

شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش ریز ماهواره در *Aegilops crassa* بومی ایران

مجتبی رنجبر*، محمدرضا نقوی**، عباس‌علی زالی***، محمدجعفرآقایی**** و محسن مردی*****

تاریخ وصول مقاله: ۸۷/۴/۲۹ و تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۲/۲۲

چکیده

در این تحقیق، ارتباط بین ۱۳ صفت کمی و ۱۴۰ نشانگر ملکولی SSR در ۷۰ نمونه *Aegilops crassa* بومی ایران مطالعه شد. سطح اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۱۶ تا ۰/۱۶ (مکان ژنی Xgwm190) تا ۰/۴۴ (مکان ژنی Xgwm161) برای نشانگرهای SSR متفاوت بود. با استفاده از روش رگرسیون چندگانه (گام به گام) ارتباط هر یک از ۱۳ صفت کمی و ۱۴۰ نشانگر بررسی شد. ارتباط تعداد ۸۷ نشانگر SSR با حداقل یکی از ۱۳ صفت کمی معنی‌دار بود که می‌توان از آنها در انتخاب مقدماتی در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: تجزیه ارتباطی، نشانگرهای مولکولی، *Aegilops crassa* SSR

* - دانشجوی دکترای زراعت و اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه

تهران، تهران - ایران (E-mail: ranjbarm57@yahoo.com)

** - دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران - ایران

*** - استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران - ایران

**** - استادیار، بخش ژنتیک، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، تهران - ایران

***** - استادیار، بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، تهران - ایران

مقدمه

نقشه لینکاژی تنها در اطراف ژن موردنظر کافی است و از طریق روش تجزیه تفرق توده نیز قابل تحقق است (۱۱). چون تهیه جمعیت‌های در حال تفرق وقت‌گیر و پرهزینه است، اگر بتوان قبل از تهیه این جمعیت‌ها نشانگرهای دارای ارتباط مناسب با صفات موردنظر را از طریق تجزیه رگرسیونی شناسایی کرد می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی به عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش (Informative markers) استفاده کرد.

در گندم تعداد زیادی ژن برای صفات متفاوت (از جمله صفات کیفی، مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده و غیره) ردیابی شده‌اند. نشانگرهای ریزماهواره به علت دارا بودن خاصیت چندآلی، وراثت هم بارز، فراوانی نسبی و پوشش وسیع ژنومی و همچنین سهولت آشکارسازی و تشخیص آنها کاربرد فراوانی دارند (۱۲). بررسی ارتباط بین نشانگرها و صفات زراعی نه تنها نقشه‌یابی ژن‌ها را با درجه اطمینان زیاد بلکه شناسایی ژن‌هایی را که در نقشه‌یابی مبتنی بر لینکاژ قابل ردیابی نیستند، مقدور می‌سازد (۱۳). هدف از این تحقیق، شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش مرتبط با صفات کمی موردنظر در ۷۰ نمونه *A. crassa* بومی ایران با استفاده از سیستم نشانگری SSR می‌باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی

در این تحقیق، از ۷۰ نمونه *A. crassa* از ۱۵ استان (همدان، ایلام، زنجان، آذربایجان

در جنس آزیلوپس ۲۱ گونه وجود دارد که ۱۷ گونه آن در ایران موجود هستند. به دلیل امکان استفاده از آنها در بهبود مقاومت گندم به تنش‌های زنده و غیرزنده دارای اهمیت خاص می‌باشند (۱۶). گونه *A. crassa* که به دو صورت تتراپلوئید ($2n = 4x = 28, D_1D_1XX$) و هگزاپلوئید ($2n = 6X = 42, D_1D_1XXD_2D_2$) گزارش شده است، یک علف هرز است که دارای تنوع مورفولوژیکی زیاد و دامنه پراکنش وسیع می‌باشد (۵ و ۱۵). به طوری که در دامنه‌های شنی، استپ‌ها و مراتع تخریب شده و حاشیه جاده‌ها یافت می‌شود (۶ و ۱۵). پراکنش *A. crassa* در کشورهای ترکیه، لبنان، فلسطین، سوریه، عراق، ایران، افغانستان و جنوب ترکمنستان گزارش شده است (۴). این گونه دارای ژن‌های مفید (نظیر ژن‌های نر عقیمی سیتوپلاسمی، مقاومت به شوری و ژن‌های مؤثر در عملکرد و بهبود کیفیت دانه) می‌باشد که می‌توان در برنامه‌های اصلاحی و یا سایر روشها به گندم‌های زراعی استفاده نمود (۲، ۷ و ۱۰). شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی یکی از مهمترین روشها برای تسریع در انتقال صفات موردنظر به ژنوتیپ‌های دیگر و ردیابی آنهاست. اصولی‌ترین روش شناسایی این نشانگرها تهیه جمعیت‌های در حال تفرق و پس از آن ردیابی صفات کیفی یا کمی در این جمعیت‌ها می‌باشد، تا براساس آن نشانگرهای پیوسته شناسایی شوند. در حالتی که صفت کمی باشد تهیه نقشه‌های پیوستگی یک روش مهم در مکان‌یابی ژن‌هاست. ولی برای صفات کیفی تهیه

غربی، قزوین، فارس، چهارمحال و بختیاری، کرمانشاه، خراسان رضوی، لرستان، آذربایجان شرقی، خراسان شمالی، مرکزی، کردستان و خوزستان) توسط بانک ژن ملی گیاهی ایران، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر جمع‌آوری شده بودند، استفاده شد.

ارزیابی مورفولوژیک

برای اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک بذور این مواد گیاهی در مزرعه بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار روی خطوط به طول یک متر و فاصله پنج سانتی‌متر بین بذور کشت شدند. صفات تاریخ گلدهی (۵۰ درصد گلدهی) و تاریخ رسیدن (۵۰ درصد رسیدن) براساس یک یادداشت از هر ردیف و صفات تعداد برگ در زیر خوشه، ارتفاع گیاه، تعداد گره در ساقه، قطر ساقه، طول سنبله، تعداد سنبله در سنبله، طول گره‌های محور سنبله، عرض گره‌های محور سنبله، عرض گلوم سنبله، طول برگ پرچم و عرض دانه براساس سه نمونه در هر تکرار بررسی شد و میانگین این سه نمونه در تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شدند.

ارزیابی مولکولی

در این تحقیق، از ۲۰ جفت نشانگر ریزماهوره استفاده شد (جدول ۱) (۱۲). استخراج دی.ان.ا. از برگ ۷۰ نمونه *Ae. crassa*

انجام گرفت (۱۴). واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر دی.ان.ا. ژنومی (غلظت ۶۰-۵۰ نانوگرم)، ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، یک میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی-مولار)، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب (غلظت ۱۰ پیکومول)، نیم واحد آنزیم Taq پلی‌مراز، ۱/۲ میکرولیتر از کلرید منیزیم ۱۵ میلی‌مولار و ۷/۲ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت پنج دقیقه، ۳۷ چرخه حرارتی (۱۲ چرخه اول سیکل حرارتی به صورت Touch Down) برنامه‌ریزی شده بود و دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و در هر چرخه دور اول با کاهش ۰/۸ درجه سانتی‌گراد، به دمای اتصال واقعی رسید. در ۲۵ چرخه بعد دمای اتصال ثابت (برحسب دمای اتصال آغازگر) و با زمان ۳۰ ثانیه انجام شد. در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشته‌سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۴ درجه در نظر گرفته شد. همچنین زمان و دمای بسط رشته به ترتیب یک دقیقه و ۷۲ درجه بود. محصولات تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید واسرشته ساز تفکیک و رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره انجام گرفت (۱).

جدول ۱ - مشخصات آغازگرهای مورد استفاده به همراه میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)

شماره ریزماهواره No. Microsatellite	توالی Sequence	موتیف Motif	دمای اتصال Annealing Temperature	تعداد آلل No. of alleles	PIC
1-Xgwm33-1D	RF:CAC TGC ACA CCT AAC TAC G C LF:GGA GTC ACA CTT GTT TGT GCA	(GA)19	60	10	0.20
2-Xgwm44-7D	RF:ACT GGC ATC CAC TGA GCT G LF:GTT GAG CTT TTC AGT TCG GC	(GA)28	60	5	0.26
3-Xgwm55-6D	RF:TCA TGG ATG CAT CAC ATC CT LF:GCA TCT GGT ACA CTA GCT GCC	TC)3(T)3 (CT)17	60	7	0.35
4-Xgwm102-2D	RF:TGT TGG TGG CTT GAC TAT TG LF:TCT CCC ATC CAA CGC CTC	(CT)15	60	8	0.26
5-Xgwm106-1D	RF:AAT AAG GAC ACA ATT GGG ATG G LF:CTG TTC TTG CGT GGC ATT AA	(GA)24	60	10	0.25
6-Xgwm161-3D	RF:TGT GAA TTA CTT GGA CGT GG LF:GAT CGA GTG ATG GCA GAT GG	(CT)15	60	2	0.44
7-Xgwm190-5D	RF:GTG CCA CGT GGT ACC TTT G LF:GTG CTT GCT GAG CTA TGA GTC	(CT)22	60	4	0.16
8-Xgwm194-4D	RF:CGA CGC AGA ACT TAA ACA AG LF:GAT CTG CTC TAC TCT CCT CC	(CT)32im p	50	7	0.29
9-Xgwm271-5D	RF:AGC TGC TAG CTT TTG GGA CA LF:CAA GAT CGT GGA GCC AGC	(CT)4imp (GA)10	60	5	0.26
10-Xgwm292-5D	RF:CCA CCG AGC CGA TAA TGT AC LF:TCA CCG TGG TCA CCG AC	(CT)38	60	9	0.24
11-Xgwm295-7D	RF:GAC GGC TGC GAC GTA GAG LF:GTG AAG CAG ACC CAC AAC AC	(GA)25	60	8	0.36
12-Xgwm325-6D	RF:TTT TTA CGC GTC AAC GAC G LF:TTT CTT CTG TCG TTC TCT TCC C	(CT)16	60	7	0.31
13-Xgwm341-3D	RF:CCG ACA TCT CAT GGA TCC AC LF:TTC AGT GGT AGC GGT CGA G	(CT)26	55	8	0.28
14-Xgwm350-7D	RF:GCA TGG ATA GGA CGC CC LF:ACC TCA TCC ACA TGT TCT ACG	(GT)14	55	6	0.30
15-Xgwm383-3D	RF:GAC ATC AAT AAC CGT GGA TGG LF:ACG CCA GTT GAT CCG TAA AC	(GT)27	60	7	0.23
16-Xgwm458-1D	RF:TTC GCA ATG TTG ATT TGG C LF:AAT GGC AAT TGG AAG ACA TAG C	(CA)13	60	3	0.28
17-Xgwm469-6D	RF:CGA TAA CCA CTC ATC CAC ACC LF:CAA CTC AGT GCT CAC ACA ACG	(CT)19 (CA)10	60	8	0.30
18-Xgwm484-2D	RF:AGT TCC GGT CAT GGC TAG G LF:ACA TCG CTC TTC ACA AAC CC	(CT)29	55	10	0.21
19-Xgwm539-2D	RF:GAG GCT TGT GCC CTC TGT AG LF:CTG CTC TAA GAT TCA TGC AAC C	(GA)27	60	8	0.31
20-Xgwm642-1D	RF:CAT GAA AGG CAA GTT CGT CA LF:ACG GCG AGA AGG TGC TC	(GT)14	60	8	0.40

تجزیه‌های آماری

همبستگی بین صفات با استفاده از میانگین داده‌های مورفولوژیک، محاسبه شد. برای داده‌های مولکولی در صورت وجود باند نمره یک و عدم باند نمره صفر داده شد. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) که میزان چندشکلی یک نشانگر را نشان می‌دهد و می‌تواند از صفر تا یک متغیر باشد با استفاده از فرمول (۱) برای هر جفت پرایمر محاسبه شد:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \quad (1)$$

برای تعیین ارتباط بین داده‌های مورفولوژیک با داده‌های مولکولی، تجزیه رگرسیون گام به گام به طور جداگانه برای هر صفت با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

همبستگی بین تعدادی از صفات در جدول ۲ ارائه شده است. همبستگی تاریخ گلدهی با تاریخ رسیدن، تعداد برگ، تعداد گره در ساقه مثبت و معنی‌دار و با صفات عرض دانه و طول برگ پرچم منفی و معنی‌دار بود. همچنین همبستگی صفت تعداد سنبلچه در سنبله با ارتفاع گیاه، طول برگ پرچم، طول سنبله و تعداد برگ، تعداد گره ساقه و قطر ساقه مثبت و معنی‌دار بود. همبستگی تاریخ رسیدن با صفات ارتفاع بوته، قطر ساقه، طول سنبله، طول گره‌های محور سنبله، عرض گلوم سنبلچه، عرض دانه و طول برگ پرچم منفی و معنی‌دار بود. با

شناسایی این ارتباطات انتخاب غیرمستقیم یک صفت از طریق صفت دیگر امکان‌پذیر می‌باشد. همچنین ۲۰ جفت نشانگر ریزماهواره تعداد ۱۴۰ باند چندشکل تولید نمودند. تعداد آلل محاسبه شده از دو تا ۱۰ عدد متفاوت بود و میانگین تعداد آلل‌ها برابر هفت بود (جدول ۱). میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریزماهواره مناسب بودن هر مکان ژن را برای برآورد تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (۱۲).

همچنین با استفاده از فراوانی آللی، آماره PIC (میزان اطلاعات چندشکلی) برای هر نشانگر، به طور جداگانه محاسبه شد که نتایج در جدول (۱) ارائه شده است. نشانگر GWM161 بیشترین مقدار PIC (۰/۴۴) و نشانگر GWM 190 کمترین PIC (۰/۱۶) را نشان داد. پس می‌توان نتیجه‌گیری نمود که با نشانگر GWM 161 با بیشترین PIC بهتر از سایر نشانگرهای مورد استفاده فاصله ژنتیکی نمونه‌ها مشخص می‌شود. میانگین PIC حاصل برابر ۰/۲۵ بود که نسبت به مقدار PIC حاصل آمده در تحقیقات قبلی در گندم دوروم (۰/۷۲) و *Ae. Tauschii* (۰/۸۲) کمتر می‌باشد (۹ و ۱۱). دلیل این تفاوت را می‌توان ناشی از متفاوت بودن ژنوتیپ‌های مورد استفاده و همچنین تفاوت در جفت آغازگرهای مورد استفاده دانست. برای تعیین ارتباط بین صفات کمی مورد مطالعه با داده‌ها مولکولی و شناسایی نشانگرهای مرتبط با این صفات از روش رگرسیون گام به گام استفاده شد. در مجموع رابطه ۸۷ نشانگر SSR با حداقل یکی از ۱۳

مستقل (X) در نظر گرفته شدند و رگرسیون گام به گام محاسبه گردید (۱۳). در این روش در ابتدا اولین X (اولین نشانگر) دارای بیشترین رابطه در معادله منظور می‌شود و به همین ترتیب سایر متغیرها (X ها) در معادله منظور می‌شوند.

صفت کمی معنی‌دار بود که از آنها می‌توان در اصلاح وابسته به نشانگر استفاده نمود. برای هر صفت به‌طور جداگانه رگرسیون گام به گام انجام شد و هر صفت کمی به عنوان متغیر وابسته و کلیه نشانگرهای مولکولی به عنوان ۱۴۰ متغیر

جدول ۲ - همبستگی بین صفات کمی در ۷۰ نمونه *Aegilops crassa* بومی ایران

تاریخ گلدهی (%50) Flowering date (1)	تاریخ رسیدن (%50) Maturity date (2)	تعداد برگ زیرخوشه No. of leaf under ears (3)	ارتفاع بوته Plant height (4)	تعداد گره در ساقه No. of node per stem (5)	قطر ساقه Stem diameter (6)	طول سنبله Spike length (7)	تعداد سنبلیچه در سنبله No. of spikelets per spike (8)	طول گره محور سنبله Rachis node length (9)	عرض گره‌ها محور سنبله Rachis node width (10)	عرض گلوم سنبلیچه Spikelets width (11)	عرض دانه Seed width (12)	طول برگ پرچم Flag leaf length (13)	
1	1	0.66**	0.42**	-0.12 ^{ns}	0.36**	-0.21 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.19 ^{ns}	-0.19 ^{ns}	-0.13 ^{ns}	-0.22 ^{ns}	-0.26*	-0.29*
2	1	0.21 ^{ns}	-0.31**	0.21 ^{ns}	-0.38**	-0.28**	-0.03 ^{ns}	-0.35**	-0.22 ^{ns}	-0.26*	-0.34**	-0.53**	
3	1	0.45**	0.91**	-0.08 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.37**	-0.15 ^{ns}	0.03 ^{ns}	-0.07 ^{ns}	-0.07 ^{ns}	-0.07 ^{ns}	0.07 ^{ns}	
4	1	0.36**	0.11 ^{ns}	0.48**	0.45**	0.12 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.21 ^{ns}	0.55**	0.05 ^{ns}	0.37**	
5	1	-0.15 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	0.30*	-0.23 ^{ns}	-0.02 ^{ns}	-0.03 ^{ns}	-0.11 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.37**	0.18 ^{ns}	0.37**	
6	1	0.45**	0.26*	0.50**	0.54**	0.27*	0.18 ^{ns}	0.37**	0.18 ^{ns}	0.37**	0.18 ^{ns}	0.37**	
7	1	0.75**	0.44**	0.42**	0.06 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.44**	0.22 ^{ns}	0.44**	0.22 ^{ns}	0.44**	0.44**	
8	1	0.07 ^{ns}	0.20 ^{ns}	-0.14 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.31**	0.07 ^{ns}	0.20 ^{ns}	-0.14 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.31**	0.31**	
9	1	0.49**	0.42**	0.25*	0.23 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.49**	0.42**	0.25*	0.23 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.23 ^{ns}	
10	1	0.42**	0.19 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.42**	0.19 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.19 ^{ns}	
11	1	0.28*	0.04 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.28*	0.04 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.04 ^{ns}	
12	1	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	
13	1	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.18 ^{ns}	

نتایج رگرسیون در جداول (۳) و (۴) ارائه شده است. بیشترین تعداد نشانگر برای صفت ارتفاع بوته (۲۸ نشانگر) و کمترین مربوط به صفت طول گره‌های محور سنبله (سه نشانگر) شناسایی شد. همچنین بیشترین R^2 کل مربوط به ارتفاع بوته (۹۶/۹ درصد) برآورد شد. در شکل (۱) یک نمونه از نشانگر آگاهی‌بخش دارای رابطه رگرسیونی با صفات ارتفاع بوته و طول برگ پرچم ارایه شده است.

جدول ۳ - تعداد نشانگرهای آگاهی‌بخش پیوسته با صفت کمی و درصد تغییرات توجیه شده نشانگرها

صفت Trait	تعداد نشانگر (T)	R^2 Max (%)	R^2 T (%)
طول گره‌های محور سنبله Rachis node length	3	11.0	28.0
عرض گره‌های محور سنبله Rachis node width	6	15.0	42.0
تعداد برگ زیر خوشه No. of leaves under ears	12	10.0	74.6
تعداد سنبلچه در سنبله No. of spikelets per spike	15	29.5	88.8
عرض گلوم سنبلچه Spikelets culm width	6	16.6	50.4
تعداد گره در ساقه No. of node per stem	10	12.3	66.8
طول برگ پرچم Length flag leaf	5	26.2	55.2
تاریخ گلدهی Flowering date	19	22.4	89.8
تاریخ رسیدن Maturity date	16	17.0	75.4
ارتفاع بوته Plant height	28	19.6	96.9
طول سنبله Spike length	14	37.7	87.1
عرض دانه Seed width	18	13.2	86.3
قطر ساقه Stem diameter	12	12.7	70.8

T: تعداد کل نشانگرهای آگاهی‌بخش معنی‌دار برای صفات کمی

R^2 max: بیشترین R^2 مربوط به یک نشانگر برای صفات کمی (%)

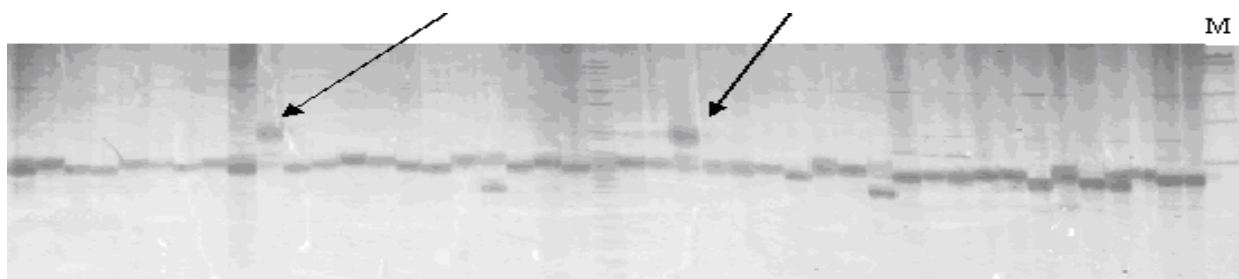
R^2 T: مجموع کل R^2 نشانگرها آگاهی‌بخش برای صفات کمی (%)

جدول ۴ - رگرسیون گام به گام ۸۷ باند چندشکل SSR و ۱۳ صفت کمی

SSR Complete%**	df	SSR Max%*	درجه آزادی Df	منبع واریانس Source of variance	صفت Trait
2.550	19	12.096	1	رگرسیون (X)	تاریخ گلدهی
0.110	50	0.616	68	خطا (Y)	Flowering date
3.970	14	52.120	1	رگرسیون (X)	تاریخ رسیدن
0.330	55	0.900	68	خطا (Y)	Maturity date
1.146	12	1.850	1	رگرسیون (X)	تعداد برگ زیر خوشه
0.008	57	0.244	68	خطا (Y)	No. of leaves under ears
228.870	26	1202.138	1	رگرسیون (X)	ارتفاع بوته
4.403	43	72.610	68	خطا (Y)	Plant height
0.885	10	1.620	1	رگرسیون (X)	تعداد گره در ساقه
0.007	59	0.171	68	خطا (Y)	No. of nodes per stem
0.154	12	0.330	1	رگرسیون (X)	قطر ساقه
0.001	57	0.003	68	خطا (Y)	Stem diameter
9.850	14	59.640	1	رگرسیون (X)	طول سنبله
0.370	55	1.450	68	خطا (Y)	Spike length
5.063	15	25.210	1	رگرسیون (X)	تعداد سنبلچه در سنبله
0.170	54	0.886	68	خطا (Y)	No. of spikelets per spike
0.0075	3	0.009	1	رگرسیون (X)	طول گره‌ها محور سنبله
0.009	66	0.001	68	خطا (Y)	Rachis node length
0.333	6	0.712	1	رگرسیون (X)	عرض گره‌ها محور سنبله
0.004	63	0.006	68	خطا (Y)	Rachis node width
0.604	6	1.195	1	رگرسیون (X)	عرض گلوم سنبلچه
0.006	63	0.009	68	خطا (Y)	Spikelets culm width
0.101	18	0.278	1	رگرسیون (X)	عرض دانه
0.006	51	0.003	68	خطا (Y)	Seed width
8.530	5	20.290	1	رگرسیون (X)	طول برگ پرچم
0.542	64	0.839	68	خطا (Y)	Length Flag leaf

* - SSR Max درصدی از تغییرات که توسط متغیر مستقل اول توجیه می‌شود.

** - SSR Complete درصدی از تغییرات که توسط کل متغیرهای مستقل منظور شده در رگرسیون توجیه می‌شود.



شکل ۱ - نشانگر آگاهی‌بخش (مشخص شده با فلش) برای صفات ارتفاع بوته و طول برگ پرچم حاصل از جفت پرایمر Xgwm383-3D بر روی ژل اکرلامید ۶٪، ژل نشان داده شده شامل ۴۸ نمونه آزیلوپس کراسا بومی ایران و (M) سایز مارکر

وجود همبستگی معنی‌دار بین تعدادی از صفات مورفولوژیک می‌توان نتیجه‌گیری نمود که همبستگی برخی از این صفات با یکدیگر بسیار زیاد است. نتایج این تحقیق، در تأمین اطلاعات اولیه برای انتخاب غیرمستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید می‌باشد. البته برای اطمینان از وجود پیوستگی بین نشانگرها و صفات مختلف زراعی نیاز به تهیه جمعیت‌های در حال تفرق مانند F_2 و جمعیت‌های دیگر مورد استفاده در نقشه مثل (DH(RIL) می‌باشد، تا براساس این جمعیت‌ها نقشه‌های پیوستگی تهیه و سپس محل مکان‌های کنترل‌کننده این صفات بر روی کروموزوم‌ها مشخص شود (۱۱). در تهیه نقشه‌های پیوستگی اطلاعات نشانگری حاصل از تحقیق حاضر در جهت انتخاب آغازگرهای مناسب مفید می‌باشد. اگرچه بعضی از این نشانگرها برای انجام کارهای اصلاحی در گونه‌های دیگر استفاده شده ولی در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق برای نقشه‌یابی، در اختیار نبودن زمان کافی و نبود لینکاژ مناسب بین صفات زراعی و نشانگرهای ملکولی از مهمترین محدودیت‌ها در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی می‌باشد (۳). همچنین با استفاده از نشانگرهای آگاهی‌بخش مرتبط با صفات زراعی از جمله اجزای عملکرد مخصوصاً در مورد نشانگرهایی که مکان کروموزومی آنها مشخص است می‌توان با تولید لاین‌های با جایگزینی کروموزومی، صفات زراعی موردنظر را در یک لاین فاقد آن صفت از طریق تلاقی انتقال داد. باتوجه به وجود ژن‌های مفید در *Ae. crassa* شناسایی نشانگرهای مرتبط با این صفات، انتقال آنها را از طرق روشهای اصلاحی معمولی و روشهای نوین نیز سهل‌تر می‌باشد (۷).

نشانگر Xgwm194-4D در اندازه ۹۰ جفت باز نشان داد که بر ۲۲/۴ و ۱۷ درصد از تغییرات به‌ترتیب صفات تاریخ گلدهی و تاریخ رسیدن مؤثر می‌باشد. نشانگر Xgwm271-5D در اندازه ۱۴۰ جفت باز دارای بیشترین R^2 با مقادیر ۳۷/۷، ۲۹/۵ و ۱۱ درصد به‌ترتیب تغییرات صفات طول سنبله، تعداد سنبله در سنبله و طول گره‌های محور سنبله را توجیه کرد. همچنین نشانگر Xgwm383-3D در طول ۶۰ جفت باز دارای بیشترین R^2 (۱۹/۶ و ۲۶/۲ درصد) برای صفت ارتفاع بوته و طول برگ پرچم بود. نشانگر Xgwm44-7D بیشترین R^2 (۱۲/۳ درصد) برای صفت تعداد گره در ساقه در اندازه ۱۳۰ جفت باز را نشان داد. نشانگر Xgwm44-7D دارای بیشترین R^2 (۱۲/۷ درصد) برای صفت قطر ساقه در طول ۱۲۰ جفت باز، نشانگر Xgwm350-7D دارای بیشترین R^2 (۱۰ درصد) برای صفت تعداد برگ در ۷۵ جفت باز، نشانگر Xgwm295-7D دارای بیشترین R^2 (۱۶/۶ درصد) برای صفت عرض گلوم سنبله در طول ۱۹۰ جفت باز، نشانگر Xgwm102-2D دارای بیشترین R^2 (۱۵ درصد) برای صفت عرض گره‌های محور سنبله در طول ۲۳۰ جفت باز و نشانگر Xgwm325-6D دارای بیشترین R^2 (۱۳/۲ درصد) برای صفت عرض دانه در اندازه ۱۱۰ جفت باز بودند. در سایر تحقیقات، با بررسی تجزیه ارتباط بین ۱۴ صفت مورفولوژیک با نشانگرهای AFLP، SSR و SAMPL از طریق روش رگرسیون گام به گام در گندم نان ۵۱ نشانگر شناسایی شده که با حداقل یکی از صفات ارتباط داشته و برای برنامه اصلاح به کمک نشانگر همراه استفاده می‌شود (۱۳).

نتایج نشان داد که تعدادی از نشانگرها با بیش از یک صفت در ارتباط می‌باشند. باتوجه به

References

- 1 - Bassam B, Caetano-Anolles JG and Gressho PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 19: 680-683.
- 2 - Fribe B, Badaeva ED, Zoshchuk SA and Gill BS (1998) Molecular cytogenetic analysis of tetraploid and hexaploid *Aegilops crassa*. *Chrom. Res.* 6: 629-637.
- 3 - Gupta PK, Rustgi S and Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Mol. Biol.* 57: 461-485.
- 4 - Kazutoshi O, Kaoru E, Bayarsukh N and Hisashi Y (1998) Genetic diversity of central Asian and north Caucasian *Aegilops* species as revealed by RAPD markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 4: 389-394.
- 5 - Kihara H, Yamashita KY, Manaka and Sakamoto S (1958) Geographical distribution of 4x and 6x forms of *Aegilops crassa*. *Wheat Info. Serv.* 5: 11-12.
- 6 - Kimber G and Feldman M (1987) Wild wheat, an introduction. College of Agriculture University of Missouri, Columbia. 142 pp.
- 7 - Liu CG, Wu YW, Hou H, Zhang C and Zhang Y (2002) Value and utilization of alloplasmic common wheats with *Aegilops crassa* cytoplasm. *Plant Breeding* 121: 407-410.
- 8 - Maccaferri M, Sanguineti MC, Noli E and Tuberosa R (2005) Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. *Mol. Breed.* 15: 271-289.
- 9 - Medini M, Hamza S, Rebai A, and Baum M (2005) Analysis of genetic diversity in Tunisian durum wheat cultivars and related wild species by SSR and AFLP markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 52: 21-31.
- 10 - Murai K and Tsunewaki K (1993) Photoperiod-sensitive cytoplasmic male sterility in wheat with *Ae. crassa* cytoplasm. *Euphytica* 67: 41-48.
- 11 - Naghavi MR, Mardi M, Pirseyedi SM, Kazemi M, Potki P and Ghaffari MR (2007) Comparison of genetic variation among accessions of *Aegilops tauschii* using AFLP and SSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 237-240.
- 12 - Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH and Gamal MW (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
- 13 - Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan HS and Gupta PK (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science* 90: 5-10.
- 14 - Saghai-Maroo MA, Soliman KM, Jorgensen RA and Allard RW (1984) DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 8014-8018.
- 15 - Van Slageren MW (1994) Wild wheats a monograph of *Aegilops L.* and *Amblyopyrum* (Jaub. and Spach) Eig (Poaceae). Wageningen Agricultural University. Wageningen, the Netherland. Pp. 94-107.
- 16 - Zaharieva M, Dimov A, Stankova P, David J and Monneveux P (2003) Morphological diversity and potential interest for wheat improvement of three *Aegilops L.* species from Bulgaria. *Genet. Resour. Crop Evol.* 50: 507-517.

**Identification of informative markers of SSR in *Aegilops crassa*
accessions of Iran**

M. Ranjbar*, M. R. Naghavi*, A. Zali*, M. J. Aghaei** and M. Mardi***

Abstract

The association between 140 microsatellite bands of 20 primer pairs and 13 quantitative traits recorded on 70 *Aegilops crassa* from Iran was evaluated. Pearson's coefficients showed significant correlations between some morphological traits. Polymorphic information contents (PIC) of loci were in the range of 0.16 (Xgwm190) to 0.44 (Xgwm161). The result of multiple regression analysis showed significant relationship between 87 SSR markers and 13 morphological traits. Using the informative markers correlated with desirable traits, may facilitate preliminary selection of these traits for breeding purposes.

Keywords: *Aegilops crassa*, Informative analysis, Molecular markers, SSR

* - Ph. D. Student, Associate Professor and Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural College, University of Tehran, Tehran- Iran (E-mail: ranjbarm57@yahoo.com)

** - Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, National Plant Gene Bank, Tehran - Iran

*** - Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute, Department of Genomics, Tehran - Iran