

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۱، صفحه ۹۱-۷۹ (۱۳۹۵)

تجزیه ارتباط صفات مورفولوژیک در کرچک (*Ricinus communis* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR

زهرا آقاعلی^۱، رضا درویش‌زاده*^۲ و فرناز گودرزی^۳

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد، اصلاح نباتات، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲-نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

پست الکترونیک: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

۳-دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، ادویه‌ای و نوشابه‌ای، گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۰۵

چکیده

کرچک (*Ricinus communis* L.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی روغنی در جهان است. این گیاه به‌طور گسترده در قسمت‌های مختلف ایران پراکنده شده است. به‌منظور شناسایی نشانگرهای ISSR پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده ۲۶ صفت مورفولوژیک در ۱۲ جمعیت کرچک از تجزیه ارتباطی بر اساس اطلاعات حاصل از ۱۶ ترکیب آغازگری ISSR استفاده شد. ارزیابی فنوتیپی جمعیت‌ها در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ارومیه در سال ۱۳۹۱ انجام گرفت. نشانگر UBC-859 موثرترین نشانگر در بررسی تنوع جمعیت‌های کرچک در این تحقیق بود. بر اساس ۱۱۶ مکان تکثیری توسط آغازگرهای ISSR، ژنوتیپ‌های مورد بررسی به ۶ زیر جمعیت تقسیم شدند. با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM)، ۲۶ مکان پیوسته با ۱۷ صفت مورفولوژیک شناسایی شد. مقدار R^2 در محدوده ۱۲/۴ (UBC857-5) تا ۲۸/۱ (UBC844-2) درصد متغیر بود. اکثر مکان‌ها به‌طور اختصاصی با یک صفت پیوسته بودند. مکان UBC812-8 با ۸ صفت مورد مطالعه پیوسته بود. وجود نشانگرهای مشترک در میان برخی صفات بررسی شده می‌تواند ناشی از اثرات پلئوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌ترادی گیاهان دارد، زیرا گزینش هم‌زمان چند صفت از طریق انتخاب به‌کمک نشانگر (MAS) را امکان‌پذیر می‌سازند.

واژه‌های کلیدی: صفات مورفولوژیک، عدم تعادل لینکاژی، کرچک، مدل خطی مخلوط، نشانگرهای مولکولی.

مقدمه

تشکیل می‌دهد که در واقع ارزش روغن کرچک به‌دلیل وجود این اسید چرب می‌باشد (Weiss, 1983; Jeong & Park, 2009). روغن کرچک همچنین دارای اسید چرب‌های اولئیک‌اسید، لینولئیک‌اسید، لینولنیک‌اسید، پالمیتیک‌اسید و استئاریک‌اسید می‌باشد (Ogunniyi, 2006). وجود گروه‌های هیدروکسیل و باندهای دوگانه

کرچک (*Ricinus communis* L.) یک محصول دانه روغنی مهم با قدمتی بیش از ۴۰۰۰ سال می‌باشد. محتوای روغن دانه در بین ارقام مختلف ۶۰-۴۰ درصد می‌باشد. در حدود ۸۰-۹۰ درصد روغن کرچک را یک هیدروکسیل‌اسید چرب غیر اشباع به‌نام اسید ریسینولیک

بذر و درصد روغن (Borch-Jensen *et al.*, 1997) و ارزیابی تنوع ژنتیکی (Bhavesh *et al.*, 2010; Goodarzi *et al.*, 2011) محدود شده‌اند. در مطالعه‌ای که توسط Pecina-Quintero و همکاران (۲۰۱۳) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۸۲ ژنوتیپ کرچک با استفاده از نشانگرهای SSR (Simple Sequence Repeat) و AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) انجام شد، تنوع ژنتیکی بالایی در ژرم پلاسما مورد مطالعه گزارش شد. در یک مطالعه دیگر که توسط Allan و همکاران (۲۰۰۸) برای بررسی تنوع ژنتیکی ۴۱ ژنوتیپ کرچک متعلق به ۳۵ کشور مختلف با استفاده از نشانگرهای SSR و AFLP انجام شد، تنوع ژنتیکی پایین و همچنین عدم مطابقت بین الگوی گروه‌بندی بر اساس داده‌های مولکولی با الگوی توزیع جغرافیایی ژنوتیپ‌ها گزارش شد. که می‌تواند به دلیل اصلاح ژنوتیپ‌ها، اهلی‌سازی یا تکثیر طولانی مدت تعداد کمی ژنوتیپ و یا استفاده از ژنوتیپ‌هایی باشد که تنوع موجود در آن‌ها نماینده تنوع درون گونه نیست (Pecina-Quintero *et al.*, 2013).

نشانگر ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) به علت چندشکلی بالا، تکرارپذیری خوب، عدم نیاز به توالی‌یابی DNA برای طراحی آغازگر، گستردگی و پوشش ژنومی بالا، توزیع تصادفی و سهولت استفاده، یکی از پرکاربردترین نشانگرهای مولکولی مورد استفاده در مطالعات انگشت‌نگاری ژنومی، تنوع ژنتیکی، تجزیه‌های فیلوژنتیکی و نقشه‌یابی ژنومی می‌باشد (Zhao *et al.*, 2007).

با توجه به اینکه ایران یکی از مراکز مهم تنوع و پراکنش کرچک به‌شمار می‌آید بنابراین ارزیابی ساختار جمعیت و انجام تجزیه ارتباط به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات و استفاده از نتایج آن در برنامه‌های اصلاحی کرچک جهت تولید واریته‌های پرمحصول ضروری به‌نظر می‌رسد. در این تحقیق برای اولین بار تجزیه ارتباط صفات مورفولوژیک در توده‌های کرچک (*Ricinus communis*) L. ایرانی با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام شد.

موجود در روغن کرچک، خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی به آن بخشیده و روغن را جهت استفاده در صنایع مختلف از جمله ساخت پلیمر، نایلون، فیبر، چرم مصنوعی، پلاستیک، روکش‌ها، روان‌کننده‌های هیدرولیک، روغن هواپیما، فیبرهای نوری، شیشه‌های ضد گلوله و نظائر اینها مناسب کرده است (Scarpa & Guerci, 1982; Caupin, 1997; Ogunniyi, 2006). این گیاه همچنین به دلیل وجود ترکیبات فیتوشیمیایی مانند فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و تانن‌ها، خواص درمانی و دارویی فراوانی دارد (Ogunniyi, 2006). گیاه کرچک دارای ۱۰ عدد کروموزوم در هر سلول هاپلوئید، ژنومی با اندازه متوسط (۳۵۰ Mb) و بومی مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر جهان می‌باشد (Savy Filho, 2005).

یکی از برنامه‌های کاربردی در مطالعه صفات کمی در دهه اخیر، مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی (QTL mapping) است. به‌طور کلی روش‌های به‌کاررفته در شناسایی و مکان‌یابی جایگاه صفات کمی به دو گروه اصلی نقشه‌یابی پیوستگی (Linkage mapping) و نقشه‌یابی ارتباطی (Association mapping) یا نقشه‌یابی عدم تعادل لینکاژی (Linkage disequilibrium mapping) تقسیم می‌شوند. در تجزیه ارتباط، رابطه بین ژنوتیپ و فنوتیپ گیاه مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت با استفاده از نامتعادل بودن پیوستگی موجود در جمعیت‌های طبیعی و مجموعه‌های ژرم پلاسما بررسی می‌شود (Buckler *et al.*, 2002). در اینگونه مطالعات به دلیل اینکه از جوامع طبیعی استفاده می‌شود اولاً تنوع ژنتیکی وسیع‌تری نسبت به جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والدی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد، ثانیاً از آنجاییکه در این نوع نقشه‌یابی تمام رویدادهای میوزی که در طول تاریخچه تکاملی گیاه انباشته شده است در نظر گرفته می‌شود دقت نقشه‌یابی بالاتر است در صورتی که در روش معمول نقشه‌یابی تنها در تعدادی از نسل‌های تلاقی یا خودگشنی میوز اتفاق می‌افتد. اکثر پژوهش‌ها در رابطه با گیاه دارویی کرچک به بررسی عوامل محیطی تاثیرگذار بر روی عملکرد

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی

بذرهای ۱۲ جمعیت کرچک جمع‌آوری شده از نواحی

مختلف کشور (جدول ۱)، از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و در این مطالعه بررسی شدند.

جدول ۱- کد، محل جمع‌آوری و مشخصات محل جمع‌آوری جمعیت‌های کرچک مورد مطالعه

شماره	کد	محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا
۱	۲۳-۸۰	تفرش (مرکزی)	۴۹° ۴۳'	۳۴° ۲۴'	۱۷۳۵
۲	۳۱-۸۰	آشتیان (مرکزی)	۵۰° ۰۴'	۳۴° ۳۰'	۲۴۵۰
۳	۲۵-۸۰	اراک (مرکزی)	۴۹° ۴۹'	۳۴° ۲۰'	۱۷۵۳
۴	۱-۱۲-۸۰	شهرضا (اصفهان)	۵۱° ۳۷'	۳۲° ۱۱'	۱۷۵۰
۵	۲۹-۸۰	تویسرکان (همدان)	۴۸° ۱۶'	۳۶° ۳۰'	۱۹۱۰
۶	۱۸-۸۰	تفت (یزد)	۵۴° ۱۵'	۳۱° ۳۲'	۲۰۰۰
۷	۱-۱۶-۸۰	فسا (فارس)	۵۱° ۴۱'	۲۸° ۵۸'	۱۳۸۲
۸	۱۷-۸۰	آشتیان (مرکزی)	۵۰° ۱۴'	۳۲° ۲۴'	۱۷۷۵
۹	۷-۸۰	مهریز (یزد)	۵۴° ۱۷'	۳۰° ۰۵'	۱۵۵۰
۱۰	۱-۱۱-۸۰	شهرضا (اصفهان)	۵۱° ۳۲'	۳۲° ۱۴'	۱۷۵۰
۱۱	۴-۸۰	جیرفت (کرمان)	۵۷° ۴۴'	۲۸° ۴۰'	۶۸۵
۱۲	۲۲-۸۰	تفرش (مرکزی)	۴۹° ۳۸'	۳۴° ۲۷'	۱۷۲۷

جدول ۲- صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده در جمعیت‌های کرچک مورد مطالعه

علامت اختصاری	صفت (واحد اندازه‌گیری)	علامت اختصاری	صفت (واحد اندازه‌گیری)
X ₁₄	وزن گل‌آذین ثانویه و ثالثیه (g)	X ₁	طول ساقه اصلی (cm)
X ₁₅	وزن کل گل‌آذین اصلی (g)	X ₂	تعداد شاخه ثانویه
X ₁₆	وزن گل‌آذین اصلی بدون کپسول و بذر (g)	X ₃	تعداد شاخه ثالثیه
X ₁₇	وزن کپسول در گل‌آذین اصلی (g)	X ₄	طول شاخه ثانویه (cm)
X ₁₈	وزن کل بذور در گل‌آذین اصلی (g)	X ₅	طول گل‌آذین اصلی (cm)
X ₁₉	وزن ۱۰ بذر در گل‌آذین اصلی (g)	X ₆	طول گل‌آذین ثانویه (cm)
X ₂₀	تعداد بذر سالم در گل‌آذین اصلی	X ₇	طول گل‌آذین ثالثیه (cm)
X ₂₁	تعداد بذر پوک در گل‌آذین اصلی	X ₈	طول گل ماده گل‌آذین اصلی (cm)
X ₂₂	سطح برگ در هر گیاه (cm ²)	X ₉	طول گل نر گل‌آذین اصلی (cm)
X ₂₃	طول پهنک برگ (cm)	X ₁₀	تعداد برگ
X ₂₄	عرض پهنک برگ (cm)	X ₁₁	قطر ساقه اصلی (cm)
X ₂₅	طول دم‌برگ (cm)	X ₁₂	وزن تر شاخه ثانویه و ثالثیه (g)
X ₂₆	وزن خشک برگ (g)	X ₁₃	وزن خشک شاخه ثانویه و ثالثیه (g)

(Thompson, 1984) استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA-های استخراج شده از برگ با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. ارزیابی ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با ۱۶ ترکیب آغازگری ISSR (جدول ۳) انجام شد. برای انجام واکنش‌های تکثیر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، از DNA (۳۰ ng)، بافر PCR 10X (۲ μl)، آغازگر (۱ μM)، dNTP (۰/۲ mM)، کلرید منیزیم (۲۵/۰ mM)، Taq پلیمرز (۱ unit) و آب دوبار تقطیر استفاده شد. واکنش تکثیر در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۶ دور شامل: ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۴۲-۵۸ درجه سانتی‌گراد (بسته به ترکیب آغازگر)، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکثیر انتهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler 5331, Eppendorf) انجام گرفت. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد و بافر (Tris base - Boric Acid - EDTA) TBE 0.5X الکتروفورز شدند. برای مشاهده باندها از اتیدیوم بروماید و اشعه UV استفاده شد.

جمعیت‌های مذکور در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی - ارومیه با طول ۴۵ درجه شرقی و عرض ۳۷ درجه شمالی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۱ کشت شدند. هر کرت شامل سه ردیف به طول ۶/۵ متر بود. فاصله ردیف‌ها از یکدیگر ۶۰ سانتی‌متر و فاصله بوته‌ها روی ردیف ۵۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. در طول فصل زراعی مراقبت‌های زراعی لازم شامل مصرف کود، وجین علف‌های هرز، کنترل آفات و بیماری‌ها و آبیاری مزرعه بر اساس توصیه مرکز تحقیقات کشاورزی انجام گرفت. از هر جمعیت در هر تکرار ۵ بوته به صورت تصادفی انتخاب و ۲۶ صفت زراعی - مورفولوژیکی مختلف در آنها اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

ارزیابی ژنوتیپی

برای ارزیابی تنوع بین و درون جمعیت‌ها، از هر جمعیت ۵ بوته به طور تصادفی انتخاب و DNA ژنومی ۶۰ ژنوتیپ متعلق به ۱۲ جمعیت مورد مطالعه به روش (Cetyl) CTAB (Murry & Trimethyl Ammonium Bromide)

جدول ۳- نام و توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کرچک

نام	توالی (3 5)	نام	توالی (3 5)
UBC812	gagagagagagagaa	UBC844	ctctctctctctctc
UBC816	cacacacacacacat	UBC848	cacacacacacacarg
UBC818	cacacacacacacag	UBC849	gtgtgtgtgtgtgtcg
UBC822	tctctctctctctca	UBC857	acacacacacacacyg
UBC825	acacacacacacact	UBC859	tgtgtgtgtgtgtgrc
UBC834	agagagagagagagyt	UBC864	atgatgatgatgatg
UBC836	agagagagagagagya	UBC885	hbhagagagagagag
UBC840	gagagagagagagayt	A12	gagagagagagacc

y = پیریمیدین، r = پورین، h = آدنین، سیتوزین و تیمین، b = سیتوزین، گوانین و تیمین.

تجزیه آماری داده‌ها

مقادیر آماره‌های توصیفی و توزیع فراوانی صفات با استفاده از نرم‌افزار Minitab 14 محاسبه شد. گروه‌بندی توده‌ها بر اساس صفات مورفولوژیک با استفاده از روش

تجزیه خوشه‌ای روی میانگین داده‌های اصلی انجام گرفت. تجزیه خوشه‌ای، پس از استاندارد کردن داده‌ها با محاسبه فواصل مربع اقلیدسی و روش Ward در نرم‌افزار Minitab 14 انجام گرفت. به دلیل اینکه در تجزیه ارتباط از جمعیت-

Tassel 3.0 به صورت مدل خطی مخلوط یا MLM (Mixed Linear Model) اجرا شد.

نتایج

تجزیه تنوع فنوتیپی

مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین حسابی و ضریب تغییرات برای هر یک از صفات مورفولوژیک در توده‌های مورد مطالعه محاسبه و خلاصه شد (جدول ۴). بیشترین ضریب تغییرات برای صفات وزن تر شاخه ثانویه و ثالثیه، وزن خشک شاخه ثانویه و ثالثیه و تعداد بذر پوک در گل‌آذین اصلی مشاهده شد. الگوی پیوسته توزیع فراوانی افراد برای اکثر صفات مورد بررسی نشان داد که صفات توسط یک سیستم چند ژنی کنترل می‌شوند. تجزیه خوشه‌ای به روش Ward، ۶۰ ژنوتیپ مورد مطالعه را در ۴ گروه اصلی قرار داد (شکل ۱). ۲۹ ژنوتیپ در گروه اول، ۶ ژنوتیپ در گروه دوم، ۲۳ ژنوتیپ در گروه سوم و ۲ ژنوتیپ در گروه چهارم قرار گرفتند. بیشترین فاصله بین گروه‌های دوم و چهارم (۱۱/۸۴) مشاهده شد.

ساختار ژنتیکی جمعیت

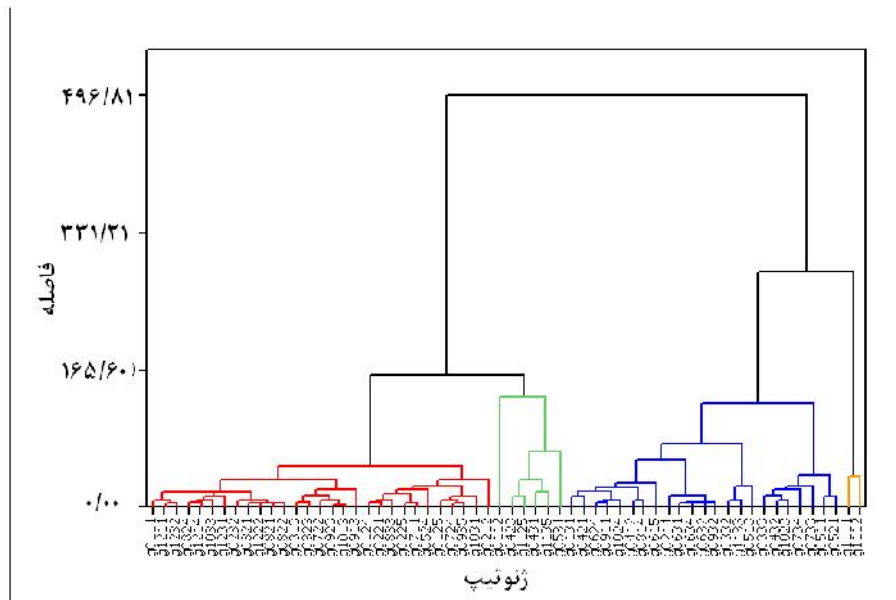
آغازگرهای ISSR مورد استفاده ۱۶۶ مکان را تکثیر کردند که از این میان ۱۱۶ مکان (۶۹/۸۵ درصد) چندشکل بودند. مطالعات متعددی (Bajay, 2010; Gajera et al., 2010; Zheng et al., 2010)، سطح بالایی از چندشکلی را در بین ژنوتیپ‌های مختلف کرچک نشان داده‌اند. در گروه‌بندی جمعیت‌ها بر اساس ماتریس Q و روش Bayesian، ۶۰ ژنوتیپ متعلق به ۱۲ جمعیت مورد مطالعه به‌طور مشخص در ۶ گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۲). گروه چهارم بیشترین درصد (۲۳/۳۳) و گروه سوم و ششم با ۳ ژنوتیپ کمترین درصد (۵) را به‌خود اختصاص دادند. ژنوتیپ‌هایی با منشأ جغرافیایی یکسان در کنار یکدیگر قرار نگرفتند. ژنوتیپ‌های ۶، ۱۹، ۳۳، ۳۷، ۴۵، ۴۷، ۵۲، ۵۳ و ۵۴ در گروه مشخصی قرار نگرفتند.

های طبیعی استفاده می‌شود وجود نیروهای تکاملی در آنها اجتناب ناپذیر است و نادیده گرفتن آنها باعث ایجاد پیوستگی‌های دروغین نشانگر- صفت می‌شود. لذا ساختار ژنتیکی جمعیت و وجود زیر جمعیت‌های احتمالی با روش گروه‌بندی Bayesian در نرم‌افزار (Pritchard et al., 2000) بررسی شد. این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیر جمعیت میزان نامتعادلی پیوستگی حداقل باشد. بین ۱ تا ۱۰ زیرجمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیر جمعیت‌ها ۵ تکرار منظور شد. برای این منظور از مدل ترکیبی (Admixture) و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار (burn-in) و روش MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیرجمعیت‌ها) یک ماتریس به نام Q تولید می‌کند. این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. هنگامی که ضریب تعلق یک فرد به گروهی خاص بیشتر از ۰/۷ باشد آن فرد به گروه مورد نظر اختصاص می‌یابد ولی اگر ضریب کمتر از ۰/۶۹ باشد آن فرد به‌عنوان ژنوتیپ مخلوط (admixed) شناسایی می‌شود (Spataro et al., 2011). تعداد واقعی زیرجمعیت‌ها (K) با استفاده از دو روش برآورد شد: یکی بر اساس معیار انتخابی در Structure یعنی $\ln P(D)$ که احتمال پسین‌داده‌ها را با در نظر گرفتن K فرضی محاسبه می‌کند، و دیگری بر اساس روش Evanno و همکاران (2005). روش اخیر بر آماره K استوار است که شیب تابع احتمالی $\ln P(D)$ را در نقطه-ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. روشی که برای بررسی ارتباط نشانگرها و صفات استفاده شد روش Q+K بود که هم اطلاعات حاصل از K (ضریب خویشاوندی افراد) و هم Q (ضرایب ساختار جمعیت) را با هم تلفیق می‌کند و معلوم شده که این روش در مقایسه با مدل‌های خطی رایج در تجزیه‌های ارتباطی روش بهتری است (Yu et al., 2006). این روش در نرم‌افزار

جدول ۴- مقادیر آماره‌های توصیفی صفات مورد بررسی در جمعیت‌های کرچک مورد مطالعه

صفات	حداقل	حداکثر	میانگین	ضریب تغییرات (CV)	صفات	حداقل	حداکثر	میانگین	ضریب تغییرات (CV)	صفات
X ₁	۲۶/۰۰	۸۹/۰۰	۵۰/۱۸	۲۸/۵۳	X ₁₄	۸/۴۵	۱۸۱/۷۰	۵۳/۹۲	۷۲/۲۸	X ₁₄
X ₂	۱/۰۰	۸/۰۰	۲/۵۵	۴۱/۷۴	X ₁₅	۱۱/۲۹	۱۱۳/۹۲	۵۹/۷۶	۴۵/۸۹	X ₁₅
X ₃	۰/۰۰	۸/۰۰	۲/۵۲	۶۴/۴۰	X ₁₆	۰/۸۵	۱۱/۵۰	۳/۰۸	۷۱/۰۷	X ₁₆
X ₄	۶/۰۰	۵۳/۵۰	۲۸/۷۳	۴۰/۲۲	X ₁₇	۷/۰۷	۴۲/۵۴	۲۱/۷۶	۴۴/۱۷	X ₁₇
X ₅	۱۳/۰۰	۸۴/۰۰	۳۱/۲۵	۴۶/۰۳	X ₁₈	۲/۷۰	۹۵/۶۰	۳۳/۶۰	۵۶/۵۵	X ₁₈
X ₆	۳/۰۰	۳۵/۵۰	۱۸/۶۵	۴۰/۱۵	X ₁₉	۰/۰۰	۴/۴۵	۲/۶۸	۲۳/۹۵	X ₁₉
X ₇	۰/۰۰	۲۰/۳۳	۷/۵۲	۷۱/۶۴	X ₂₀	۰/۰۰	۲۶۶/۰۰	۱۲۵/۷۷	۴۷/۲۹	X ₂₀
X ₈	۶/۰۰	۸۰/۰۰	۲۱/۰۱	۵۹/۰۷	X ₂₁	۰/۰۰	۶۰/۰۰	۵/۷۲	۱۹۲/۵۲	X ₂₁
X ₉	۲/۰۰	۲۸/۰۰	۹/۵۲	۶۷/۷۳	X ₂₂	۲۳۳/۹۰	۲۴۱۴/۰۰	۱۰۵۶/۶۰	۴۱/۲۰	X ₂₂
X ₁₀	۵/۰۰	۵۳/۰۰	۲۰/۷۵	۴۸/۰۳	X ₂₃	۱۵/۵۵	۳۲/۵۰	۲۱/۶۳	۲۰/۷۱	X ₂₃
X ₁₁	۱/۱۰	۲/۶۰	۱/۶۲	۲۱/۳۹	X ₂₄	۱۶/۰۰	۴۷/۴۵	۲۳/۱۹	۲۵/۵۳	X ₂₄
X ₁₂	۰/۰۰	۲۰۵/۰۰	۵۵/۸۰	۸۰/۹۷	X ₂₅	۷/۰۸	۳۱/۸۳	۱۶/۵۴	۳۱/۶۵	X ₂₅
X ₁₃	۰/۰۰	۷۵/۹۵	۱۹/۶۳	۷۸/۳۹	X ₂₆	۵/۰۰	۱۶۵/۰۰	۴۳/۱۱	۷۵/۵۱	X ₂₆

X₁ = طول ساقه اصلی (cm)، X₂ = تعداد شاخه ثانویه، X₃ = تعداد شاخه ثالثیه، X₄ = طول شاخه ثانویه (cm)، X₅ = طول گل آذین اصلی (cm)، X₆ = طول گل آذین ثانویه (cm)، X₇ = طول گل آذین ثالثیه (cm)، X₈ = طول گل ماده گل آذین اصلی (cm)، X₉ = طول گل نر گل آذین اصلی (cm)، X₁₀ = تعداد برگ، X₁₁ = قطر ساقه اصلی (cm)، X₁₂ = وزن تر شاخه ثانویه و ثالثیه (g)، X₁₃ = وزن خشک شاخه ثانویه و ثالثیه (g)، X₁₄ = وزن گل آذین ثانویه و ثالثیه (g)، X₁₅ = وزن گل آذین اصلی (g)، X₁₆ = وزن گل آذین اصلی بدون کپسول و بذر (g)، X₁₇ = وزن کپسول در گل آذین اصلی (g)، X₁₈ = وزن کل بذر در گل آذین اصلی (g)، X₁₉ = وزن ۱۰ بذر در گل آذین اصلی (g)، X₂₀ = تعداد بذر سالم در گل آذین اصلی، X₂₁ = تعداد بذر پوک در گل آذین اصلی، X₂₂ = سطح برگ در هر گیاه (cm²)، X₂₃ = طول پهنک برگ (cm)، X₂₄ = عرض پهنک برگ (cm)، X₂₅ = طول دمیرگ برگ (cm) و X₂₆ = وزن خشک برگ (g).



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای ۶۰ ژنوتیپ متعلق به ۱۲ جمعیت کرچک مورد مطالعه بر اساس ۲۶ صفت مورفولوژیک با استفاده از روش Ward و مربع فاصله اقلیدسی. دو رقم بعد از g شماره جمعیت را نشان می‌دهد. نام جمعیت مرتبط با هر شماره در جدول ۱ ارائه شده است.

تجزیه ارتباط

با استفاده از روش مدل خطی مخلوط (MLM) ۲۶ مکان پیوسته با ۱۷ صفت شناسایی شد (جدول ۵). مقدار احتمال (*P-value*) از ۰/۰۰۱۰ (UBC812-8) تا ۰/۰۰۹۹ (A12-7 و UBC836-14) متغیر بود. مقدار R^2 (درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده) در محدوده ۱۲/۴ (UBC857-۷) تا ۲۸/۱ درصد (UBC844-2) متغیر بود. با توجه به جدول ۵، سه مکان با صفات طول گل نر گل آذین اصلی (X_9) و وزن ۱۰ بذر در گل آذین اصلی (X_{19})، ۲ مکان با صفات تعداد شاخه ثانویه (X_2)، طول شاخه ثانویه (X_4)، طول گل آذین ثانویه (X_6)، تعداد برگ (X_{10}) و وزن خشک

برگ (X_{26}) پیوسته بودند. سایر مکان‌ها به طور اختصاصی فقط با یک صفت پیوسته بودند. از بین مکان‌های پیوسته، مکان UBC812-8 بین اکثر صفات شامل تعداد شاخه ثانویه (X_2)، تعداد شاخه ثالثیه (X_3)، طول گل ماده گل آذین اصلی (X_8)، تعداد برگ (X_{10})، قطر ساقه اصلی (X_{11})، وزن خشک شاخه ثانویه و ثالثیه (X_{13})، وزن کل بذور در گل آذین اصلی (X_{18}) و وزن خشک برگ (X_{26}) مشترک بود. شاخص R^2 در بین صفات مذکور از ۰/۱۲۵ تا ۰/۲۲۲ متغیر بود. صفات طول شاخه ثانویه (X_4) و طول گل آذین ثانویه (X_6) نیز دارای دو مکان مشترک UBC836-9 و A12-7 بودند.

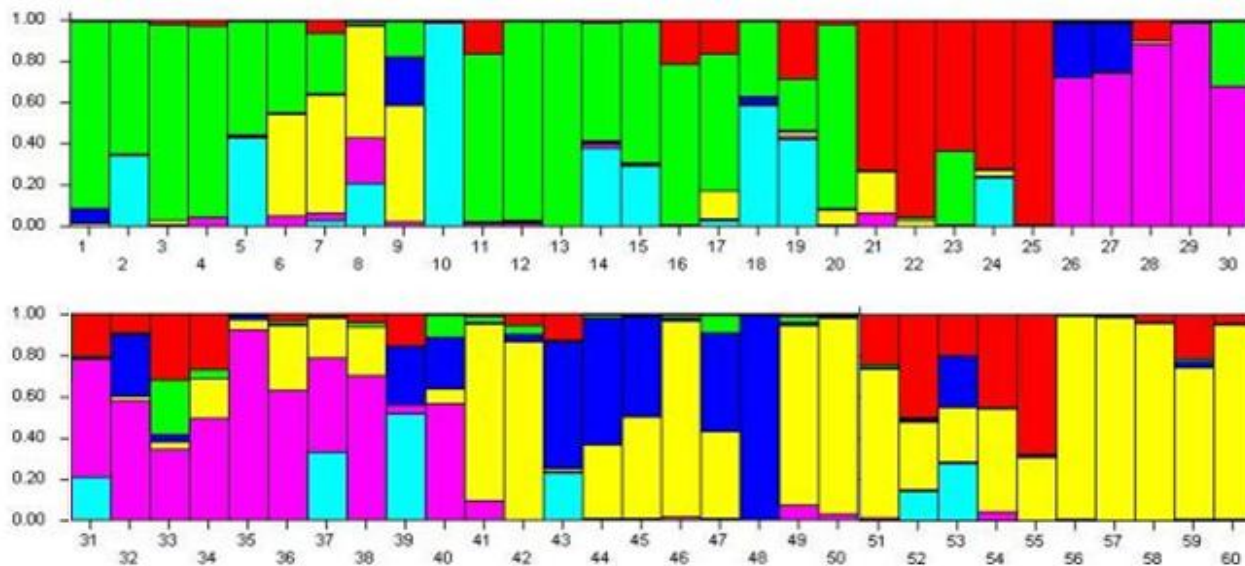
جدول ۵- نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات مورفولوژیک در جمعیت‌های کرچک مورد مطالعه

بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM)

صفت	مکان	R^2	<i>P-value</i>	صفت	مکان	R^2	<i>P-value</i>
X_1	UBC844-7	۰/۱۸۶	۰/۰۰۱۸	X_{11}	UBC812-8	۰/۱۳۷	۰/۰۰۸۷
X_2	UBC836-1	۰/۱۳۳	۰/۰۰۹۷	X_{12}	UBC848-5	۰/۱۵۳	۰/۰۰۵۴
	UBC812-8	۰/۲۲۳	۰/۰۰۱۰	X_{13}	UBC812-8	۰/۱۸۲	۰/۰۰۲۶
X_3	UBC812-8	۰/۱۲۵	۰/۰۰۹۸	X_{14}	UBC836-1	۰/۲۰۱	۰/۰۰۹۱
X_4	A12-7	۰/۱۳۲	۰/۰۰۹۹	X_{16}	UBC844-2	۰/۲۸۱	۰/۰۰۵۴
	UBC836-9	۰/۱۵۵	۰/۰۰۵۵	X_{18}	UBC812-8	۰/۲۰۱	۰/۰۰۱۲
X_6	UBC836-9	۰/۱۲۷	۰/۰۰۹۸	X_{19}	UBC857-5	۰/۱۲۴	۰/۰۰۷۳
	A12-7	۰/۱۴۷	۰/۰۰۵۵		A12-7	۰/۱۲۶	۰/۰۰۷۱
X_8	UBC812-8	۰/۱۲۷	۰/۰۰۶۹		UBC840-6	۰/۱۵۲	۰/۰۰۳۲
X_9	UBC844-9	۰/۱۲۹	۰/۰۰۸۵	X_{21}	UBC836-5	۰/۱۳۹	۰/۰۰۷۴
	UBC885-10	۰/۱۵۳	۰/۰۰۴۴	X_{26}	UBC836-14	۰/۱۲۹	۰/۰۰۹۹
	UBC885-11	۰/۱۵۳	۰/۰۰۴۴		UBC812-8	۰/۱۹۴	۰/۰۰۱۸
X_{10}	UBC848-5	۰/۱۴۸	۰/۰۰۵۱				
	UBC812-8	۰/۱۹۰	۰/۰۰۱۶				

X_1 = طول ساقه اصلی (cm)، X_2 = تعداد شاخه ثانویه، X_3 = تعداد شاخه ثالثیه، X_4 = طول شاخه ثانویه (cm)، X_6 = طول گل آذین ثانویه (cm)، X_8 = طول گل ماده گل آذین اصلی (cm)، X_9 = طول گل نر گل آذین اصلی (cm)، X_{10} = تعداد برگ، X_{11} = قطر ساقه اصلی (cm)، X_{12} = وزن تر شاخه ثانویه و ثالثیه (g)، X_{13} = وزن خشک شاخه ثانویه و ثالثیه (g)، X_{14} = وزن گل آذین ثانوی و ثالثیه (g)، X_{16} = وزن گل آذین اصلی بدون کپسول و بذر (g)، X_{18} = وزن کل بذور در گل آذین اصلی (g)، X_{19} = وزن ۱۰ بذر در گل آذین اصلی (g)، X_{21} = تعداد بذر پوک در گل آذین اصلی، X_{26} = وزن خشک برگ (g). R^2 درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط نشانگر شناسایی شده (QTL) را نشان می‌دهد.

شکل ۲- گروه‌بندی ۶۰ ژنوتیپ متعلق به ۱۲ جمعیت کرچک بر اساس ۱۱۶ مکان تکثیری حاصل از آغازگرهای ISSR مورد استفاده. محور Y نشان دهنده ضریب تعلق افراد به گروه‌های مربوطه و محور X نشان دهنده نام ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. افراد دارای سایه مشابه به گروهی مشابه تعلق دارند.



افراد ۵-۱ متعلق به جمعیت ۱، ۶-۱۰ متعلق به جمعیت ۲، ۱۱-۱۵ متعلق به جمعیت ۳، ۱۶-۲۰ متعلق به جمعیت ۴، ۲۱-۲۵ متعلق به جمعیت ۵، ۲۶-۳۰ متعلق به جمعیت ۶، ۳۱-۳۵ متعلق به جمعیت ۷، ۳۶-۴۰ متعلق به جمعیت ۸، ۴۱-۴۵ متعلق به جمعیت ۹، ۴۶-۵۰ متعلق به جمعیت ۱۰، ۵۱-۵۵ متعلق به جمعیت ۱۱، ۵۶-۶۰ متعلق به جمعیت ۱۲ هستند.

بحث

تجزیه فنوتیپی

بیشترین ضریب تغییرات برای صفات وزن تر شاخه ثانویه و ثالثیه، وزن خشک شاخه ثانویه و ثالثیه و تعداد بذر پوک در گل‌آذین اصلی مشاهده شد. در واقع جمعیت‌های کرچک مورد بررسی برای این صفات بیشترین تنوع را نشان می‌دهند. در بررسی تنوع آگرومورفولوژیکی و ژنتیکی ۳۳ ژنوتیپ کرچک توسط Kanti و همکاران (۲۰۱۵)، بیشترین تنوع برای طول گل‌آذین اصلی گزارش شد. آن‌ها همچنین تنوع قابل توجهی برای تعداد گل‌آذین ثانویه، تعداد گل‌آذین ثالثیه و تعداد گل‌آذین در هر گیاه مشاهده کردند. تنوع زیاد برای یک صفت زمینه را برای انتخاب مواد گیاهی مناسب در پروژه‌های اصلاحی فراهم می‌نماید.

بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات مورفولوژیک، با الگوی منشأ جغرافیایی آنها مطابقت نداشت. الگوی تنوع گیاهان موجود در هر منطقه

می‌تواند تحت تاثیر برنامه‌های اصلاحی، جمع‌آوری ژرم پلاسما و فعالیت بشر قرار گیرد (Kumar et al., 2012). قرارگیری ژنوتیپ‌های متعلق به مناطق مختلف جغرافیایی در یک گروه بیانگر تنوع ژنتیکی در هر منطقه جغرافیایی و عدم تمرکز منابع ژنتیکی با ویژگی خاص در هر ناحیه است. از این رو به منظور طراحی برنامه به‌نژادی برای گیاه و در یک منطقه، احتمالاً امکان دسترسی به منابع ژنتیکی با قابلیت‌های مورد نظر و سازگار با همان شرایط وجود دارد (Bidkhani Nejad et al., 2015). یکی از دلایلی که ژنوتیپ‌های ژرم پلاسما موجود بر اساس مکان‌ها شباهتی در دسته‌بندی نشان نمی‌دهند ممکن است عدم شناخت منشأ دقیق گیاه باشد یعنی ژنوتیپ‌هایی که در یک منطقه جغرافیایی وجود دارند در اصل از مکان دیگری منشأ گرفته ولی تحت نام جدیدی در مقصد کشت شده باشند. چنین نتایجی اغلب به این علت رخ می‌دهد که جابه‌جایی ژنوتیپ‌ها از منطقه‌ای به سایر بخش‌های کشور بیشتر بر پایه

از ژنوم خود را از تبار خود در جمعیت K به ارث برده باشد (Ebrahimi et al., 2014). البته تعداد ناکافی نشانگرهای چندشکل استفاده شده در این مطالعه می‌تواند یکی از عوامل اساسی عدم مشاهده رابطه مشخص بین افراد هر گروه بر اساس تقسیم‌بندی‌های جغرافیایی باشد. بنابراین با افزایش تعداد نشانگرها و نوع نشانگر (Ebrahimi et al., 2014) مورد استفاده به تفکیک بهتری در ژرم‌پلاسم مورد مطالعه دست یافت.

تجزیه ارتباط

در این تحقیق از روش MLM جهت شناسایی مکان‌های پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفات مورفولوژیک استفاده شد که در نهایت ۲۶ مکان پیوسته با ۱۷ صفت شناسایی شد. بیشترین تعداد نشانگر برای صفات طول گل نر گل‌آذین اصلی (X_9) و وزن ۱۰ بذر در گل‌آذین اصلی (X_{19}) شناسایی شد. مکان UBC844-2 شناسایی شده برای صفت وزن گل‌آذین اصلی بدون کپسول و بذر (X_{16}) بیشترین مقدار R^2 را داشت. از این رو می‌توان گفت که قسمت اعظم تنوع فنوتیپی این صفت (۲۸ درصد) توسط این مکان توجیه می‌شود. در این مطالعه، برای برخی از صفات، مکان‌های مشترک شناسایی شد. به‌عنوان نمونه مکان UBC812-8 با اکثر صفات مورفولوژیک مورد مطالعه (۸ صفت)، پیوستگی نشان داد (جدول ۵). شناسایی مکان‌های مشترک می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد (Jun et al., 2008). شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌تازدی گیاهان دارد، زیرا گزینش همزمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌کنند (Tuberosa et al., 2002; Hittalmani et al., 2003). شناسایی نشانگرهای پیوسته با نواحی ژنومی کنترل‌کننده صفات در گیاهان مختلف انجام گرفته است. در مطالعه‌ای نقشه ژنتیکی ۹۳ ژنوتیپ حاصل از تلاقی برگشتی گیاه *Jatropha* با ۲۱۶ نشانگر ریزماهواره و ۲۹۰ نشانگر تفاوت تک نوکلئوتیدی تهیه شد. نشانگرهای مورد مطالعه در یازده گروه لینکاژی با فاصله ۲/۸ cM نقشه‌یابی شدند.

خصوصیات مورفولوژیک صورت می‌گیرد. نتایج مشابهی توسط Allan و همکاران (۲۰۰۸)، Bhavesh و همکاران (۲۰۱۰) و Kanti و همکاران (۲۰۱۵) در گیاه کرچک گزارش شده است.

در گیاهان زراعی، یکی از معیارهای انتخاب والدین برای تلاقی و بهره‌مندی از پدیده‌ی هتروزیس، فاصله‌ی ژنتیکی می‌باشد. هرچند مکانیزم‌های ژنتیکی که در فرایند هتروزیس دخیل‌اند به‌خوبی درک نشده است ولی مشخص شده است که هیبریدهای حاصل از تلاقی بین والدین با روابط ژنتیکی کمتر و فاصله ژنتیکی بیشتر، قدرت بیشتری را نسبت به هیبریدهای حاصل از والدین با روابط ژنتیکی نزدیک‌تر از خود نشان می‌دهند. بنابراین افراد متعلق به گروه‌های هتروتیک دوم و چهارم (شکل ۱) می‌تواند به‌طور بالقوه به‌عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های اصلاحی کرچک استفاده شوند.

ساختار ژنتیکی جمعیت

در سال ۲۰۰۰، Pritchard و همکارانش بحث‌هایی در مورد برخی محدودیت‌های موجود در روش‌های خوشه‌بندی بر مبنای فاصله مطرح و روش خوشه‌بندی بر مبنای مدل را پیشنهاد کردند. این روش بر اساس روش آماری Bayesian می‌باشد. به‌کمک این روش حتی با استفاده از تعداد اندکی نشانگرهای مولکولی تجزیه موثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به زیرجمعیت‌های مناسب و تشخیص افراد مختلط امکان‌پذیر می‌شود. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر مبنای مدل با روش بی‌زین به‌منظور بی‌بردن به ساختار فاصله‌ای زیر جمعیت‌ها و با فرض اینکه مدل تبار از نوع مخلوط و مدل فراوانی آلی از نوع پیوسته باشد نشان داد در ژرم‌پلاسم مورد مطالعه ۶ زیر جمعیت وجود دارد که هیچ یک از آنها بر مبنای مناطقی که ژنوتیپ‌ها از آنجا جمع‌آوری شده بودند به‌طور کامل از هم تفکیک نشده‌اند (شکل ۲). اختلاط شدید مشاهده شده در این ژرم‌پلاسم این فرض را که تبار ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نوع مخلوط باشد پیشنهاد می‌کند. یعنی فرد i ام ممکن است بخش‌هایی

در UBC812-8، UBC840-6، UBC857-5 و A12-7 در صورت تایید می‌توان برای گزینش افراد جهت افزایش وزن کل بذور در گل‌آذین اصلی (X_{18})، وزن ۱۰ بذر در گل‌آذین اصلی (X_{19}) و از مکان UBC836-5 جهت کاهش تعداد بذر پوک در گل‌آذین اصلی (X_{25}) و در نتیجه افزایش عملکرد بذر و عملکرد روغن کرچک بهره جست. عملکرد روغن از ترکیب عملکرد بذر و مقدار روغن به دست می‌آید. بنابراین کاهش عملکرد دانه باعث کاهش عملکرد روغن می‌شود و مقدار پایین روغن به دلیل پرنشدن و نارس بودن دانه‌ها می‌باشد (Koutroubas *et al.*, 2000). کرچک در حالت طبیعی تعداد زیادی شاخه فرعی و گل‌آذین تولید می‌کند که یک ویژگی نامناسب و غیر اقتصادی به‌شمار می‌آید. چون این صفت باعث افزایش طول دوره بلوغ و رشد گیاه و ایجاد اختلال در برداشت مکانیکی می‌شود. یکی از اهداف اصلاحی این گیاه تولید ارقامی پاکوتاه، دارای تعداد اندکی شاخه فرعی و وجود ۱ تا ۳ گل‌آذین می‌باشد (Koutroubas *et al.*, 1999). بنابراین در برنامه‌های اصلاحی می‌توان از مکان‌های پیوسته با صفات طول ساقه اصلی (X_1)، تعداد شاخه ثانویه (X_2)، تعداد شاخه ثالثیه (X_3) و طول گل‌آذین اصلی (X_5) به‌منظور تولید چنین ارقامی استفاده کرد.

با استفاده از روش MLM، ۲۶ مکان پیوسته با ۱۷ صفت شناسایی شد. با استفاده از مکان‌های مرتبط با صفات زراعی از جمله اجزای عملکرد می‌توان صفات مورد نظر را از طریق تلاقی‌های فی مابین به یک ژنوتیپ فاقد آن صفت انتقال داد. همچنین می‌توان برای صفات مورد نظر آغازگرهای SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) را از روی نشانگرهای پیوسته طراحی کرد و در انتخاب به‌کمک نشانگر MAS، Marker Assisted Selection) به‌صورت ویژه در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد.

با نقشه تهیه شده مکان‌های ژنی کنترل‌کننده ترکیبات روغن مانند استتاریک‌اسید و اولئیک‌اسید مشخص شد (Wang *et al.*, 2011). بر اساس نظر Wang و همکاران (۲۰۱۱) از نتایج مطالعه اخیر می‌توان جهت نقشه‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده صفات زراعی، کلن‌سازی ژن و انتخاب به‌کمک نشانگر در گیاه جاتروفا بهره جست. در مطالعه‌ای که توسط King و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، ژن‌های کنترل‌کننده ارتفاع گیاه، قطر ساقه، تعداد شاخه‌ها، تعداد کل بذر در هر گیاه، وزن ۱۰۰ دانه، محتوای روغن بذر و ترکیبات اسیدچرب در گیاه جاتروفا مکان‌یابی شدند. در این تحقیق تعدادی QTL هم‌مکان برای قطر ساقه و ارتفاع گیاه شناسایی شد. محققین پیشنهاد کردند از مکان‌های ژنی شناسایی شده می‌توان جهت ایجاد واریته‌هایی با بهبود عملکرد بذر و روغن استفاده کرد. در این خصوص Li و همکاران (۲۰۱۴) تجزیه ارتباط برای صفات محتوای روغن و پروتئین در ۳۶۹ ژنوتیپ کنجد را با ۱۱۲ نشانگر چندشکل SSR انجام دادند. این تحقیق ۱۹ نشانگر پیوسته با محتوای روغن، ۲۴ نشانگر پیوسته با محتوای پروتئین و ۱۹ نشانگر مشترک برای هر دو صفت شناسایی شد. آلل‌های پیوسته با میزان روغن بالا، همیشه با میزان پروتئین پایین پیوسته بودند. نشانگرهای یافت شده از طریق روش MLM نشان داد محتوای روغن و پروتئین به‌وسیله ژن‌های اصلی کنترل می‌شوند. در بررسی که به‌منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک در بادام زمینی با استفاده از نشانگرهای SSR انجام شد، مکان ریز ماهواره‌ای PM36 با بسیاری از صفات مورد مطالعه از جمله طول غلاف، عرض غلاف، تعداد دانه در غلاف، نسبت وزن دانه به‌وزن غلاف، وزن غلاف در بوته، تعداد دانه در بوته، طول دانه و وزن دانه مرتبط بود (Abdollahi Mandoulakani *et al.*, 2010).

عملکرد بذر یک صفت اقتصادی مهم برای گیاه دارویی کرچک به‌شمار می‌آید که عوامل زیادی از جمله ژنوتیپ، محیط و زمان برداشت بر روی آن تاثیر می‌گذارند (Koutroubas *et al.*, 1999). بنابراین از مکان‌های

application. Marcel Dekker, New York 787-795.

- Ebrahimi, M.A., Mir, M., Zinalabedini, M. and Imani, A., 2014. Application of microsatellite markers and some morphological traits in core collection identification of *Prunus dulcis* Mill. *Crop Biotechnology*, 8: 57-75.
- 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.
- Gajera, B.B., Kumar, N., Singh, A.S. and Punvar, B.S., 2010. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. *Industrial Crops and Products*, 32: 491-498.
- Goodarzi, F., Darvishzadeh, R., Hassani, A. and Hassanzadeh, A., 2011. Study on genetic variation in Iranian castor bean (*Ricinus communis* L.) accessions using multivariate statistical techniques. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 5254-5261.
- Hittalmani, S., Huang, N., Courtois, B., Venuprasad, R., Shashidhar, H.E., Zhuang, J.Y., Zheng, K.L., Liu, G.F., Wang, G.C., Sidhu, J.S., Srivantaneeyakul, S., Singh, V.P., Bagali, P.G., Prasanna, H.C., McLaren, G. and Khush, G.S., 2003. Identification of QTL for growth and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 679-90.
- Jeong, G.T. and Park, D.H., 2009. Optimization of biodiesel production from castor oil using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 156: 431-441.
- Jun, T.H., Van, K., Kim, M.Y., Lee, H.S. and Walker, D.R., 2008. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica*, 162: 179-191.
- Kanti, M., Anjani, K., Usha Kiran, B. and Vivekananda, K., 2015. Agro-morphological and molecular diversity in castor (*Ricinus communis* L.) germplasm collected from Andaman and Nicobar Islands, India. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 51: 96-109.
- King, A.J., Montes, L.R., Clarke, J.G., Itzep, J., Perez, C.A.A., Jongschaap, R.E.E., Visser, R.G.F., Loo, E.N. and Graham, I.A., 2015. Identification of QTL markers contributing to plant growth, oil yield and fatty acid

سپاسگزاری

بدینوسیله نگارندگان از دانشکده کشاورزی، پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه و همچنین از ریاست محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی که امکانات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم کردند، قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

- Abdollahi Mandoulakani, B., Alami, A. and Esfahani, M., 2010. Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 12: 510-519.
- Allan, G., Williams, A., Rabinowicz, P.D., Chan, A.P., Ravel, J. and Keim, P., 2008. Worldwide genotyping of castor bean germplasm (*Ricinus communis* L.) using AFLPs and SSRs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55: 365-378.
- Bajay, M.M., 2010. Development of microsatellite markers and characterization of germplasm of castor (*Ricinus communis* L.). Dissertation, Universidade de Sao Paulo-USP, Brazil.
- Bhavesh, B.G., Kumar, N., Singh, A.S., Punvar, B.S., Ravikiran, R., Subhash, N. and Jadeja, G.C., 2010. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. *Industrial Crops and Products*, 33: 491-498.
- Bidkhani Nejad F., Mohammadi Mirik, A., and Dashti, H., 2015. Evaluation of two subspecies of flax (*Linum usitatissimum*) in different geographical regions for genetic diversity of seed yield and its components. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 45: 603-611.
- Borch-Jensen, C., Jensen, B., Mathiasen, K. and Mollerup, J., 1997. Analysis of seed oil from *Ricinus communis* and *Dimorphoteca pluvialis* by gas and supercritical fluid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74: 277-284.
- Buckler, E.S. and Thornsberry, J.M., 2002. Plant molecular diversity and applications to genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 107-111.
- Caupin, H.J., 1997. Products from castor oil: past, present, and future. In Gunstone, F.D., Padly, F.B., (eds), *Lipid technologies and*

- Scarpa, A. and Guerci, A., 1982. Various uses of the castor oil plants (*Ricinus communis* L.) a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 5: 117-137.
- Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti Zeuli, P. and Negri, V., 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 122: 1281-1291.
- Tuberosa, R., Salvi, S., Sanguineti, M.C., Landi, P., Maccaferri, M. and Conti, S., 2002. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield in drought-stressed maize: case studies, shortcomings and perspectives. *Annals of Botany*, 89: 941-963.
- Wang, C.M., Liu, P., Yi, C., Gu, K., Sun, F., Li, L., Chueng Lo, L., Liu, X., Feng, F., Lin, G., Cao, S., Hong, Yan., Yin, Z. and Yue, G.H., 2011. A First generation microsatellite- and SNP-based linkage map of *Jatropha*. *Plos One*, 6: 1-8.
- Weiss, E.A., 1983. *Oilseed Crops*. Longman. New York. 660 pp.
- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W., Vroh, B.I., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., Nielsen, D.M., Holland, J., Kresovich, S. and Buckler, E.S., 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 38: 203-208.
- Zheng, L., Qi, J., Fang, P., Su, J., Xu, J. and Tao, A., 2010. Genetic diversity and phylogenetic relationship of castor germplasm as revealed by SRAP analysis. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 28(1): 1-6.
- Zhao, K.G., Zhou, M.Q. and Chen, L.Q., 2007. Genetic diversity and discrimination of *Chimonanthus praecox* (L.) Link germplasm using ISSR and RAPD markers. *Horticulture Science*, 42: 1144-1148.
- composition in the oilseed crop *Jatropha curcas* L. *Biotechnology for Biofuels*, 8: 160.
- Koutroubas, S.D., Papakosta, D.K. and Doitsinis, A., 1999. Adaptation and yielding ability of castor plant (*Ricinus communis* L.) genotypes in a Mediterranean climate. *European Journal of Agronomy*, 11: 227-237.
- Koutroubas, S.D., Papakosta, D.K. and Doitsinis, A., 2000. Water requirements for castor oil crop (*Ricinus communis* L.) in a Mediterranean climate. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 184: 33-41.
- Kumar, H., Kaur, G. and Banga, S., 2012. Molecular characterization and assessment of genetic diversity in sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm collection using ISSR markers. *Journal of Crop Improvement*, 26: 540-557.
- Li, C., Miao, H., Wei, L., Zhang, T., Han, X. and Zhang, H., 2014. Association Mapping of Seed Oil and Protein Content in *Sesamum indicum* L. Using SSR Markers. *Plos One*, 9: 1-12.
- Murry, M. and Thompson, W.F., 1984. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325.
- Ogunniyi, D.S., 2006. Castor oil: a vital industrial raw material. *Bioresource Technology*, 97: 1086-1091.
- Pecina-Quintero, V., Anaya-López, J.L., Núñez-Colín, C.A., Zamarripa-Colmenero, A., Montes-García, N., Solís-Bonilla, J.L. and Aguilar-Rangel, M.R., 2013. Assessing the genetic diversity of castor bean from Chiapas, México using SSR and AFLP markers. *Industrial Crops and Products*, 41: 134-143.
- 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.
- Savy Filho, A., 2005. Castor bean breeding. In: Borém A. (Ed.) *Improvement of Cultivated Species*. Viçosa: Federal University of Viçosa.

Association analysis of morphological traits in castor (*Ricinus communis* L.) by using ISSR markers

Z. Aghaali¹, R. Darvishzadeh*² and F. Goodarzi³

1-M.Sc., Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, I.R.Iran.

2*-Corresponding author, Prof., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, I.R.Iran.

Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

3-M.Sc., Herbs, Spices, and Medicinal Plants, Department of Horticulture, Urmia University, Urmia, I.R.Iran.

Received: 27.08.2015

Accepted: 04.02.2016

Abstract

Castor (*Ricinus communis* L.) is one of the most ancient medicinal oil crops in the world. It has been vastly distributed in different parts of Iran. Association analysis based on 16 combinations of ISSR primers was applied in order to identify ISSR markers associated with genes controlling 26 morphological traits in 12 populations of castor. The genotypes were evaluated for morphological traits in randomized complete block design with three replications in experimental field of Agricultural Research Center of West-Azerbaijan during 2012. Locus UBC-859 was the most effective marker to assessment the diversity in populations of castor. Based on 116 loci produced by ISSR primers, the studied genotypes divided into 6 subpopulations. Using mixed linear model (MLM), 26 loci were identified to be significantly associated with 17 morphological traits. R^2 values ranged from 12.4% (UBC857-5) to 28.1% (UBC844-2). Most of the identified markers were associated specifically with one trait. UBC812-8 was associated with 8 traits. Common markers between some of the studied traits can be due to linkage or pleiotropic effects. The common markers lead to increase the efficiency of marker-assisted selection in plant breeding programs via simultaneously selection for several traits.

Keywords: Castor, linkage disequilibrium, mixed linear model, molecular markers, morphological traits.