مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره دهم، تابستان ۱۳۹۴ (۷۲-۵۷)

Crop Biotech.
Summer (2015) 10: 57-72.

اعتبارسنجی و تجزیه ارتباطی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با تحمل به تنش خشکی و شوری در برنج‌های هوازی و ایرانی تحت تنش اسمزی

طیبه رئیسی[۱] و عاطفه صبوری[۲*]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد اصلاح‌نباتات گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت

۲. استادیار اصلاح نباتات گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۳/۸- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/٦/۲۹)

Validation and association analysis of microsatellite markers related to drought and salinity tolerance in aerobic and Iranian rice under osmotic stress

Tayebeh Raiesi[1] and Atefeh Sabouri[2]*

1. M.Sc. student of Plant Breeding, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

(Received: May 29, 2015 - Accepted: Sep. 20, 2015)

چکیده

پژوهش حاضر در راستای اعتبارسنجی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با تحمل به تنش خشکی و شوری در برنج، در جمعیت طبیعی شامل برنج-های هوازی، ارقام خارجی و ایرانی انجام شد. مواد گیاهی در شرایط نرمال و همچنین دو سطح از تنش اسمزی (۸- و ۱٦- بار حاصل از مانیتول) با استفاده از آزمون‌های استاندارد جوانه‌زنی از لحاظ ۱٤ صفت ارزیابی شدند. ارزیابی ژنوتیپی با استفاده از ۲٦ جفت نشانگر ریزماهواره بر روی ۵۳ ژنوتیپ برنج انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه ساختار نشان داد که تعداد خوشه‌هایی که پارامتر ΔK را به حداکثر خود می‌رساند برابر ۳ می‌باشد. سپس تجزیه ارتباط با استفاده از ماتریس ساختار جمعیت و با مدل‌های آماری GLM و MLM انجام شد. دو مدل MLM در سطح ۵٪، به ترتیب ۷۵ و ۳۰ نشانگر برای صفات مورد مطالعه شناسایی کردند. نشانگرهای RM11943، RM104، RM190،RM28166، RM231، RM510، RM270 ، RM19367 و RM431 به عنوان نشانگرهای مرتبط با تحمل به تنش اسمزی با توجیه تغییرات مرتبط با چندین صفت جوانه‌زنی شناسایی شدند. همچنین نشانگر RM270 با توجیه ٤۰/٤٪ از تغییرات شاخص بنیه بذر و نشانگر RM276 با توجیه ۳۳/۹٪ از تغییرات درصد آب بافت گیاهچه و نشانگر RM523 با توجیه ٤۰/٦ و ۳۰/۷٪ از تغییرات ضریب سرعت جوانه‌زنی در دو مدل، بیشترین ضریب تبیین را در شرایط تنش نسبت به سایر نشانگرها به خود اختصاص دادند که می‌تواند دلیلی بر تأیید ارتباط آنها با صفات جوانه‌زنی در شرایط تنش اسمزی باشد. با توجه به نتایج کسب شده، در صورت تأیید نتایج در سایر زمینه‌های ژنتیکی می‌توان از این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی بهره‌برداری نمود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ساختار، تنش خشکی، مؤلفه‌های جوانه‌زنی، نشانگر SSR.

Abstract

The present study was conducted to validate microsatellite markers associated with drought tolerance in rice, in the natural population, including foreign varieties, aerobic rice and Iranian varieties. Plant material under normal and two levels of osmotic stress (-8 and -16 bar using of mannitol) were evaluated by standard germination test in terms of 14 traits. Genotyping was done using 26 pairs of microsatellite markers on 53 genotypes of rice. The results of the structure analysis showed the number of clusters that maximizes ΔK parameter is three. Then association analysis was conducted using the matrix structure of the population by GLM and MLM statistical models. Two MLM models identified, 75 and 30 markers for studied traits at 5% level, respectively. The markers RM11943, RM104, RM190, RM28166, RM231, RM510, RM270, RM19367 and RM431 were identified as markers associated with tolerance to osmotic stress with explain variation of several germination traits. Also the results indicated RM270 with 40.4% of the seed vigor, RM276 with explain variation of 33.9% of the percentage of water content of the seedling, and RM523 with explain variation of 40.6% and 30.7% of the speed of germination coefficient, had highest of coefficient of determination under stress relatively to other markers. That could be a reason for conformation of their relationship with germination traits under osmotic stress. Considering of the obtained results, after verification of results in the other genetic backgrounds we can use these markers in the breeding programs.

Keywords: Structural analysis, Drought stress, Components of germination, SSR marker.

* نویسنده مسئول: عاطفه صبوری

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

مقدمه

غلات مهم‌ترین گیاهان غذایی کره زمین و تأمین‌کننده ۷۰٪ از غذای مردم کره زمین می‌باشند. در این میان برنج (*Oryza sativa* L.) غله‌ایی است که بعد از گندم رتبه دوم را در بین غلات دارا بوده و از جمله مهم‌ترین ماده غذایی دنیا محسوب می‌شود (Emam, 2007). این گیاه بیشترین نیاز آبی را در بین غلات دارد (Karimi, 1990). در سطح جهانی بخش عمده برنج تولیدی از مزارع غرقاب به دست می‌آید. این مزارع نیاز به آب تازه و کافی دارند. نیاز ماهیانه آنها به آب گاهی تا ۸۵۰ میلی‌متر هم می‌رسد (Emam, 2007). بطورکلی آب یکی از منابع مهم محدودکننده در تولید محصول برنج می‌باشد (Vial, 2007). مؤسسه بین المللی تحقیقات برنج (IRRI) با هدف کاهش مشکل بحران آب در تولید برنج، تکنولوژی تولید برنج هوازی را در سال ۲۰۰۲ معرفی کرد. در این سیستم، گیاه به زمین غیرگل‌آلود و غیرغرقاب متحمل است و برنج هوازی همانند رشد یک گیاه در زمین‌های مرتفع رشد می‌کند. در کشور چین مصرف آب برای برنج های هوازی ۶۵ تا ۵۵٪ کمتر از برنج غرقاب گزارش شده است (Bouman *et al*., 2002). البته برنج‌های هوازی کارایی مصرف آب بالاتری دارند اما از نظر عملکرد با برنج‌های غرقاب یکسان نیستند. لذا معرفی ژنوتیپ‌هایی از برنج‌های هوازی تحت شرایط آبی که قادر باشند در خاک‌های هوازی رشد کنند لازم به نظر می‌رسد (Bouman *et al*., 2002). با توجه به تأثیر شرایط نامساعد محیطی بر رشد گیاهان، خشکی هنوز عمده‌ترین محدودیت در تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود، به گونه‌ایی که از بین تنش‌های زنده و غیرزنده، خشکی به تنهایی مسبب ۴۵٪ از کاهش عملکرد محصولات زراعی می‌باشد (Belhassen, 1996). در این راستا Ehdaie و Waines (۱۹۹۳) بیان نمودند ژنوتیپ‌هایی که آب قابل دسترس را با کارایی بیشتری مصرف نموده و قادر به تحمل تنش خشکی باشند، یک هدف عمده برای افزایش عملکرد محصولات زراعی در محیط‌های مستعد تنش خشکی می‌باشد. لذا شناسایی صفات مرتبط با تحمل به خشکی می‌تواند در گزینش ژنوتیپ‌های سازگار به کار گرفته شود. تحمل به تنش‌های محیطی از جمله تنش خشکی در مراحل مختلف رشد گیاه برنج از جوانه‌زنی تا رسیدن کامل متفاوت بوده و در مرحله جوانه‌زنی به تنش خشکی حساس است (Lutts *et al*., 1995). از طرفی Blum و همکاران (۱۹۸۰) نشان دادند بذور ژنوتیپ‌هایی که در مراحل جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای از تحمل به تنش رطوبتی بالاتری برخوردار بودند، در مراحل بعدی نیز این قابلیت را بروز داده‌اند. برای ایجاد محیط‌های مصنوعی کنترل پتانسیل آب، معمولاً از مواد جامد با جرم مولکولی بالا که نقشی در تغذیه بافت نداشته و جذب گیاه نمی‌شود، استفاده می‌شود که از جمله این مواد می‌توان به مانیتول اشاره کرد (Eemmerich and Hardegree, 1990).

از دیدگاه به‌نژادی تحمل به خشکی یک صفت پیچیده و کمی است و روش اندازه‌گیری مستقیمی برای اندازه‌گیری آن وجود ندارد که این امر باعث مشکل شدن شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی می‌شود (Abdolshahi *et al*., 2010). در روش‌های مولکولی مثل مکان‌یابی ارتباطی از عدم تعادل پیوستگی بین مکان‌های ژنومی برای شناسایی و مکان‌یابی جایگاه صفات کمی استفاده می‌شود. در پژوهشی Agrama و همکاران (۲۰۰۷) ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی را با استفاده از چهار صفت زراعی و ۱۲۳ نشانگر ریزماهواره بر روی ۹۲ ژنوتیپ برنج مورد بررسی قرار دادند. آنها بسیاری از QTLهایی که قبلاً برای صفات مختلف شناسایی شده بود، ردیابی کردند و نتیجه گرفتند که مکان‌یابی ارتباطی، یک جایگزین مناسب برای مکان‌یابی QTL بر اساس تلاقی بین لاین‌های مختلف است. در یک تحقیق، تجزیه ارتباط ۱۲۸ ژنوتیپ برنج و ۱۱ صفت زراعی در طول دو سال مورد بررسی قرار گرفت.

جمعیت با استفاده از ۱۲۵ نشانگر ریزماهواره که سراسر ژنوم را پوشش می‌دادند، انجام شد. در کل ۱۶ نشانگر ارتباط معنی‌داری با صفت مختف نشان دادند که محققین بیان داشتند که استفاده از تجزیه ارتباط برای بررسی ژنوتیپ‌های مختلف برنج در روند برنامه‌های اصلاحی مفید و کارآمد است (Zhou *et al*., 2012).

در این راستا پژوهش حاضر با هدف اعتبارسنجی و شناسایی نشانگرهای مثبت و آگاهی بخش مرتبط با برخی صفات جوانه‌زنی برنج در شرایط تنش اسمزی با استفاده از روش تجزیه ارتباط طرح‌ریزی شد.

مواد وروش‌ها

مواد گیاهی پژوهش حاضر شامل تعداد ۳۱ رقم برنج خارجی و هوازی و تعداد ۲۲ رقم برنج ایرانی بود که به ترتیب از موسسه تحقیقات بین المللی برنج (IRRI) و موسسه تحقیقات برنج کشور در رشت تهیه شد که در جدول ۱ نام و علایم اختصاری آنها آورده شده است.

جدول ۱. مشخصات مواد گیاهی مورد مطالعه

شماره ژنوتیپ Number Genotype	نام یا شجره Name or Pedigree	شماره ژنوتیپ Number Genotype	نام یا شجره Name or Pedigree
1	Palawan	32	قصرالدشتی
2	IR66417–18–1-1–1	33	سنگ طارم
3	IR71525–19–1-1	34	سنگ جو
4	IR60080-46A	35	رشتی سرد
5	IR65907–116–1-B	36	شاه سپند
6	IRAT170	37	عنبر جو
7	Caiapo	38	سالاری
8	Pegaso	39	ندا
9	IRAT216	40	اهلمی طارم
10	IR 81024-B-254-1-B	41	علی کاظمی
11	IR 81422-B-B-200-4	42	خزر
12	IR 82310-B-B-67-2	43	هاشمی
13	IR 82590-B-B-32-2	44	چمپا بودار
14	IR 82616-B-B-64-3	45	غریب
15	IR 82635-B-B-82-2	46	دم سیاه
16	IR 82639-B-B-103-4	47	سپید رود
17	IR 82639-B-B-118-3	48	کادوس
18	IR 82639-B-B-140-1	49	درفک
19	IR 83749-B-B-46-1	50	گوهر
20	IR 82589-B-B-114-3	51	حسن سرایی
21	IR 82589-B-B-84-3	52	نعمت
22	IR 82590-B-B-90-4	53	صدری
23	IR 82590-B-B-94-4		
24	IR 82590-B-B-98-2		
25	IR 82635-B-B-143-1		
26	IR 82635-B-B-32-4		
27	IR 83749-B-B-87-3		
28	IR 83752-B-B-12-3		
29	Panda		
30	Vandana		
31	Nonaboka		

ژنوتیپ‌های ۱تا ۳۱ ارقام خارجی و هوازی و۳۲ تا ۵۳ ارقام ایرانی اند.

به منظور بررسی ژنوتیپ برنج‌های هوازی و ارقام ایرانی از نظر مؤلفه‌های جوانه‌زنی تحت تنش اسمزی، آزمایشی به صورت طرح اسپلیت‌پلات با فاکتور اصلی تنش اسمزی در سه سطح (آب مقطر به عنوان شاهد، ۸- و ۱۶- بار حاصل از مانیتول) و فاکتور فرعی رقم با استفاده از ۵۳ ژنوتیپ برنج در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط آزمایشگاهی اجرا گردید. برای هر واحد آزمایشی ۲۵ عدد بذر سالم با محلول ۵٪ هیپوکلریت سدیم برای ۳۰ ثانیه ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر شستشو داده شد. در شرایط نرمال (شاهد) میزان ۵ میلی‌لیتر از آب مقطر به بذور موجود روی کاغذ صافی درون پتری‌دیش‌ها اضافه شد. برای سطوح تنش اسمزی نیز از محلول‌های ۸- بار و ۱۶- بار و از مانیتول برای تهیه محلول‌های مذکور استفاده شد. پتری‌دیش‌ها داخل انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۴۲٪ منتقل شدند. برای انجام آزمون استاندارد جوانه‌زنی شمارش تعداد بذرهای جوانه‌زده در ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت و بیشتر پس از آغاز آزمایش تا زمان تثبیت تعداد بذور جوانه‌زده، انجام شد (Djanaguiraman *et al.*, 2004). معیار بذرهای جوانه‌زده خروج ریشه‌چه به طول دو میلی‌متر یا بیشتر بود (Willenborg *et al.*, 2005). پس از اتمام جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه کلیه ۲۵ بذر در هر واحد آزمایشی با خط‌کش مدرج میلی‌متری اندازه‌گیری شد و وزن تر مجموع ریشه‌چه‌ها و ساقه‌چه‌های موجود در هر پتری‌دیش و وزن خشک آنها نیز پس از قراردادن در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت با ترازوی دیجیتالی حساس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد، سپس با استفاده از روابط معین، درصد جوانه‌زنی (Camberato and Mccarty, 1999)، انرژی جوانه‌زنی (Agrawal., 1980)، ضریب سرعت جوانه‌زنی[1] (Hunter *et al.*, 1984)، شاخص بنیه بذر (Abdul-Baki and Anderson, 1973)، درصد آب بافت گیاهچه (Tsonev *et al.*, 1998)، ضریب آلومتریک (Khavazeh, 1998) و همچنین حداکثر درصد مقدار جوانه‌زنی (Gmax)، سرعت جوانه‌زنی (R50)، یکنواختی جوانه‌زنی (GU)، زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵، ۱۰، ۵۰، ۹۰ و ۹۵٪ حداکثر جوانه‌زنی (D05، D10، D50، D90 و D95)، از طریق برنامه Garmin محاسبه شد (Soltani and Maddah, 2010).

استخراج DNA و انجام PCR

از برگ‌های تازه و جوان ژنوتیپ‌ها، نمونه‌های برگی به منظور استخراج DNA به روش CTAB، استفاده شد (Saghai Maroof, 1994). پس از استخراج DNA، کیفیت و کمیت تقریبی آن به وسیله ژل آگاروز ۰/۸٪ تعیین شد.

واکنش زنجیره پلی‌مرازی

این آزمایش با استفاده از ۲۶ جفت آغازگر SSR ژنوم گیاه برنج انجام شد. این نشانگرها طبق مطالعات پیشین با استفاده از جمعیت‌ها و زمینه‌های ژنتیکی متعدد، پیوسته با QTLهای صفات مرتبط با تنش خشکی و شوری در گیاه برنج شناسایی شدند. برای انتخاب این نشانگرها از مقالات و سایت معتبر گرامینه (www.gramene.org) استفاده شد. اطلاعات مرتبط با این نشانگرها در جدول ۲ ارائه شده است.

پس از رقیق‌سازی DNA در حجم ۱۰ میکرولیتر، با اجزای ۲ میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X)، ۰/۴ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۶۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۰/۶ میکرولیتر مخلوط

1. Coefficient of velocity of germination (CVG)

dNTP (۲ میلی‌مولار)، ۰/۴۸ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۱۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) و ۵ میکرولیتر آب دیونیزه شده انجام شد. واکنش PCR به صورت تاچ داون[1] و توسط دستگاه ترموسایکلر BIO RAD صورت گرفت. چرخه حرارتی شامل یک چرخه واسرشت اولیه برای DNA الگو در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و به دنبال آن ۱۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (با کاهش هر یک درجه سانتی‌گراد در هر چرخه تا رسیدن به دمای اتصال) و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۲۶ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و پس از اتمام ۲۶ چرخه فوق، نمونه‌ها به منظور انجام بسط نهایی پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس فرآورده‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۶٪ تفکیک و به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند (Switzer *et al*., 1979). در نهایت امتیازدهی نوارها انجام گرفت.

1. Touchdown

جدول ۲. اطلاعات نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده

شماره Number	نام Name	منبع Reference	شماره Number	نام Name	منبع Reference
1	RM5	Diwan *et al*., 2013	14	RM480	Gramene site
2	RM7	Diwan *et al*., 2013	15	RM493	Thomson *et al*., 2010
3	RM104	Vikram *et al*., 2011	16	RM510	Venuprasad *et al*., 2012b
4	RM140	Thomson *et al*., 2010	17	RM511	Bernier *et al*., 2007
5	RM190	Gramene site	18	RM523	Bernier *et al*., 2007
6	RM212	Wang *et al*., 2005	19	RM3805	Venuprasad *et al*., 2012b
7	RM231	Diwan *et al*., 2013	20	RM5672	Gramene site
8	RM270	Gramene site	21	RM10793	Thomson *et al*., 2010
9	RM276	Gramene site	22	RM11943	Vikram *et al*., 2011
10	RM302	Venuprasad *et al*., 2012b	23	RM12091	Vikram *et al*., 2011
11	RM306	Diwan *et al*., 2013	24	RM19367	Venuprasad *et al*., 2012b
12	RM319	Wang *et al*., 2005	25	RM28099	Bernier *et al*., 2007
13	RM431	Vikram *et al*., 2011	26	RM28166	Bernier *et al*., 2007

جدول ۳. چهار مدل آماری استفاده شده برای انجام تجزیه ارتباط نشانگرهای SSR و صفات فنوتیپی

نام و شماره مدل‌ها Name and number of models	مجموعه داده مورد استفاده Used data set
1: GLM[a]	Phenotype + SSR
2: GLM	Phenotype + SSR + Q[b]
3: MLM[c]	Phenotype + SSR + K[d]
4: MLM	Phenotype + SSR + K + Q

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

b: Q: Population structure data or Inferred ancestry of individuals دادهای ساختار جمعیت یا اصل و نسب انتساب شده از افراد

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

d: K: Kinship data derived from general similarity in genetic background arising from shared kinship

دادهای خویشاوندی حاصل از مشابهت کلی افراد از لحاظ ژمینه ژنتیکی ناشی از خویشاوندی

تجزیه‌های آماری

جهت انجام تجزیه ارتباطی ابتدا تجزیه ساختار انجام شد. برای انجام این تجزیه و تفکیک جمعیت به زیرجمعیت‌های متمایز از لحاظ ساختار ژنتیکی از نرم‌افزار STRUCTURE نسخه 2.3.4 استفاده شد (Pritchard *et al*., 2000). تعداد بهینه K (یعنی تعداد

زیرجمعیت‌های مورد مطالعه در جمعیت موردنظر) از طریق شبیه‌سازی با طول دوره Burnin ۱۰۰۰۰۰ و تعداد تکرار MCMC ۱۰۰۰۰۰ در این نرم‌افزار تعیین شد. برای این منظور تعداد K از ۲ تا ۱۰ در نظر گرفته شد. سپس برای تعیین تعداد بهینه K، از روش Evanno و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. انتساب افراد به زیرجمعیت‌ها نیز مطابق روش Spataro و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد و برای هر فرد در هر گروه درصد عضویت محاسبه شد. مطابق این روش یک ژنوتیپ هنگامی می‌تواند به انتساب یک گروه درآید که درصد عضویت آن ۰/۷ یا بیش‌تر از آن باشد و درصورتی‌که درصد عضویت کمتر از ۰/۶۹ باشد به عنوان ژنوتیپ مخلوط در نظر گرفته می‌شود. پس از تعیین تعداد K ماتریس Q بر اساس آن تشکیل گردید و برای انجام تجزیه ارتباط وارد نرم افزار TASSEL 4.1.32 شد (Bradbury *et al*., 2007). تجزیه ارتباط با نرم افزار TASSEL با استفاده از چهار مدل (جدول ۳) انجام شد. تفاوت این مدل‌ها در مجموعه داده‌های مورد استفاده در تجزیه ارتباطی است. این نرم افزار امکان انجام تمام آزمون‌های مرتبط با مدل‌ها و رویه‌هایی مانند GLM[1] و MLM[2] را امکان‌پذیر می‌سازد. تجزیه ارتباطی برای هر سطح تنش به طور مجزا انجام شد و در هر سطح تنش از میانگین تکرارها به عنوان مجموعه داده فنوتیپی آن استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه ساختار ژنتیکی

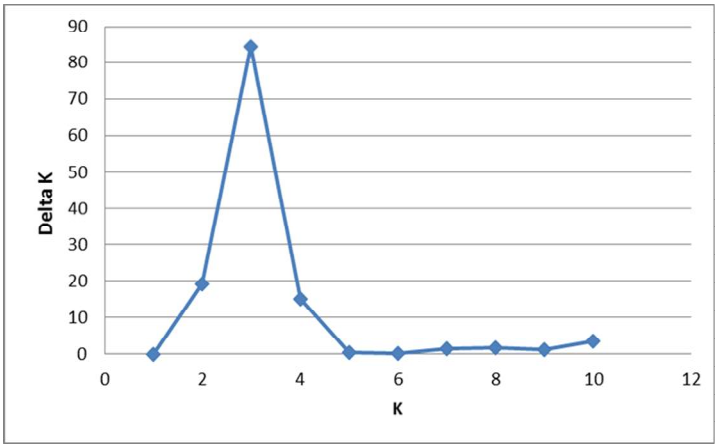
تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE، امکان تفکیک کل جمعیت را به زیرجمعیت‌هایی با زیر ساختارهای متفاوت فراهم می‌سازد. زیرجمعیت‌های تشکیل‌شده از لحاظ ژنتیکی متمایز از یکدیگر می‌باشند و چنانچه ژنوتیپ‌ها به صورت اختلاط یافته باشند، پس از انجام این تجزیه قابل تشخیص خواهند بود (Dadras *et al*., 2014). طبق نتایج حاصل از نرم‌افزار STRUCTUR، K و ΔK (که به ترتیب زیرگروه‌ها و میزان تغییرات آنها با توجه به شبیه‌سازی‌های انجام‌شده در نرم افزار می‌باشد) استخراج و نمودار دو بعدی آن رسم شد. شکل ۱ نمودار دو طرفه برای تعیین بهینه K را نشان می‌دهد که با توجه به نمودار بهترین K در این پژوهش که در واقع همان نقطه اوج منحنی است، ۳ می‌باشد. در واقع تجزیه ساختار نشان داد که تعداد خوشه‌هایی که پارامتر ΔK را به حداکثر خود می‌رساند برابر ۳ می‌باشد. جدول ۵٪ عضویت ژنوتیپ‌های برنج را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج مندرج در این جدول ۲۳ ژنوتیپ شامل ژنوتیپ‌های شماره ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۷، ۲۸، ۳۰، ۳۱، ۳۳، ۴۷، ۴۸، ۴۹ و ۵۰ منتسب به گروه ۱ شدند که شامل ۱۸ ژنوتیپ هوازی و ۵ ژنوتیپ ایرانی بودند و تعداد ۱۰ ژنوتیپ‌های هوازی شامل ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ به عضویت گروه ۲ و ۱۶ ژنوتیپ شامل دو ژنوتیپ هوازی ۲۶و ۲۹ و ۱۴ ژنوتیپ ایرانی ۳۲، ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۴۵، ۴۶ و ۵۱ به عضویت گروه ۳ در آمدند و ۴ ژنوتیپ ۱۴، ۴۴، ۵۲ و ۵۳ هم جزو ژنوتیپ‌های مخلوط بودند که فقط یک ژنوتیپ هوازی در این گروه وجود داشت. بدین معنی که چون درصد عضویت کمتر از ۰/۶۹ داشتند بنابراین نتوانستند به هیچ یک از گروه‌ها منتسب گردند. در این گروه‌بندی ۲۱/۷۴ درصد از ژنوتیپ‌های گروه اول، صفر درصد از ژنوتیپ‌های گروه دوم، ۸۷/۸۵ درصد از ژنوتیپ‌های گروه سوم و ۷۵٪ از ژنوتیپ‌هایی که در گروه مخلوط دسته‌بندی شدند، ارقام ایرانی بودند. در حقیقت ژنوتیپ‌های هوازی و خارجی از ارقام ایرانی به طور کامل از هم تفکیک نشدند. بار پلات ساختار جمعیت در شکل ۲ نشان داده شده است.

1. General Linear Model.
2. Mixed Linear Model

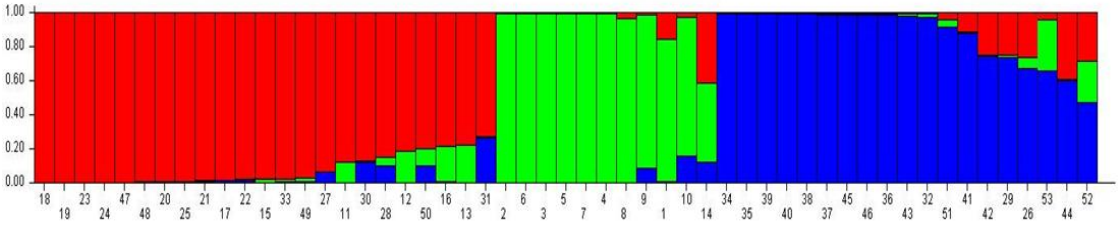
جدول ۴. آماره‌های محاسبه شده برای مقادیر بهینه K با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE

K	L(K)[a]	Stdev	L'(K)[b]	L"(K)[c]	|Ln(K)|	ΔK[d]
1	-3472.525	1.5341	-	-	-	0
2	-3007.375	6.6455	465.15	-127.0375	127.0375	19.1164
3	-2669.2625	1.73199	338.1125	-146.2375	146.2375	84.4328
4	-2477.3875	7.0915	191.875	-107.35	107.35	15.1378
5	-2392.8625	118.1475	84.525	53.275	53.275	0.4509
6	-2255.0625	106.9834	137.8	-15.375	15.375	0.1437
7	-2132.6375	21.7017	122.425	-32.6875	32.6875	1.5062
8	-2042.9	4.9742	89.7375	-8.0125	8.0125	1.6108
9	-1961.175	8.8717	81.725	-11.2	11.2	1.2624
10	-1890.65	20.7222	70.525	-70.525	70.525	3.4034

[a] میانگین LnP(D) تکرارها برای هر K، [b] $L(K)_n - L(K)_{n-1}$، [c] $L'(K)_n - L'(K)_{n-1}$ و [d] $|L''(K)|/Stdev$



شکل ۱. نمودار دو طرفه برای تعیین مقدار بهینه K



شکل ۲. بار پلات ساختار جمعیت مستخرج از STRUCTURE و ۲۶ نشانگر SSR که در سه بخش رنگی تقسیم شده است . نام ژنوتیپ‌ها با شماره آنها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

در پژوهش دیگری نیز که تجزیه ساختار بر روی ۵۰ ژنوتیپ توتون تیپ غربی شامل ۱۷ ژنوتیپ تیپ بارلی و ۳۳ ژنوتیپ تیپ ویرجینیای گرمخانه‌ای با استفاده از ۲۱ ترکیب آغازگری نشانگر AFLP، انجام شد، ساختار جمعیت به دو گروه اصلی تفکیک شدند. اما در بررسی مذکور تعداد ۳۱ ژنوتیپ که از هر دو تیپ بارلی و ویرجینیای گرمخانه‌ای بودند به یک گروه منتسب شدند. تعداد ۹ ژنوتیپ به گروه ۲ و تعداد ۱۰ ژنوتیپ نیز جزء ژنوتیپ‌های مخلوط شناخته شدند (Dadras, 2012). در مقابل در مطالعه‌ای که بر روی

۲۲۵ توده جو با استفاده از ۷۳ نشانگر SSR انجام شد تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE توانست به‌خوبی توده‌های اسپانیایی را از توده‌های اروپایی تفکیک کند (Casas *et al*., 2006).

جدول ۵. درصد عضویت ژنوتیپ‌ها بر اساس نتایج مستخرج از نرم افزار STRUCTURE

شماره Number	علامت اختصاری Abbreviation	درصد عضویت در گروه ۱ Member percentage of group 1	درصد عضویت در گروه ۲ Member percentage of group 2	درصد عضویت در گروه ۳ Member percentage of group 3	شماره Number	رقم Variety	درصد عضویت در گروه ۱ Member percentage of group 1	درصد عضویت در گروه ۲ Member percentage of group 2	درصد عضویت در گروه ۳ Member percentage of group 3
1	AE1	0.153	0.837	0.010	32	قصرالدشتی	0.004	0.024	0.972
2	AE2	0.003	0.994	0.003	33	سنگ طارم	0.973	0.019	0.008
3	AE3	0.003	0.993	0.004	34	سنگ جو	0.003	0.003	0.994
4	AE4	0.005	0.991	0.005	35	رشتی سرد	0.003	0.003	0.994
5	AE5	0.003	0.992	0.005	36	شاه سپند	0.006	0.007	0.988
6	AE6	0.003	0.994	0.003	37	عنبر جو	0.003	0.005	0.991
7	AE7	0.006	0.992	0.003	38	سالاری	0.004	0.003	0.993
8	AE8	0.033	0.962	0.005	39	ندا	0.003	0.003	0.994
9	AE9	0.01	0.904	0.086	40	اهلمی طارم	0.003	0.003	0.994
10	AE10	0.027	0.813	0.16	41	علی کاظمی	0.112	0.004	0.883
11	AE11	0.873	0.124	0.003	42	خزر	0.244	0.012	0.744
12	AE12	0.813	0.183	0.004	43	هاشمی	0.007	0.008	0.985
13	AE13	0.775	0.222	0.003	44	چمپا بودار	0.387	0.007	0.606
14	AE14	0.413	0.459	0.128	45	غریب	0.005	0.004	0.991
15	AE15	0.973	0.024	0.002	46	دم سیاه	0.006	0.005	0.989
16	AE16	0.78	0.210	0.01	47	سپید رود	0.993	0.003	0.004
17	AE17	0.979	0.006	0.015	48	کادوس	0.989	0.007	0.004
18	AE18	0.994	0.003	0.003	49	درفک	0.967	0.021	0.012
19	AE19	0.994	0.003	0.003	50	گوهر	0.799	0.099	0.101
20	AE20	0.987	0.006	0.006	51	حسن سرایی	0.042	0.04	0.918
21	AE21	0.982	0.01	0.008	52	نعمت	0.285	0.238	0.477
22	AE22	0.975	0.004	0.022	53	صدری	0.040	0.296	0.664
23	AE23	0.994	0.003	0.003					
24	AE24	0.994	0.003	0.003					
25	AE25	0.986	0.004	0.010					
26	AE26	0.258	0.065	0.677					
27	AE27	0.93	0.004	0.066					
28	AE28	0.843	0.053	0.104					
29	AE29	0.249	0.010	0.741					
30	AE30	0.866	0.010	0.124					
31	AE31	0.724	0.008	0.268					

تجزیه ارتباط

تجزیه ارتباط با استفاده از نرم‌افزار TASSEL اجرا شد. در این بررسی از چهار مدل آماری برای تجزیه ارتباط استفاده شد که نتایج سه مدل در جدول ۳ نشان داده شده است (مدل اول یعنی GLM بدون ماتریس Q، بدلیل حجم زیاد نتایج ارائه نشده است). امروزه بیشتر از

رویه MLM برای درک ارتباط معنی‌دار بین نشانگر و صفت استفاده می‌شود زیرا در پیدا کردن ارتباط می‌توان هم ماتریس‌های ساختار جمعیت و هم خویشاوندی افراد را دخالت داد و در نتیجه اریب ناشی از این عوامل را کاهش داد. در این حالت ارتباطات معنی‌دار شناسایی‌شده بین نشانگر و صفت از اعتبار و اطمینان بیشتری برخوردارند (Agrama *et al*., 2007). در مجموع برای ۱۴ صفت اندازه‌گیری‌شده در هر یک از شرایط نرمال و تنش اسمزی ۸- بار و ۱۶- بار برای مدل اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب تعداد ۴۵۷، ۹۸، ۷۵ و۳۰ نشانگر ارتباط معنی‌داری را با صفات مورد مطالعه در سطح ۵٪ نشان دادند.

از این تعداد ۱۴۰، ۲۲، ۱۴ و ۶ نشانگر به ترتیب به مدل اول، دوم، سوم و چهارم در شرایط نرمال، ۱۵۰، ۳۶، ۲۳ و ۱۲ نشانگر به ترتیب به چهار مدل در شرایط تنش اسمزی ۸- بار و ۱۶۷، ۴۰، ۳۸ و ۱۲ نشانگر نیز به ترتیب به چهار مدل در شرایط تنش اسمزی ۱۶- بار اختصاص داشت. در جداول ۸، ۹ و ۱۰ نشانگرهای دارای ارتباط معنی‌دار شناسایی شده با استفاده از سه مدل GLM و MLM در سطح ۵٪ آورده شده است. البته باید یادآور شد تعداد زیادی از نشانگرها که با مدل‌های MLM شناسایی شدند، با استفاده از مدل‌های GLM نیز تعیین شده بودند.

در شرایط نرمال برای صفات زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۱۰٪ ،۵۰٪، ۹۰٪ و ۹۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و ضریب سرعت جوانه‌زنی نشانگرهای RM190 و RM510، برای صفت درصد جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی و حداکثر درصد مقدار جوانه‌زنی نشانگر RM28166، شاخص بنیه بذر نشانگر RM12091، یکنواختی جوانه‌زنی نشانگر RM270، ضریب آلوتریک نشانگر RM431 و برای صفات زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۱۰٪ و سرعت جوانه‌زنی نشانگر RM3805 شناسایی‌شده است. همچنین در شرایط نرمال بالاترین ضریب تبیین در مدل سوم به نشانگر RM190 با توجیه ۴۴/۵٪ از تغییرات زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۱۰٪ حداکثر جوانه‌زنی و در مدل چهارم به نشانگر RM12091 با توجیه ۳۳/۸٪ از تغییرات شاخص بنیه بذر در سطح ۵٪ اختصاص داشت.

از طرفی با توجه به نتایج ذکر شده در شرایط نرمال نشانگر RM190 و RM510 مرتبط با هفت صفت زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۱۰٪، ۵۰٪، ۹۰٪ و ۹۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و ضریب سرعت جوانه‌زنی و نشانگر RM28166 نیز مرتبط با سه صفت درصد جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی و حداکثر درصد مقدار جوانه‌زنی شناسایی شد که باید خاطر نشان نمود شناسایی نشانگرهای مرتبط با چندین صفت مهم می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی بسیار کاربردی باشد و در ادامه اشاره خواهد شد که بسیاری از این نشانگرها در کنترل بسیاری از صفات تحت تنش خشکی نیز نقش دارند که در بسیاری از منابع به آنها اشاره شده است.

دو مدل MLM (سوم و چهارم) در سطح ۵٪، برای ۱۴ صفت اندازه‌گیری‌شده در شرایط تنش اسمزی ۸- بار به ترتیب ۲۳ و ۱۲ نشانگر معنی‌دار شناسایی شدند. که برای پنج صفت زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۱۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و ضریب سرعت جوانه‌زنی نشانگر RM190 و سه صفت درصد جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی و حداکثر درصد مقدار جوانه‌زنی نشانگرهای RM28166 و RM231، شاخص بنیه بذر نشانگر RM270، برای صفت درصد آب بافت گیاهچه نشانگرهای RM270، RM276 و RM11943 و برای صفت ضریب آلومتریک نیز نشانگر RM104 به صورت مشترک برای چهار مدل شناسایی شده است.

از طرفی در شرایط اسمزی ۸- بار بالاترین

ضریب تبیین در مدل سوم به نشانگر RM270 با توجیه ۴۰/۴٪ از تغییرات شاخص بنیه بذر و در مدل چهارم به نشانگر RM276 با توجیه ۳۳/۹٪ از تغییرات درصد آب بافت گیاهچه اختصاص یافت.

برای ۱۴ صفت مورد مطالعه در شرایط تنش اسمزی ۱۶- بار، توسط دو مدل MLM (سوم و چهارم) در سطح ۵٪ به ترتیب ۳۸ و ۱۲ نشانگر معنی‌دار شناسایی شد. در این شرایط نشانگرهای RM104 و RM231 مرتبط با شش صفت زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۱۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۹۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۹۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و نشانگرهای RM270، RM11943 و RM28166 نیز مرتبط با سه صفت درصد جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی و حداکثر درصد مقدار جوانه‌زنی و نشانگر RM270 مرتبط با سه صفت یکنواختی جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر و ضریب آلومتریک و نشانگرهای RM231 و RM523 برای صفت ضریب سرعت جوانه‌زنی به طور مشترک برای چهار مدل شناسایی شد. بالاترین ضریب تبیین در مدل سوم و چهارم به نشانگر RM523 به ترتیب با توجیه ۴۰/۶ و ۳۰/۷٪ از تغییرات ضریب سرعت جوانه‌زنی اختصاص یافت.

در پژوهش حاضر، ارزیابی تعیین اعتبار نشانگرهایی که در مطالعات مختلف مرتبط با QTLهای صفات مرتبط با خشکی و شوری معرفی شده بودند، نشان داد که نشانگرهای، RM11943، RM104، RM190،RM28166، RM231، RM510، RM270، RM19367 و RM431 به‌عنوان نشانگرهای مرتبط با صفات جوانه‌زنی در شرایط تنش اسمزی در این پژوهش شناخته شدند. از طرفی توجه به این نکته ضروری به نظر می‌رسد این نشانگرها در مقالات متفاوت به عنوان نشانگرهای پیوسته به QTLهای بزرگ‌اثر که در کنترل چندین صفت مهم در شرایط تنش خشکی، نقش دارند ذکر شده است.

برنیر و همکاران (Bernier *et al*., 2007) در مطالعه‌ای روی جمعیت برنج حاصل از تلاقی IR74371-46-1-1/2*Sabitri، یکQTL بزرگ‌اثر $qDTY_{12.1}$ را که در حد فاصل نشانگرهای RM28166-RM28199 بر روی کروموزوم ۱۲ قرار داشت، به عنوان اولینQTL بزرگ‌اثر برای عملکرد برنج تحت تنش خشکی معرفی کردند. البته آنها اشاره کردند که این QTL بزرگ‌اثر در کنترل چندین صفت دیگر تحت تنش خشکی نیز نقش دارد. همچنین در مطالعه‌ایی بر روی یک جمعیت حاصل از تلاقی Vandana/IR72 یک QTL بزرگ‌اثر تحت تنش خشکی برای صفت عملکرد برنج بر روی کروموزوم شش شناسایی شد، اینQTL در نزدیکی نشانگر RM19367 قرار دارد و مطابق نتایج همبستگی آن با صفت عملکرد دانه در برنج به ۳۹٪ رسید (Venuprasad *et al*., 2012a). همچنین در یک بررسی بر روی دو جمعیت برنج حاصل از تلاقی Apo/Swarna و Apo/IR72، QTL بزرگ‌اثر $qDTY_{6.1}$ برای عملکرد برنج تحت شرایط هوازی و آبیاری بر روی کروموزوم ۶ در مجاورت نشانگر RM510 معرفی شد که این نشانگر با صفت عملکرد ۶۶٪ همبستگی نشان داد (Venuprasad *et al*., 2012a).

در بررسی دیگری بر روی جمعیت برنج حاصل از تلاقی Dhagaddeshi/Swarna دو QTL بزرگ‌اثر برای صفت عملکرد دانه ($qDTY_{1.1}$) و تعداد روز تا گلدهی ($qDTF_{1.1}$) در حدفاصل نشانگرهای RM104-RM431 و همچنین یک QTL بزرگ‌اثر مرتبط با صفت ارتفاع بوته ($qDTH_{1.1}$) در حدفاصل نشانگرهای RM11943-RM431 شناسایی شد (Ghimirea *et al*., 2013). در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد این نشانگرها نقش بسزایی در کنترل صفات درصد جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی و حداکثر درصد مقدار جوانه‌زنی در شرایط

تنش ۸- و ۱۶- داشتند.

در پژوهشی Vikram و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی روی یک جمعیت حاصل از تلاقی N22/Swarna در برنج سه QTL بزرگ‌اثر $qDTF_{1.1}$، $qDTH_{1.1}$ و $qDTB_{1.1}$ را بر روی کروموزوم یک در حدفاصل نشانگرهای RM11943-RM431، RM11943-RM12091 و RM315-RM431 شناسایی نمودند و بیان کردند این QTLها می‌توانند در کنترل چندین صفت تحت تنش خشکی مؤثر واقع گردند.

جدول ۶. نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرهای SSR و صفات مختلف در شرایط نرمال با سه مدل آماری

مدل ۲ GLM: G+P+Q				مدل ۳ MLM: G+P+K				مدل ۴ MLM: G+P+Q+K			
Trait صفت	Marker نشانگر	P احتمال معنی‌داری	R^2 ضریب تبیین	Trait صفت	Marker نشانگر	P احتمال معنی‌داری	R^2 ضریب تبیین	Trait صفت	Marker نشانگر	P احتمال معنی‌داری	R^2 ضریب تبیین
D10	RM190	0.0017	0.19005	D10	RM190	0.007	0.445	D10	RM190	0.015	0.282
	RM510	8.04E-04	0.20335		RM510	0.012	0.401	D10	RM510	0.034	0.234
					RM3805	0.030	0.327				
D50	RM190	0.01081	0.16559	D50	RM190	0.026	0.337				
D90	RM190	0.00401	0.19408	D90	RM28166	0.049	0.199				
D95	RM190	0.02217	0.14595								
				GU	RM270	0.026	0.239				
Gmax	RM190	0.04691	0.15574	Gmax	RM28166	0.019	0.259				
	RM231	0.04224	0.13782								
D05	RM190	0.02041	0.1666								
GR	RM190	0.00183	0.199	GR	RM190	0.012	0.398	GR	RM190	0.011	0.309
	RM510	5.14E-04	0.22151		RM510	0.028	0.331	GR	RM510	0.027	0.256
					RM3805	0.026	0.336				
AC	RM431	0.00485	0.2888	AC	RM431	0.012	0.342	AC	RM431	0.016	0.292
GRC	RM190	0.01949	0.15119	GRC	RM510	0.043	0.298				
	RM510	0.03277	0.13881								
GE	RM190	0.03935	0.15892	GE	RM28166	0.021	0.254				
	RM231	0.04467	0.13436								
G	RM276	0.03176	0.16511	G	RM28166	0.025	0.241				
SIV	RM270	0.00455	0.23951					SIV	RM12091	0.042	0.338
	RM523	0.00839	0.28273								
	RM12091	0.04727	0.24333								
	RM28099	0.00787	0.22106								
WPT	RM5	0.02722	0.20188								
	RM5672	0.04765	0.13125								

D05: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، D10: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۱۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، D50: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، D90: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۹۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، D95: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۹۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، GU: یکنواختی جوانه‌زنی، GR: سرعت جوانه‌زنی، G: درصد جوانه‌زنی، GE: انرژی جوانه‌زنی، Gmax: حداکثر درصد مقدار جوانه‌زنی، GRC: ضریب سرعت جوانه‌زنی،

SIV: شاخص بنیه بذر،WPT: درصد آب بافت گیاهچه، AC: ضریب آلومتریک.

جدول ۷. نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرهای SSR و صفات مختلف در شرایط تنش اسمزی ۸- باسه مدل آماری

GLM: G+P+Q				MLM: G+P+K				MLM: G+P+Q+K			
Trait صفت	Marker نشانگر	P احتمال معنی‌داری	R^2 ضریب تبیین	Trait صفت	Marker نشانگر	P احتمال معنی‌داری	R^2 ضریب تبیین	Trait صفت	Marker نشانگر	P احتمال معنی‌داری	R^2 ضریب تبیین
D10	RM190	0.005	0.199	D10	RM190	0.027	0.333	D10	RM190	0.03141	0.26269
D50	RM190	0.007	0.162	D50	RM190	0.043	0.298	D50	RM190	0.03503	0.22681
					RM28166	0.043	0.208				
D90	RM190	0.016	0.156								
	RM270	0.044	0.095								
D95	RM190	0.039	0.143	D95	RM231	0.047	0.247				
	RM270	0.044	0.101								
GU											
Gmax	RM190	0.006	0.174	Gmax	RM231	0.031	0.276				
	RM276	0.030	0.154		RM28166	0.040	0.211				
D05	RM190	0.005	0.206	D05	RM190	0.046	0.292	D05	RM190	0.02067	0.33856
	RM270	0.014	0.138	D05	RM510	0.045	0.294	D05	RM510	0.03969	0.28992
	RM306	0.041	0.110								
	RM510	8.5E-04	0.245								
GR	RM190	0.008	0.185	GR	RM190	0.030	0.326	GR	RM190	0.03461	0.24688
AC	RM104	0.006	0.215	AC	RM104	0.032	0.173	AC	RM104	0.01543	0.21761
	RM140	0.036	0.146								
	RM511	0.048	0.134								
	RM19367	0.040	0.180								
GRC	RM190	0.009	0.186					GRC	RM190	0.03508	0.29403
	RM270	0.018	0.126								
	RM510	0.007	0.191								
	RM28166	0.049	0.102								
GE	RM190	0.006	0.174	GE	RM231	0.031	0.276				
	RM276	0.030	0.154		RM28166	0.040	0.211				
G	RM104	0.038	0.072	G	RM231	0.038	0.262				
	RM190	0.049	0.120		RM28166	0.041	0.211				
	RM276	0.030	0.147								
SIV	RM270	2.9E-04	0.325	SIV	RM270	0.002	0.4043	SIV	RM270	0.00486	0.26371
	RM480	7.4E-04	0.362		RM480	0.046	0.29308				
	RM5672	0.006	0.229		RM5672	0.024	0.24506				
	RM12091	0.035	0.257		RM19367	0.036	0.21826				
WPT	RM270	4.5E-05	0.377	WPT	RM104	0.034	0.171	WPT	RM270	0.00443	0.33081
	RM276	0.001	0.380		RM270	0.005	0.342		RM276	0.0326	0.3392
	RM306	0.029	0.176		RM276	0.024	0.392		RM510	0.01947	0.33435
	RM510	0.001	0.350		RM11943	0.003	0.370		RM11943	0.00797	0.29378
	RM11943	2.1E-04	0.336		RM19367	0.032	0.226				
	RM19367	0.006	0.231								

D05: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، D10: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۱۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، D50: زمان لازم از کاشت تا رسیدن

به ۵۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، D90: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۹۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، D95: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۹۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، GU: یکنواختی جوانه‌زنی، GR: سرعت جوانه‌زنی، G: درصد جوانه‌زنی، GE: انرژی جوانه‌زنی، Gmax: حداکثر درصد مقدار جوانه‌زنی، GRC: ضریب سرعت جوانه‌زنی، SIV: شاخص بنیه بذر،WPT: درصد آب بافت گیاهچه، AC: ضریب آلومتریک.

جدول ۸. نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرهای SSR و صفات مختلف در شرایط تنش اسمزی ۱۶- با سه مدل آماری

GLM: G+P+Q				MLM: G+P+K				MLM: G+P+Q+K			
Trait صفت	Marker نشانگر	P احتمال معنی‌داری	R^2 ضریب تبیین	Trait صفت	Marker نشانگر	P احتمال معنی‌داری	R^2 ضریب تبیین	Trait صفت	Marker نشانگر	P احتمال معنی‌داری	R^2 ضریب تبیین
D10	RM140	0.035	0.083	D10	RM104	0.044	0.157				
	RM231	0.031	0.128		RM231	0.008	0.372				
	RM319	0.034	0.056								
	RM5672	0.040	0.102								
D50	RM231	0.025	0.122	D50	RM104	0.017	0.209				
	RM319	0.028	0.055		RM231	0.014	0.332				
	RM5672	0.034	0.097		RM270	0.030	0.230				
					RM302	0.030	0.326				
					RM306	0.019	0.258				
					RM510	0.023	0.348				
D90	RM231	0.033	0.109	D90	RM104	0.019	0.203				
	RM319	0.012	0.067		RM231	0.017	0.318				
	RM5672	0.047	0.084		RM270	0.027	0.236				
					RM302	0.026	0.337				
					RM306	0.032	0.226				
					RM510	0.024	0.344				
D95	RM231	0.030	0.107	D95	RM104	0.021	0.197				
	RM319	0.012	0.064		RM231	0.018	0.316				
					RM270	0.025	0.241				
					RM302	0.024	0.344				
					RM306	0.038	0.215				
					RM510	0.027	0.334				
					RM11943	0.047	0.202				
GU	RM302	0.017	0.159	GU	RM7	0.045	0.204				
	RM319	0.025	0.062		RM270	0.032	0.226				
					RM306	0.048	0.201				
					RM11943	0.016	0.270				
Gmax	RM270	0.002	0.180	Gmax	RM270	0.019	0.259	Gmax	RM270	0.025	0.226
	RM306	0.027	0.117		RM11943	0.049	0.199				
	RM11943	0.036	0.110		RM28166	0.037	0.217				
D05	RM231	0.014	0.179	D05	RM231	0.009	0.368	D05	RM231	0.029	0.212
	RM270	0.036	0.127								
RG	RM140	0.034	0.085	RG	RM104	0.033	0.173	RG	RM104	0.046	0.123
	RM231	0.034	0.128		RM231	0.011	0.351		RM231	0.018	0.252
	RM319	0.043	0.053								
	RM5672	0.047	0.100								
AC	RM270	0.037	0.159	AC	RM510	0.046	0.293	AC	RM270	0.036	0.202
	RM5672	0.033	0.163								
	RM10793	0.034	0.273								
GRC	RM212	0.021	0.217	GRC	RM231	0.013	0.341	GRC	RM231	0.039	0.222
	RM231	0.024	0.186		RM523	0.011	0.406		RM523	0.019	0.307
	RM523	0.003	0.275		RM28166	0.042	0.209				
GE	RM270	0.002	0.180	GE	RM270	0.019	0.260	GE	RM270	0.024	0.227
	RM306	0.027	0.117		RM11943	0.049	0.199				
	RM11943	0.035	0.110		RM28166	0.037	0.217				
G	RM270	0.003	0.156	G	RM270	0.019	0.259	G	RM270	0.031	0.207
	RM11943	0.032	0.103		RM11943	0.016	0.272		RM11943	0.046	0.183
					RM28166	0.048	0.201				
SIV	RM270	0.002	0.200	SIV	RM270	0.022	0.249	SIV	RM270	0.024	0.223
	RM306	0.040	0.124								
WPT	RM270	0.006	0.153	WPT	RM231	0.043	0.254	WPT	RM11943	0.010	0.226
	RM302	0.036	0.151		RM270	0.016	0.272				
	RM5672	0.047	0.104		RM5672	0.037	0.217				
	RM11943	0.003	0.168		RM11943	0.011	0.295				
					RM28166	0.031	0.228				

D05: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، D10: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۱۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، D50: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۵۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، D90: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۹۰٪ حداکثر جوانه‌زنی، D95: زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۹۵٪ حداکثر جوانه‌زنی، GU یکنواختی جوانه‌زنی، GR: سرعت جوانه‌زنی، G: درصد جوانه‌زنی، GE: انرژی جوانه‌زنی، Gmax: حداکثر درصد مقدار جوانه‌زنی، GRC: ضریب سرعت جوانه‌زنی، SIV: شاخص بنیه بذر،WPT: درصد آب بافت گیاهچه، AC: ضریب آلومتریک.

در یک پژوهش که در آن از ۲۶۹ نشانگر SSR که کل کروموزوم‌های برنج را پوشش می‌داد، استفاده شد، یک QTL بزرگ‌اثر مربوط به کنترل صفات جوانه‌زنی از جمله سرعت جوانه‌زنی تحت تنش خشکی در حدفاصل نشانگرهای RM231-RM7 بر روی کروموزوم سه شناسایی شد. از سوی دیگر اظهار شد که این QTL نزدیک به ژن آلفا آمیلاز در شرایط تنش خشکی قرار دارد (Diwan *et al*., 2013). در مطالعه حاضر نیز همانطور که مشاهده شد نشانگر RM231 در کنترل بسیاری از صفات مرتبط با جوانه‌زنی در شرایط تنش اسمزی ۸- و ۱۶- نقش دارد.

با توجه به بررسی‌های انجام شده و نتایج بدست آمده در پژوهش‌های قبلی و این تحقیق می‌توان به میزان اعتبار نشانگرهای مورد مطالعه پی برد. در مجموع در پژوهش حاضر نشانگرهای، RM11943، RM104، RM190، RM28166، RM231، RM510، RM270، RM19367 و RM431 به‌عنوان نشانگرهای مرتبط با صفات جوانه‌زنی در شرایط تنش اسمزی شناخته شدند که پیشنهاد می‌شود نشانگرهای مذکور با استفاده از زمینه‌های ژنتیکی وسیع‌تر مورد ارزیابی‌های دقیق‌تری قرار گیرند و همچنین اعتبارسنجی با استفاده از تعداد نشانگرهای بیشتر و انواع دیگر نشانگرها نیز انجام گردد.

مطالعات متفاوتی برای تجزیه ارتباط در گیاهان زراعی با استفاده از نشانگرهای مختلف با اندازه‌گیری صفات متفاوت انجام شده است. در بررسی که به منظور شناسایی جایگاه صفات کمی و تجزیه ارتباط در ۱۵۵ ذرت اینبرد با استفاده از ۱۵۳۶ نشانگر SNP انجام شد نشان داده شد که استفاده از مدل MLM ۱/۱۵، ۱/۱۵ و ۱/۶۶٪ از SNPها ارتباط معنی‌داری با محتوای توکوفرول در دانه ذرت، ارتفاع گیاه و طول دانه در سطح ۱٪ داشتند. همچنین این پژوهش نشان داد که برای تمامی صفات استفاده از مدل مبتنی بر K و مدل مبتنی بر Q به تنهایی عملکرد خوبی ندارد. اما به کاربردن مدل مبتنی بر K و Q به طور مشترک (MLM) نتایج بهتر و مؤثرتری را در بر دارد (Yang *et al*., 2010).

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از جناب آقای دکتر حسین صبوری و جناب آقای مهندس احمدرضا دادرس که از ارائه هیچ کمکی در به ثمر رسیدن این تحقیق دریغ ننمودند قدردانی نمایند.

REFERENCES

Abdul-Baki AA, Anderson JD (1973) Vigour deterioration in soybean seeds by multiple criteria. Crop Sci. 13: 630-633.

Abdolshahi R, Omidi M, Talei AR, Yazdi Samadi, B (2010) Evaluation of bread wheat genotypes for drought tolerance. Esci. J. Crop Prod. 3 (1): 159-171.

Agrama HA, Eizenga GC, Yan W (2007) Association mapping of yield and its components in rice cultivars. Mol. Breeding 19: 341-356.

Agrawal, R (1980) Seed technology. Pub. Co. PVT. LTD. New Dehli. India.

Belhassen E (Ed) (1996) Drought in higher plants: Genetical, Physiological and Molecular biological analysis. ENSA-INRA SGAP, Montpellier, France.

Bernier J, Kumar A, Ramaiah V, Spaner D, Atlin G (2007) A large-effect QTL for grain yield under reproductive-stage drought stress in upland rice. Crop Sci. 47(2): 507-518.

Blum A, Sinmena B, Ziv O (1980) An evaluation of seed and seedling drought tolerance screening tests in wheat. Euphytica. 29: 727-736.

Bouman BA, Xiaoguang M, Huaqi Y, Zhiming W, Junfang W, Changgui Z, Bin C (2002) Aerobic Rice (Han Dao): A New Way of Growing Rice in Water-Short Areas, 12th ISCO Conference Beijing.

Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdess Y, Buckler ES (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in divers samples. Bioinformatics Appl. Note. 2633-2635.

Camberato J, Mccarty B (1999) Irrigation water quality: part I. Salinity. South Carolina Turf grass Foundation New. 6: 68.

Casas AM, Kopahnke D, Habekub A, Schwizer G, Gracia MP, Lasa JM, Ciudad FJ, Codesal P, Moralejo MA, Molina-Cano JL, Igartua E, Ordon F (2006) Marker-trait association for disease resistance in the Spanish barley core collection. Eucarpia, Lleida. 81: 141-145.

Dadras AR (2012) Evaluation of genetic diversity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars using AFLP molecular markers. Iran, MSc. Thesis. Shahid Bahonar University of Kerman.

Dadras AR, Sabouri H, Mohammadi-Nejad G, Sabouri A, Shoaei-Deilami M (2014) Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. Mol. Biol. Rep. 41(5): 3317-3329.

Diwan JM, Channbyregowda V, Shenoy P, Salimath Bhat R (2013) Molecular mapping of early vigor related QTLs in rice. Res. J. Biol. 1: 24-30.

Djanaguiraman M, Senthil A, Ramadass R (2004) Mechanism of salt tolerance in rice genotypes during germination and seedling growth. Indian J. Agric. Res. 38 (1): 73-76.

Eemmerich WE, Hardegree SP (1990) Polyethylene glycol solution contact effect on seed germination. Agron. J. 82: 1103-1107.

Ehdaie B, Waines JG (1993) Variation in water use efficiency and its components in wheat. Crop Sci. 31: 1282-1288.

Emam E (2007) Careal Production. Shiraz University Press. pp190.

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.

Ghimirea KH, Quiatchona LA, Vikram P, Swamy BPM, Dixit SH, Ahmedb H, Hernandeza JE, orromeoa TH, Kumar A (2013) Identification and mapping of a QTL (qDTY1.1) with a consistent effect on grain yield under drought. Field Crops Res. 131:88-96.

Hunter EA, Glasbey CA, Naylor REL (1984) The analyses of data from germination test. J. Agri. Sci. Cambridge. 102: 207-213.

Kanagaraj P, Silvas K, Babu C (2010) Microsatellite Markers linked to drought resistance in Rice (*Oryza sativa* L.). Curr. Sci. J. 98:836-839.

Karimi H (1983) Crops. 3rd Ed. University of Tehran Press.

Khavazeh M (1998) Effect of salinity on germination, growth, and Cl, Na content of four arid and desert species. MSc Thesis, Isfahan University of Technology, Tehran.

Lutts S, Kinetand JM, Buoharmont J (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. J. Exp. Bot. 46: 1843-1852.

Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000) Association mapping in structured populations. Am. Soc. Hum. Gen. 67: 170-181.

Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan HS, Gupta PK (2006) Association analysis agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Curr Sci. 90: 683-689.

Saghai Mroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 91: 5466–5570.

Soltani A, Maddah V (2010) Applied, Simple programs for Education and Research in Agronomy. Iranian Society Ecological Agriculture. Tehran, Iran.

Switzer RC, Merril CR, Shifrin S (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gel. Anal Biochem. 98: 231-237.

Thomson MJ, de Ocampo M, Egdane J, Akhlasor Rahman M, Godwin Sajise A, Adorada DL, Tumimbang-Raiz E,

Blumwald E, Seraj ZI, Singh RK, Gregorio GB, Ismail AM (2010) Characterizing the *Saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. Rice 3(2): 148-160.

Tsonev TD, Lazova GN, Stoinova ZG, Popova LP (1998) A possible role forjasmonic acid in adaptation of barley seedling to salinity stress. J Plant Growth Regul. 17(3): 153-159.

Venuprasad R, Bool ME, Quiatchon L, Atlin GN (2012a) A QTL for rice grain yield in aerobic environments with large effects in three genetic backgrounds. Theor. Appl. Genet. 124: 323-332.

Venuprasad R, Bool ME, Quiatchon L, Cruz Sta, Amante M, Atlin GN, (2012b) A large-effect QTL for rice grain yield under upland drought stress on chromosome 1. Mol. Breed. 30: 535-547.

Vial LK (2007) Aerobic and Alternate-wet-and-dry (AWD) Rice Systems. Nuffield Australia publishing. Griffith NSW 2680. Australia.

Vikram P, Mallikarjuna Swamy BP, Dixit S, Ahmed HU, Sta Cruz MT, Singh AK, Kumar A (2011) qDTY 1.1, a major QTL for rice grain yield under reproductive-stage drought stress with a consistent effect in multiple elite genetic backgrounds. BMC Genet. 12: 89.

Wang, XS, Zhu J, Mansueto L, Bruskiewich (2005) Identification of candidate genes for drought stress tolerance in rice by the integration of a genetic (QTL) map with the rice genome physical map. J. Zhejiang Univ. SCI 6B (5): 382-388.

Willenborg CJ, Wildeman JC, Miller AK, Rossnagel BG, Shirtliffe SJ (2005) Oat germination characteristics differ among genotypes, seed size and osmotic potentials. Crop Sci. 45: 2023-2029.

Yang X, Yan J, Shah T, Warburton ML, Li Q, Li L, Gao Y, Chai Y, Fu Z, Zhou Y, Xu S, Bai G, Meng Y, Zheng Y, Li J (2010) Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection. Theor. Appl. Genet. 22: 235-301.

Zhang Q, Wu C, Ren F, Li Y, Zhang C (2012) Association analysis of important agronomical traits of maize inbread lines with SSRs. Australian Journal of Crop Sci. 6(6): 1131-1138.