

ارزیابی نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها در شناسایی مکان‌های مرتبط با عملکرد و برخی صفات گیاهی در ژنوتیپ‌های کتان ایرانی (*Linum usitatissimum* L.)

حسین عباسی هولاسو^{۱*}، فاطمه رحمانی^۲، مینا حسین‌زاده^۲ و عبدالله حسن‌زاده قورت‌تپه^۴

۱- نویسنده مسئول، دانشجوی فرادکتری، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

پست الکترونیک: hossein.pdf55@gmail.com

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- استادیار، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان‌غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۹

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۹

چکیده

با توجه به اینکه ارزش اقتصادی یک رقم به صفات مختلف آن بستگی دارد، بنابراین چگونگی اعمال انتخاب برای چندین صفت به‌منظور حصول حداکثر ارزش اقتصادی همواره مورد نظر به‌نژادگران بوده است. از این‌رو اطلاع دقیق از رفتار و ارتباط ژنتیکی این صفات به اصلاح ژنوتیپ‌ها کمک خواهد نمود. در این تحقیق، به‌منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با ۲۱ صفت زراعی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک در ۴۵ ژنوتیپ مختلف کتان (*Linum usitatissimum* L.) براساس مدل خطی مخلوط، از ۳۱ آغازگر مبتنی بر رتروترانسپوزون (۱۲ آغازگر IRAP و ۱۹ آغازگر REMAP) استفاده شد. مطالعه ساختار جمعیت به روش بی‌زین (Bayesian) نشان داد که دو زیرگروه احتمالی ($K=2$) در جمعیت مورد مطالعه وجود دارد. با استفاده از مدل خطی مخلوط در مجموع ۲۹ مکان مرتبط با ۲۱ صفت مورد مطالعه ($P \leq 0.01$) شناسایی شد. صفات وزن صد دانه و عملکرد دانه بیشترین تعداد مکان پیوسته را به خود اختصاص دادند. وجود نشانگرهای مشترک در میان برخی صفات بررسی شده مانند ارتباط معنی‌دار نشانگر LTR1-UBC808-2 با صفات ارتفاع بوته و وزن صد دانه و نشانگر LTR1-UBC807-4 با صفات وزن ساقه اصلی و تعداد کپسول ساقه اصلی می‌تواند ناشی از آثار پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در این صفات باشد. با وجود این، نتایج این مطالعه می‌تواند با گنجاندن تعداد بیشتری از نشانگرهایی که با صفات مهم اقتصادی مرتبط هستند، تقویت شود.

واژه‌های کلیدی: ساختار جمعیت، عدم تعادل لینکاژی، عملکرد دانه، کتان (*Linum usitatissimum* L.)، مدل خطی مخلوط.

مقدمه

کتان (*Linum usitatissimum* L.) گیاهی مهم از نظر اقتصادی، با قدمتی بیش از ۱۰۰۰۰ سال که امروزه بیشتر برای هر دو هدف فیبری و روغنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (He *et al.*, 2019). از سال ۲۰۱۱، کتان سومین محصول بزرگ فیبری در تولید نساجی و پنجمین محصول بزرگ روغنی در جهان است که کانادا بزرگترین صادرکننده بذر کتان در جهان می‌باشد (You *et al.*, 2017). این گیاه یکی از مهمترین و ارزان‌ترین محصولات غذایی در تأمین اسیدهای چرب ضروری به‌ویژه اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶ در کشورهای در حال توسعه بوده که علاوه بر داشتن مقدار زیادی از این اسیدهای چرب، در مقایسه با سایر دانه‌های روغنی، روی، آهن، منگنز و فسفر آن قابل توجه می‌باشد (Xie *et al.*, 2018).

گیاه کتان دارای ویژگی‌های مطلوبی از جمله غنی از ریزمغذی‌ها و امگا ۳، نیاز کم به نیتروژن، مقاومت به تنش‌های محیطی و سازگاری به شرایط نامساعد محیطی می‌باشد، ولی تنش‌های زیستی و غیرزیستی متعدد موجب کاهش عملکرد آن می‌شود (Jia & Booker, 2018). افزایش عملکرد، بهبود کارایی زراعی، افزایش مقاومت به بیماری‌ها و بهبود ویژگی‌های کیفی از جمله اهداف اصلاحی کتان به‌شمار می‌رود (You *et al.*, 2017). اندازه ژنوم کتان زراعی با ۳۰ کروموزوم در حدود ۳۷۳Mb است (Ragupathy *et al.*, 2011). این ژنوم ترکیبی از توالی‌های تکراری و غیرتکراری می‌باشد که DNA تکراری بیش از ۵۵٪ کل ژنوم را تشکیل می‌دهد (Smykal *et al.*, 2011). شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات کمی بر مبنای عدم تعادل پیوستگی است و به دو روش اصلی نقشه‌یابی پیوستگی (Linkage mapping) و نقشه‌یابی ارتباطی (Association mapping) یا نقشه‌یابی عدم تعادل لینکاژی (Linkage disequilibrium mapping) انجام می‌شود که اکثراً برای فهم ارتباط بین یک ژنوتیپ و یک فنوتیپ خاص مورد استفاده قرار می‌گیرند.

اصطلاحات عدم تعادل لینکاژی و مکان‌یابی ارتباطی در مقالات اغلب بجای هم استفاده می‌شوند. در واقع نقشه‌یابی ارتباطی به ارتباط شدید یک نشانگر مولکولی و یک صفت فنوتیپی اشاره دارد، در حالی‌که نقشه‌یابی پیوستگی به پیوستگی غیرتصادفی دو نشانگر یا دو ژن یا دو QTL (Quantitative trait loci) یا ارتباط غیرتصادفی یک ژن یا یک QTL و یک مکان نشانگر اشاره می‌کند. بدین ترتیب نقشه‌یابی ارتباطی در حقیقت یکی از چندین مورد کاربرد LD (Linkage disequilibrium) است. به لحاظ آماری، نقشه‌یابی ارتباطی بیانگر کواریانس چندشکلی یک نشانگر و یک صفت مطلوب است، در صورتی‌که LD کواریانس چندشکلی‌های ارائه شده توسط دو نشانگر مولکولی یا دو ژن را نشان می‌دهد (Hedrick, 1987). در روش نقشه‌یابی ارتباطی، نیازی به تهیه جمعیت در حال تفرق نیست و از جمعیت‌های متنوع موجود برای شناسایی مکان‌های ژنومی پیوسته با صفات مورد مطالعه استفاده می‌شود. بنابراین امکان شناسایی بیشتر آلل‌های پیوسته با صفات مورد مطالعه وجود دارد. در این روش به دلیل رخداد نوترکیبی‌های زیاد در طول تاریخچه تکاملی گیاهان، دقت نقشه‌یابی بالاتر است و به راحتی می‌توان از نتایج آن در فرایند انتخاب به کمک نشانگر (Marker-assisted selection) استفاده نمود. در صورتی‌که در روش معمول نقشه‌یابی، تنها در تعدادی از نسل‌های تلاقی با خودگشتی میوز اتفاق می‌افتد (Moose & Mumm, 2008).

البته تاکنون مطالعات قابل توجهی در مورد تعیین جایگاه‌های ژنی صفات مختلف با استفاده از نقشه‌یابی پیوستگی در کتان روغنی و فیبری به‌ویژه ژرم‌پلاسما‌های جمع‌آوری شده از نقاط مختلف جهان انجام شده است (Cloutier *et al.*, 2012؛ Asgarinia *et al.*, 2013). اگرچه از روش مکان‌یابی ارتباطی نیز به‌منظور شناسایی آلل‌های مطلوب برای صفات مختلف در کتان مانند عملکرد فیبر (Choudhary *et al.*, 2017)، عملکرد دانه (Soto-Cerda *et al.*, 2017؛ Soto-Cerda *et al.*, 2014c؛ Soto-Cerda *et al.*, 2014a) و روغن دانه (Soto-Cerda *et al.*, 2014b) استفاده شده است.

مراقبت‌های زراعی لازم شامل مصرف کود، وجین علف‌های هرز، کنترل آفات و بیماری‌ها و آبیاری مزرعه بر اساس توصیه مرکز تحقیقات انجام شد.

ارزیابی ژنتیکی

DNA ژنومی ژنوتیپ‌ها به روش Cetyl (CTAB) (Ausubel *et al.*, 1995) (Trimethyl Ammonium Bromide) در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه استخراج شد. کمیّت و کیفیت DNAهای استخراج شده از برگ با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و اسپکتوفتومتری ارزیابی شد. تعداد ۹ آغازگر IRAP و ۴۵ ترکیب آغازگری REMAP (حاصل از ترکیب ۵ آغازگر مبتنی بر توالی‌های ریزماهواره با ۹ آغازگر IRAP) برای ارزیابی چندشکلی ادغامی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه استفاده شد (جدول ۲)، از این تعداد فقط ۱۲ آغازگر IRAP (۷ آغازگر منفرد و ۵ آغازگر ترکیبی) و ۱۹ آغازگر REMAP تکثیر شده و چندشکلی نشان دادند (جدول ۳). تکثیر قطعات DNA در یک واکنش ۲۰ میکرولیتری حاوی بافر PCR ده برابر، ۰/۲ میکرومولار dNTP، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۱۰ پیکومول آغازگر، ۰/۵ واحد آنزیم Tag DNA پلی‌مراز و ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی در دستگاه ترموسایکلر اپندورف مدل ۵۳۳۱ (هامبورگ، آلمان) انجام گردید. الگوی دمایی واکنش‌های PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در ۵۷ درجه سانتی‌گراد، دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۸٪ و بافر TBE 0.5X (Tris base-boric Acid-EDTA) در ولتاژ ۶۵ به مدت ۳ ساعت انجام شد. برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها از اتیدیوم بروماید استفاده شد.

استفاده شده است، ولی گزارش نسبتاً کمتری با استفاده از این روش برای صفات مهم کتان به‌ویژه برای ژنوتیپ‌های ایرانی وجود دارد. بر این اساس در این تحقیق در نظر است نقشه‌یابی ارتباطی برای برخی از خصوصیات مهم زراعی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP روی بخشی از ژرم‌پلاسم کتان بومی ایران انجام شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۵ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی ساعتلو، واقع در ۳۰ کیلومتری شمال‌غرب شهرستان ارومیه با عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۴۴ دقیقه و ۱۸ ثانیه شمالی و طول جغرافیایی ۴۵ درجه و ۱۰ دقیقه و ۵۳ ثانیه شرقی و با ارتفاع ۱۳۳۸ متر از سطح دریا اجرا شد. در این مطالعه، ۴۵ ژنوتیپ کتان زراعی (جدول ۱) تهیه شده از مؤسسه اصلاح نهال و بذر کرج به‌منظور ارزیابی ژنتیکی ۲۱ صفت زراعی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک، بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار روی خطوطی به طول دو متر کشت شدند. صفات مورد مطالعه شامل ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، طول گلبرگ (میلی‌متر)، عرض گلبرگ (میلی‌متر)، وزن ساقه اصلی (گرم)، وزن شاخه فرعی (گرم)، تعداد شاخه‌های اولیه، تعداد شاخه‌های ثانویه، تعداد کپسول ساقه اصلی، تعداد کپسول ساقه فرعی، وزن کپسول در بوته (گرم)، وزن برگ (گرم)، وزن هزاردانه (گرم)، عملکرد (کیلوگرم در هکتار)، عملکرد بیولوژیکی (کیلوگرم در هکتار)، شاخص برداشت، روز از کاشت تا سبز شدن، روز از کاشت تا گلدهی، روز از کاشت تا کپسول‌دهی، درصد روغن، درصد پروتئین و درصد نیتروژن بودند (Soto-Cerda *et al.*, 2014c; Sharma *et al.*, 2014; Hegary *et al.*, 2014; Choudhary *et al.*, 2017). در طول فصل زراعی

جدول ۱- مشخصات ۴۵ ژنوتیپ کتان (*Linum usitatissimum L.*) مورد استفاده در این مطالعه

کد ژنوتیپ‌ها	محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
TN97-2	کرمان-سیرجان	۵۶° ۰۸'	۲۹° ۵۲'	۲۴۸۰
TN97-3	کرمان-بردسیر	۵۵° ۴۰'	۲۹° ۳۰'	۱۶۵۰
TN97-5	زنجان-خدابنده	۴۸° ۳۵'	۳۶° ۰۷'	۱۳۲۶
TN97-6	کرمان-بردسیر-علی‌آباد	۵۲° ۴۴'	۳۱° ۲۱'	۱۶۲۵
TN97-10	شاهیندژ-باروق-نادرگلی	۳۶° ۴۰'	۴۶° ۳۴'	۱۴۰۶
TN97-11	شاهیندژ-کشاورز	۳۵° ۲۱'	۴۱° ۴۰'	۱۲۵۴
TN97-12	شهرکرد-کوه‌رنگ	۴۹° ۵۶'	۳۱° ۵۹'	۲۳۶۵
TN97-13	شاهیندژ-باروق-قرمزی بلاغ	۴۶° ۲۹'	۳۶° ۴۷'	۱۶۰۰
TN97-14	تکاب-قره‌بلاغ	۴۷° ۱۴'	۳۶° ۳۳'	۲۰۰۰
TN97-17	کرمان-شهر بابک	۵۵° ۰۷'	۳۰° ۰۶'	۱۸۳۵
TN97-18	شازند-هندودر	۴۹° ۱۰'	۳۳° ۴۰'	۱۸۵۰
TN97-19	کرمان-بافت	۵۶° ۵۲'	۲۹° ۱۸'	۲۴۵۰
TN97-21	کرمان-قلعه عسگر	۵۶° ۴۰'	۲۹° ۳۱'	۲۶۰۷
TN97-26	اصفهان	۵۱° ۳۵'	۳۲° ۵۰'	۱۳۲۰
TN97-27	شوشتر	۴۸° ۵۰'	۳۲° ۰۵'	۱۶۰
TN97-33	زابل	۶۱° ۴۱'	۳۰° ۵۴'	۴۸۲
TN97-51	شوشتر-شعیبیه	۴۸° ۵۱'	۳۲° ۱۶'	۶۰
TN97-53	بناب-روشت کوچک	۴۶° ۰۳'	۳۷° ۲۰'	۱۳۰۰
TN97-55	بناب-روشت بزرگ	۴۲° ۲۴'	۳۷° ۰۴'	۱۳۱۱
TN97-89	نقده-حسنلو	۴۵° ۲۴'	۳۷° ۰۴'	۱۴۵۰
TN97-90	شاهیندژ-آغچه مسجد	۴۶° ۲۹'	۳۶° ۴۷'	۱۶۰۰
TN97-91	شاهیندژ-باروق-قطار	۴۶° ۲۳'	۳۷° ۰۲'	۱۴۵۰
TN97-92	شاهیندژ-هولاسو	۴۶° ۲۵'	۳۷° ۰۳'	۱۵۵۰
TN97-93	تکاب-چمن	۴۶° ۳۰'	۳۷° ۰۱'	۲۰۰۰
TN97-94	میاندوآب-باروق-اشکه	۴۶° ۳۰'	۳۷° ۰۱'	۱۶۰۰
TN97-95	میاندوآب-باروق-نادرگلی	۴۶° ۲۴'	۳۶° ۵۸'	۱۴۷۰
TN97-96	ارومیه-گردنه قوشچی	۴۴° ۵۷'	۳۸° ۰۲'	۱۸۰۰
TN97-106	اردبیل-مشکین شهر	۴۷° ۴۰'	۳۸° ۲۰'	۱۹۰۰
TN97-112	اهواز-لالی	۴۹° ۱۹'	۳۲° ۱۷'	۴۳۰

ادامه جدول ۱-...

کد واریته‌ها	محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
TN97-113	اهواز-مسجدسلیمان	۴۹° ۱۵'	۳۱° ۵۹'	۲۵۰
TN97-114	اهواز-دزفول	۴۸° ۳۳'	۳۲° ۳۰'	۴۰۰
TN97-115	اهواز-جاده مسجدسلیمان	۴۹° ۰۵'	۳۲° ۰۵'	۲۴۷
TN97-167	کرمان-بافت-رابر	۵۶° ۵۲'	۲۹° ۱۸'	۲۴۵۰
TN97-177	کرمان-جاده قلعه عسگر	۵۶° ۴۰'	۲۹° ۳۱'	۲۵۹۶
TN97-209	تبریز-اسکو	۴۵° ۵۹'	۳۷° ۵۶'	۱۳۳۰
TN97-210	تبریز-سراب	۴۷° ۳۸'	۳۷° ۳۴'	۱۷۲۰
TN97-244	اردبیل-خلخال	۴۸° ۳۰'	۳۷° ۳۸'	۱۸۰۰
TN97-246	مرکزی-شازند	۴۹° ۷۰'	۳۳° ۲۵'	۲۰۰۵
TN97-249	خداپنده-کشک‌آباد	۴۸° ۴۸'	۳۵° ۴۲'	۱۷۰۰
TN97-273	اصفهان-چادگان	۵۰° ۱۳'	۳۲° ۳۲'	۲۹۳۲
TN97-274	شاهیندژ-هاچه سو	۳۶° ۳۸'	۳۶° ۵۰'	۱۵۷۸
TN97-290	خلخال-خوجین	۴۸° ۳۲'	۳۷° ۲۲'	۱۸۰۰
TN97-291	خلخال-هشجین	۴۸° ۳۴'	۳۷° ۲۰'	۱۵۶۲
TN97-301	دهگلان-بیان‌آباد	۳۷° ۲۴'	۳۵° ۲۰'	۱۶۵۰
TN97-302	شاهیندژ-جاده تکاب	۳۶° ۳۸'	۳۶° ۵۰'	۱۵۴۳

جدول ۲- اسامی و ساختار توالی آغازگرهای رتروترانسپوزونی مورد استفاده در پژوهش

توالی (5'-3')	آغازگرهای ISSR	توالی (5'-3')	آغازگرهای رتروترانسپوزون
(GA) ₈ C	UBC807	ATGACTAAATCTGCCTACTCATTCAACA	TP1IRAP
(AG) ₈ C	UBC808	ACGGCGGAGCCGATCCC GGGATGTGACA	TP2IRAP
(GA) ₈ A	UBC812	ATGTACACACCTATGTATCTGTACCCGGC	LTR6150
(GT) ₈ T	UBC821	CTCGCTCGCCACACATCAACCGGTTTA	LTR6149
(AC) ₈ T	UBC825	ACAACCTTTATACGGGATCTCCGTT	5'LTR1
-	-	CTTAATACGGGATCTCCCTTACTA	5'LTR2
-	-	GGGAACCAACCGTCACA	GAGA
-	-	CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC	NIKITA
-	-	TGTCACAGACCTGAAGAACA	LTR1

جدول ۳- نام آغازگرهای IRAP و REMAP مورد استفاده در این مطالعه

آغازگرهای REMAP	آغازگرهای REMAP	آغازگرهای IRAP ترکیبی	آغازگرهای IRAP منفرد
LTR1-UBC808	LTR1-UBC807	5'LTR1-5'LTR2	TP1IRAP
5'LTR2-UBC807	LTR1-UBC812	LTR6150-5'LTR1	LTR6150
5'LTR2-UBC808	5'LTR2-UBC812	LTR6150-NIKITA	5'LTR1
5'LTR1-UBC807	5'LTR1-UBC808	LTR6150-5'LTR2	5'LTR2
NIKITA-UBC807	NIKITA-UBC821	NIKITA-LTR1	GAGA
TP2IRAP-UBC807	NIKITA-UBC825	-	NIKITA
TP2IRAP-UBC808	TP2IRAP-UBC812	-	LTR1
GAGA-UBC812	GAGA-UBC825	-	-
LTR6149-UBC812	LTR6150-UBC808	-	-
-	LTR6149-UBC825	-	-

از نرم افزار STRUCTURE HARVESTER v.0.9.94 (Earl *et al.*, 2010) تعیین شد. ماتریس روابط خویشاوندی افراد (ماتریس Kinship) و تجزیه ارتباط به روش مدل خطی مخلوط (Mixed linear model: MLM) با نرم افزار Trait analysis by association, TASSEL 3:0 (Bradbury *et al.*, 2007) انجام گردید (evolution and linkage) و نشانگرهای پیوسته با صفات مورد بررسی در سطح معنی دار ۱٪ و ۵٪ مشخص شد. در مدل خطی مخلوط علاوه بر ساختار جمعیت (ماتریس Q)، روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت (ماتریس K) نیز در تجزیه ارتباط به عنوان متغیر کمکی در نظر گرفته می شود، بنابراین ارتباطات و پیوستگی های دروغین بین نشانگر و صفت به حداقل می رسد (Yu *et al.*, 2006؛ Zhang *et al.*, 2012).

نتایج

آماره های توصیفی

مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین، دامنه تغییرات و ضریب تغییرات فنوتیپی برای هر یک از صفات زراعی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک در ژنوتیپ های مورد مطالعه محاسبه و خلاصه شد (جدول ۴). براساس نتایج بدست آمده، بالاترین ضریب تغییرات مربوط به عملکرد دانه و وزن

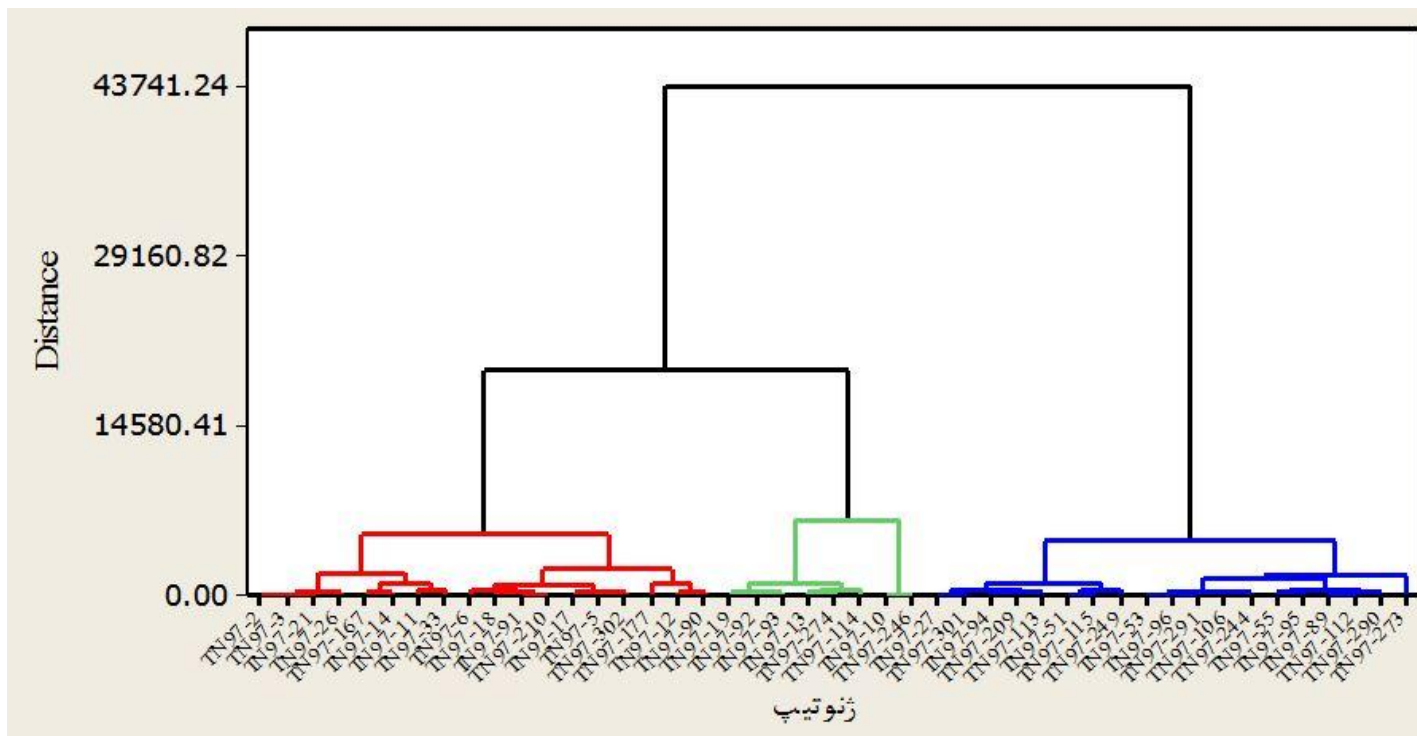
تجزیه های آماری مقادیر آماره های توصیفی و توزیع فراوانی صفات با استفاده از نرم افزار (16) Minitab محاسبه شد. گروه بندی ژنوتیپ ها براساس صفات زراعی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک با استفاده از روش تجزیه خوشه ای روی میانگین داده های اصلی انجام گردید. تجزیه خوشه ای پس از استاندارد کردن داده ها با محاسبه فواصل اقلیدسی و روش Ward در نرم افزار (16) Minitab انجام شد. باندهای حاصل از هر دو نشانگر به صورت یک (حضور) و صفر (عدم حضور) امتیازدهی و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار جمعیت استفاده شد. ساختار جمعیت و تعداد زیرجمعیت های احتمالی براساس داده های حاصل از تلفیق دو نشانگر با استفاده از نرم افزار STRUCTURE 2.3.4 و مدل Bayesian (Pritchard *et al.*, 2000) در حالت Admixture با ۵۰۰۰۰ Burn-in و ۵۰۰۰۰ بار تکرار MCMC در مقادیر مختلف K از ۱ تا ۱۰ (۵ تکرار برای هر K) تعیین شد. ماتریس سهم عضویت (Q: Q-matrix) و همچنین میانگین شاخص تثبیت (Fixation index: Fst) برای زیرگروه های احتمالی نیز با استفاده از همین نرم افزار برآورد گردید. عدد K بهینه (تعداد زیرجمعیت های احتمالی) براساس روش Delta K (Evanno *et al.*, 2005) با استفاده

بالاترین ریشه روی (Roys Largest Root) (۱۰/۱۶) در سطح احتمال ۱٪ معنی دار شدند. بنابراین به طور قاطع می‌توان نتیجه گرفت که بین بردار میانگین‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشته است. از سوی دیگر به منظور بررسی صحت گروه‌بندی‌های بدست‌آمده از روش تجزیه خوشه‌ای، از تجزیه تابع تشخیص استفاده شد که نتایج آن در جدول ۵ آمده است. نتایج تجزیه تابع تشخیص نشان داد که تمامی ژنوتیپ‌ها به طور صحیح گروه‌بندی شده‌اند و میزان موفقیت کل تابع تشخیص، ۱۰۰٪ بود.

صد دانه (به ترتیب ۲۱/۹۲٪ و ۱۹/۱۸٪) بود. تجزیه خوشه‌ای به روش Ward، ۴۵ ژنوتیپ مورد مطالعه را در ۳ گروه اصلی قرار داد (شکل ۱). ۱۹ ژنوتیپ در گروه اول، ۸ ژنوتیپ در گروه دوم و ۱۸ ژنوتیپ در گروه سوم قرار گرفتند. به منظور تأیید اختلافات بین گروه‌ها، تجزیه واریانس چندمتغیره بر پایه طرح کاملاً تصادفی برای صفات مورد نظر انجام شد که در آن، هر چهار آماره ویلکس لامبدا (Wilks Lambda) (۰/۰۳۵)، اثر پیلای (Pillais Trace) (۱/۴۴۹)، اثر هتلینگ (Hotellings Trace) (۱۱/۲۸) و

جدول ۴- حداقل، حداکثر، میانگین و ضریب تغییرات فنوتیپی صفات مورد بررسی در ۴۵ ژنوتیپ کتان

صفات مورد مطالعه	حداقل	حداکثر	میانگین	ضریب تغییرات (%)
ارتفاع بوته	۲۹/۰۳	۴۷/۵	۴۰/۲۷	۶/۲۶
طول گلبرگ	۵	۱۱	۷/۳۶	۹/۷۲
عرض گلبرگ	۴	۸	۵/۵۶	۷/۰۷
وزن ساقه اصلی	۰/۰۵	۱/۶	۰/۵۵	۱۱/۱۵
وزن شاخه فرعی	۰/۰۲	۰/۱۸	۰/۰۷	۴/۶۲
تعداد شاخه اولیه	۴	۲۱	۱۰/۹۷	۱۰/۵۸
تعداد شاخه ثانویه	۸	۳۹	۲۱/۳۵	۶/۴۷
تعداد کپسول ساقه اصلی	۱۳	۸۲	۳۰/۷۱	۱۳/۴۵
تعداد کپسول ساقه فرعی	۲۵	۲۰۶	۹۸/۱۱	۸/۸۹
وزن کپسول در بوته	۰/۵۲	۱۷/۰۴	۳/۶۳	۹/۷۰
وزن برگ	۱/۲۵	۴/۸۳	۲/۳۸	۱۰/۱۱
وزن صد دانه	۰/۳۲	۰/۶۳	۰/۴۶	۱۹/۱۸
عملکرد دانه	۹۸/۸	۱۸۴۰	۹۴۶/۳۹	۲۱/۹۲
عملکرد بیولوژیکی	۶۲/۸	۷۳۳۵/۴	۳۳۰۳/۵	۱۵/۴۴
شاخص برداشت	۰/۱۴	۰/۵۶	۰/۳۲	۱۲/۰۶
روز از کاشت تا سبز شدن	۴	۱۰	۶/۴	۹/۲۱
روز از کاشت تا گلدهی	۳۳	۵۴	۳۸/۸۳	۱۰/۰۷
روز از کاشت تا کپسول‌دهی	۴۲	۶۰	۴۷/۱۹	۱۲/۳۱
درصد روغن	۴۶/۲	۵۶/۰۸	۵۰/۲۹	۱۱/۰۹
درصد پروتئین	۱۶/۳۵	۲۲/۵۷	۱۹/۷۹	۱۵/۳۷
درصد نیتروژن	۲/۸۹	۳/۴۴	۳/۱۷	۱۴/۰۵



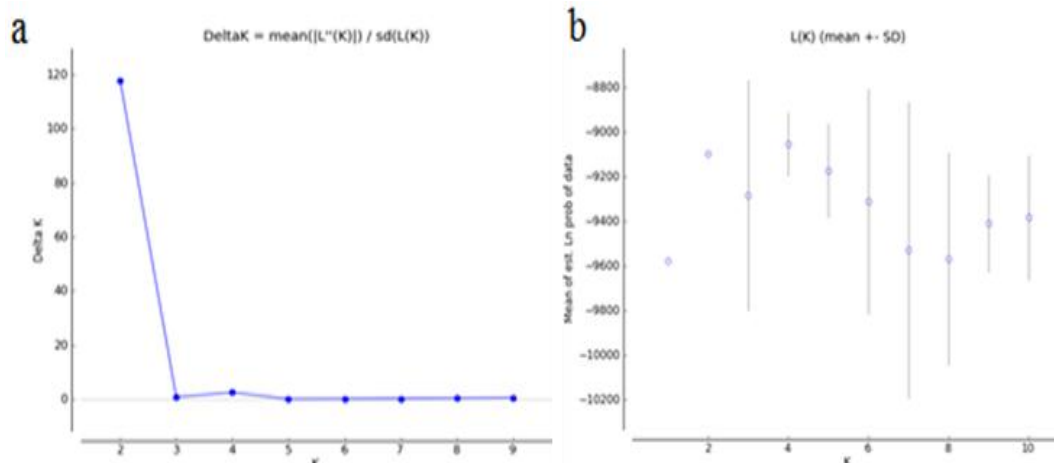
شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای ۴۵ ژنوتیپ کتان زراعی مورد مطالعه براساس ۲۱ صفت زراعی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک با استفاده از روش Ward و مربع فاصله اقلیدسی

جدول ۵- نتایج تجزیه تابع تشخیص برای صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های کتان

جمع کل	گروه‌های پیش‌بینی شده بر اساس تجزیه تابع تشخیص			خوشه	
	۳	۲	۱		
۱۹	۰	۰	۱۹	۱	مجموع
۸	۰	۸	۰	۲	اصلی
۱۸	۱۸	۰	۰	۳	
۱۰۰	۰	۰	۱۰۰	۱	درصد
۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۲	
۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۳	

محاسبه متوسط شاخص تثبیت برای هر گروه برآورد شد. در باریلات ارائه شده برای ۴۵ ژنوتیپ، محور افقی مربوط به ژنوتیپ‌ها و محور عمودی سهم تعلق هر ژنوتیپ به هر گروه را نشان می‌دهد (شکل ۳). همچنین در این پلات هر گروه با رنگی متمایز مشخص شده است که دو رنگ مجزا از هم برای هر ژنوتیپ نشان‌دهنده تعلق آن ژنوتیپ به یکی از دو گروه یا هر دو گروه است. متوسط شاخص تثبیت برای گروه‌های احتمالی I و II به ترتیب ۰/۱۸ و ۰/۰۲ بود.

بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP هفت آغازگر منفرد، پنج ترکیب آغازگری IRAP و ۱۹ ترکیب آغازگری REMAP الگوی باندی چندشکل و قابل امتیازدهی تولید کردند. در کل ۳۳۹ مکان تکثیر شد که از این تعداد، ۲۶۳ مکان (۷۷/۵۸٪) چندشکل بودند. در بررسی ساختار جمعیت براساس مقادیر ΔK و $\text{LnP}(D)$ دو زیر جمعیت (شکل ۲) در بین ۴۵ ژنوتیپ مورد استفاده مشخص و مقدار $K=2$ مناسب‌ترین عدد برای

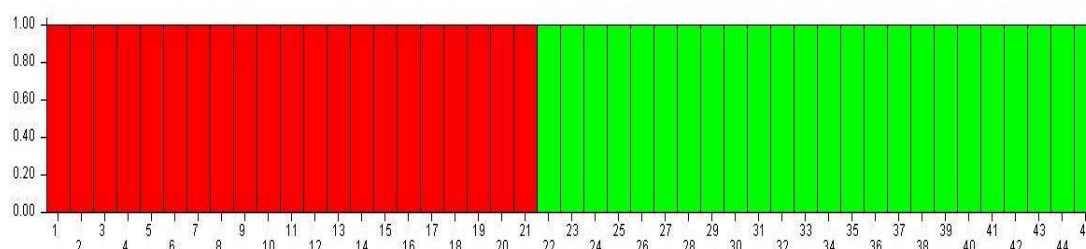


شکل ۲- نمودارهای دوبعدی برای تعیین تعداد مناسب زیرگروه‌های احتمالی در ژنوتیپ‌های کتان زراعی

مورد مطالعه ($K=2$) براساس نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون IRAP و REMAP با استفاده از نرم‌افزار Structure Harvester.

(a) ΔK برای اختلاف تعداد زیرجمعیت‌ها (b) تخمین $\text{LnP}(D)$

از زیرجمعیت‌های احتمالی (K) از ۱ تا ۱۰



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر مدل Bayesian برای ۴۵ ژنوتیپ کتان مورد مطالعه براساس

۱۲ آغازگر IRAP و ۱۹ آغازگر REMAP (K=۲)

هر رنگ یک زیر جمعیت یا خوشه را نشان می‌دهد.

اعداد روی محور افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به هر خوشه را نشان می‌دهد.

جدول ۶- نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه در ۴۵ ژنوتیپ کتان

R ²	P-value	نوع مارکر	مکان	صفت
۰/۱۶۵	۰/۰۰۴۱	REMAP	LTR1-UBC808-2	ارتفاع بوته
۰/۱۱۲	۰/۰۰۷۰	REMAP	5'LTR2-UBC812-3	طول گلبرگ
۰/۲۰۱	۰/۰۰۳۳	REMAP	NIKITA-UBC821-2	عرض گلبرگ
۰/۱۰۵	۰/۰۰۵۱	REMAP	LTR1-UBC807-4	وزن ساقه اصلی
۰/۱۶۲	۰/۰۰۱۲	IRAP	NIKITA-3	
۰/۱۵۸	۰/۰۰۲۸	REMAP	TP2IRAP-UBC812-10	تعداد کپسول ساقه اصلی
۰/۲۱۶	۰/۰۰۸۸	REMAP	LTR1-UBC807-4	
۰/۱۹۳	۰/۰۰۹۱	REMAP	GAGA-UBC825-11	تعداد کپسول ساقه فرعی
۰/۱۵۶	۰/۰۰۴۷	REMAP	LTR6149-UBC812-9	وزن کپسول در بوته
۰/۱۰۲	۰/۰۰۱۷	IRAP	LTR6150-7	
۰/۱۱۹	۰/۰۰۳۸	IRAP	TP1IRAP-10	وزن برگ
۰/۱۷۲	۰/۰۰۶۱	IRAP	LTR6150-5'LTR1-3	
۰/۱۹۱	۰/۰۰۸۳	REMAP	TP2IRAP-UBC808-6	وزن صد دانه
۰/۱۶۹	۰/۰۰۳۹	REMAP	NIKITA-UBC807-5	
۰/۱۲۸	۰/۰۰۱۶	REMAP	LTR1-UBC808-2	
۰/۱۹۹	۰/۰۰۱۳	IRAP	LTR6150-NIKITA-8	
۰/۲۱۸	۰/۰۰۸۲	REMAP	NIKITA-UBC821-3	عملکرد دانه
۰/۱۰۴	۰/۰۰۵۵	REMAP	LTR1-UBC812-6	

ادامه جدول ۶-

R ²	P-value	نوع مارکر	مکان	صفت
۰/۱۵۸	۰/۰۰۲۶	REMAP	LTR1-UBC807-6	
۰/۱۷۳	۰/۰۰۷۹	IRAP	LTR6150-NIKITA-10	
۰/۱۲۲	۰/۰۰۱۱	REMAP	LTR6149- UBC825-3	عملکرد بیولوژیکی
۰/۱۰۶	۰/۰۰۳۷	REMAP	LTR1-UBC807-3	
۰/۲۰۶	۰/۰۰۶۸	REMAP	NIKITA-UBC807-3	شاخص برداشت
۰/۱۸۸	۰/۰۰۱۲	REMAP	5'LTR2-UBC812-4	روز از کاشت تا گلدهی
۰/۱۵۹	۰/۰۰۵۲	IRAP	5'LTR1-5'LTR2-7	روز از کاشت تا کپسول‌دهی
۰/۱۴۲	۰/۰۰۹۲	IRAP	NIKITA-LTR1-9	درصد روغن
۰/۱۳۰	۰/۰۰۳۹	REMAP	TP2IRAP-UBC807-7	
۰/۱۹۸	۰/۰۰۸۱	REMAP	5'LTR1-UBC808-10	درصد پروتئین
۰/۱۷۱	۰/۰۰۷۴	REMAP	TP2IRAP-UBC808-5	

تجزیه ارتباط

وزن برگ، عملکرد بیولوژیکی، درصد روغن و درصد پروتئین، یک مکان پیوسته با ارتفاع بوته، طول گلبرگ، عرض گلبرگ، تعداد کپسول ساقه فرعی، شاخص برداشت، روز از کاشت تا گلدهی و روز از کاشت تا کپسول‌دهی شناسایی شد. بیشترین تعداد مکان پیوسته (چهار مکان) برای صفات وزن صد دانه و عملکرد دانه و کمترین تعداد (یک مکان) برای صفات ارتفاع بوته، طول گلبرگ، عرض گلبرگ، تعداد کپسول ساقه فرعی، شاخص برداشت، روز از کاشت تا گلدهی و روز از کاشت تا کپسول‌دهی شناسایی شد (جدول ۶).

بحث

بیشترین ضریب تغییرات برای صفات عملکرد دانه و وزن صد دانه مشاهده شد. در واقع ژنوتیپ‌های کتان مورد بررسی برای این صفات بیشترین تنوع را نشان دادند. تنوع زیاد برای یک صفت در مواد اصلاحی موفقیت پروژه‌های اصلاحی را تضمین می‌کند. این تنوع می‌تواند در مطالعه

در این مطالعه، به منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های مختلف کتان زراعی، تجزیه ارتباط براساس مدل خط عمومی (GLM: General linear model) وابسته به مدل Q و همچنین مدل خطی مخلوط وابسته به مدل Q+K با استفاده از نرم‌افزار TASSEL انجام گردید. در کل براساس مدل خطی مخلوط (MLM) از ۳۳۹ مکان تکثیری، ۲۹ مکان (۲۱ مکان REMAP و ۸ مکان IRAP) با ۱۶ صفت در سطح معنی‌دار ۱٪ ($P \leq 0.01$) پیوستگی نشان دادند (جدول ۴). مقدار شاخص R^2 (ضریب تغییرات فنوتیپی توجیه شده) از ۰/۱۰۲ (LTR6150-7) تا ۰/۲۱۸ (NIKITA-UBC821-) (3) متغیر بود. مقدار احتمال (P-value) از ۰/۰۰۱۱ (NIKITA-LTR1-) تا ۰/۰۰۹۲ (LTR6150-UBC825-3) (9) متغیر بود. تعداد چهار مکان پیوسته با صفات وزن صد دانه و عملکرد دانه، سه مکان پیوسته با شاخص برداشت، دو مکان پیوسته با وزن ساقه اصلی، تعداد کپسول ساقه اصلی،

یک جمعیت، حاصل انتخاب و در سطوح بالاتر اختلاط در آن جمعیت می‌باشد و منجر به افزایش عدم تعادل لینکاژی بین نشانگرهای غیر پیوسته می‌شود (Rostok *et al.*, 2006). بنابراین با در نظر گرفتن ساختار جمعیت در مطالعات نقشه‌یابی ارتباطی به منظور شناسایی واریانت‌های (متغیرهای) کمیاب در مکان‌هایی که بین جمعیت‌ها متغیر هستند، ولی به‌طور شایعی درون زیرجمعیت‌ها تثبیت شده‌اند، از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (Breseghello & Sorrells, 2006).

نقشه‌یابی ارتباطی براساس مبنای ژنتیکی مرتبط با صفات متنوع به‌طور موفقیت‌آمیزی در گیاهان دارویی انجام شده است (Choudhary *et al.*, 2017). نقشه‌یابی ارتباطی به‌منظور تشخیص و شناسایی ارتباط بین نشانگر-صفت نیازمند وجود تنوع ژنتیکی و فنوتیپی بالا در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد (Zhu *et al.*, 2008). وجود ساختار و روابط خویشاوندی در جمعیت مورد مطالعه منجر به ایجاد ارتباط کاذب نشانگر-صفت در نقشه‌یابی ارتباطی می‌شود (Soto-Cerda *et al.*, 2014b). مدل‌های مختلفی برای کاهش نتایج مثبت کاذب در تجزیه ارتباط مورد استفاده قرار می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به ماتریس K در داخل مدل K و ماتریس Q در داخل مدل Q اشاره نمود. مدل دیگر Q+K می‌باشد که ترکیبی از دو مدل قبلی است و تأثیر آن در کاهش نتایج مثبت کاذب بیشتر از دو مدل Q و K است (Yan *et al.*, 2009). اطلاعات نشانگری بدست‌آمده از نقشه‌های پیوستگی، محدودیت‌هایی همانند در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق، نبود لینکاژ مناسب بین صفات گیاهی و نشانگرهای مولکولی و زمان ناکافی، کارایی این نقشه‌ها را در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات گیاهی کاهش می‌دهد (Gupta *et al.*, 2005). با توجه به اینکه روش تجزیه ارتباطی با از بین بردن این محدودیت‌ها و همچنین با در نظر گرفتن ساختار و روابط خویشاوندی و حذف ارتباط دروغین نشانگر-صفت، اطلاعات نشانگری مناسبی را در اختیار محققان قرار می‌دهد، در این تحقیق از روش مدل خطی مخلوط برای

تجزیه ارتباطی حاضر مفید واقع شود، زیرا در روش تجزیه ارتباطی عامل‌های مرتبط با چندشکلی‌های فنوتیپی در جمعیت‌های متنوع‌تر از جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والد مشخص همانند ژنوتیپ‌های غیرخویشاوند جستجو می‌شوند. بنابراین، وقوع وقایع نوترکیبی در طول تاریخ تکاملی این جمعیت‌های با تنوع زیاد که معمولاً چندین نسل دورتر از جد مشترک خود هستند، باعث شکست بلوک‌های عدم تعادل پیوستگی درون ژنوم می‌شوند. به‌عبارت دیگر، در این نقشه‌یابی تمام رویدادهای میوزی که در طول تاریخچه تکاملی گیاه انباشه شده است، در نظر گرفته می‌شود، در صورتی‌که در روش‌های معمول نقشه‌یابی فقط در تعدادی از نسل‌های تلاقی یا خودگشنی، میوز اتفاق می‌افتد. بنابراین وجود تنوع زیاد در جمعیت‌های مورد بررسی برای وضوح و دقت بیشتر نتایج حاصل ضروری به نظر می‌رسد که این تنوع از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی در جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق مشاهده می‌شود. در بررسی تنوع زراعی و ژنتیکی ۱۳۰ ژنوتیپ کتان زراعی توسط Choudhary و همکاران (۲۰۱۷)، بیشترین تنوع برای عملکرد دانه، وزن فیبر خشک و روز تا ۵۰٪ گلدھی گزارش شد.

در مطالعات ژنتیکی یکی از ارکان اساسی در تجزیه ارتباط و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات، بررسی ساختار جمعیت است، بنابراین ابتدا ساختار جمعیت مورد مطالعه با استفاده از ۱۲ آغازگر IRAP (۷ آغازگر منفرد و ۵ آغازگر ترکیبی) و ۱۹ آغازگر REMAP مورد بررسی قرار گرفت. این آغازگرها در کل ۳۳۹ مکان ژنومی را تکثیر نمودند که ۷۷/۵۸٪ مکان‌های تکثیری دارای چندشکلی بودند. چندشکلی نسبتاً بالای حاصل در این پژوهش را می‌توان به فعالیت بالای رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم کتان و درج آنها در نواحی یوکروماتینی و ژنی و وسعت مناطق جغرافیایی نمونه‌برداری شده نسبت داد (Smykal *et al.*, 2011). تجزیه ساختار جمعیت براساس تمامی نشانگرهای مورد مطالعه نشان داد که ۴۵ ژنوتیپ کتان در $k=2$ به دو گروه (رنگ سبز و قرمز) تقسیم‌بندی شد (شکل ۳). ساختار

بررسی ارتباط نشانگر-صفت در ژنوتیپ‌های کتان زراعی ایرانی استفاده شد که در نهایت ۲۹ مکان پیوسته با ۱۶ صفت شناسایی شد. بیشترین تعداد نشانگر برای صفات وزن صد دانه و عملکرد دانه شناسایی شد. نتایج حاصل با نتایج Choudhary و همکاران (۲۰۱۷) که عرض کپسول (با ۱۲ مکان) و وزن فیبر خشک (با ۱۱ مکان) بیشترین تعداد مکان پیوسته را به خود اختصاص دادند مغایر بود. این تفاوت ممکن است به دلیل نوع نشانگرهای مورد استفاده و اندازه ژنوتیپ‌ها در هر تحقیق باشد. به طوری که مکان شناسایی شده برای صفت عملکرد دانه بیشترین مقدار R^2 را داشت. از این رو می‌توان گفت که قسمت اعظم تنوع فنوتیپی این صفت (۲۲٪) توسط این مکان توجیه می‌شود. کم بودن مقدار ضریب تبیین (R^2) برای بیشتر نشانگرهای مرتبط مؤید ماهیت توارث کمی و چندژنی صفات مورد ارزیابی می‌باشد و نشان‌دهنده توجیه بخش کمی از تغییرات این صفات از طریق مکان‌های ژنی شناسایی شده و تأثیر بیشتر اثر محیط روی تغییرات این صفات می‌باشد (Soto-Cerda *et al.*, 2014a; 2014c). در مطالعه Soto-Cerda و همکاران (۲۰۱۴b) نیز حداقل ضریب تبیین برای بیشتر صفات مورد مطالعه در کتان روغنی بدست آمد. در این تحقیق، برای برخی از صفات، مکان‌های مشترک شناسایی شد. به عنوان مثال مکان LTR1-UBC808-2 با صفات ارتفاع بوته و وزن صدانه و مکان LTR1-UBC807-4 با صفات وزن ساقه اصلی و تعداد کپسول ساقه اصلی پیوستگی نشان داد (جدول ۶).

بررسی ارتباط نشانگر-صفت در ژنوتیپ‌های کتان زراعی ایرانی استفاده شد که در نهایت ۲۹ مکان پیوسته با ۱۶ صفت شناسایی شد. بیشترین تعداد نشانگر برای صفات وزن صد دانه و عملکرد دانه شناسایی شد. نتایج حاصل با نتایج Choudhary و همکاران (۲۰۱۷) که عرض کپسول (با ۱۲ مکان) و وزن فیبر خشک (با ۱۱ مکان) بیشترین تعداد مکان پیوسته را به خود اختصاص دادند مغایر بود. این تفاوت ممکن است به دلیل نوع نشانگرهای مورد استفاده و اندازه ژنوتیپ‌ها در هر تحقیق باشد. به طوری که مکان شناسایی شده برای صفت عملکرد دانه بیشترین مقدار R^2 را داشت. از این رو می‌توان گفت که قسمت اعظم تنوع فنوتیپی این صفت (۲۲٪) توسط این مکان توجیه می‌شود. کم بودن مقدار ضریب تبیین (R^2) برای بیشتر نشانگرهای مرتبط مؤید ماهیت توارث کمی و چندژنی صفات مورد ارزیابی می‌باشد و نشان‌دهنده توجیه بخش کمی از تغییرات این صفات از طریق مکان‌های ژنی شناسایی شده و تأثیر بیشتر اثر محیط روی تغییرات این صفات می‌باشد (Soto-Cerda *et al.*, 2014a; 2014c). در مطالعه Soto-Cerda و همکاران (۲۰۱۴b) نیز حداقل ضریب تبیین برای بیشتر صفات مورد مطالعه در کتان روغنی بدست آمد. در این تحقیق، برای برخی از صفات، مکان‌های مشترک شناسایی شد. به عنوان مثال مکان LTR1-UBC808-2 با صفات ارتفاع بوته و وزن صدانه و مکان LTR1-UBC807-4 با صفات وزن ساقه اصلی و تعداد کپسول ساقه اصلی پیوستگی نشان داد (جدول ۶).

Choudhary و همکاران (۲۰۱۷) برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک در کتان زراعی از تجزیه ارتباط با استفاده از نشانگرهای SSR (Simple sequence repeat) و EST-SSR (Expressed sequence tag) استفاده نمودند و بیان کردند که این روش برای شناسایی مکان‌های آگاهی‌بخش مرتبط با صفات مورفولوژیک، مفید و مطمئن بوده و نشانگرهای مؤثر حاصل از این مطالعات می‌توانند در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر و تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی استفاده شوند.

Soto-Cerda و همکاران (۲۰۱۴c) به منظور بهبود نتایج و کاهش نتایج مثبت دروغین از مدل خطی مخلوط در بررسی صفاتی همانند وزن هزاردانه، ارتفاع گیاه، شروع گلدهی، پایان گلدهی و شاخه‌دهی گیاه در کتان استفاده و نتایج دقیق‌تری را در مقایسه با مدل‌های خطی منفرد K یا Q گزارش کردند (Soto-Cerda *et al.*, 2014c). در تحقیقی دیگر Soto-Cerda و همکاران (۲۰۱۳) در مکان‌یابی ارتباطی در ژرم‌پلاسم کتان روغنی و فیبری بیان کردند که استفاده از مدل خطی مخلوط به کاهش نتایج مثبت دروغین (ارتباطات کاذب نشانگر-صفت) و ارزیابی کمتر نتایج کمک زیادی می‌کند. در این مطالعه از روش مدل خطی مخلوط برای شناسایی مکان‌های پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفات زراعی-مورفولوژیک استفاده گردید که در نهایت ۲۱ مکان پیوسته با ۲۰ صفت شناسایی شد. Soto-Cerda و همکاران (۲۰۱۴a) با استفاده از نشانگرهای SSR، نه نشانگر را در Pale flax و پنج نشانگر را در کتان زراعی شناسایی نمودند که رابطه معنی‌داری با صفات مختلف زراعی-مورفولوژیک نشان دادند.

ایران با شرایط اقلیمی متنوع برای پاسخگویی به نیاز روغن و فیبر داخلی دارای قابلیت رشد کتان می‌باشد. دسترسی به منابع ژنتیکی متنوع گیاهی و نشانگرهای مناسب مرتبط با صفات مورد نظر دو شرط لازم برای توسعه ارقام خاص در کمترین زمان ممکن با دقت و پیش‌بینی می‌باشد. نتایج این تحقیق در دادن اطلاعات اولیه در مورد انتخاب غیرمستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید خواهد نمود. البته برای اطمینان از وجود ارتباط پیوستگی بین نشانگرها و صفات مختلف زراعی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک نیاز به تهیه جمعیت‌های تفرق مانند F_2 ، RIL (Recombinant inbred line) و DH (Double haploid) می‌باشد تا براساس این جمعیت‌ها نقشه‌های پیوستگی تهیه و بعد محل مکان‌های کنترل‌کننده این صفات را بر روی کروموزوم‌ها مشخص نمود (Russo *et al.*, 2012). نتایج این مطالعه کارایی استفاده از مدل خطی مخلوط را در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم مرتبط با دانه در

Mapping quantitative trait loci for powdery mildew resistance in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Crop science*, 53: 2462-2472.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M. and Varki, A.A., 1995. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York, 750p.

- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y. and Buckler, E.S., 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23: 2633-2635.

- Breseghello, F. and Sorrells, M.E., 2006. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*, 172: 1165-1177.

- Choudhary, Sh.B., Sharma, H.K., Kumar, A.A., Chowdhury, I., Maruthi, R.T. and Kak, A., 2017. Genetic diversity spectrum and marker trait association for agronomic traits in global accessions of *Linum usitatissimum* L. *Industrial Crops and Products*, 108: 604-615.

- Cloutier, S., Ragupathy, R., Miranda, E., Radovanovic, N., Reimer, E., Walichnowski, A., Ward, K., Rowland, G., Duguid, S. and Banik, M., 2012. Integrated consensus genetic and physical maps of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 125: 1783-1795.

- Earl, D.A., Louie, K.D., Bardeleben, C., Swift, C.C. and Jacobs, D.K., 2010. Rangewide microsatellite phylogeography of the endangered tidewater goby, *Eucyclogobius newberryi* (Teleostei: Gobiidae), a genetically subdivided coastal fish with limited marine dispersal. *Conservation Genetics*, 11: 103-114.

- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.

- Gupta, P.K., Rustgi, S. and Kulwal, P.L., 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*, 57: 461-485.

- He, L., Xiao, J., Rashid, Kh.Y., Yao, Zh., Li, P., Jia, G., Wang, X., Cloutier, S. and You, F.M., 2019. Genome-wide association studies for pasmo resistance in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 9: 1982.

- Hedrick, P.W., 1987. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. *Genetics*, 117: 331-341.

- Hegarty, S., Geleta, M., Bryngelsson, T., Asanaliev, A., Garkava-Gustavsson, L., Persson Hovmalm, H. and Ortiz, R., 2014. Genetic diversity analysis in *Phaseolus vulgaris* L. using morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61: 555-566.

ژنوتیپ‌های کتان زراعی مورد مطالعه نشان می‌دهد. البته بهتر است برای افزایش کارایی شناسایی نشانگرهای مرتبط، از نشانگرهای بیشتر و مؤثرتر مانند نشانگرهای SNP (Single nucleotide polymorphism) و SSR در مطالعات تجزیه ارتباط استفاده شود. همچنین لازم است نشانگرهای شناسایی شده در چنین مطالعاتی در جمعیت‌های بزرگ با تنوع ژنتیکی بالا مورد بررسی قرار گیرند تا از ارتباط آنها با صفات مورد مطالعه اطمینان حاصل شود و بدین ترتیب کارایی کاربرد این نشانگرها در برنامه‌های به‌نژادی کتان زراعی افزایش یابد. همچنین برای بهره‌برداری بهتر از ژرمپلاسم گیاه دارویی کتان، استفاده از راهبرد جدید تولید جمعیت‌های MAGIC (Multiparent advanced generation iner-cross) پیشنهاد می‌شود. هدف اصلی از تولید چنین جمعیت‌هایی ایجاد ژنوتیپ‌هایی با بیشترین صفات مؤثر و کارا در ژنوم گیاه مورد نظر و افزایش دقت و وضوح QTLها در نتیجه افزایش نوترکیبی است. چنین جمعیت‌ها و شیوه‌هایی راه‌های جدیدی برای تجزیه و تحلیل تجزیه ژنتیکی در گیاهان مهیا می‌کنند (Mackay *et al.*, 2014) و صفاتی که هتروزیس برای چنین جمعیت‌هایی مشاهده می‌شود، در نهایت مورد استفاده بهره‌برداران قرار گرفته و یکی از اهداف کشاورزی پایدار که بهبود ذخایر ژرمپلاسم (توسط به‌نژادگران) می‌باشد، تحقق می‌یابد.

سپاسگزاری

نویسندگان از مسئولان محترم دانشکده علوم و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه و همچنین از رئیس محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی که امکانات لازم را برای انجام این تحقیق فراهم نمودند، قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

- Asgarinia, P., Cloutier, S., Duguid, S., Rashid, Kh., Mirlohi, A.F., Banik, M. and Saeidi, Gh., 2013.

- Cloutier, S., 2013. Genetic characterization of a core collection of flax (*Linum usitatissimum* L.) suitable for association mapping studies and evidence of divergent selection between fiber and linseed types. *BMC Plant Biology*, 13: 78.
- Soto-Cerda, B.J., Diederichsen, A., Duguid, S., Booker, H., Rowland, G. and Cloutier, S., 2014a. The potential of pale flax as a source of useful genetic variation for cultivated flax revealed through molecular diversity and association analysis. *Molecular Breeding*, 34(4): 2091-2107.
- Soto-Cerda, B.J., Duguid, S., Booker, H., Rowland, G., Diederichsen, A. and Cloutier, S., 2014b. Association mapping of seed quality traits using the Canadian flax (*Linum usitatissimum* L.) core collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(4): 881-896.
- Soto-Cerda, B.J., Duguid, S., Booker, H., Rowland, G., Diederichsen, A. and Cloutier, S., 2014c. Genomic regions underlying agronomic traits in linseed (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by association mapping. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56: 75-87.
- Xie, D., Dai, Zh., Yang, Z., Tang, Q., Sun, J., Yang, X., Song, X., Lu, Y., Zhao, D., Zhang, L. and Su, J., 2018. Genomic variations and association study of agronomic traits in flax. *BMC Genomics*, 19: 512.
- Yan, J., Shan, T., Warburton, M., Buckler, E., McMullen, M. and Crouch, J., 2009. Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. *PLoS One*, 4: 8451.
- You, F.M., Jia, G., Xiao, J., Duguid, S.D., Rashid, K.Y., Booker, H.M. and Cloutier, S., 2017. Genetic variability of 27 traits in a core collection of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 8: 1636.
- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Vroh, B.I., Yamasaki, M. and Doebley, J.F., 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *National Genetics*, 38: 203-208.
- Zhang, Q., Wu, C., Ren, F., Li, Y. and Zhang, C., 2012. Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. *Australian Journal of Crop Science*, 6(6): 1131-1138.
- Zhu, C.M., Gore, E., Buckler, S. and Yu, J., 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome*, 1: 5-20.
- Jia, G. and Booker, H.M., 2018. Optimal models in the yield analysis of new flax cultivars. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 98: 897-907.
- Mackay, I.J., Bansep-Basler, P., Barber, T., Bentley, A.R., Cockram, J., Gosman, N., Greenland, A.J., Horsnell, R., Howells, R., Osullivan, D.M., Rose, G.A. and Howell, P.J., 2014. An eight-parent multiparent advanced generation inter-cross population for winter-sown wheat: creation, properties, and validation. *G3-Genes Genomes Genetics*, 4(9): 1603-1610.
- Moose, S.P. and Mumm, R.H., 2008. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*, 147: 969-977.
- Pritchard, J.K., Stephanes, M., Rosenberg, N.A. and Donnelly, P., 2000. Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics*, 67: 170-181.
- Ragupathy, R., Rathinavelu, R. and Cloutier, S., 2011. Physical mapping and BAC-end sequence analysis provide initial insights into the flax (*Linum usitatissimum* L.) genome. *BMC Genomics*, 12(1): 217.
- Rostok, N., Ramsay, L., MacKenzie, K., Cardle, L. and Bhat, P.R., 2006. Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 18656-18661.
- Russo, M.A., Ficco, D.B.M., Marone, D., De Vita, P., Vallega, V., Pasam, R.K., Sharma, R., Malosetti, M., van Eeuwijk, F.A. and Haseneyer, G., 2012. Genome-wide association studies for agronomical traits in a worldwide spring barley collection. *BMC Plant Biology*, 12: 16.
- Sharma, H.K., Sarkar, M., Choudhary, S.B., Kumar, A.A., Maruthi, R.T., Mitra, J. and Karmakar, P.G., 2016. Diversity analysis based on agro-morphological traits and microsatellite based markers in global germplasm collections of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Industrial Crops and Products*, 89: 303-315.
- Smykal, P., Bacova-Kertesova, N., Kalendar, R., Corander, J., Schlman, A.H. and Pavelek, M., 2011. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 122: 1385-1397.
- Soto-Cerda, B.J., Diederichsen, A., Ragupathy, R. and

Evaluation of the retrotransposon-based markers in identifying the loci associated with yield and some plant characteristics in Iranian flax (*Linum usitatissimum* L.) genotypes

H. Abbasi Holasou^{1*}, F. Rahmani², M. Hoseinzadeh³ and A. Hassanzadeh Ghorttapeh⁴

1*- Corresponding author, Postdoctoral student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran, E-mail: hossein.pdf55@gmail.com

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

3- M.Sc. graduated, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

4- Seed and Plant Improvement Department, West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Urmia, Iran

Received: April 2020

Revised: August 2020

Accepted: August 2020

Abstract

Since the economic value of a cultivar depends on its different characteristics, thus procedure of selection for several traits to achieve maximum economic value has always been considered by plant breeders. Therefore, accurate knowledge of the behavior and genetic relationship of these traits will help breeders to improve plant genotypes. In this study, 31 retrotransposon-based primers (12 IRAP and 19 REMAP primers) were used to identify molecular markers associated with 21 agronomic, morphological, and physiological traits in 45 different flax (*Linum usitatissimum* L.) genotypes based on a mixed linear model (MLM). Analysis of population structure by Bayesian method revealed two possible subgroups (K=2) in the population studied. Using MLM, a total of 29 loci associated with the 21 traits studied were identified ($P < 0.01$). The maximum number of associated loci was identified for 100-seed weight and seed yield traits. The existence of common markers among some traits studied, such as the significant relationship between LTR1-UBC808-2 marker with plant height and 100-seed weight, and LTR1-UBC807-4 with main stem weight and the number of capsules per the main stem can be due to pleiotropic effects or linkage between genomic regions involved in these traits. However, findings of the present study can be further strengthened with the inclusion of more markers putatively associated with economically important traits.

Keywords: Population structure, linkage disequilibrium, seed yield, Flax (*Linum usitatissimum* L.), mixed linear model.