Y., Liu, X. Z., He, C. S. & Yang, Y. M. (2008). Genetic diversity among flue-cured tobacco cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(6), 1097-1101.
27. Zhang, P., Wu, C., Ren, F., Li, Y. & Zhang, C. (2012). Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. *Australian Journal of Crop Science*, 6(6), 1131-1138.