تجزیه ارتباط بین ماندگاری و نشانگرهای مولکولی AFLP در ژنوتیپ‌های گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)

زینب روئین[1*]، معظم حسن‌پور اصیل[2]، عاطفه صبوری[3]

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه ایلام، ایلام. ۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، رشت. ۳- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه گیلان، رشت.

*نویسنده مسئول:z.roein@ilam.ac.ir

چکیده

با هدف شناسایی نشانگرهای AFLP مرتبط با ماندگاری گل داوودی از تجزیه ارتباط استفاده شد. ارتباط بین آغاز پیری و نشانگرهای مولکولی AFLP با استفاده از ۲۵ ترکیب آغازگری (*Eco*RI و *Mse*I) و ۴۴ ژنوتیپ گل داوودی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تجزیه ارتباط در مدل MLM برای متغیر ماندگاری داوودی سبب شناسایی ۱۴ نشانگر معنی‌دار و مرتبط گردید، در حالی‌که در مدل GLM، ۲۸ نشانگر مرتبط با صفت مذکور شناسایی شد. قوی‌ترین ارتباط (۳۲ درصد)، بین ماندگاری و نشانگر M-CTT/E-AAC35 برقرار بود. از طرف دیگر نشانگر M-CTT/E-AGA68 فقط ۱۷ درصد از تغییرات مربوط به ماندگاری را توجیه نمود. بنابراین نشانگرهای آگاهی‌بخش حاوی اطلاعات مفید که همبستگی معنی‌داری با نشانگرها دارند، در صورت تائید در سایر آزمایش‌ها، می توانند در برنامه‌های اصلاحی برای افزایش ماندگاری داوودی استفاده شوند.

کلمات کلیدی: پیری گلبرگ، داوودی، نشانگر آگاهی‌بخش، ماندگاری

مقدمه

استفاده از تجزیه ارتباط به عنوان یک رهیافت برای آشکارسازی ارتباط بین صفت و نشانگر می‌تواند مکمل مناسبی برای مطالعات اصلاح کلاسیک باشد. تجزیه ارتباط به‌طور موفقیت‌آمیزی در محصولات مختلف برای شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با انواع صفات به‌کار گرفته شده است (Berger et al., 2013). از جمله روش‌های مولکولی تجزیه صفات کمی با استفاده از نشانگرهای DNA، تجزیه ارتباط می‌باشد. این روش می‌تواند راه حل سودمندی برای آشکارسازی ارتباط بین صفت و نشانگر باشد. به عبارت دیگر تجزیه ارتباط روشی جایگزین برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و پیچیده در مجموعه ژرم-پلاسم است، به‌طوری‌که قبل از استفاده از ژرم‌پلاسم در برنامه‌های به نژادی اطلاعات مناسبی را در اختیار به‌نژادگر قرار می‌دهد (Hwang, 2008). برای طبقه‌بندی جمعیت‌ها در ابتدا تنها از مدل خطی عمومی یا GLM استفاده می‌شد که بر ارتباط‌های ساختاری، کنترل ژنومی و روابط خویشاوندی استوار است. اما با گذشت زمان مدل خطی مخلوط یا MLM به عنوان یک روش بهبود یافته برای محاسبه هم‌زمان ساختار جمعیت و ارتباط بین افراد جمعیت معرفی شد (Zhang et al., 2010).

پیری در برگ و گلبرگ به وسیله علایم قابل مشاهده مانند زردی برگ، ریزش، پژمردگی و پلاسیدگی گلبرگ که تعیین‌کننده کیفیت و ارزش زینتی گیاه است مشخص می‌شود. اما این نشانه‌ها در مراحل پایانی و بعد از تغییرات ساختاری، مولکولی و بیوشیمیایی ظاهر می‌شوند (Battelli et al., 2011; Lerslerwong et al., 2009). گل داوودی یکی از پر کاربردترین گیاهان زینتی است. آنچه مهم به نظر می‌رسد اهمیت شناخت تغییرات فیزیولوژیک است که در طی پیری در گل به عنوان اندام نهایی برای ارزیابی اتفاق می‌افتد. شناسایی این رفتارهای فیزیولوژیک در زمان پیری و پس از برداشت برای انتخاب ژنوتیپ برتر مهم به نظر می رسد. تنوع ژنوتیپی یک فرصت مناسب برای توسعه گیاهان با ماندگاری طولانی است. پژوهش‌های متعددی در سال‌های اخیر برای درک رابطه بین صفت و نشانگر در محصولات مختلف انجام شده است. بیشتر مطالعات در گل داوودی به صفات زینتی و رویشی محدود شده است. این در حالی است که تهیه نقشه ژنی، استفاده از نشانگرهای مولکولی و تجزیه QTL در گل داوودی

کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته و به کندی در حال پیشرفت است (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2011). در پژوهشی برای بررسی ارتباط ۱۹ نشانگر SRAP و ۱۸ صفت مهم فنوتیپی از ۵۸ رقم داوودی استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که شش مکان در نشانگرهای SRAP ارتباط معنی‌داری با پنج صفت کمی مربوط به گل و برگ دارند. به‌طوری‌که مقدار تبیین فنوتیپی مکان‌ها بین ۰/۰۷۴ تا ۰/۴۸ بود (Li et al., 2012). هدف از انجام پژوهش حاضر استفاده از روش تجزیه ارتباط برای آشکارسازی ارتباط بین آغاز پیری گلبرگ داوودی با نشانگرهای AFLP بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد ارزیابی شامل ۴۴ ژنوتیپ داوودی بودند که از ایستگاه ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی شهرستان محلات تهیه شدند. این بررسی به صورت طرح کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا و برای گلدهی ژنوتیپ‌ها در فضای گلخانه شرایط مطلوب فراهم شد. برای مقایسه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از لحاظ رفتار پیری، گل‌ها با گلچه‌های زبانه‌ای کاملاً باز برداشت شدند. چهار عدد گل از هر بوته برداشت و بدون ساقه گل در لوله‌های آزمایشی محتوی آب مقطر قرار گرفت. سپس گل‌ها در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد و نور ۱۵ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه نگهداری شدند. آغاز پیری گل به صورت تعداد روز از برداشت گل (باز شدن گل) تا زمانی‌که یک یا دو گلچه زبانه‌ای بیرونی پژمرده شوند، محاسبه شد (Lv et al., 2011). مراحل استخراج DNA با روش CTAB (Saghai-Maroof et al., 1984) انجام پذیرفت. روش AFLP بر اساس روش Vos et al., (1995) انجام شد. مطابق با جدول ۱، ۲۵ ترکیب آغازگری مبتنی بر دو آنزیم برشی *Eco*RI و *Mse*I برای تحقیق حاضر انتخاب شد (Roein et al., 2014).

جدول ۱- توالی آغازگرهای AFLP مورد استفاده برای بررسی ژنوتیپ‌های گل داوودی

آغازگر انتخابی	کد	توالی
MseI +3		
MseI+ CAC	M-CAC	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3’
MseI+ CAG	M-CAG	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3’
MseI+ CAA	M-CAA	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3’
MseI+ CTT	M-CTT	5’-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3’
MseI+ CTG	M-CTG	5’-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3’
EcoRI+3		
EcoRI+ ACA	E-ACA	5’-GTAGACTGCGTACCAATTCACA-3’
EcoRI+ AAC	E-AAC	5’-GTAGACTGCGTACCAATTCAAC-3’
EcoRI + AAG	E-AAG	5’-GTAGACTGCGTACCAATTCAAG-3’
EcoRI+ AGA	E-AGA	5’-GTAGACTGCGTACCAATTCAGA-3’
EcoRI+ ACC	E-ACC	5’-GTAGACTGCGTACCAATTCACC-3’
EcoRI+ ACG	E-ACG	5’-GTAGACTGCGTACCAATTCACG-3’
EcoRI+ AA	E-AA	5’-GTAGACTGCGTACCAATTCAA-3’

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای مطالعه رابطه بین ویژگی‌های بیوشیمیایی و مولکولی ژنوتیپ‌های گل داوودی از روش تجزیه ارتباط با نرم افزار TASSEL نسخه 3.1 (Bradbury et al., 2007) استفاده شد. در تحقیق حاضر برای اجتناب از نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب که در اثر تجزیه ارتباط شکل می‌گیرند، از دو مدل GLM و MLM برای تجزیه ارتباط استفاده شد. برای به‌دست آوردن سطح معنی-داری از ۱۰۰۰ جایگشت استفاده شد. اما در نهایت با توجه به برتری و پایداری نتایج مدل MLM (Yu et al., 2006)، از این مدل برای تفسیر نتایج استفاده شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از آماره‌های توصیفی میانگین زمان تا شروع پیری گل در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی ۱۹/۴۵ روز بود. حداکثر ماندگاری ۴۰ روز و حداقل آن ۱۰ روز بود. ماندگاری گل به عنوان یکی از مهم‌ترین معیارها برای ارزیابی ارزش زینتی گل‌ها محسوب می‌شود، به‌طوری‌که گل‌هایی با ماندگاری بیشتر از موقعیت مناسب‌تری برای انتخاب جهت اهداف مختلف برخوردارند. تأخیر در پیری گل و آغاز فرایندهای مرتبط با پیری به عنوان یک عامل مثبت برای انتخاب گل محسوب می‌گردد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر زمان تا مشاهده علایم پیری بین ژنوتیپ‌ها وجود داشت. این موضوع از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا انتخاب ژنوتیپ‌هایی که در بروز نشانه‌های پیری تأخیر دارند، امکان انتخاب و تولید ارقام با ماندگاری بالا را فراهم می‌سازد. در مدل GLM تعداد نشانگرهای بیش‌تری با صفت ماندگاری گل ارتباط معنی‌داری نشان دادند، اما در خروجی مدل MLM، تعداد نشانگرهای مرتبط با صفت مذکور نسبت به مدل GLM کاهش یافت. دلیل این امر، همبستگی بین نشانگرهایی است که در مدل MLM برآورد شده‌اند، به‌طوری‌که این مدل نشانگرهای غیر همبسته یا نشانگرهایی با همبستگی کاذب را حذف می‌کند (Zhao et al., 2007). لازم به ذکر است که حداقل سطح معنی‌داری برای تجزیه ارتباط بین صفات و نشانگرها در این پژوهش یک درصد ($P<0.01$) در نظر گرفته شد. در مجموع در این بررسی برای دو مدل GLM و MLM، به ترتیب ۲۸ و ۱۴ نشانگر شناسایی شد که با ماندگاری ارتباط معنی‌دار (در سطح احتمال یک درصد) داشتند. مطابق با نتایج و آنچه در جدول ۲ ارایه شده است، ۱۴ نشانگر مرتبط با آغاز پیری گل یا ماندگاری به‌دست آمد. از بین این تعداد نشانگر، می‌توان به نشانگر M-CTT/E-AAC35 با ضریب تبیین ۳۲ درصد اشاره کرد که به عنوان مهم‌ترین نشانگر در بیان پیری گل به حساب می‌آید. لازم به ذکر است که ضریب تبیین سایر نشانگرها کم‌تر از ۳۰ درصد بود.

جدول ۲- نشانگرهای AFLP مرتبط با ماندگاری در گل داوودی با استفاده از مدل MLM

صفت	نشانگر	سطح معنی‌داری (P value)	ضریب تبیین (درصد) (R^2)
پیری	M-CAC/E-ACA60	0.007055	19
	M-CAC/E-AAG16	0.005296	20
	M-CAC/E-AGA3	0.003827	22
	M-CAC/E-ACC11	0.007731	18
	M-CAC/E-ACC19	0.008472	25
	M-CAG/E-AAC18	0.008591	18
	M-CAG/E-AGA53	0.006186	19
	M-CAA/E-AAC49	0.00727	18
	M-CAA/E-AAC56	0.007633	18
	M-CAA/E-AAG40	0.001087	28
	M-CTT/E-AAC35	**0.002689**	**32**
	M-CTT/E-AGA68	0.008885	17
	M-CTG/E-ACA36	0.001159	28
	M-CTG/E-AAG60	0.006184	19

R^2: درصد توجیه تغییرات فنوتیپی صفات مورد نظر را نشان می‌دهد

منابع

1. Battelli, R., Lombardi, L., Rogers, H.J., Picciarelli, P., Lorenzi, R. and Ceccarelli, N. 2011. Changes in ultrastructure, protease and caspase-like activities during flower senescence in *Lilium longiflorum*. Plant Science 180: 716-725.
2. Berger, G.L., Liu, S., Hall, M.D., Brooks, W.S., Chao, S., Muehlbauer, G.J., Baik, B.K., Steffenson, B. and Griffey, C.A. 2013. Marker-trait associations in Virginia Tech winter barley identified using genome-wide mapping. Theoretical and Applied Genetics 126: 693-710.
3. 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.
4. Hwang, E.Y. 2008. Association analysis in soybean. Ph.D. Thesis. University of Maryland, College Park.
5. Lerslerwong, L., Ketsa, S. and van Doorn, W.G. 2009. Protein degradation and peptidase activity during petal senescence in *Dendrobium* cv. Khao Sanan. Postharvest Biology and Technology 52: 84-90.
6. Li, R.W., Chen, W. and Dai, S.L. 2012. The Association Analysis of Phenotypic Traits with SRAP Markers in Chrysanthemum. Scientia Agricultura Sinica 45: 1355-1364.
7. Lv, G., Tang, D., Chen, F., Sun, Y., Fang, W., Guan, Z., Liu, Z. and Chen, S. 2011. The anatomy and physiology of spray cut chrysanthemum pedicels, and expression of a caffeic acid 3-O-methyltransferase homologue. Postharvest Biology and Technology 60: 244-250.
8. Roein, Z., Hassanpour Asil, M., Sabouri, A. and Dadras, A.R. 2014. Genetic structure of *Chrysanthemum* genotypes from Iran assessed by AFLP markers and phenotypic traits. Plant Systematics and Evolution 300: 493-503.
9. Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences 81: 8014-8018.
10. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Delee, T.V., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M.1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research 23: 4407-4414.
11. Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Vroh, B.I., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., Nielsen, D.M., Holland, J.B., 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.
12. Zhang, F., Chen, S., Chen, F., Fang, W. and Li, F. 2010. A preliminary genetic linkage map off chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers. Scientia Horticulturae 125: 422-428.
13. Zhang, F., Chen, S., Chen, F., Fang, W., Chen, Y. and Li, F. 2011. SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*). Molecular Breeding 27: 11-23.
14. Zhao, K., Aranzana, M.J., Kim, S., Lister, C., Shindo, C., Tang, C., Toomajian, C., Zheng, H., Dean, C., Marjoram, P. and Nordborg, M. 2007. An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. PLoS Genetics 3: 71-82.

Association analysis of flower longevity with AFLP markers in Chrysanthemum genotypes (*Chrysanthemum morifolium*)

Z. Roein[1*], M. Hassanpour Asil[2], A. Sabouri[3]

1- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Ilam University, 2- Professor, Department of Horticultural Sciences, University of Guilan. 3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Guilan

*Corresponding author: z.roein@ ilam.ac.ir

Abstract

In order to identify informative AFLP markers for description of longevity in Chrysanthemum, association analysis was used. The relationships between flower longevity and molecular markers based on 25 primer combinations (*Eco*RI and *Mse*I) and genetic structure of 44 chrysanthemum genotypes were evaluated. Results of MLM association analysis model longevity showed that 14 AFLP markers were found to be associated with longevity in Chrysanthemum, whereas GLM model identified 28 markers. The strongest association was detected between AFLP markers of M-CTT/E-AAC35, with petal senescence which explained 32 percent of variation. The lowest variation of (17%) was accounted by M-CTT/E-AGA68 marker. Moreover, informative markers such as M-CTT/E-AAC35 that have been shown to significant correlation with longevity can used for breeding programs and other analyses associated with future studies of Chrysanthemum if they contribute to increase longevity in other experiments.

Key words: Chrysanthemum, Informative markers, Longevity, Petal senescence