

مطالعه ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مهم میوه در فندق با استفاده از آنالیز رگرسیونی چندمتغیره

محمد محمدزاده M.Sc.^۱، محمدرضا فتاحی مقدم Ph.D.^{۱*}، ذبیح‌اله زمانی Ph.D.^۱، عبدالله خدیوی خوب Ph.D.^{۲*}

۱- دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم باغبانی، صندوق پستی ۳۱۵۸۷، کرج، ایران
 ۲- دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم باغبانی، صندوق پستی ۳۸۱۵۶۸۳۴۹، اراک، ایران
 * پست الکترونیک نویسنده مسئول: fattahi@ut.ac.ir و a-khadivi@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۳

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق شناسایی نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR مرتبط با صفات ریخت‌شناسی مهم میوه در فندق (*Corylus avellana*) بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، رابطه بین نشانگرهای ISSR و RAPD با صفات مهم میوه (ابعاد و وزن نات و مغز) در ۳۵ ژنوتیپ فندق از طریق آنالیز رگرسیونی چندمتغیره (MRA) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: برخی از قطعات چندشکل ISSR و RAPD با صفات مورد مطالعه میوه فندق ارتباط و همبستگی نشان دادند. برخی از این نشانگرهای آگاهی‌بخش با بیش از یک صفت ارتباط نشان دادند که می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپیک QTL های مرتبط با هم در صفات مختلف باشد. به‌عنوان مثال، برخی از نشانگرهای آگاهی‌بخش با دو صفت طول نات و طول مغز همبستگی معنی‌دار نشان دادند که بیان‌کننده همبستگی مثبت این دو صفت با همدیگر می‌باشد. همچنین برخی از این نشانگرها با طول و وزن نات و وزن مغز و برخی دیگر با هر دو صفت وزن و طول مغز رابطه نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند در انتخاب والدین مناسب برای تولید جمعیت جهت نقشه‌یابی به کار روند. همچنین برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر به‌خصوص وقتی که اطلاعاتی از پایه ژنتیکی آن‌ها مانند نقشه لینکازی در دسترس نیست مفید باشد.

واژگان کلیدی: خصوصیات میوه، فندق، نشانگرهای مولکولی، آنالیز رگرسیونی

مقدمه

گونه فندق (*Corylus avellana*) از خانواده Betulaceae می‌باشد. جنس *Corylus* دارای ۲۵ گونه بوده که تنها ۱۰ گونه آن از نظر اقتصادی و به‌نژادی اهمیت دارند. اکثر گونه‌های فندق به‌صورت درختچه بوده و به‌ندرت به صورت درختی دیده می‌شوند. تاریخچه کشت آن به ۵۰۰۰ تا ۶۰۰۰ سال قبل از میلاد برمی‌گردد. در اروپا، فندق از پوشش‌های گیاهی غالب بوده ولی منشا دقیق آن مشخص نشده است. از نظر جغرافیایی دامنه پراکنش آن بسیار وسیع بوده و از سواحل پرتغال، ایرلند، جزایر آرکتیکا و قسمت غربی کوه‌های اورال و گسترش شمالی آن از نروژ تا روسیه می‌باشد ولی مناطق عمده کشت فندق در نزدیکی حوزه‌های بزرگ آبی که دارای زمستان‌های ملایم و تابستان‌های خنک می‌باشند، قرار دارد (۱). مناطق عمده کشت فندق ترکیه، ایتالیا، اسپانیا و آمریکا می‌باشند که این کشورها از نظر تولید فندق در رتبه‌های برتر جهان قرار دارند (۱). با وجود این که تنوع ژنتیکی فندق در ایران بالا می‌باشد، لیکن منشا اصلی آن در ایران چندان روشن نمی‌باشد. هر چند رویشگاه اصلی آن در منطقه حیران تا دیناچال در استان گیلان قرار دارد ولی مناطق عمده فندق‌کاری در ایران به حاشیه دریای خزر و نواحی کوهستانی محدود می‌شود. هنوز مجموعه جامع و کاملی مبنی بر جمع‌آوری ارقام و ژنوتیپ‌های فندق در ایران تاسیس نشده است. ایران با تولید بالغ بر ۱۴ هزار تن میوه فندق در رتبه هشتم دنیا قرار گرفته است ولی می‌تواند با اقدامات به‌نژادی و به‌زراعی به یکی از کشورهای عمده تولیدکننده فندق تبدیل شود. استان گیلان با بیش از ۱۲ هزار تن تولید فندق در صدر قرار دارد و پس از آن استان‌های قزوین با ۱۷۸۰ تن، مازندران با ۱۳۲۰ تن و اردبیل با ۵۰۰ تن قرار دارند. عمل‌کرد فندق در ایران پایین بوده و به حداکثر یک تن در هکتار می‌رسد، در حالی که در کشورهای اصلی تولیدکننده این مقدار ۴/۵ تا ۵ تن در هکتار می‌باشد (۲).

در طی سال‌های گذشته نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA به‌طور گسترده‌ای برای اهداف مختلف در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳). پیشرفت دائمی در بهبود اصلاح گونه‌های گیاهی به تنوع ژنتیکی گیاهان بستگی دارد. بنابراین شناسایی و مدیریت این تنوع برای برنامه‌های اصلاحی لازم می‌باشد. به‌علاوه، آگاهی از تنوع ژنتیکی مدیریت حفاظت از ژرم‌پلاسما گیاهی را راحت‌تر می‌نماید. اگر چه نقشه‌یابی بر پایه مکان‌های صفات کمی (Quantitative trait loci, QTL) برای ردیابی

ژن‌های وابسته به این صفات مناسب می‌باشد اما این عمل وقت‌گیر و پرهزینه می‌باشد (۴). برای غلبه بر این محدودیت‌ها، شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت از طریق رگرسیون مناسب به‌نظر می‌رسد. آنالیز رگرسیونی چندمتغیره (Multiple regression analysis, MRA) بر پایه رابطه بین نشانگرهای مولکولی (به‌عنوان متغیر مستقل) و صفات ریخت‌شناسی (به‌عنوان متغیر وابسته) روش مناسبی برای شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت می‌باشد. این آنالیز ضریب تبیین (R^2) را تعیین می‌کند که این ضریب میزان رابطه صفت ریخت‌شناسی را با نشانگر مولکولی نشان می‌دهد (۵).

در دسترس بودن تعداد زیادی از نشانگرهای مولکولی و صفات ریخت‌شناسی می‌تواند به مطالعه آنالیز رگرسیونی بین این نشانگرها و صفات ریخت‌شناسی کمک نماید. اکثر مطالعات تجزیه ارتباطی مبتنی بر پیوستگی، امکان ردیابی نشانگرهای مختلف مرتبط با صفات ریخت‌شناسی را مقدور نموده است، ولی اغلب به‌دلیل فاصله زیاد بین نشانگر و صفت ریخت‌شناسی، انتخاب با کمک نشانگر همراه و همچنین جداسازی و همسانسازی ژن مورد نظر را مشکل ساخته است و به‌علاوه فقط از تعداد کمی ژنوتیپ به‌عنوان والد برای نقشه‌یابی ژن‌ها استفاده شده است. در سال‌های اخیر برای فائق آمدن بر این مشکل از آنالیز رگرسیونی بین نشانگرها و صفات ریخت‌شناسی استفاده شده است که نه تنها نقشه‌یابی ژن‌ها را با درجه اطمینان بالاتری ممکن می‌سازد، بلکه شناسایی نشانگرهایی که در نقشه‌یابی مبتنی بر لینکاژ قابل ردیابی نبودند را مقدور می‌سازد (۳، ۶ و ۷).

استفاده از نشانگرهای مولکولی در تعیین نشانگرهای وابسته به صفت در برخی از گیاهان استفاده شده است و نتایج خوبی نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال رابطه بین داده‌های حاصل از تکنیک‌های مولکولی مختلف با صفات بیوشیمیایی در گونه‌های جنس *Morus* (۸) و گونه *Valeriana jatamansi* (۹) بررسی شده است. همچنین رابطه این نشانگرها با صفات ریخت‌شناسی در گونه‌هایی مانند کتان (۱۰ و ۱۱)، گندم (۱۲)، ذرت (۱۳)، *Morus laevigata* (۱۴)، انار (۱۵) و گیلاس (۱۶) بررسی شده است. تکنیک RAPD (Random amplified polymorphic DNA) بر مبنای تکثیر قطعات تصادفی DNA انجام می‌شود و نیازی به آگاهی و اطلاع از توالی DNA الگو ندارد. از مزایای دیگر این تکنیک می‌توان به هزینه کم، سادگی، سرعت بالا و نیاز

مطالعات مولکولی: استخراج DNA از نمونه های برگي بالغ و تازه با استفاده از روش Doyle و Doyle (۲۰) صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز DNA در ژل آگارز با غلظت یک درصد مشخص گردید و به کمک آن ها غلظت یکسان از DNA (۵ نانوگرم در میکرولیتر) آماده شد. برای رقیق سازی از آب مقطر دوبار تقطیر استریل استفاده شد. واکنش PCR برای تکنیک RAPD بر اساس روش تشریح شده توسط Khadivi-Khub و همکاران (۲۱) صورت گرفت و این واکنش برای تکنیک ISSR بر اساس روش بکار برده شده توسط Thimmappaiah و همکاران (۲۲) انجام شد. برای هر مخلوط واکنش، مقدار یک میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت ۵ نانوگرم بر میلی لیتر به ۲۴ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل dNTPS، Taq DNA polymerase، primer و MgCl₂ (شرکت سیناژن، ایران) و آب دوبار تقطیر استریل اضافه گردید که در نهایت حجم محلول واکنش PCR به ۲۵ میکرولیتر رسید و مخلوط حاصله تحت واکنش زنجیره ای پلی مرز در دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل I-Cycler قرار گرفت. برای تکنیک ISSR، واکنش زنجیره ای پلیمرز با واسرشت سازی اولیه DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت چهار دقیقه آغاز و با ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه برای واسرشت سازی، اتصال پرایمرها به رشته الگو به مدت ۵۰ ثانیه (دمای اتصال پرایمرها از ۴۸ تا ۵۷ درجه سانتی گراد متناسب با پرایمر متغیر بود)، گسترش (بسط) رشته جدید به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه دنبال شد. برای تکنیک RAPD، چرخه های حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت چهار دقیقه برای واسرشت سازی اولیه، تعداد ۳۵ چرخه با دمای ۹۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه برای واسرشت سازی، دمای اتصال ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و دمای تکثیر قطعات ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه دمایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه برای تکمیل بسط بود. الکتروفورز محصول PCR در ژل آگاروز با غلظت ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

به مقدار کم DNA اشاره کرد (۱۴). به علاوه، تکنیک ISSR (Inter simple sequence repeat) شامل کاربرد تسوایی ریزماهوره به عنوان پرایمر در واکنش زنجیره ای پلیمرز به منظور تکثیر نشانگرهای چندآلی می باشد. این تکنیک روشی ساده، سریع و سودمند بوده و قابلیت تکرارپذیری بالایی دارد (۱۶).

نتایج تحقیقات بین المللی بیانگر تنوع وسیع ژرم پلاسما فنقد از نظر خصوصیات کمی و کیفی می باشد (۲، ۱۷، ۱۸ و ۱۹). ایران نیز دارای تنوع بالایی از فنقد می باشد ولی تاکنون رابطه رگرسیونی صفات ریخت شناسی با نشانگرهای مولکولی برای این گونه بررسی نشده است. بنابراین، هدف از این تحقیق شناسایی نشانگرهای RAPD و ISSR مرتبط با صفات ریخت شناسی مهم میوه در ۳۵ ژنوتیپ فنقد از آنالیز رگرسیونی چندمتغیره (MRA) می باشد. نتیجه این مطالعه به شناسایی ژن های مسئول بروز صفات مهم کمک می نماید که می تواند در برنامه های اصلاحی به کار رود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی مورد آزمایش و ارزیابی های ریخت شناسی: در این مطالعه ۳۵ رقم و ژنوتیپ فنقد (۲۹ ژنوتیپ ایرانی و شش رقم خارجی) مورد مطالعه قرار گرفتند (جدول ۱). اکثر ژنوتیپ های ایرانی در مناطق فنقد کاری ایران مانند استان های اردبیل و گلستان مورد استفاده قرار می گیرند. این ژنوتیپ ها از نظر ویژگی های مهم گل (زمان باز شدن گل نر و ماده، طول شاتون و مقدار دانه گرده) و میوه (طول، عرض، وزن و شکل نات، طول، عرض، وزن، رنگ و شکل مغز) تفاوت های بارزی با یکدیگر دارند. این درختان هشت ساله و در مراحل باردهی کامل بودند. برداشت میوه ها به شکل تصادفی از قسمت های مختلف درختان صورت گرفت. صفات مورد ارزیابی شامل صفات مربوط به نات (طول، عرض و وزن) و صفات مربوط به مغز (طول، عرض، وزن و درصد) بود. ارزیابی صفات در طی دو سال روی ۵۰ عدد میوه از هر ژنوتیپ انجام شد. صفات مربوط به ابعاد نات و مغز با استفاده از کولیس دیجیتالی اندازه گیری شدند. همچنین اندازه گیری صفات مربوط به وزن نات و مغز با استفاده از ترازوی الکترونیکی (Lutron, GM-500) با دقت یک صدم گرم انجام گرفت (جدول ۱). مقایسه میانگین ها با استفاده از نرم افزار SAS و آزمون دانکن انجام شد.

جدول ۱: میانگین صفات میوه در ژنوتیپ‌های فندق مورد مطالعه

| ژنوتیپ یا رقم | منشاء | طول نات (mm) | عرض نات (mm) | وزن نات (g) | طول مغز (mm) | عرض مغز (mm) | وزن مغز (g) | درصد مغز (%) |
|---------------|----------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| فندقلو ۱ | آذربایجان شرقی | ۱۳/۹۳ | ۱۵/۱۵ | ۰/۹۳ | ۸/۴۲ | ۸/۹۵ | ۰/۳۳ | ۳۲/۱۵ |
| فندقلو ۲ | آذربایجان شرقی | ۲۰/۱۴ | ۱۳/۰۳ | ۰/۹۰ | ۵/۹۷ | ۱۳/۶۶ | ۰/۴۰ | ۱۸/۷۵ |
| فندقلو ۳ | آذربایجان شرقی | ۱۵/۸۸ | ۱۷/۵۰ | ۰/۹۳ | ۹/۲۰ | ۸/۸۰ | ۰/۳۱ | ۱۳/۶۴ |
| فندقلو ۴ | اردبیل | ۱۵/۳۴ | ۱۷ | ۲/۰۰ | ۱۰/۸۸ | ۸/۸۳ | ۰/۳۷ | ۳۰/۰۹ |
| فندقلو ۵ | اردبیل | ۱۵/۵۱ | ۱۷/۵۲ | ۱/۹۵ | ۱۱/۲۵ | ۸/۸۵ | ۰/۲۶ | ۱۵/۷۸ |
| فندقلو ۶ | اردبیل | ۱۵/۴۵ | ۱۶/۷۸ | ۱/۳۷ | ۱۰/۵۹ | ۱۰/۳۶ | ۰/۴۲ | ۲۴/۲۸ |
| فندقلو ۷ | اردبیل | ۱۶/۹۳ | ۱۸/۲۰ | ۱/۹۰ | ۱۱/۷۰ | ۸/۶۵ | ۰/۳۰ | ۳۶/۱۵ |
| کلیبر ۱ | آذربایجان شرقی | ۱۶/۷۴ | ۱۵/۴۱ | ۱/۴۰ | ۱۱/۰۴ | ۹/۷۴ | ۰/۲۰ | ۳۳/۳۳ |
| کلیبر ۲ | آذربایجان شرقی | ۱۹/۲۲ | ۱۶/۳۹ | ۱/۳۰ | ۱۴/۷۶ | ۱۰/۵۰ | ۰/۲۱ | ۲۵/۳۱ |
| کلیبر ۳ | آذربایجان شرقی | ۱۵/۳۸ | ۱۵/۳۸ | ۰/۹۶ | ۱۰/۶۲ | ۸/۶۴ | ۰/۳۱ | ۱۷/۹۴ |
| کلیبر ۴ | آذربایجان شرقی | ۱۷/۲۸ | ۱۶/۴۳ | ۱/۵۸ | ۱۱/۵۸ | ۱۰/۰۳ | ۰/۲۵ | ۱۴/۸۳ |
| کلیبر ۵ | آذربایجان شرقی | ۱۷/۵۵ | ۱۶/۳۳ | ۱/۵۶ | ۱۲/۰۱ | ۱۱/۲۳ | ۰/۲۸ | ۲۱/۴۷ |
| کلیبر ۶ | آذربایجان شرقی | ۱۸/۳۳ | ۱۵/۹۹ | ۱/۵۵ | ۱۴/۶۶ | ۱۱/۲۳ | ۰/۲۳ | ۲۴/۲۴ |
| کلیبر ۷ | آذربایجان شرقی | ۱۹/۸۷ | ۱۷/۶۵ | ۱/۴۹ | ۱۵/۲۱ | ۱۱/۱۳ | ۰/۳۲ | ۱۹/۰۷ |
| کلیبر ۸ | آذربایجان شرقی | ۱۶/۳۲ | ۱۵/۲۱ | ۱/۳۲ | ۱۱/۳۵ | ۱۰/۱۵ | ۰/۳۲ | ۲۰/۰۰ |
| کلیبر ۹ | آذربایجان شرقی | ۱۷/۵۶ | ۱۶/۵۴ | ۱/۵۲ | ۱۱/۶۵ | ۱۰/۲۳ | ۰/۲۹ | ۶۹/۶۴ |
| کلیبر ۱۰ | آذربایجان شرقی | ۱۸/۹۹ | ۱۷/۶۵ | ۱/۶۰ | ۱۲/۳۹ | ۱۱/۹۰ | ۰/۳۲ | ۳۰/۱۷ |
| اشکورات ۱ | گیلان | ۱۶/۷۴ | ۱۷/۰۴ | ۱/۸۱ | ۱۲/۷۹ | ۱۳/۰۶ | ۰/۸۶ | ۴۶/۸۷ |
| اشکورات ۲ | گیلان | ۱۶/۴۹ | ۱۶/۱۶ | ۱/۶۳ | ۱۲/۴۰ | ۱۲/۰۴ | ۰/۷۵ | ۴۵/۵۹ |
| اشکورات ۳ | گیلان | ۱۸/۴۷ | ۱۶/۶۲ | ۱/۹۲ | ۱۳/۵۳ | ۱۲/۶۰ | ۰/۹۰ | ۴۶/۱۵ |
| اشکورات ۴ | گیلان | ۱۷/۱۳ | ۱۷/۱۹ | ۱/۹۳ | ۱۳/۵۷ | ۱۳/۲۵ | ۰/۸۸ | ۴۳/۲۴ |
| اشکورات ۵ | گیلان | ۱۷/۴۶ | ۱۶/۹۴ | ۱/۹۵ | ۱۳/۷۵ | ۱۳/۱۱ | ۰/۹۰ | ۴۵/۹۱ |
| اشکورات ۶ | گیلان | ۱۸/۰۶ | ۱۷/۵۲ | ۲/۲۲ | ۱۴/۱۰ | ۱۳/۴۰ | ۰/۹۶ | ۵۰/۴۲ |
| اشکورات ۷ | گیلان | ۱۶/۶۰ | ۱۶/۵۵ | ۱/۹۶ | ۱۴/۰۹ | ۱۳/۰۹ | ۰/۹۰ | ۴۱/۶۶ |
| دانشکده ۱ | کرج | ۱۷/۵۰ | ۱۳/۴۸ | ۱/۱۹ | ۱۴/۲۸ | ۱۰/۱۲ | ۰/۶۰ | ۸۳/۳۳ |
| دانشکده ۲ | کرج | ۲۰/۸۰ | ۱۵/۰۹ | ۱/۲۰ | ۱۵/۳۷ | ۷/۸۰ | ۰/۵۰ | ۵۴/۵۴ |
| دانشکده ۳ | کرج | ۲۲/۳۳ | ۱۳/۹۹ | ۱/۲۰ | ۲۱/۸۲ | ۱۰/۳۱ | ۱/۰۰ | ۵۱/۵۴ |
| دانشکده ۴ | کرج | ۲۰/۳۲ | ۱۴/۲۵ | ۱/۱۰ | ۱۸/۸۹ | ۱۲/۵۶ | ۰/۶۰ | ۱۳/۶۴ |
| دانشکده ۵ | کرج | ۱۶/۳۵ | ۱۲/۰۶ | ۰/۹۷ | ۱۴/۰۸ | ۹/۱۳ | ۰/۵۰ | ۸۳/۳۳ |
| نگرت | اسپانیا | ۱۷/۳۶ | ۱۸/۱۴ | ۱/۶۸ | ۱۲/۳۱ | ۱۲/۰۴ | ۱/۱۷ | ۳۱/۳۵ |
| مروبله | اسپانیا | ۲۰/۸۰ | ۱۸/۳۱ | ۲/۳۲ | ۱۴/۵۵ | ۱۱/۴۷ | ۰/۷۰ | ۴۰/۶۷ |
| لونگ | اسپانیا | ۲۲/۱۲ | ۱۹/۷۳ | ۲/۸۷ | ۱۵/۶۳ | ۱۱/۲۶ | ۰/۹۰ | ۵۲/۱۲ |
| سگوره | اسپانیا | ۱۷/۱۵ | ۱۸/۶۸ | ۱/۷۷ | ۱۱/۳۸ | ۱۲/۴۷ | ۰/۷۲ | ۴۵/۴۵ |
| رُند | ایتالیا | ۱۶/۳۸ | ۱۶/۰۴ | ۱/۶۵ | ۱۲/۵۳ | ۱۳/۲۳ | ۰/۸۶ | ۴۷/۵۱ |
| فرتیل | اسپانیا | ۱۸/۷۹ | ۱۷/۹۴ | ۲/۳۱ | ۱۴/۴۱ | ۱۳/۴۲ | ۱/۰۵ | ۴۶/۰۱ |

R_p (Resolving power) محاسبه شد. این ضریب بیانگر میزان کارایی هر نشانگر برای جداسازی و تفکیک نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. این شاخص بر اساس فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$R_p = \sum I_b$$

$$I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

آنالیز آماری: پس از انجام آزمایشات ISSR و RAPD، برای بررسی چندشکلی ژنتیکی بین ارقام، به حضور یک باند خاص عدد یک و به عدم حضور آن عدد صفر داده شد. اندازه باندهای تکثیر شده به وسیله نرم‌افزار کوانتیتی وان (Quantity One) تخمین زده شد. برای هر پرایمر، تعداد کل باندهای تولید شده، تعداد باندهای چندشکل، درصد چندشکلی و قدرت تفکیک یا

نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) نشان داد که ارقام مورد بررسی از نظر صفات مورد اندازه‌گیری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهند و به همین دلیل در مراحل بعدی وارد تجزیه و تحلیل آماری برای تعیین رابطه آن‌ها با نشانگرهای مولکولی گردیدند. صفاتی که دارای ضریب تغییرات بالایی می‌باشند محدوده وسیع‌تری از کمیت صفت را دارا بوده که دامنه انتخاب وسیع‌تری برای آن صفت محسوب می‌شود.

تکنیک مولکولی ISSR

پس از غربالگری، در مجموع ۱۰ پرایمر ISSR برای انجام واکنش PCR انتخاب شد و برای تمام ژنوتیپ‌ها به کار رفتند. پرایمرهای مورد استفاده در مجموع ۱۵۰ باند در ژرم پلاسما مورد مطالعه تولید کردند که از این تعداد ۱۴۰ باند چندشکلی نشان دادند. همچنین میانگین چندشکلی ردیابی شده توسط پرایمرهای مورد استفاده برابر با ۹۲/۱۴ درصد بود که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در ژرم پلاسما مورد آزمایش بود (جدول ۲).

در فرمول بالا Ib میزان آگاهی بخش بودن هر باند یک پرایمر می‌باشد. این مقدار طبق فرمول بالا برای هر کدام از باندهای تولید شده می‌تواند بین یک تا صفر متغیر باشد و p نسبتی از ژنوتیپ‌ها که دارای باند مورد نظر می‌باشند، می‌باشد. تجزیه رگرسیونی گام به گام (Stepwise) برای ردیابی رابطه بین صفات ریخت‌شناسی مورد آزمایش (به‌عنوان متغیرهای وابسته) و نشانگرهای RAPD و ISSR (به‌عنوان متغیرهای مستقل) با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 16 انجام شد. دو ضریب R^2 و با استفاده از آنالیز رگرسیونی محاسبه شدند و برای نشانگرهای مختلف وابسته به صفات، مورد بررسی قرار گرفتند. R^2 ضریب همبستگی توجیه شده چندگانه بوده که برای هر نشانگر محاسبه می‌شود و نشان‌دهنده میزان همبستگی نشانگر با صفت ریخت‌شناسی می‌باشد. همچنین، ضریب رگرسیون استاندارد شده می‌باشد که برای هر نشانگر مرتبط به صفت به‌وسیله MRA محاسبه می‌شود (۸).

نتایج

صفات ریخت‌شناسی

جدول ۲: پرایمرهای ISSR مورد استفاده برای مطالعه ژرم پلاسما فندق مورد مطالعه و خصوصیات آن‌ها

| پرایمر | تعداد کل قطعات تکثیر شده (a) | تعداد قطعات چندشکل (b) | درصد چندشکلی (b/a×100) | قدرت تفکیک (Rp) |
|---------|------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|
| UBC-810 | ۱۳ | ۱۲ | ۹۲/۳۱ | ۳/۸۸ |
| UBC-813 | ۱۴ | ۱۰ | ۷۱/۴۳ | ۱/۴۲ |
| UBC-816 | ۱۶ | ۱۵ | ۹۳/۷۵ | ۵/۴۲ |
| UBC-849 | ۲۰ | ۲۰ | ۱۰۰ | ۵/۷۷ |
| UBC-850 | ۱۶ | ۱۶ | ۱۰۰ | ۳/۷۷ |
| UBC-866 | ۱۷ | ۱۷ | ۱۰۰ | ۶/۲۸ |
| UBC-868 | ۱۲ | ۹ | ۷۵ | ۳/۰۲ |
| UBC-873 | ۱۲ | ۱۲ | ۱۰۰ | ۲/۹۷ |
| UBC-880 | ۲۱ | ۲۱ | ۱۰۰ | ۷/۵۴ |
| UBC-881 | ۹ | ۸ | ۸۸/۸۹ | ۱/۹۴ |
| کل | ۱۵۰ | ۱۴۰ | - | - |
| میانگین | ۱۵ | ۱۴ | ۹۲/۱۴ | ۴/۲۰ |

مقدار ۴/۲۰ به‌دست آمد. میزان تشابه بین ژنوتیپ‌ها در دامنه ۰/۱۸ تا ۰/۷۶ بود که نشان‌دهنده تنوع بالا در ژرم پلاسما مورد مطالعه بود.

آنالیز رگرسیونی چندمتغیره (MRA) بین باندهای چندشکل و صفات ریخت‌شناسی مورد بررسی نشان داد که برخی از نشانگرهای ISSR همبستگی معنی‌داری با این صفات دارند

اندازه باندهای تشکیل شده از ۲۵۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز متغیر بود. بیشترین باند چندشکل تکثیر شده ۲۱ عدد (برای پرایمر UBC-880) و کمترین آن ۸ عدد (برای پرایمر UBC-881) بود. قدرت تفکیک (Rp) پرایمرها نیز در محدوده ۱/۴۲ (برای پرایمر UBC-813) تا ۷/۵۴ (برای پرایمر UBC-880) بود. میانگین قدرت تفکیک (Rp) برای تمامی پرایمرهای مورد استفاده به

مثبت و ۲ نشانگر دارای همبستگی منفی با صفت عرض نات بودند. در بین نشانگرهای وابسته به این صفت، بیشترین مقدار R^2 توجیه شده و بیشترین مقدار مربوط به نشانگر UBC810₁₇₂₀ بود ($R^2 = -0.70$ و $R^2 = 0.48$). بعلاوه، تعداد ۳۲ نشانگر با وزن نات همبستگی نشان دادند که مجموع کل R^2 توجیه شده توسط آنها ۱۰۰ درصد بود. در بین نشانگرهای وابسته به این صفت، نشانگر UBC810₁₇₂₀ دارای بیشترین مقدار R^2 توجیه شده و بیشترین مقدار بود ($R^2 = -0.75$ و $R^2 = 0.43$).

(جدول ۳). بیشترین تعداد نشانگر برای صفت طول مغز (۳۴ نشانگر) و کمترین تعداد نشانگر (۱۲ نشانگر) برای عرض مغز بود. تعداد ۳۱ نشانگر با طول نات همبستگی نشان دادند که ۲۴ نشانگر همبستگی مثبت و ۷ نشانگر همبستگی منفی داشتند. مجموع کل R^2 توجیه شده توسط آنها ۱۰۰ درصد بود. در بین نشانگرهای وابسته به این صفت، نشانگر UBC868₃₀₀ دارای بیشترین مقدار R^2 توجیه شده و بیشترین مقدار بود ($R^2 = 0.53$ و $R^2 = 0.23$). همچنین تعداد ۱۴ نشانگر با عرض نات همبستگی نشان دادند که مجموع کل R^2 توجیه شده توسط آنها ۹۹ درصد بود. از این تعداد ۱۲ نشانگر دارای همبستگی

جدول ۳: نتایج حاصل از آنالیز رگرسیونی گام به گام بین باندهای چندشکل نشانگر ISSR با صفات مهم میوه فندق

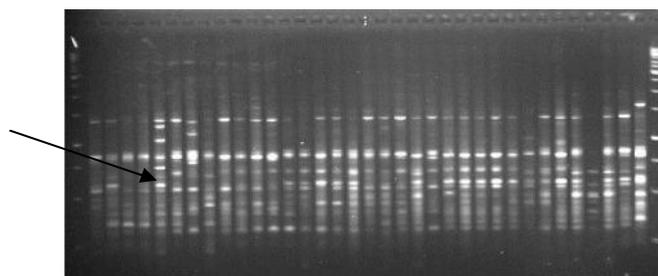
| صفت | تعداد نشانگر آگاهی بخش | R^2 کل (%) | بیشترین R^2 توجیه شده (%) | بیشترین نشانگر دارای بیشترین R^2 | نشانگر دارای بیشترین R^2 |
|----------|------------------------|--------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| طول نات | ۳۱ | ۱۰۰ | ۲۳ | UBC868 ₃₀₀ | UBC868 ₃₀₀ |
| عرض نات | ۱۴ | ۹۹ | ۴۸ | UBC810 ₁₇₂₀ | UBC810 ₁₇₂₀ |
| وزن نات | ۳۲ | ۱۰۰ | ۴۳ | UBC810 ₁₇₂₀ | UBC810 ₁₇₂₀ |
| طول مغز | ۳۴ | ۱۰۰ | ۲۵ | UBC868 ₃₀₀ | UBC868 ₃₀₀ |
| عرض مغز | ۱۲ | ۹۵ | ۳۱ | UBC810 ₄₇₅ | UBC810 ₄₇₅ |
| وزن مغز | ۳۲ | ۱۰۰ | ۲۴ | UBC810 ₇₃₅ | UBC810 ₇₃₅ |
| درصد مغز | ۱۳ | ۹۵ | ۳۳ | UBC880 ₈₄₅ | UBC880 ₁₁₁₅ |

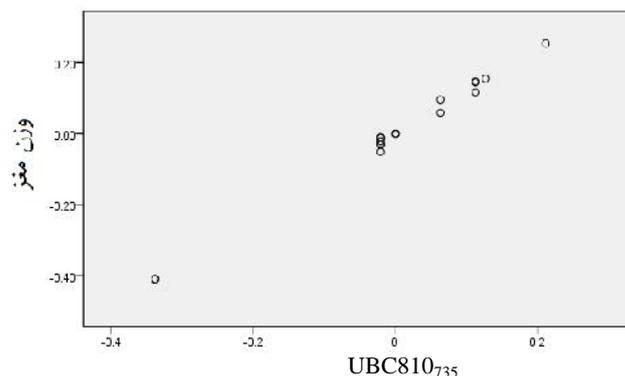
وابسته به این صفت، بیشترین مقدار R^2 توجیه شده و بیشترین مقدار مربوط به نشانگر UBC810₇₃₅ بود ($R^2 = -0.78$ و $R^2 = 0.24$). شکل ۱ پروفایل پرایمر UBC810 را نشان می‌دهد که نشانگر UBC810₇₃₅ روی آن مشخص شده است. همچنین شکل ۲ رابطه رگرسیونی بین نشانگر UBC810₇₃₅ و صفت وزن مغز را نشان می‌دهد.

درصد مغز با تعداد ۱۳ نشانگر ارتباط داشت که مجموع کل R^2 توجیه شده توسط آنها ۹۵ درصد بود. در بین نشانگرهای وابسته به این صفت، نشانگر UBC880₁₁₁₅ دارای بیشترین مقدار R^2 توجیه شده ($R^2 = 0.33$) و UBC880₈₄₅ دارای بیشترین مقدار بود ($R^2 = -0.64$).

در مورد صفات مربوط به مغز، تعداد ۳۴ نشانگر با طول مغز همبستگی نشان دادند که مجموع کل R^2 توجیه شده توسط آنها ۱۰۰ درصد بود. در بین نشانگرهای وابسته به این صفت، بیشترین مقدار R^2 توجیه شده و بیشترین مقدار مربوط به نشانگر UBC868₃₀₀ بود ($R^2 = 0.94$ و $R^2 = 0.25$). عرض مغز با ۱۲ نشانگر رابطه داشت که مجموع کل R^2 توجیه شده توسط آنها ۹۵ درصد بود. در بین نشانگرهای وابسته به این صفت، بیشترین مقدار R^2 توجیه شده و بیشترین مقدار مربوط به نشانگر UBC810₄₇₅ بود ($R^2 = 0.71$ و $R^2 = 0.31$). تعداد ۳۲ نشانگر با وزن مغز همبستگی نشان دادند که مجموع کل R^2 توجیه شده توسط آنها ۱۰۰ درصد بود. در بین نشانگرهای

شکل ۱: پروفایل پرایمر UBC810 که نشانگر UBC810₇₃₅ را نشان می‌دهد. این نشانگر با علامت فلش مشخص شده است.





شکل ۲: پلات رابطه رگرسیونی بین نشانگر $UBC810_{735}$ و صفت وزن مغز

تکنیک مولکولی RAPD

تا ۳۰۰۰ جفت باز تخمین زده شد. بیشترین باند چندشکل تکثیر شده ۲۰ عدد (برای پرایمر TIBMBC-17) و کمترین آن ۳ عدد (برای پرایمر OPN-08) بود. قدرت تفکیک (Rp) پرایمرها نیز در محدوده ۱/۴۲ (برای پرایمر OPN-08) تا ۶/۲۸ (برای پرایمر OPAB-04) بود. میانگین قدرت تفکیک (Rp) برای تمامی پرایمرهای استفاده شده ۳/۷۱ بدست آمد (جدول ۴). میزان تشابه بین ژنوتیپها در دامنه ۰/۲۷ تا ۰/۷۵ بود که نشان دهنده تنوع بالا در ژرم پلاسما مورد مطالعه بود.

از تعداد ۱۰۰ پرایمر آزمایش شده، در مجموع ۱۵ پرایمر RAPD برای انجام واکنش PCR انتخاب شدند و برای تمام ژنوتیپها به کار رفتند. این تعداد پرایمر در مجموع ۲۰۱ قطعه DNA تولید کردند که از بین آنها ۱۸۸ قطعه در بین ژنوتیپها چندشکلی نشان دادند. همچنین میانگین چندشکلی ردیابی شده توسط پرایمرهای مورد استفاده برابر با ۹۷/۹۴ درصد بود که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در ژرم پلاسما مورد آزمایش بود (جدول ۴). اندازه قطعات در تمام پرایمرها در محدوده ۳۰۰

جدول ۴: پرایمرهای RAPD مورد استفاده برای مطالعه ژرم پلاسما فندق مورد مطالعه و خصوصیات آنها

| پرایمر | تعداد کل قطعات تکثیر شده (a) | تعداد قطعات چندشکل (b) | درصد چندشکلی (b/a×100) | قدرت تفکیک (Rp) |
|-----------|------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| TIBMBC-07 | ۱۵ | ۱۴ | ۹۳/۳۳ | ۳/۸۸ |
| TIBMBC-04 | ۱۹ | ۱۷ | ۸۹/۴۷ | ۴/۷۴ |
| TIBMBC-17 | ۲۰ | ۲۰ | ۱۰۰ | ۵/۷۷ |
| TIBMBC-08 | ۱۳ | ۱۲ | ۹۲/۳۱ | ۳/۸۸ |
| TIBMBC-19 | ۱۳ | ۱۱ | ۸۴/۶۲ | ۱/۹۴ |
| TIBMBC-15 | ۸ | ۷ | ۸۷/۵۰ | ۱/۶۲ |
| TIBMBC-18 | ۹ | ۷ | ۷۷/۷۸ | ۳/۴۸ |
| TIBMBC-03 | ۶ | ۵ | ۸۳/۳۳ | ۱/۴۸ |
| OPE-13 | ۱۹ | ۱۹ | ۱۰۰ | ۳/۱۴ |
| OPN-13 | ۱۵ | ۱۳ | ۸۶/۶۷ | ۴/۵۱ |
| OPAB-04 | ۱۷ | ۱۷ | ۱۰۰ | ۶/۲۸ |
| OPE-11 | ۱۵ | ۱۵ | ۱۰۰ | ۵/۴۸ |
| OPN-01 | ۱۲ | ۱۲ | ۱۰۰ | ۳/۲۰ |
| OPE-17 | ۱۶ | ۱۶ | ۱۰۰ | ۳/۷۷ |
| OPN-08 | ۴ | ۳ | ۷۵ | ۱/۴۲ |
| کل | ۲۰۱ | ۱۸۸ | - | - |
| میانگین | ۱۳/۴۰ | ۱۲/۵۳ | ۹۷/۹۴ | ۳/۷۱ |

مجموع کل R^2 توجیه شده توسط آن‌ها برای صفات ذکر شده ۱۰۰ درصد بود. در بین نشانگرهای وابسته به طول نات، نشانگر TIBMBC19₁₅₄₅ دارای بیشترین مقدار R^2 توجیه شده بود ($R^2=0.30$) و بیشترین مقدار مربوط به TIBMBC04₃₃₀ بود ($R^2=0.63$). در بین نشانگرهای وابسته به عرض نات، بیشترین مقدار R^2 توجیه شده و بیشترین مربوط به TIBMBC08₁₇₆₅ بود ($R^2=0.48$ و -0.79). همچنین در بین نشانگرهای وابسته به وزن نات، بیشترین مقدار R^2 توجیه شده و بیشترین مربوط به TIBMBC08₁₇₆₅ بود ($R^2=0.42$ و -0.89).

با استفاده از روش رگرسیونی گام به گام بین هر یک از صفات ریخت‌شناسی با ۱۸۸ باند چندشکل RAPD، نشانگرهای گروه RAPD مرتبط با هر یک از صفات ریخت‌شناسی میوه شناسایی شدند (جدول ۵). گروه نشانگرهای RAPD برای صفات ریخت‌شناسی طول نات، عرض نات و وزن نات به ترتیب دارای ۲۸، ۳۲ و ۲۷ نشانگر RAPD بودند که مجموع کل R^2 توجیه شده توسط آنها برای صفات ذکر شده ۱۰۰ درصد بود. همچنین تعداد نشانگرهای وابسته به صفات طول مغز، عرض مغز، وزن مغز و درصد مغز به ترتیب ۳۲، ۲۸، ۳۲ و ۳۴ نشانگر بودند که

جدول ۵: نتایج حاصل از آنالیز رگرسیونی گام به گام بین باندهای چندشکل نشانگر RAPD با صفات مهم میوه فندق

| صفت | تعداد نشانگر آگاهی‌بخش | R^2 کل (%) | بیشترین R^2 توجیه شده (%) | بیشترین نشانگر دارای بیشترین R^2 | نشانگر دارای بیشترین R^2 |
|----------|------------------------|--------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| طول نات | ۲۸ | ۱۰۰ | ۳۰ | TIBMBC19 ₁₅₄₅ | TIBMBC04 ₃₃₀ |
| عرض نات | ۳۲ | ۱۰۰ | ۴۸ | TIBMBC08 ₁₇₆₅ | TIBMBC08 ₁₇₆₅ |
| وزن نات | ۲۷ | ۱۰۰ | ۴۲ | TIBMBC08 ₁₇₆₅ | TIBMBC08 ₁₇₆₅ |
| طول مغز | ۳۲ | ۱۰۰ | ۴۱ | TIBMBC17 ₁₈₅₀ | OPE11 ₄₄₀ |
| عرض مغز | ۲۸ | ۱۰۰ | ۳۲ | TIBMBC15 ₁₄₃₅ | TIBMBC19 ₁₅₄₅ |
| وزن مغز | ۳۲ | ۱۰۰ | ۳۲ | TIBMBC04 ₁₀₁₀ | OPN13 ₁₂₁₅ |
| درصد مغز | ۳۴ | ۱۰۰ | ۱۷ | OPN13 ₁₉₇₀ | TIBMBC04 ₆₈₀ |

رگرسیونی چندمتغیره را داد. برخی از باندهای تولید شده توسط نشانگرهای ISSR و RAPD با صفات ریخت‌شناسی مورد مطالعه همبستگی نشان دادند. محل قرارگیری این نشانگرها در داخل ژنوم احتمالاً مناطقی از ژنوم می‌باشد که کدکننده ژن‌های مربوط به صفات ریخت‌شناسی مورد نظر می‌باشد (۲۳). با هر صفت چندین نشانگر همبستگی نشان دادند که نشانگری که بالاترین R^2 را داشته است به‌عنوان موثرترین نشانگر در کد کردن آن صفت محسوب می‌شود (۸).

برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت میوه ارتباط نشان دادند که ارتباط یک نشانگر با بیش از یک صفت می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپیک (Pleiotropic) QTL های مرتبط با هم در صفات مختلف باشد (۲۴ و ۲۵)، اما برای آگاهی بیشتر از این رابطه، ایجاد یک جمعیت در حال تفرق و نقشه‌یابی لینکاژی آن می‌تواند مفید باشد (۲۶). اثر پلیوتروپیک زمانی رخ می‌دهد که یک ژن بتواند به‌طور هم‌زمان در بروز چندین صفت تاثیر داشته باشد. همچنین QTL های مرتبط با همدیگر که صفات مختلف را کنترل می‌کنند نیز می‌توانند منجر به ایجاد یک نشانگر واحد شوند که با بیش از یک صفت همبستگی داشته باشد (۲۵). به عنوان مثال در مطالعه حاضر، در بین نشانگرهای ISSR،

در مورد صفت طول مغز، نشانگر TIBMBC17₁₈₅₀ دارای بیشترین مقدار R^2 توجیه شده ($R^2=0.41$) و نشانگر OPE11₄₄₀ دارای بیشترین مقدار بود ($R^2=0.72$). در بین نشانگرهای وابسته به عرض مغز، نشانگر TIBMBC15₁₄₃₅ دارای بیشترین مقدار R^2 توجیه شده ($R^2=0.32$) و نشانگر TIBMBC19₁₅₄₅ دارای بیشترین مقدار بود ($R^2=0.91$). در بین نشانگرهای وابسته به وزن مغز، نشانگر TIBMBC04₁₀₁₀ دارای بیشترین مقدار R^2 توجیه شده ($R^2=0.32$) و نشانگر OPN13₁₂₁₅ دارای بیشترین مقدار بود ($R^2=0.78$). در مورد صفت درصد مغز؛ نشانگرهای OPN13₁₉₇₀ دارای بیشترین مقدار R^2 توجیه شده ($R^2=0.17$) و نشانگر TIBMBC04₆₈₀ دارای بیشترین مقدار بود ($R^2=-0.84$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ‌های فندق مورد مطالعه دارای تنوع بالایی از نظر صفات ریخت‌شناسی میوه و جنبه‌های مولکولی می‌باشند و در نتیجه این تنوع بالا اجازه ردیابی رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات میوه را از طریق آنالیز

انتخاب نتاج برتر از نظر صفات مهم گل و میوه کاری دشوار می‌باشد اما با شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت (MAS)، می‌توان نتاج برتر را در مراحل اولیه رشد آنها شناسایی کرد (۲۳). روش کار به این صورت است که می‌توان قطعات DNA چندشکل شناسایی شده به‌عنوان نشانگر آگاهی‌بخش برای صفت مورد مطالعه (مانند صفات مربوط به میوه) را از روی ژل جدا کرد و کلون نمود. سپس توالی شناسایی شده را در پایگاه اطلاعاتی NCBI با توالی‌های موجود هم‌ردیف (Alignment) نمود و ژن‌های کاندید (Candidate genes) که شباهت بالایی به نشانگرهای آگاهی‌بخش مورد نظر داشتند را مشخص نمود. همچنین می‌توان از روی توالی به‌دست آمده، پرایمرهای SCAR را طراحی نمود و در انتخاب به‌واسطه نشانگر وابسته به صفت (MAS) در برنامه‌های اصلاحی بهره برد (۳۰).

شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن‌های اصلی کنترل-کننده صفات مورد نظر در سال‌های اخیر از طریق ایجاد جمعیت‌های در حال تفرق همچون F_1 در گیاهان هتروزایگوت و F_2 ، RIL، DH و در گیاهان هموزایگوت انجام گرفته است. بعضی از این نشانگرها جهت انجام کارهای اصلاحی استفاده شده‌اند، اما در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق جهت نقشه‌یابی، در اختیار نبودن زمان کافی و نبود همبستگی کافی بین صفات ریخت‌شناسی و نشانگرهای مولکولی از جمله مهمترین محدودیت‌ها در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات ریخت‌شناسی می‌باشد اما انجام آنالیز همبستگی رگرسیونی فاقد این محدودیت‌ها می‌باشد (۳۱).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده وابسته به خصوصیات میوه در فندق می‌توانند راهنمای خوبی برای شناسایی ژنوتیپ‌های دارای صفات با ارزش میوه باشد. در برنامه‌های اصلاحی انتخاب مواد گیاهی با کیفیت معمولاً وقت و هزینه زیادی می‌طلبد. با این حال، نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر بخصوص وقتی که اطلاعاتی از پایه ژنتیکی آن‌ها مانند نقشه لینکازی در دسترس نیست مفید باشد. همچنین، این نشانگرها می‌توانند در انتخاب والدین مناسب برای تولید جمعیت جهت نقشه‌یابی به کار بروند.

نشانگرهای $UBC810_{1340}$ ، $UBC868_{300}$ و $UBC810_{1750}$ با دو صفت طول نات و طول مغز همبستگی معنی‌دار نشان دادند که بیان‌کننده همبستگی مثبت این دو صفت با همدیگر می‌باشد. همچنین در بین نشانگرهای RAPD، نشانگرهای $TIBMBC19_{1545}$ ، $TIBMBC15_{1435}$ و $OPE11_{1125}$ با این دو صفت همبستگی مثبت نشان دادند. این نتیجه با نتایج محققان دیگر مطابقت دارد، به‌طوری‌که گزارش شده است طول نات همبستگی مثبت و معنی‌دار با طول مغز دارد (۲۷، ۲۸ و ۲۹).

به‌علاوه، در بین نشانگرهای ISSR، نشانگرهای $UBC868_{330}$ ، $UBC873_{755}$ ، $UBC866_{775}$ ، $UBC868_{950}$ ، $UBC850_{410}$ ، $UBC850_{825}$ ، $UBC881_{2410}$ و $UBC810_{685}$ با طول نات، وزن نات و وزن مغز همبستگی مثبت نشان دادند. همچنین در بین نشانگرهای RAPD، نشانگر $OPE11_{740}$ با این صفات همبستگی مثبت داد. گزارش شده است که این صفات با همدیگر همبستگی مثبت دارند و کاهش یا افزایش در هر کدام می‌تواند باعث کاهش یا افزایش در دیگری شود (۲۷ و ۲۹). در بین نشانگرهای ISSR، نشانگرهای $UBC849_{2335}$ و $UBC810_{1260}$ با طول و وزن مغز همبستگی نشان دادند. همچنین در بین نشانگرهای RAPD، نشانگرهای $OPAB04_{380}$ و $OPE11_{935}$ با این دو صفت همبستگی نشان دادند. همبستگی مثبت بین این دو صفت با استفاده از مطالعات ریخت‌شناسی گزارش شده است (۲۷ و ۲۸).

تجزیه رگرسیونی چندمتغیره (MRA) یک روش مناسب و سریع برای یافتن رابطه بین صفات و نشانگرها می‌باشد (۳۰). نشانگرهای شناسایی شده در این مطالعه که با صفات میوه فندق همبستگی نشان داده‌اند می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی MAS به کار بروند. مزایای بارز این آنالیز این است که این روش می‌تواند مکان‌های صفات کمی (QTL) را ردیابی کند. همچنین نیاز به زمان و هزینه کمتری داشته (۳۰) و به تشکیل جمعیت جهت نقشه‌یابی نیاز ندارد (۲۳).

انتخاب اولیه صفات مطلوب مربوط به میوه و گل نیاز به نمو گیاهان و وارد شدن آنها به مرحله بلوغ دارد و یا به عبارت دیگر درختان میوه باید مرحله طولانی نونهالی را طی نمایند و وارد مرحله میوه‌دهی شوند تا بتوان این صفات را مورد بررسی قرار داد و گیاهان دارای صفات مطلوب از نظر گل و میوه پیدا نمود (۲۳). اما با ردیابی نشانگرهای وابسته به این صفات، نیاز به وارد شدن گیاهان به مرحله بلوغ نمی‌باشد. به‌عبارت دیگر، برای گیاهان چوبی (مانند درختان میوه) دارای دوره طولانی نونهالی،

mapping of kernel oil concentration with high-oil maize by SSR markers. *Maydica*. 2004; 49: 41-48.

14. Chatterjee SN, Nagaraja GM, Srivastava PP, Naik G. Morphological and molecular variation of *Morus laevigata* in India. *Genetica*. 2004; 121(2):133-143.

15. Basaki T, Choukan R, Khayam-Nekouei SM, Mardi M, et al. Association analysis for morphological traits in pomegranate (*Punica granatum* L.) using microsatellite markers. *Mid East J Sci Res*. 2011; 9(3): 410-417.

16. Ganopoulos IV, Kazantzis K, Chatzicharisis I, Karayiannis I, et al. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers. *Euphytica*. 2011, 24: 835-844.

17. Boccacci P, Botta R. Microsatellite variability and genetic structure in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars from different growing regions. *Sci Hortic*. 2010; 124: 128-133.

18. Ferreira JJ, Garcia-Gonzalez C, Tous J, Rovira M. Genetic diversity revealed by morphological traits and ISSR markers in hazelnut germplasm from northern Spain. *Plant Breeding*. 2010; 129: 435-441.

19. Gokirmak T, Mehlenbacher SA, Bassil NV. Characterization of European hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars using SSR markers. *Genet Resour Crop Evol*. 2009; 56: 147-172.

20. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 1987; 19: 11-15.

21. Khadivi-Khub A, Zamani Z, Bouzari N. Evaluation of genetic diversity in some Iranian and foreign sweet cherry cultivars by using RAPD molecular markers and morphological traits. *Hortic Environ Biotechnol*. 2008; 49, 188-196.

22. Timmappaiah WG, Shobha G, Melwyn S. Assessment of genetic diversity in Cashew germplasm using and ISSR markers. *Sci Hortic*. 2009; 120: 411-417.

23. Virk PS, Ford-Lloyd BV, Jackson MT, Pooni HS, et al. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Hered*. 1996; 76: 296-304.

24. Culp TW, Harrell DC, Kerr T. Some genetic implications in the transfer of high fiber strength genes to upland cotton. *Crop Sci*. 1979; 19:481- 484.

25. Meredith A, Bridge RR. Breakup of linkage block in cotton, *Gossypium hirsutum* L. *Crop Sci*. 1971; 11: 695-697.

26. Ebrahimi A, Naghavi MR, Sabokdast M, Moradi AS. Association analysis of agronomic traits with

منابع

1. Mehlenbacher S.A. Hazelnuts. In: Fulbright DW (eds) A Guide to nut tree culture in North America, vol 1. Northern Nut Growers Assoc; 2003; 183-215

2. Mehlenbacher SA. Genetic resources for hazelnut: state of the art and future perspectives. *Acta Hort*. 2009; 845: 33-38.

3. Langridge P, Lagudah ES, Holton TA, Appels R, et al. Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Aus J Agri Res*. 2001; 52: 1043-1077.

4. Rakshit A, Rakshit S, Singh J, Chopra SK, et al. Association of AFLP and SSR markers with agronomic and fibre quality traits in *Gossypium hirsutum* L. *J Genet*. 2010; 89: 155-162.

5. Gomez, K, Gomez, A.A. Statistical procedures for agricultural research, 2th ED. John Wiley, New York, USA; 1984.

6. Neale DB, Savolainen O. Association genetics of complex traits in conifers. *Tre Plant Sci*. 2004; 9(7): 325-330.

7. Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan HS, et al. Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Cur Sci*. 2006; 90: 5-10.

8. Kar PK, Srivastava PP, Awasthi AK, Urs SR. Genetic variability and association of ISSR markers with some biochemical traits in mulberry (*Morus* spp.) genetic resources available in India. *Tree Genet Genomes*. 2008; 4:75-83.

9. Jugran A, Rawat S, Dauthal P, Mondal S, et al. Association of ISSR markers with some biochemical traits of *Valeriana jatamansi* Jones. *Industrial Crops and Products*. 2013; 44: 671-676.

10. Shen XL, Guo WZ, Lu QX, Zhu XF, et al. Genetic mapping of quantitative trait loci for fiber quality and yield trait by RIL approach in Upland cotton. *Euphytica*. 2007; 155: 371-380.

11. Zeng L, Meredith WR, Gutierrez OA, Boykin DL. Identification of association between SSR markers and fiber traits in an exotic germplasm derived from multiple cross among *Gossypium* tetraploid species. *Theor Appl Genet*. 2009; 119: 93-103.

12. Ma HX, Bai GH, Carver BF, Zhou LL. Molecular mapping of a quantitative trait locus for aluminium tolerance in wheat cultivar Atlas 66. *Theor Appl Genet*. 2005; 112: 51-57.

13. Song XF, Song TM, Dai JR, Rocheford TR. Collaborative working group on underutilized QTL

microsatellite markers in Iranian barley landraces barley. *J. Mod Genet.* 2011; 24: 15-23.

27. Zeki Bostan S, Islam A. Some nut characteristics and variation of these characteristics within hazelnut cultivar Palaz. *Tur J Agri For.* 1999; 23: 367-370.

28. Yao Q, Mehlenbacher SA. Heritability, variance components and correlation of morphological and phonological traits in hazelnut. *Plant Breed.* 2000; 119: 369-381.

29. Miletic R, Zikic M, Mitic N, Nolic R. Pomological characteristic of superior selections of European filbert (*C. avellana* L.). *Genetica.* 2005; 37: 103-111.

30. Ruan CJ, Li H, Mopper S. Characterization and identification of ISSR markers associated with resistance to dried-shrink disease in sea buckthorn. *Mol Breed.* 2009; 24(3): 255-268.

31. Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Mo. Biol.* 2005; 57(4): 461-485.

Study of Association between Molecular Markers and Fruit Characters in Hazelnut Using Multiple Regression Analysis

Mohammadzede M, M.Sc.¹, Fattahi Moghadam R, Ph.D^{1*}, Zamani Z, Ph.D¹, Khadivi-Khub A, Ph.D^{2*}

1. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, 31587, Karaj, Iran

2. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, 38156-8-8349, Arak, Iran

* Email corresponding author: fattahi@ut.ac.ir & a-khadivi@araku.ac.ir

Received: 25 Oct. 2013

Accepted: 26 Nov. 2013

Abstract

Aim: This study was carried out to evaluate association of ISSR and RAPD markers with fruit traits of hazelnut (*Corylus avellana*).

Material and Methods: In this research, associations between ISSR and RAPD markers with fruit traits were investigated in 35 genotypes of hazelnut by applying multiple regression analysis (MRA).

Results: Some ISSR and RAPD fragments were found to be associated with seven of affecting fruit traits. Some of ISSR and RAPD markers were associated with more than one fruit trait in multiple regression analysis. Such an association may arise due to pleiotropic effect of the linked quantitative trait locus (QTL) on different traits. For example, some informative markers were associated with both nut length and kernel weight traits. Also, some informative markers showed association with all nut length and weight and kernel weight. Also, some markers had correlation with both kernel length and weight, indicating a significant correlation among these traits.

Conclusion: It is possible to use these markers along with morphological traits in hazelnut breeding programs for identification of suitable parents to produce mapping populations and hybrid cultivars. Also, these results could be useful in marker-assisted breeding programs when no other genetic information is available.

Keywords: Fruit characters, Hazelnut, Molecular markers, Regression analysis