



شناسایی نشانگر RAPD پیوسته با صفات مورفولوژیک و تعیین ساختار جمعیت در ارقام کتان زراعی (*Linum usitatissimum* L.)

معصومه گلشن^۱، فاطمه رحمانی^۲ و حسین عباسی هولاسو^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

۲- استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

۳- دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، (نویسنده مسئول: hossein.pdf55@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۷

چکیده

Linum بزرگترین جنس از خانواده Linaceae می‌باشد که نزدیک به ۲۳۰ گونه دارد. این گیاه از لحاظ تولید فیبر به‌عنوان سومین گیاه زراعی در جهان تلقی می‌شود. به منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات ارتفاع بوته، وزن کپسول در بوته، وزن ساقه فرعی، تعداد کپسول ساقه‌های فرعی، تعداد کپسول ساقه اصلی، طول ساقه اصلی، طول ساقه فرعی، وزن هزار دانه، شمار کپسول در بوته، عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیکی و شاخص برداشت در ارقام مختلف کتان زراعی، از نشانگرهای RAPD استفاده شد. ۱۳ آغازگر مورد استفاده، ۱۶۹ مکان در ۱۰ رقم کتان زراعی تولید کردند. میانگین تعداد مکان‌ها ۱۳ مکان برای هر آغازگر بدست آمد. میانگین میزان اطلاعات چند شکل (PIC) برای آغازگرها ۰/۱۶ و از ۰/۰۵ تا ۰/۲۹ (OPA-03) و ۰/۲۹ تا ۰/۰۳ (OPD-03) متغیر نشان داد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر RAPD به روش Neighbour-Joining و ضریب Number of difference، ارقام را به دو گروه متناسب کرد، که با توزیع و گروه‌بندی جغرافیایی ارقام مورد مطالعه تطابق داشت. در ضمن نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای در تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز تأیید شد. میزان $K=2$ برای گروه‌بندی دندروگرام در بررسی ساختار جمعیت با استفاده از مدل بیزی بدست آمد. برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک، تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام بین داده‌های مولکولی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورفولوژیک به‌عنوان متغیرهای وابسته انجام گرفت. آغازگرهای OPD-03 و OPD-05 با هر دو صفت وزن هزار دانه و تعداد ساقه فرعی مرتبط بودند. با توجه به اینکه همه مکان‌های مورد مطالعه بجز OPB-04 روی صفات مورد مطالعه مؤثر بودند، بنابراین احتمال دارد بتوان از این مکان‌ها همراه با اطلاعات مربوط به صفات مورفولوژیک در اصلاح کتان جهت شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های در حال تفرق و تولید ارقام هیبرید استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ارتباط، تجزیه به مولفه‌های اصلی، صفات مورفولوژیک، نشانگر RAPD

مقدمه

بشر از گذشته‌های دور گیاهان دارویی را به عنوان موهبت‌های طبیعی دانسته و به‌عنوان ابزاری مؤثر در پزشکی استفاده کرده است. با گذشت زمان و مشخص شدن عوارض و اثرات سوء داروهای شیمیایی، توجه زیادی به سوی طبیعت و استفاده از گیاهان دارویی جلب شده است (۲۲). گیاهان دارویی و معطر در مقایسه با سایر گیاهان زراعی، اراضی کمی را به خود اختصاص می‌دهند. با این وجود، این دسته از گیاهان تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی را شامل می‌شوند که دارای بیشترین تنوع در صفات و خصوصیات بیولوژیکی می‌باشند. البته با وجود تنوع کافی، اصلاح گیاهان دارویی نسبت به گیاهان زراعی با روند کندتری صورت می‌گیرد. اما به‌نژادگران سعی نمودند تا با بهره‌برداری از تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان دارویی، میانگین تولید و پایداری اکولوژیکی را در این گیاهان بهبود بخشند (۲۳). جنس کتان دارای حدود ۲۳۰ گونه است که ۲۲ گونه آن در ایران یافت می‌شوند (۲۶، ۳۳) و دانه‌های بسیاری از آنها از جمله *Linum usitatissimum* منبع غنی از اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶ هستند (۱۳). در اکثر فارماکوپه‌های معتبر از کتان به عنوان یک گیاه دارویی یاد شده است و خواص درمانی آن مورد بررسی قرار گرفته است. تعداد کروموزوم‌ها در گونه‌های *Linum* محدوده وسیعی را از $2n=16$ تا $2n=72$ نشان می‌دهد. *Linum usitatissimum* و خویشاوندان وحشی آن دارای $2n=30$ می‌باشند (۱۹). بعضی از محققین گونه وحشی

L. bienne حاوی دانه‌های کوچک را به عنوان جد کتان در نظر می‌گیرند. این گونه از کردستان ایران منشأ گرفته است. بعضی دیگر از محققین گونه *L. angustifolium* حاوی روغن بالا و وزن دانه بیشتر را به عنوان جد کتان در نظر گرفته‌اند که از نواحی مدیترانه منشأ گرفته است (۲۰). اخیراً مطالعه با نشانگرهای مولکولی نشان داد که این سه گونه از یک جد مشترک منشأ گرفته‌اند و *L. angustifolium* قدیمی‌ترین جد کتان می‌باشد (۱۹). موفقیت کتان به‌عنوان یک گیاه دانه روغنی و فیبری عمدتاً در ارتباط با درصد روغن، فیبر و عملکرد دانه آن می‌باشد. با این حال تنوع ژنتیکی در ارقام زراعی کم است. بیشترین تنوع ژنتیکی یک گونه گیاهی را می‌توان در نژادهای بومی و همچنین در گونه‌های وحشی و خویشاوند آن مشاهده کرد (۶). برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی و ژنتیکی از جمله گروه‌بندی لاین‌ها و جمعیت‌ها، مطالعه تکامل خویشاوندان وحشی، بهبود شجره‌ها، بررسی تغییرات فراوانی‌ها و حفاظت از منابع ژنتیکی دارد. تنوع ژنتیکی را می‌توان با روش‌های مختلف و با مطالعه ویژگی‌های متفاوت بررسی کرد که از جمله آن‌ها می‌توان به بررسی صفات مورفولوژیک، آناتومیک، نشانگرهای بیوشیمیایی و نشانگرهای مولکولی اشاره کرد (۳۲). همچنین با استفاده از نشانگرهای DNA امکان شناسایی و جداسازی ژن‌های دخیل در مراحل مختلف چرخه‌های متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی وجود دارد (۱۵). از این رو، تعیین ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و

صفات مورفولوژیک، می‌تواند گامی موثر در استفاده از گزینش جمعیتی باشد. پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان‌های ژنی صفات کمی، محتمل‌ترین توجیه برای وجود رابطه بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی است (۳۹). مطالعه روابط بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی دارای کاربردهای متعددی از قبیل، امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص، شناسایی ال‌های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرم‌پلاسمی، تسهیل مکان‌یابی دقیق ال‌های صفات کمی و تایید ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات کمی می‌باشد (۹). در دسترس بودن تعداد بسیار زیادی از نشانگرها و صفات مورفولوژیکی می‌تواند به مطالعه تجزیه رگرسیونی بین این نشانگرها و صفات مورفولوژیکی کمک نماید. در مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها به عنوان والدین جمعیت در حال تفرق برای شناسایی چند شکلی‌های مرتبط با صفات مورد مطالعه غربال می‌شوند که این خود سبب ایجاد محدودیت می‌شود، زیرا ممکن است نشانگرهای شناسایی شده در این والدین برای گزینش به کمک نشانگر در زمینه‌های ژنتیکی والدین و ارقام دیگر مفید نباشد. برای غلبه بر این محدودیت‌ها در سال‌های اخیر روش مکان‌یابی ارتباطی (Association mapping) یا تجزیه ارتباطی (Association analysis) معرفی شده است که نه تنها امکان مکان‌یابی دقیق و مطمئن ژن‌ها و مکان‌های کنترل کننده صفات کمی را فراهم می‌کند، بلکه امکان شناسایی نواحی کروموزومی دیگری که در مطالعات پیوستگی امکان‌پذیر نیستند را میسر می‌سازد (۲۹). کارایی این روش در انسان برای شناسایی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات مندلی نشان داده شده است (۱۴، ۷، ۳). در علوم گیاهی نیز این روش رو به گسترش است. رشیدی منفرد و همکاران (۲۵) با استفاده از نشانگرهای SSAP برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم زراعی در گندم نشان دادند که، نشانگرهای SSAP و رگرسیون گام‌به‌گام برای شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات زراعی مفید می‌باشند. عبدالهی مندولکانی و همکاران (۱) در تجزیه ارتباط به روش MLM، ۹۵ مکان مرتبط با صفات مورد مطالعه شناسایی کردند، ۵۴ درصد مکان‌ها مبتنی بر نشانگرهای رتروترنسپوزونی و ۴۶ درصد مکان‌های شناسایی شده مبتنی بر نشانگرهای ISSR و SSR بود. در مطالعه تجزیه ارتباطی تجمع کادمیم در گندم با استفاده از نشانگرهای AFLP و RAPD، در مجموع ۱۱۳ نشانگر آگاهی بخش در سطح

شاهد و ۷۷ نشانگر آگاهی بخش در سطح ۰/۲۵ میلی‌مولار کادمیم شناسایی شد (۳۰). سوتوسردا و همکاران (۳۷) با استفاده از تجزیه ارتباط و نشانگرهای ریزماهواره که در ۳ سال در ۶ محیط انجام گرفت، ۹ QTL (Quantitative trait loci) را برای صفت محتوای روغن در ۳۹۰ نمونه کتان شناسایی کردند، که ۵۸ درصد از ال‌های QTL در ارقام کانادایی اختصاصی بودند. در نتیجه نمونه‌های کانادایی دارای ال‌های QTL با پتانسیل مفید در بهبود صفات کیفی نقش دارند. در مطالعه‌ای دیگر تجزیه ارتباط ۹ صفت زراعی با ۱۱۲ نشانگر SSR روی ۱۲۵ ژنوتیپ کتان کانادایی مشخص شد که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت در ارتباط هستند (۳۶). با توجه به اینکه هنوز استفاده از تجزیه ارتباط در کتان برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک در ایران گزارش نشده است، هدف از این آزمایش شناسایی نشانگرهای مثبت و آگاهی بخش مرتبط و پیوسته با صفات مورفولوژیک و همچنین بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت در ارقام زراعی کتان مورد مطالعه با استفاده از نشانگر RAPD، رگرسیون گام‌به‌گام و Structure بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل ۱۰ واریته کتان زراعی (جدول ۱)، در سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸ در ایستگاه تحقیقاتی کشاورزی ساعتلو، واقع در ۳۰ کیلومتری شمال ارومیه کشت شدند. نمونه‌های گیاهی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۴ تکرار روی خطوطی به طول دو متر کشت شده و صفات ارتفاع بوته (cm)، وزن کپسول در بوته (g)، وزن ساقه فرعی (g)، تعداد کپسول ساقه‌های فرعی، تعداد کپسول ساقه اصلی، طول ساقه اصلی (cm)، طول ساقه فرعی (cm)، تعداد ساقه فرعی، وزن هزار دانه (g)، تعداد کپسول در بوته، عملکرد دانه (kg/ha)، عملکرد بیولوژیکی (kg/ha) و شاخص برداشت بر اساس ۵ نمونه در هر کرت اندازه‌گیری و ثبت شدند. نخست مقادیر صفات اندازه‌گیری شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. میزان وراثت‌پذیری عمومی صفات بر مبنای اجزای متشکله واریانس با استفاده از رابطه زیر صورت گرفت. $h^2 = \sigma^2_G / \sigma^2_P$ که در این فرمول σ^2_G و σ^2_P به ترتیب واریانس ژنتیکی و فنوتیپی می‌باشد.

جدول ۱- محل جمع‌آوری ارقام مورد استفاده در این مطالعه

کد ارقام مورد مطالعه	منطقه مربوطه	رقم
Kerman	کرمان	۹۷-۲
Khodabandeh-KA	خدابنده-کشک آباد	۹۷-۵
Shahindezh-BNG	شاهیندهژ-باروق نادر گلی	۹۷-۱۰
Shahindezh-K	شاهیندهژ-کشاورز	۹۷-۱۱
Shahindezh-BGB	شاهیندهژ-باروق قرمزی بلاق	۹۷-۱۳
Bonab-R	بناب-روشت	۹۷-۱۶
Kerman-SN	کرمان-شهر نایک	۹۷-۱۷
Markazi-SH	مرکزی-شازند	۹۷-۲۴
Markazi-H	مرکزی-هندوبه	۹۷-۲۵
Sistan	سیستان و بلوچستان	۹۷-۴۶

استخراج DNA ژنومی و تکثیر آن

برای بررسی تنوع ژنتیکی، برگ‌های تازه در شهریور ماه ۸۸ جمع‌آوری و با استفاده از سلیکاژل به همراه یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد. استخراج DNA با روش CTAB (۲) انجام و کیفیت و کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز و اسپکتروفتومتری تعیین شد. تکثیر قطعات DNA در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی بافر PCR با غلظت ۱x، dNTP ۰/۶ میلی‌مول، ۱/۹MgCl₂ میلی‌مول، آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی با غلظت ۰/۵ میکرومول، ۱ واحد آنزیم تک پلی مرز و ۲۵ نانوگرم DNA ژنومی به‌علاوه آب دوبار تقطیر در دستگاه ترموسایکلر اپندورف صورت گرفت. سپس PCR با برنامه حرارتی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و برای ۴۵ سیکل: ۱ دقیقه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۳۵ یا ۳۶ درجه سانتی‌گراد (با توجه به آغازگر) و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه و سرانجام بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. ۱۲ میکرولیتر از محصولات PCR با یک میکرولیتر بافر بارگذاری ۶x مخلوط شد و در ژل آگارز دو درصد در ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به مدت ۱/۵ ساعت الکتروفورز شدند. عکس‌برداری از ژل در دستگاه ژل داک مدل ۲۰۰۰ زیر نور UV انجام شد.

تجزیه آماری داده‌ها

الگوهای نواری بصورت یک و صفر بر اساس وجود و عدم وجود باند در هر مکان امتیازدهی شدند. شاخص PIC که یکی از معیارها نشان دهنده قدرت تفکیک آغازگرها می‌باشد، با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum p_i^2$ محاسبه شد. در این فرمول p_i فراوانی ال‌ نام در یک مکان مشخص می‌باشد. شاخص نشانگر نیز از دیگر معیارهایی برآورد قدرت تفکیک آغازگرهاست که با استفاده از فرمول $MI = PIC * B$ محاسبه گردید، که در این فرمول B تعداد مکان‌های چند شکل می‌باشد. فاصله ژنتیکی ارقام بر اساس ضریب Number of difference و باروش Neighbour-Joining، با استفاده از نرم‌افزار MEGA3 (۱۶) محاسبه شد. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) جهت رسم نمودار دو بعدی بای پلات با استفاده از نرم افزار 2.1 NTSYS (۲۷) انجام گردید. جهت بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت در ارقام کتان زراعی و نیز تایید گروه‌بندی Neighbour-Joining از نرم‌افزار Structure 2.3.4 (۲۴) در حالت No Admixture با ۱۰۰۰۰ بار Burn-in و ۵۰۰۰۰ بار تکرار MCMC در مقادیر مختلف K استفاده شد. عدد K بهینه بر اساس روش delta K محاسبه و تعیین شد. برای شناسایی آغازگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک مورد مطالعه، تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام با در نظر گرفتن مکان‌های نشانگری به‌عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورفولوژیک به عنوان متغیرهای وابسته با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ (۱۷) انجام گرفت.

نتایج و بحث

جدول ۲ میانگین، انحراف معیار، کمترین و بیشترین مقدار صفات را نشان می‌دهد. در مطالعه ما میانگین عملکرد دانه ۵۰۱/۱۲ کیلوگرم بر هکتار بود. گرانت و همکاران (۱۱)

میانگین عملکرد دانه کتان را ۷۷۷ کیلوگرم بر هکتار و بالاترین میزان آن را ۱۸۳۱ کیلوگرم بر هکتار ذکر کرده‌اند، همچنین این محققان اظهار داشته‌اند که با افزایش کوددهی (فسفر و روی) عملکرد این گیاه را می‌توان تا ۲۶۴۵ کیلوگرم در هکتار افزایش داد. این اختلاف در میانگین عملکرد دانه را به اختلاف در شرایط اقلیمی و مهم‌تر از آن به تفاوت‌های ژنتیکی بین ارقام می‌توان ربط داد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر ژنوتیپ بر عملکرد دانه، ارتفاع گیاه، طول ساقه‌های اصلی و فرعی، وزن دانه در بوته، وزن کپسول در ساقه از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵ درصد و وزن هزار دانه، شمار کپسول در گیاه، تعداد کپسول ساقه‌های فرعی، وزن کل بوته، عملکرد بیولوژیکی و شاخص برداشت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بنابراین بین ارقام زراعی از نظر این صفات تنوع زیادی وجود دارد. دامنه تغییرات گسترده صفات مورد مطالعه نیز این مطلب را تأیید می‌کند. بالا بودن وراثت‌پذیری عمومی برای صفات وزن هزار دانه (۶۳ درصد)، شاخص برداشت (۵۶ درصد) و عملکرد بیولوژیکی (۴۷ درصد) بیانگر اهمیت ژن‌های افزایشی به عنوان مهم‌ترین جز کنترل‌کننده این صفات است و می‌توان پاسخ به گزینش مطلوبی را برای این صفات پیش‌بینی نمود. بنابراین اصلاح صفات مذکور از طریق روش‌های گزینش امکان‌پذیر است. وراثت‌پذیری متوسط عملکرد دانه (۲۹ درصد) نیز نشان‌دهنده این نکته است که هر دو نوع ژن‌های غیر افزایشی و و افزایشی در کنترل این صفت سهم دارند. از ۱۵ آغازگر RAPD مورد استفاده، ۱۳ آغازگر الگوی بانندی مشخص و چند شکل و دو آغازگر OPD-011 و OPA-05 به دلیل عدم وضوح و قابلیت تکرارپذیری کافی حذف شدند (جدول ۳). ۱۶۹ مکان توسط ۱۳ آغازگر تکثیر شد که از این تعداد ۸۷ مکان چند شکل (۵۳ درصد) بودند. متوسط مکان‌های چند شکل برای هر آغازگر ۷ بود. آغازگرهای OPD-03 و OPD-08 با ۱۸ مکان بیشترین و آغازگر OPB-03 با ۵ مکان کمترین تعداد مکان‌ها را تولید کردند (جدول ۳). بیشترین درصد مکان‌های چند شکل مربوط به آغازگر OPA-07 (۷۳ درصد)، و کمترین درصد مربوط به آغازگر OPA-03 (۱۶ درصد) بود. میزان اطلاعات چند شکل از ۰/۰۵ تا ۰/۲۹ به ترتیب برای آغازگرهای OPA-03 و OPD-03 متغیر بود. میانگین میزان اطلاعات چندشکل برای آغازگرهای مورد مطالعه ۰/۱۶ بود (جدول ۳). آغازگرهای OPD-03 و OPA-06 (به ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۲۸) با بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها، بیشترین شاخص چند شکلی را نشان می‌دهند. به این معنی که این دو آغازگر بهتر از همه آغازگرهای استفاده شده، توانسته است فاصله ژنتیکی ارقام را مشخص کند. همچنین آغازگرهایی که دارای میزان اطلاعات چند شکلی بالایی بودند، تنوع ژنی بالایی نیز داشتند که این موضوع نشان‌دهنده همبستگی بین PIC و تنوع ژنی است. میانگین شاخص نشانگر برای هر آغازگر در این آزمایش ۱/۴۲ محاسبه شد، به‌طوری‌که بیشترین مقدار مربوط به آغازگر OPD-03 (۳/۴۸) و کمترین آن مربوط به آغازگر OPA-03 (۰/۱) بود (جدول ۳).

جدول ۲- شاخص‌های آماری صفات مورد بررسی ارقام کتان زراعی (*Linum usitatissimum* L.)

Table 2. Statistical parameters in flax cultivars for studied traits

متغیر	ارتفاع بوته (cm)	وزن کپسول در بوته (g)	وزن ساقه فرعی (g)	تعداد کپسول ساقه فرعی	تعداد کپسول ساقه اصلی	طول ساقه اصلی (cm)
میانگین	۴۲/۵۹	۳/۶۲	۰/۳۴	۷۰/۵۴	۲۳	۴۱/۵۵
انحراف معیار	۵/۵۹	۲/۸۶	۰/۱۳	۴۷/۷۲	۱۲/۳۹	۵/۴۶
مجموع	۱۷۰۴	۱۴۴/۸۵	۱۳/۶۲	۲۸۲۲	۹۲۰	۱۶۶۲
مینیمم	۳۲/۴	۰/۴۹	۰/۱۷	۱۰/۱۰	۸/۲۳	۳/۵
ماکزیمم	۵۸/۵	۱۶/۵۱	۰/۹۴	۱۸۳/۵	۶۵	۵۶/۵
وراثت‌پذیری عمومی (درصد)	۳۱/۷	۲۵/۲۲	۳۳/۳	۴۰/۴۶	۱۹/۴۷	۳۳/۵۱

Table 2 continued

ادامه جدول ۲

متغیر	طول ساقه فرعی (cm)	تعداد ساقه فرعی	وزن هزار دانه (g)	شمار کپسول در بوته	عملکرد دانه (kg/ha)	عملکرد بیولوژیکی (kg/ha)	شاخص برداشت
میانگین	۳۵/۸۰	۱۱/۵۱	۴/۲۸	۹۳/۳۲	۵۰۱/۱۲	۲۶۵۴	۲۰/۴۷
انحراف معیار	۵/۱۵	۴/۸۵	۰/۵۱	۵۷/۶۵	۲۸۷/۲۶	۱۵۳۴	۷/۴۸
مجموع	۱۴۳۲	۴۶۰/۵۵	۱۷۱/۳۴	۳۷۳۳	۲۰۰۴۵	۱۰۶۱۶۳	۸۱۹/۱۰
مینیمم	۲۷/۰۲	۴/۸۰	۲/۹۳	۱۸/۳۳	۱۷۲/۵۰	۷۵۷/۵۰	۵/۷۴
ماکزیمم	۵۰/۶۸	۲۳/۵	۵/۱۶	۲۳۰	۱۲۸۳	۸۶۳۳	۳۸/۱۹
وراثت‌پذیری عمومی (درصد)	۳۴/۶۶	۲۶/۷۲	۶۳	۳۷/۰۶	۲۹/۳۲	۴۷/۵۷	۵۶/۴۲

جدول ۳- نام و خصوصیات آغازگرهای RAPD مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 3. Name and properties of RAPD primers used in current study

آغازگر	تعداد کل مکان‌های تولید شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	شاخص نشانگر	محتوای اطلاعاتی حاصل از چند شکلی
OPB-01	۱۱	۵	٪۴۵	۰/۷	۰/۱۴
OPB-02	۱۱	۴	٪۳۶	۰/۵۲	۰/۱۳
OPB-03	۵	۳	٪۶۰	۰/۷۵	۰/۲۵
OPB-04	۱۲	۷	٪۵۸	۱/۲۶	۰/۱۸
OPB-05	۱۳	۸	٪۶۱	۱/۶۸	۰/۲۱
OPD-02	۱۴	۴	٪۲۹	۰/۳۶	۰/۰۹
OPD-03	۱۸	۱۲	٪۶۷	۳/۴۸	۰/۲۹
OPD-05	۱۶	۱۰	٪۶۲	۲/۳	۰/۲۳
OPD-08	۱۸	۹	٪۵۰	۱/۳۵	۰/۱۵
OPA-03	۱۲	۲	٪۱۶	۰/۱	۰/۰۵
OPA-04	۱۱	۷	٪۶۳	۱/۴	۰/۲
OPA-06	۱۳	۹	٪۶۹	۲/۵۲	۰/۲۸
OPA-07	۱۵	۱۱	٪۷۳	۲/۰۹	۰/۱۹
مجموع	۱۳	۷	٪۵۳	۱/۴۲	۰/۱۶

تعدادی از نشانگرهای مؤثر در این دو صفت نیز یکسان بود. در این پژوهش وجود مکان‌های مشترک برای برخی صفات، احتمالاً به دلیل پیوستگی و یا پلی‌تروپی مکان‌های کروموزومی می‌باشد که وجود همبستگی معنی‌دار بین صفات مورفولوژیک با همدیگر می‌تواند دلیلی بر این واقعیت باشد. در این مطالعه آغازگرهای OPB-05 و OPA-06 مقدار قابل توجهی از تغییرات صفات را توجیه کردند. احتمالاً ژن‌های مربوط به این صفات، ژن‌های نزدیک به هم در مکان‌های کروموزومی باشند و ممکن است در فراهم آوردن اطلاعات اولیه در خصوص انتخاب غیر مستقیم صفات از طریق آغازگرهای مرتبط مفید باشند. البته برای درک و اطمینان از وجود ارتباط پیوسته بین آغازگرها و صفات مختلف زراعی و همچنین شناسایی محل مکان‌های کنترل‌کننده این صفات بر روی کروموزوم‌ها نیاز به جمعیت‌های در حال تفرق مثل F2, RIL و دبل هاپلوئید می‌باشد (۲۱). با توجه به مفید بودن اطلاعات نشانگری بدست آمده از نقشه‌های پیوستگی، محدودیت‌هایی همچون در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق، عدم وجود لینکاژ مناسب بین صفات زراعی و

به‌منظور تعیین ارتباط بین صفات یادداشت شده و داده‌های مولکولی و شناسایی آغازگرهایی که بالقوه قابلیت پیوستگی با این صفات را دارند از روش رگرسیون گام‌به‌گام استفاده شد. نتایج نشان داد که مکان‌های تکثیری توسط آغازگرهای OPA-06 و OPB-05 با بیشترین صفت مرتبط هستند (جدول ۴). هر دو آغازگر ۱۳ مکان را در ارقام مورد مطالعه نشان دادند. کمترین تعداد آغازگر مؤثر برای صفات (OPD-03 و OPD-05) شناسایی شد. سوتوسردا و همکاران (۳۶) کمترین تعداد آغازگر SSR مؤثر (یک آغازگر) را برای صفات وزن هزار دانه، ارتفاع بوته و هم‌پوشانی گلبرگ در ارقام زراعی گزارش نمودند و همچنین در گونه وحشی *pale flax* (*Linum bienne* Mill.) به ترتیب صفات تعداد بذر در هر قوزه، ارتفاع بوته، شروع گلدهی، شکل گل و رنگ گلبرگ کمترین SSR مؤثر را دارا بودند این محققین برای صفت وزن هزار دانه در *pale flax* تعداد دو آغازگر SSR گزارش نمودند. بیشترین آغازگر مثبت برای صفات تعداد کپسول ساقه‌های فرعی و عملکرد بیولوژیکی شناسایی شد،

ژنوم کتان زراعی مورد مطالعه دارند و شاید این دلیلی بر پیوستگی تعداد بیشتری از نشانگرهای RAPD با صفات زراعی در این تحقیق باشد. سوتوسردا و همکاران (۲۹) از نشانگر SSR برای شناسایی آغازگرهای مرتبط با صفات مهم زراعی در کتان استفاده کردند. آنها بیان کردند که این روش برای شناسایی مکان‌های آگاهی بخش مرتبط با صفات مورفولوژیک مفید و مطمئن بوده و آغازگرهای موثر حاصل از این مطالعات می‌تواند در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر و تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی استفاده شوند. با توجه به اینکه همه پرایمرهای RAPD مورد استفاده، مکان‌های مورد نظر را تکثیر کردند بنابراین احتمال دارد بتوان از این مکان‌های RAPD در برنامه‌های اصلاحی برای شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و تهیه ارقام هیبرید استفاده کرد

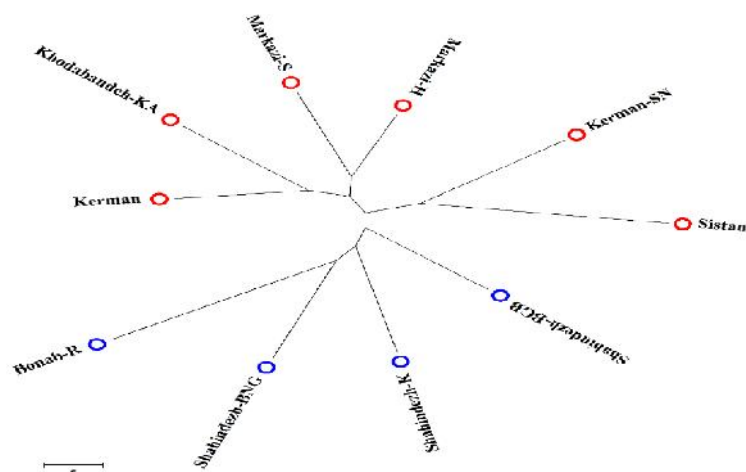
نشانگرهای مولکولی و زمان کافی کارایی این نقشه‌ها را در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی پایین می‌آورد (۱۲). البته با استفاده از نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با صفات زراعی از جمله اجزای عملکرد مخصوصا در مورد نشانگرهایی که مکان کروموزومی آنها مشخص می‌باشد می‌توان با تولید لاین‌های با جایگزینی کروموزومی، صفات زراعی مورد نظر را در یک لاین فاقد آن صفت از طریق تلاقی‌های فی مابین انتقال داد. که با انجام آنالیز ارتباطی می‌توان تا حدودی بر این محدودیت‌ها فائق آمد (۲۱). آغازگر OPD-03 فقط ۴۵ درصد از تغییرات مربوط به صفت تعداد ساقه فرعی را تبیین کرد. گلشن و همکاران (۱۰) با استفاده از تجزیه خوشه‌ای گزارش نمودند که آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این مطالعه همبستگی کمتری با همدیگر دارند و قادرند ارقام مختلف کتان را از همدیگر متمایز سازند. بنابراین می‌توان گفت آغازگرهای مورد بررسی توزیع یکنواختی در

جدول ۴- نتایج رگرسیون گام‌به‌گام بین صفات مورفولوژیک و داده‌های مولکولی برای شناسایی آغازگرهای مثبت در ارقام کتان مورد مطالعه
Table 4. Results of stepwise regression between morphological and molecular data to define informative markers in studied genotypes

صفه گیاهی	مکان ژنی	R ² تصحیح شده	سطح معنی‌داری
ارتفاع بوته	OPB-05, OPD-05, OPA-06	۰/۹۸۶	۰/۰۰۶
وزن کپسول در بوته	OPB-03, OPD-02, OPD-03, OPD-08	۰/۹۷۵	۰/۰۲۶
وزن ساقه فرعی	OPB-05, OPD-03, OPA-06	۰/۹۵۰	۰/۰۴۵
تعداد کپسول ساقه‌های فرعی	OPD-08, OPD-02, OPD-03, OPA-04, OPB-05, OPA-03, OPA-06,	۰/۹۹۸	۰/۰۳۴
تعداد کپسول ساقه اصلی	OPA-06, OPB-03, OPB-05, OPD-05, OPA-07	۰/۹۹۵	۰/۰۱۲
طول ساقه اصلی	OPA-06, OPD-08, OPA-07,	۰/۹۸۰	۰/۰۰۵
طول ساقه فرعی	OPA-04, OPB-01, OPB-02, OPB-05	۰/۹۹۱	۰/۰۱۱
تعداد ساقه فرعی	OPD-03	۰/۴۵۴	۰/۰۲۰
وزن هزار دانه	OPD-03, OPD-05	۰/۷۳۲	۰/۰۰۱
شمار کپسول در بوته	OPB-03, OPD-02, OPD-08	۰/۹۶۹	۰/۰۱۷
عملکرد دانه	OPD-08, OPA-06, OPD-03, OPA-07, OPB-05	۰/۹۹۷	۰/۰۱۰
عملکرد بیولوژیکی	OPD-03, OPD-02, OPB-02, OPB-05, OPA-07, OPA-06	۰/۹۸۹	۰/۰۱۲
شاخص برداشت	OPB-02, OPB-05, OPA-06	۰/۹۸۰	۰/۰۱۱

تجزیه به بردارهای اصلی نیز به عنوان روش مکمل تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت، وجود دو گروه با این مجموعه از داده‌ها از طریق PCoA نیز توجیه شد (شکل ۲). گروه اول مربوط به ارقامی که در مناطق مرکز و جنوب شرقی ایران اندازه کافی در ژنوم پراکنده‌اند (۳۹). از طرفی کاهش اطلاعات به دو مولفه اصلی توانست اکثر ارقام را مطابق با تجزیه خوشه‌ای از هم جدا کند. همانگونه که در نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به بردار اصلی مشاهده می‌گردد، تجمع ارقام مربوط به گروه اول در یک ناحیه مشخص از پلات کاملاً مشخص و گویاست. در مطالعه سوتوسردا و همکاران (۳۶) دو مولفه اول حدود ۶۶ درصد از واریانس کل را توجیه کردند، که در مطالعه این محققین نیز هم‌پوشانی تقریباً کامل بین ساختار جمعیت و تجزیه به بردارهای اصلی بود.

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbor-Joining و ضریب فاصله Number of differences، ارقام مورد مطالعه را در دو خوشه اصلی گروه بندی کرد (شکل ۱). ارقام بناب-روشت، شاهیندژ-کشاورز، شاهیندژ-باروق نادر گلی و شاهیندژ-باروق قرمزی بلاق در گروه اول قرار گرفتند. گروه دوم شامل ارقام کرمان، کرمان - شهر نایک، خدابنده-کشک آباد، مرکزی-سازند، مرکزی - هندویه و سیستان و بلوچستان بود. در بررسی دندروگرام حاصل می‌توان دریافت که در هر دو گروه، ارقامی که در کنار هم جای گرفته‌اند که دارای شرایط آب و هوایی کاملاً مشابه و یا نسبتاً مشابهی می‌باشند. بیشترین فاصله ژنتیکی بین ارقام بناب-روشت و کرمان بود که در برنامه‌های به‌نژادی کتان می‌توان از این ژنوتیپ‌ها به عنوان والدین تلاقی جهت کسب حداکثر هتروزیس استفاده نمود.

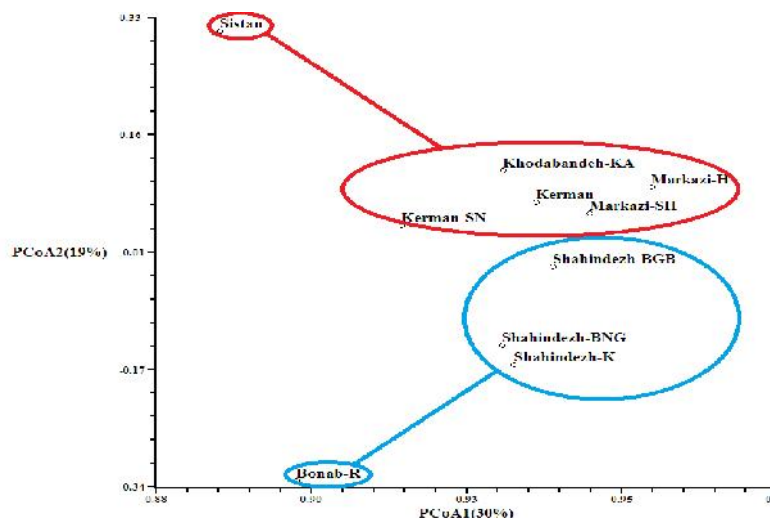


شکل ۱- گروه‌بندی ارقام کتان مورد مطالعه با استفاده از الگوریتم Neighbour-Joining و ضریب فاصله Number of differences (Kerman: کرمان، Khodabandeh-KA: خدابنده-کشک‌آباد، Shahindezh-BNG: شاهیندهز-باروق نادرگلی، Shahindezh-K: شاهیندهز-کشاوری، Shahindezh-BGB: شاهیندهز-کشاوری، Bonab-R: بناب-روشت، Kerman-SN: کرمان-شهر بابک، Markazi-H: مرکزی-شلزند، Markazi-SH: مرکزی-هندویه، Sistan: سیستان و بلوچستان)

Figure 1. Denderogram depicting relations of flax cultivars by Number of differences distance and Neighbour-Joining algorithm (Kerman, Khodabandeh-Khashkabad, Shahindezh- Barogh Nader Gholi, Shahindezh- Keshavarz, Shahindezh- Barogh Ghermezi Bolagh, Bonab-Ravesht, Kerman-Shahr-e Babak, Markazi-Shazand, Markazi-Hendoyeh, Sistan and Baluchestan)

جدول ۵- مقدار ویژه، درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی مربوط به ۵ مولفه اول

مؤلفه	مقادیر ویژه	درصد مقادیر ویژه	درصد تجمعی مقادیر ویژه
اول	۳۹/۸۹	۸۵/۸۶	۸۵/۸۶
دوم	۱۹/۲۹	۲/۸۱	۸۸/۶۸
سوم	۱۴/۲۹	۲/۶۱	۹۱/۲۹
چهارم	۱۰/۹۶	۱/۹۴	۹۳/۲۳
پنجم	۸/۴۶	۱/۸۱	۹۵/۰۵

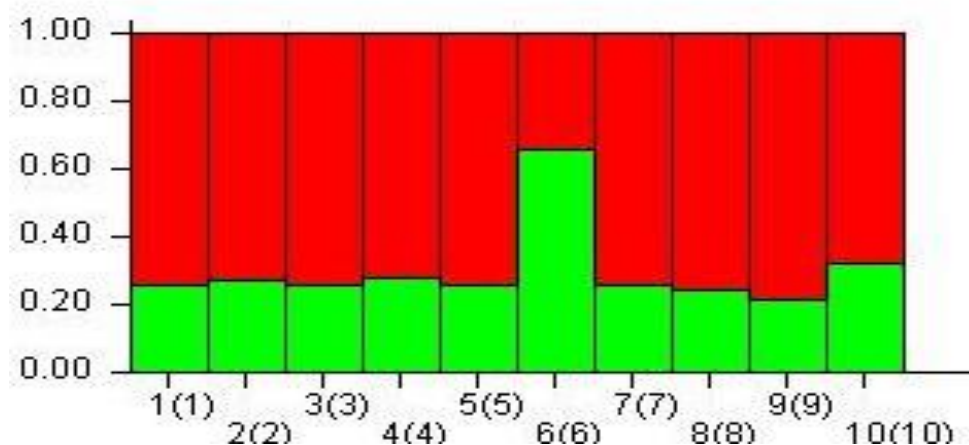


شکل ۲- پلات دو بعدی ۱۰ رقم گونه *L. usitatissimum* بر اساس تجزیه به مختصات اصلی. (Kerman: کرمان، Khodabandeh-KA: خدابنده-کشک-آباد، Shahindezh-BNG: شاهیندهز-باروق نادرگلی، Shahindezh-K: شاهیندهز-کشاوری، Shahindezh-BGB: شاهیندهز-کشاوری، Bonab-R: بناب-روشت، Kerman-SN: کرمان-شهر بابک، Markazi-H: مرکزی-شلزند، Markazi-SH: مرکزی-هندویه، Sistan: سیستان و بلوچستان)

Figure 2. Two dimensional plot of the genetic relationship among 10 *L.usitatissimum* cultivars produced by principle coordinate analysis on RAPD data. (Kerman, Khodabandeh-Khashkabad, Shahindezh- Barogh Nader Gholi, Shahindezh- Keshavarz, Shahindezh- Barogh Ghermezi Bolagh, Bonab-Ravesht, Kerman-Shahr-e Babak, Markazi-Shazand, Markazi-Hendoyeh, Sistan and Baluchestan)

جریان ژنی نسبتاً پایین بین ارقام می‌باشد (۵). اسمایکل و همکاران (۳۵) جهت بررسی تنوع ژنتیکی ارقام زراعی کتان با استفاده از نشانگر IRAP، F_{st} پایین‌تر از ۰/۳ را بدست آوردند. با توجه به اینکه جمعیت‌های مورد مطالعه از دو نواحی آب و هوایی زاگرس (گرم و خشک) و البرز (سرد و مرطوب) اند، بنابراین تفاوت جغرافیایی و متافوت جمع‌آوری شده دلیل اصلی در تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌باشد. ساختار 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 (۲۸، ۴). بنابراین در نظر گرفتن ساختار جمعیت در مطالعات نقشه‌یابی ارتباطی به منظور شناسایی واریانت‌های کمیاب در مکان‌هایی که بین جمعیت‌ها متغیر هستند، ولی به طور شایعی درون زیر جمعیت‌ها تثبیت شده‌اند، از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (۸، ۳).

ساختار ژنتیکی جمعیت نشان‌دهنده اثر متقابل ما بین گونه‌ها با توجه به تاریخ تکامل طولانی مدت، جهش و نوترکیبی، رانده‌شدگی ژنتیکی، سیستم تولید مثلی، جریان ژنی و انتخاب طبیعی می‌باشد (۳۴، ۳۱). بنابراین درک درستی از سطح و ساختار ژنتیکی محصولی پیش نیاز حفاظت و استفاده کارآمد از ژرم‌پلاسما در دسترس برای کارهای اصلاحی می‌باشد (۱۸). به منظور تعیین و تایید گروه‌های متمایز حاصله از تجزیه خوشه‌ای ارقام مورد مطالعه، تجزیه ساختار ژنتیکی ارقام مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Structure 2.3.4 و بر اساس مدل بیزی صورت گرفت (شکل ۳). پس از انجام محاسبه مقادیر مختلف K (بر اساس روش ΔK)، مقدار $K=2$ مناسب‌ترین عدد برای محاسبه متوسط شاخص تثبیت (F_{st}) برای هر گروه برآورد شد و تعداد ۲ گروه حاصل از تجزیه خوشه‌ای تایید شد. متوسط مقدار F_{st} برای گروه اول و دوم به ترتیب ۰/۲۲ و ۰/۰۶ بود. در گروه اول مقدار متوسط F_{st} بیشتر از ۰/۲۱ بود که نشان‌دهنده تمایز نسبتاً بالا و



شکل ۳- دسته بندی ژرم پلاسما کتان بر اساس نرم افزار Structure. ۱: کرمان، ۲: خدابنده-کاشک آباد، ۳: شاهیندهز- باروق نادرگلی، ۴: شاهیندهز- کشاورز، ۵: شاهیندهز-باروق قرمزی بلاق، ۶: بناب-روشت، ۷: کرمان-شهر نایک، ۸: مرکزی-شلزند، ۹: مرکزی-هندویه، ۱۰: سیستان و بلوچستان

Figure 3. Clustering of Flax germplasm using Structure software. (1:Kerman, 2:Khodabandeh-Khashkabad, 3:Shahindezh- Barogh Nader Gholi, 4:Shahindezh- Keshavarz, 5:Shahindezh- Barogh Ghermezi Bolagh, 6:Bonab-Ravesh, 7:Kerman-Shahr-e Babak, 8:Markazi-Shazand, 9:Markazi-Hendoyeh, 10:Sistan and Baluchestan)

پژوهش‌های دیگر استفاده نمود. همچنین با توجه به اینکه اکثر آغازگرهای تولیدی توسط آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق بر روی صفات مورد مطالعه موثر بودند بنابراین احتمال دارد بتوان از این آغازگرهای RAPD در برنامه‌های اصلاحی کتان برای شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید استفاده کرد.

مطالعه حاضر اولین گزارش در استفاده از تجزیه ارتباط برای شناسایی آغازگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک در ارقام مورد مطالعه می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر و تحقیقات یاد شده نشان می‌دهد که چنانچه از آغازگرهای بیشتری و جمعیت‌های بزرگتری استفاده شود می‌توان به شناسایی آغازگرهایی که دارای همبستگی بالا و قابل اعتماد با صفات مرتبط با عملکرد و اجزای عملکرد امیدوار بود و از آنها در

منابع

1. Abdollahi Mandoulakani, B., H. Azizi, Y. Piri, S. Rahmanpour and L. Hassani. 2016. Association Analysis for Morphological Traits in Cultivated Alfalfa using Molecular Markers. *Journal of Crop Breeding*, 8: 52-60.
2. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, L.M. Albright, D.M. Coen and A. Varki. 1995. *Current protocols in molecular biology*. Jon Wiley, 225 pp.
3. Breseghello, F. and M.E. Sorrells. 2006. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science*, 46: 1323-1330.
4. Cardon, L.R. and L.J. Palmer. 2003. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*, 15: 598-604.
5. Carvalho, A., H. Guedes-Pinto and P. Martin Lopes. 2010. Genetic variability of old Portuguese bread wheat cultivar assayed by IRAP and REMAP markers. *Annals of Applied Biology*, 156: 337-345.
6. Clegg, M.T. 1997. Plant genetic diversity and the struggle to measure selection *Journal of Heredity*, 88: 1-7.
7. Crossa, J., J. Burguen, S. Dreisigacker, M. Vargas, S.A. Herrera-Foessel, M. Lillemo, R.P. Singh, R. Trethowan, M. Warburton, J. Franco, M. Reynolds, J.H. Crouch and R. Ortiz. 2007. Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics*, 177: 1889-1913.
8. Flint-Garcia, S.A., A.C. ThUILlet, J. Yu, G. Pressoir, S.M. Romero, S.E. Mitchell, J. Doebley, S. Kresovich, M.M. Goodman and E.S. Buckler. 2005. Maize association population: A high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant Journal*, 44: 1054-1064.
9. Gebhardt, C., A. Ballvora, B. Walkemeier, P. Oberhagemann and K. Schuler. 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: A case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Molecular Breeding*, 13: 93-102.
10. Golshan, M., F. Rahmani and A. Hasanzadeh. 2014. Study of diversity in cultivated Flax (*Linum usitatissimum* L.) based on morphological traits and RAPD molecular marker. *Iranian Journal of Modern Genetic*, 9:107-16.
11. Grant, C.A. and L.D. Baily. 1993. Interaction of Zinc with banded and broadcast phosphorus fertilizer on the dry matter and seeds yield of oilseed flax. *Canadian Journal of Plant Science*, 73:7-15.
12. Gupta, P.K., S. Rustgi and P.L. Kulwal. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*, 57: 461-485.
13. Ivanova, S., T. Rashevskaya and M. Makhonina. 2011. Flaxseed additive application in dairy products production. *Procedia Food Science*, 1: 275-280
14. Jun, T.H., K. Van, M.Y. Kim, S.H. Lee and D.R. Walker. 2008. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica*, 162: 179-191.
15. Kumar, J. and P. Kumar Gupta. 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reports*, 2: 93-112.
16. Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3. Integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment *Briefing in Bioinformatics*, 5: 150-163.
17. Levesque, R. 2007. *SPSS Programming and Data Management: A Guide for SPSS and SAS Users*, Fourth Edition, SPSS Inc., Chicago.
18. Li, M., Z. Zhao, X. Miao and J. Zhou. 2014. Genetic diversity and population Structure of Siberia apricot (*Prunus Siberia* L.) in China. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 377-400.
19. Muravenko, O.V., V.A. Lemeshe, T.E. Samatadze, A.V. Amosova, Z.E. Grushetskaya, K.V. Popov, O.Y. Semenova, L.V. Khotyuleva and A.V. Zelenin. 2003. Genome comparisons with chromosomal and molecular markers for three closely related flax species and their hybrids. *Russian Journal of Genetics*, 39: 414-421.
20. Murre, M.M. 1955. *Vezelvas. Uitgeverij Ceres. Meppel. The Netherlands*: 112 pp.
21. Naghavi, M.R., M. Mardi, S.M. Pirseyedi, M. Kazemi, P. Potki and M.R. Ghaffari. 2007. Comparison of genetic variation among accessions of *Aegilops tauschii* using AFLP and SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 237-240.
22. Omid-Beigi, R. 1995. *Findings about Production and Process of Medicinal Plants*. Fekre Rooz Publication, 110 pp.
23. Pank, F. 2006. Adaptation of medicinal and aromatic plants to contemporary quality and technological demands by breeding: aims, methods and trends. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai, Botucatu*, 8: 39-42.
24. Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
25. Rashidi Monfared, S., M. Mardi, A.H. Hoseinzadeh and M.R. Naghavi. 2008. Association analysis of important agronomic traits to retrotransposon markers SSAPs in durum wheat accessions. *Journal of Modern Genetic*, 3: 29-35.
26. Rechinger, K.H. 1974. *Flora Iranica: Linacea*. Graz: Akademische Druk-und Verlagsanstalt, 106 pp.

27. Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York.
28. Rostok, N., L. Ramsay, K. MacKenzie, L. Cardle, P.R. Bhat, M.L. Roose, J.T. Svensson, N. Stein, R.K. Varshney, D.F. Marshall, A. Graner, T.J. Close and R. Waugh. 2006. Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 103: 18656-18661.
29. Roy, J.K., R. Bandopadhyay, S. Rustgi, H.S. Balyan and P.K. Gupta. 2006. Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science*, 90: 5-10.
30. Saremi Rad, B., M. Shokrpour, O. Sofalian, S.E. Hashemi Nezhad, A. Avanes and E. Esfandiari. 2014. Association Analysis of AFLP and RAPD Markers with Cadmium Accumulation in Wheat. *Journal of Crop Breeding*, 8: 126-133 (In Persian).
31. Schaal, B.A, D.A. Hayworth, K.M. Olsen, J.T. Rauscher and W.A. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: Problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7: 465-474.
32. Semagn, K., A. Bjornstad and M.N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5: 2540-2568.
33. Sharifinia, F. and M. Assadi. 2001. Flora of Iran, No. 34: *Linaceae*. Research Inst, Forests and Rangelands. Ministry of Jihad-e-Sazandegi, 114-125.
34. Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations *Science*, 236: 787-792.
35. Smykal, P., N. Bacova-Kerteszo, R. Kalendar, J. Corander, A.H. Schlman and M. Pavelek. 2011. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 122: 1385-1397.
36. Soto-Cerda, B.J., A. Diederichsen, S. Duguid, H. Booker, G. Rowland and S. Cloutier. 2014. 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: 2091-2107.
37. Soto-Cerda, B.J., S. Duguid, H. Booker, G. Rowland, A. Diederichsen and S. Cloutier. 2014. Association mapping of seed quality traits using the Canadian flax (*Linum usitatissimum* L.) core collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 127: 881-896.
38. Talebibodaf, M., A. Tabatabaei, K.H. Razmjoo and B. Shirvan. 2006. Genetic variation within and among species of perennial grass using AFLP markers. *Iranian Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 10: 29-38.
39. Virk, P.S., B.V. Ford-Lloyd, M.T. Jackson, H.S. Pooni, T.P. Clemeno and H.J. Newbury. 1996. Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. In: Khush GS, editor. *Rice genetics III Proceeding of the Third International Rice Genetics Symposium*, Manila (Philippines): International Rice Research Institute, pp: 307-316.

Identification of RAPD Marker Associated with Morphological Traits and Population Structure Assessed in Cultivated Flax (*Linum Usitassimum* L.)

Masoomeh Golshan¹, Fatemeh Rahmani² and Hossein Abbasi Holasou³

1- Graduate M.Sc., Department Faculty of Science, Urmia University

2- Assistant, Department Faculty of Science, Urmia University

3- Genetic PhD, Faculty of Agricultural Sciences, Tabriz University (Corresponding Author: Hossein.pdf55@gmail.com)

Received: August 11, 2015

Accepted: February 6, 2016

Abstract

Linum is the largest genus of the *Linaceae* family comprising nearly 2030 species. Flax (*Linum usitassimum* L.) is the third largest natural fiber crop in the world. In the present study, RAPD marker were employed to identify informative markers associated with traits such as plant high, weight of capsules per plant, weight branch, capsules number of branches, capsules of the main stem, stem length, branch length, number of branches, thousand seed weight, number of capsules per plant, seed yield, biological yield and harvest index in flax cultivars. Thirteen RAPD primers amplified 169 loci among 10 flax cultivars, with an average of 13 loci per primer. Polymorphic information content (PIC) ranged from 0.05 (OPA-03) to 0.29 (OPD-03), with an average of 0.16. Cluster analysis based on molecular data assigned the genotypes into two groups, which coincided to geographic distribution. Cluster analysis result was confirmed by principal components analysis. Population structure analysis using model-based Bayesian confirmed the K=2, as the reliable value for the number of clusters. Stepwise regression analysis between molecular data as independent variables, and morphological data as dependent variables was performed to identify informative markers associated with the studied traits. Loci OPD-03 and OPD-05 were associated with both thousand seed weight and number of branches. Since all used RAPD loci except OPB-04 showed significant association with the studied traits, therefore, it is possible to use these primers along with morphological traits in flax breeding programs for identification of suitable parents to produce mapping populations and hybrid varieties.

Key words: Association analysis, Morphological traits, Principal component analysis, RAPD marker