

Marker association and genetic variation of agronomic traits in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using AFLP marker

Lida Soltani

M. Sc. Graduate, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. Tel: +989903458312, Email: lidasoltani2010@yahoo.com

Fatemeh Ebrahimi 

*Corresponding author, Assistant Professor, Research & Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. Tel: +989133970869, Email: fa.ebrahimi@uk.ac.ir

Ghasem Mohammadi Nejad 

Associate Professor, College of Agriculture and Research & Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. Tel: +989133415937 Email: mohammadinejad@uk.ac.ir

Abstract

Objective

This experiment was conducted in order to assess genetic variation, determine of the best genetic structure and association analysis of safflower to identify markers associated with different agronomic traits.

Materials and methods

In this study, 17 genotypes of safflower were planted as the randomised complete block design at research farm of Shahid Bahonar University of Kerman in 2016. Traits including seed yield, plant height, number of capitulum per plant, number of seed per capitulum, 1000- seed weight, capitulum diameter, day to 50% flowering and day to maturity were measured. The AFLP Technique was performed by the eight EcoR1/Mse1 primer combinations.

Results

In total, 147 polymorphic bands were generated with average 81.58 polymorphic percentage. Cluster analysis using UPGMA and Jacard as similarity index discriminated safflower genotypes into two groups. Based on GLM and MLM model, 45 and 39 markers had significant association with the studied traits, respectively. M14/E6-10, M14/E11-16, M14/E11-13, M3/E10-14 and M4/E36-12 markers with seed yield, M3/E10-12, M3/E36-29, M59/E36-21 and M14/E11-10 with capitulum number per plant, M4/E36-8, M59/E36-21, M3/E10-9, M14/E11-14 and M14/E11-13 with number of seed per capitulum, M4/E36-19, M4/E36-12, M14/E11-1 and M4/E10-1 with 1000- seed weight, M4/E10-2, M59/E36-21, M3/E36-30, M4/E10-11 and M4/E36-24 with plant height, M3/E36-24, M3/E36-6, M3/E10-20 and M4/E36-18 with capitulum diameter, M14/E11-10, M3/E36-30 and M59/E36-21 with day to 50% flowering, M14/E11-10 and M59/E36-22 markers with day to maturity in both models.

Conclusions

Detected AFLP markers with strong effects in this study could be desirable candidates for the marker-assisted selection in breeding programs and conversion into other specific markers.

Keywords: Association analysis, marker coefficient of determination, cluster analysis, mixed linear model.

Citation: Soltani L, Ebrahimi F, Mohammadi Nejad Gh (2020) Marker association and genetic variation of agronomic traits in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using AFLP marker. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (2), 43-62.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (2), 43-62.

DOI: 10.22103/jab.2020.14197.1139

Received: January 19, 2020; Accepted: March 7, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

ارتباط نشانگری و تنوع ژنتیکی صفات زراعی گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) با

استفاده از نشانگر AFLP

لیدا سلطانی

دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۹۰۳۴۵۸۳۱۲، ایمیل:

lidasoltani2010@yahoo.com

فاطمه ابراهیمی

*نویسنده مسئول، استادیار، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۳۹۷۰۸۶۹، ایمیل:

fa.ebrahimi@uk.ac.ir

قاسم محمدی نژاد

دانشیار، دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۳۴۱۵۹۳۷، ایمیل:

mohammadinejad@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۷

چکیده

هدف: این آزمایش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی، تعیین بهترین ساختار ژنتیکی و تجزیه ارتباطی گلرنگ با استفاده از نشانگر AFLP جهت شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات زراعی مختلف انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۷ ژنوتیپ گلرنگ به صورت طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال ۱۳۹۵ کشت گردیدند. صفات فنوتیپی شامل عملکرد دانه، ارتفاع بوته، تعداد قوزه در بوته، تعداد دانه در قوزه، وزن هزار دانه، قطر قوزه، روز تا رسیدگی اندازگی شد. تکنیک AFLP با استفاده از هشت ترکیب آغازگری EcoRI و MseI انجام شد.

نتایج: در کل ۱۴۷ باند چند شکلی با میانگین ۸۱/۵۸ درصد چندشکلی ایجاد شد. تجزیه کلاستر بر اساس روش الگوبندی UPGMA و معیار جاکارد ژنوتیپ‌های گلرنگ را به دو گروه تقسیم کرد. تعداد ۴۵ و ۳۹ نشانگر به ترتیب بر اساس مدل GLM و MLM ارتباط معنی‌دار با صفات مورد مطالعه داشتند. نشانگرهای M14/E11-13، M14/E11-16، M14/E6-10، M3/E10-12، M3/E36-29، M3/E36-21، M14/E11-10 و M59/E36-21 با تعداد قوزه در بوته، M4/E36-12، M3/E10-14، M4/E36-8، M3/E10-9، M59/E36-21، M14/E11-14، M14/E11-13 و M14/E11-10 با تعداد دانه در قوزه،

M4/E36-19، M4/E36-12، M4/E11-1 و M4/E10-1 با وزن هزار دانه، M4/E10-2، M59/E36-21، M3/E36-30 و M4/E36-24 با ارتفاع گیاه، M3/E36-24، M3/E36-6، M3/E10-20 و M4/E36-18 با قطر قوزه، M14/E11-10، M3/E36-30 و M59/E36-21 با روز تا ۵۰٪ گلدهی و M14/E11-10 و M59/E36-21 با روز تا رسیدگی در هر دو مدل همبستگی معنی‌دار نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نشانگرهای AFLP مشخص شده با اثرات قوی در این مطالعه می‌تواند کاندیدهای مناسبی برای انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی و تبدیل به نشانگرهای اختصاصی دیگر باشند.

کلمات کلیدی: تجزیه ارتباطی، ضریب تبیین نشانگر، تجزیه کلاستر، مدل خطی چندگانه.

مقدمه

کلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است که تا حدودی با مناطق کم‌آب سازگاری یافته است. این گیاه با توجه به ویژگی‌های زراعی منحصر به فرد آن می‌تواند به‌عنوان یک گیاه جایگزین و امیدوارکننده در اکوسیستم‌های زراعی مناطق خشک در نظر گرفته شود (Janmohammadi et al. 2017). منابع ژنتیکی نقش مهمی در افزایش پتانسیل عملکرد دارند و کاهش تنوع ژنتیکی با مشکلات عدیده‌ای در یافتن ژن‌های جدید برای بهبود عملکرد کمی و کیفی و مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده همراه است. مطالعه تنوع ژنتیکی نه تنها برای سازماندهی و حفاظت مواد گیاهی، بلکه برای پدیده هتروزیس و تولید بذور هیبرید نیز اهمیت دارد. تنوع ژنتیکی بین و داخل جمعیت‌های گونه‌های گیاهی، یکی از موارد اصلی مورد مطالعه به‌نژادگران و متخصصان ژنتیک می‌باشد تا وارپته‌های با عملکرد بالا و مقاوم انتخاب شوند (Gepts 2006). از بین انواع روش‌هایی که برای تخمین میزان تنوع ژنتیکی در بین گونه‌های گیاهی موجود هستند، ثابت شده است که نشانگرهای مولکولی DNA یکی از ابزارهای بسیار مهم و قوی جهت ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی هستند (Ren & Timko 2001). نشانگرهای مولکولی با انواع متعدد و مزایای بسیار، به‌عنوان یک ابزار تکمیلی، همراه نشانگرهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در بررسی روابط فیلوژنتیکی گیاهی و در اصلاح نباتات مولکولی جهت افزایش بازدهی گزینش برای صفات به کمک نشانگرهای مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند، زیرا تحت تاثیر شرایط محیطی نبوده و در هر مرحله از رشد گیاه قابل استفاده هستند (Lagudah et al. 2006; Manifesto et al. 2001). در بین نشانگرهای مولکولی، نشانگر AFLP به‌عنوان ابزاری قدرتمند در شناسایی چندشکلی میان ژنوتیپ‌ها و بررسی ارتباط نشانگر با صفت گزارش شده است. AFLP دارای مزایایی از قبیل چندشکلی بالا، پوشش وسیع و تصادفی در ژنوم، عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر، غیرحساس بودن به غلظت DNA الگو، ظرفیت بررسی کل ژنوم برای نمایان کردن چندشکلی و تولید تعداد زیاد نوار تکرارپذیر در مدت زمان کوتاه، دقت و

تکرارپذیری بالا می‌باشد (Naghavi et al. 2008). از نشانگر AFLP جهت بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین ساختار ژنتیکی در گیاهان متعدد (Badfar-Chaleshtori et al. 2012; Subudhi et al. 2000) از قبیل گلرنگ (Johnson et al. 2007; Sehgal & Raina 2005; Kumar et al. 2015) استفاده شده است.

یکی از کاربردهای بسیار زیاد نشانگرهای مولکولی تجزیه پیوستگی و بررسی ارتباط نشانگر با صفت جهت بهبود و افزایش کارایی روش‌های مرسوم اصلاح نباتات از طریق انتخاب غیر مستقیم می‌باشد. نشانگرهای مولکولی در مورد صفات تک ژنی و هم در مورد مکان‌های کنترل کننده صفات کمی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اصلاح ژنتیکی در گلرنگ نیز از طریق انتخاب به کمک نشانگر استفاده شده است (Hussain et al. 2016). برخلاف روش مرسوم تجزیه پیوستگی که یک جمعیت ساختمانی مانند نسل F₂، تلاقی برگشتی، هاپلوئیدهای مضاعف برای پیش‌بینی روابط فنوتیپ و ژنوتیپ مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش تجزیه ارتباطی با بهره‌گیری از عدم تعادل گامتی در یک جمعیت طبیعی باعث وضوح نقشه‌یابی و کاهش زمان پروژه تحقیقاتی می‌گردد (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 آنجائیکه در این جمعیت‌ها نوترکیبی تثبیت و از تمام رویدادهای میوزی انباشته شده در طول تاریخچه تکاملی گیاه استفاده شده است، دقت نقشه‌یابی بالاتر است. در صورتی که در روش معمول نقشه‌یابی تنها در تعدادی از نسل‌های تلاقی یا خودگشنی میوز اتفاق می‌افتد. سوم اینکه با در نظر گرفتن ساختار جمعیت مانع از ایجاد پیوستگی‌های دروغین ژنوتیپ- فنوتیپ می‌شود (Rostok et al. Breseghello & Sorrells 2006; Ebrahimi et al. 2017). تجزیه ارتباطی نشانگر AFLP با صفات مختلف تحت شرایط تنش خشکی در گلرنگ گزارش شده است (Ebrahimi et al. 2017). اگرچه تجزیه پیوستگی در گلرنگ انجام شده است. اما تجزیه ارتباطی بندرت در گلرنگ انجام شده است. لذا این مطالعه با اهداف (۱) تجزیه ساختار، تنوع ژنتیکی و در نهایت تعیین بهترین ساختار ژنتیکی (۲) تجزیه ارتباطی صفات زراعی گلرنگ با استفاده از نشانگر AFLP انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این مطالعه بذور ۱۷ ژنوتیپ گلرنگ (جدول ۱) از پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان تهیه و در مزرعه تحقیقاتی این دانشگاه سال ۱۳۹۵ مورد ارزیابی قرار گرفتند. مزرعه در مختصات جغرافیایی به ترتیب با طول جغرافیایی ۵۶ درجه و ۵۸ دقیقه طول شرقی، عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و ۱۵ دقیقه عرض شمالی واقع شده است، که دارای میانگین بارندگی سالانه ۱۵۰ میلی‌لیتر، ارتفاع ۱۷۵۴ متر از سطح دریا و خاک با بافت لومی و رسی می‌باشد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به صورت طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار در هفته آخر آبان‌ماه کشت گردیدند. هر پلات شامل ۴ ردیف به طول ۲/۶ متر با فاصله بین ردیف ۳۰ سانتی‌متر و فاصله روی ردیف ۱۰ سانتی‌متر بود. عملیات تهیه زمین شامل شخم، دیسک، تسطیح و

تهیه ردیف‌های کاشت در مهرماه انجام گرفت. کنترل علف‌های هرز در طول فصل رشد با دست انجام گرفت. کوددهی قبل از کشت و در زمان گلدهی بر اساس آزمایش خاک انجام شد. آبیاری مطابق عرف و به صورت یکنواخت در هر کرت انجام گرفت. با استفاده از حشره‌کش دیازینون بر علیه مگس گلرنگ در مرحله داشت سمپاشی انجام گرفت. صفات فنوتیپی شامل عملکرد دانه در هکتار (kg ha^{-1})، ارتفاع بوته (cm)، تعداد قوزه در بوته، تعداد دانه در قوزه، وزن هزار دانه، قطر قوزه، روز تا ۵۰٪ گلدهی و روز تا رسیدگی اندازه‌گیری شد. در هر کرت ۱۰ بوته به طور تصادفی و با رعایت اثر حاشیه انتخاب شد و صفات ارتفاع و اجزاء عملکرد در آنها در انتهای فصل رشد (مردادماه) اندازه‌گیری شد. صفات فنولوژیک شامل روز تا ۵۰٪ گلدهی و روز تا رسیدگی در طول دوره رشد به صورت مشاهده‌ای برای هر واحد آزمایشی یادداشت برداری شدند.

جدول ۱. ژنوتیپ‌های گلرنگ مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Safflower Genotypes used in this study

منشأ	کد ژنوتیپ	شماره	منشأ	کد ژنوتیپ	شماره
Origin	Genotype code	Number	Origin	Genotype code	Number
Iran	Darab13	10	USA	HARTMAN	1
Iran	Golmehr	11	Iran	Mahali Yazd	2
Iran	Isfahan22	12	Syria	Syrian	3
Iran	Zarghan279	13	USA	TN79670	4
Iran	Padideh	14	Iran	Mahali Bonab	5
unknown	TN79717	15	Iran	Sahebe dorosht	6
Iran	Shotor mel riz	16	unknown	TN79639	7
France	PI198877	17	USA	S-541	8
			Iran	Isfahan14	9

استخراج DNA ژنومی: بذور مربوط به هر ژنوتیپ در داخل گلدان کشت شدند و در ژرمیناتور تحت دمای ۲۰-۲۴

درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از چهار هفته نمونه‌برداری از برگ‌های جوان انجام شد و استخراج DNA از نمونه‌های برگ‌ی به روش Zhang و همکاران (Zhang et al. 1998) با کمی تغییرات (CTAB با غلظت ۱ درصد و NaCl با غلظت ۲/۵ مولار) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و نیز اسپکتروفتومتری تعیین گردید.

AFLP: تکنیک AFLP بر اساس روش Vos و همکاران (Vos et al. 1995) با استفاده از هشت ترکیب آغازگری

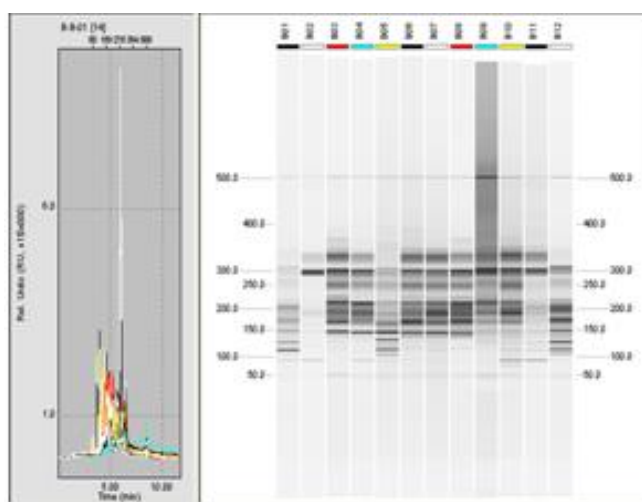
EcoRI/MseI (با حداکثر تعداد باند چندشکل) انتخاب شده از بین ۲۰ ترکیب آغازگری انجام شد (جدول ۲). DNA ژنومی با آنزیم EcoRI (5U) به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم شد و سپس هضم دوم با آنزیم MseI (5U) در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. پس از برش DNA توسط آنزیم‌های برشی سازگارسازهای (آداپتور) الیگونوکلوئیدی دو رشته‌ای به هر دو انتهای قطعه‌های برشی چسبنده اضافه شد. نمونه‌ها در مرحله تکثیر مقدماتی با آغازگرهای

MseI و EcoRI دارای یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' تکثیر یافتند و محصولات پس از رقیق سازی به نسبت ۱:۱۰ در مرحله تکثیر انتخابی با هشت ترکیب آغازگری دارای ۲ نوکلئوتید انتخابی دیگر در انتهای ۳' تکثیر شدند. در این مرحله برنامه پی.سی.آر مورد استفاده برای تکثیر قطعات Touch Down پی.سی.آر می باشد. بدین ترتیب که بعد از یک مرحله ۲ دقیقه در ۹۴ °C، تکثیر انتخابی در ۱۳ سیکل شامل ۹۴ °C در ۳۰ ثانیه، ۶۵ °C در ۳۰ ثانیه با ۰/۷ کمتر برای هر سیکل و ۷۲ °C در یک دقیقه انجام شد. سپس با ۲۰ سیکل ۹۴ °C در ۳۰ ثانیه، ۵۶ °C در ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C در یک دقیقه به نهایت بسط نهایی با دمای ۷۲ °C در ۱۰ دقیقه ادامه داده شد. جداسازی و مشاهده قطعات تکثیری محصولات پی.سی.آر با استفاده از دستگاه کواکسل (QIAGEN, Hilden, Germany) انجام شد (شکل ۱). باندها به صورت ماتریس صفر و یک با استفاده از نرم افزار BioCalculator امتیازدهی شدند.

جدول ۲. ترکیبات آغازگری مورد استفاده برای تجزیه AFLP در گلرنگ

Table 2. Primer combinations used to analyze AFLP in safflower

ترکیب آغازگر	نام آغازگر	ترکیب آغازگر	نام آغازگر
MseI/ EcoRI Primer combination	Primer name	MseI/ EcoRI Primer combination	Primer name
CTG/ AGC	M14/ E11	CTT/ AAC	M4/ E10
CTG/ ACC	M14/ E36	CAA/ ACC	M3/ E36
CTA/ ACC	M59/ E36	CAA/ AAC	M3/ E10
CTT/ACC	M4/ E36	CTT/ AGC	M4/ E11



شکل ۱: نمونه عکس ژل شبیه سازی شده توسط دستگاه QIAxcel

Figure 1. The sample of simulated gel image using the QIAxcel system

آنالیز آماری

آمار توصیفی برای هر ترکیب آغازگری با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx (Peakall & Smouse 2012) انجام شد، که عبارت اند از: محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) $PIC = 1 - p^2 - q^2$ (Weising et al. 2005)، شاخص نشانگر $MI = PIC \times \text{number of polymorphic loci}$ (Powell et al. 1996)، شاخص شانون $H = -1 \times (H)$ (Shannon 1948) $(p \times \ln(p) + q \times \ln(q))$ ، در معادلات فوق p و q به ترتیب فراوانی آلل غالب و مغلوب هستند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از تلفیق نشانگر AFLP با استفاده از نرم‌افزار XISTAT 2018) (Addinsof 2012) انجام شد. همچنین ساختار جمعیت داده‌های مولکولی با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE 2.3.4 در حالت Admixture با ۱۰۰۰۰ بار Burn-in و ۱۰۰۰۰۰ بار تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) در مقادیر مختلف K از ۲ تا ۱۰ (۵ تکرار برای هر K) بررسی شد. عدد K بهینه (تعداد زیر جمعیت احتمالی) بر اساس میزان ΔK در روش اوانو و همکاران (Evanno et al. 2005) با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE HARVESTER تعیین گردید. در این روش حداکثر میزان ΔK نمایانگر K بهینه است. روش اندازه‌گیری میزان ΔK در روش اوانو به طریقه زیر انجام می‌شود:

$$\Delta K = m |L''(K)| / s[L(K)]$$

در معادله فوق $|L''(K)|$ میانگین قدر مطلق لگاریتم احتمال داده‌ها در مقادیر K پشت سر هم و $s[L(K)]$ انحراف استاندارد لگاریتم احتمال داده‌ها برای تکرارهای مختلف در هر K را نشان می‌دهد. در نهایت بر اساس K بهینه تعیین شده به روش اوانو، ماتریس Q (ماتریس ساختار جمعیت) از نتایج ساختار جمعیت استخراج شد.

برای اندازه‌گیری تمایز زیر جمعیت‌ها از آماره شاخص تثبیت F_{st} استفاده شد. شاخص تثبیت با فرمول $F_{st} = (H_t - H_s) / H_t$ محاسبه گردید (Lynch & Milligan 1994). در این فرمول H_t و H_s به ترتیب هتروزیگوسیتی کل و هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها می‌باشد. تجزیه ارتباطی با استفاده از هر دو روش MLM و GLM با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 4.2.1 انجام گرفت (Yu et al. 2006) در روش GLM (General linear model) از ماتریس عضویت افراد در زیر جوامع (Q)، ماتریس فنوتیپی و ژنوتیپی استفاده شد. به طوری که ماتریس (Q) به عنوان متغیر کوواریانت وارد مدل شد، اما در روش MLM (Mixed linear model) علاوه بر ماتریس‌های عضویت افراد در زیر جوامع (Q)، فنوتیپی و ژنوتیپی از ماتریس خویشاوندی افراد (ماتریس Kinship) نیز استفاده شد. ماتریس روابط خویشاوندی افراد بر اساس اطلاعات نشانگرها در نرم‌افزار TASSEL 4.2.1 محاسبه شد.

نتایج و بحث

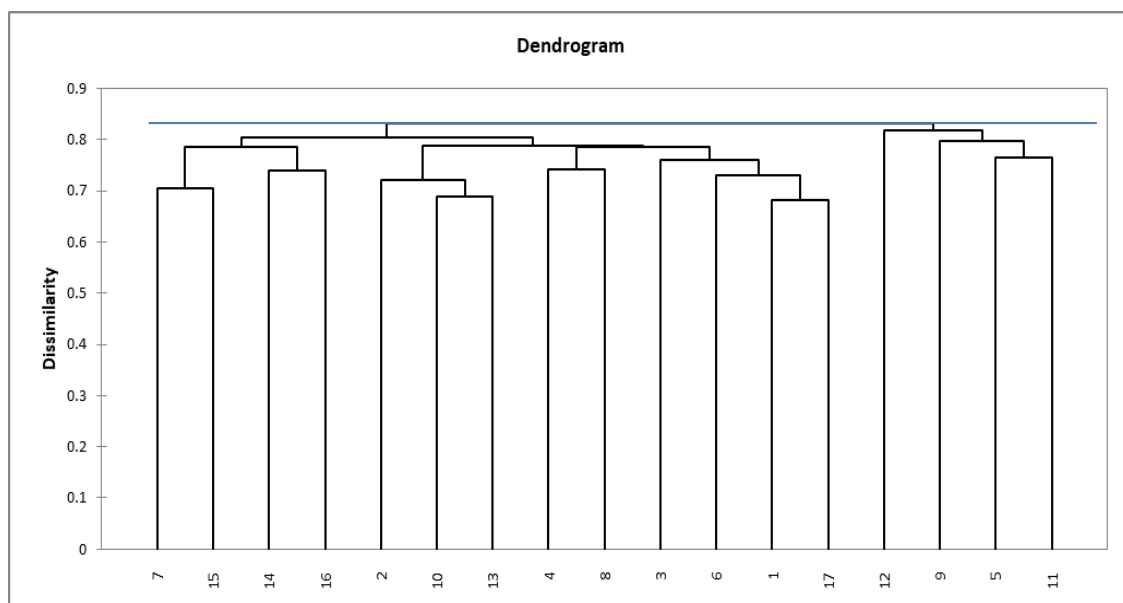
تعداد هشت ترکیب آغازگری AFLP در ۱۷ ژنوتیپ گلرنگ ۱۴۷ باند چندشکل ایجاد کرد. شاخص‌های تنوع برای هشت ترکیب آغازگری در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین تعداد باند چندشکل در ترکیب آغازگری M3/ E36 با ۳۱ باند و کمترین تعداد باند در ترکیب آغازگری M4/ E11 با هشت باند بدست آمد. شاخص PIC (میزان اطلاعات چند شکلی) بین ۰/۲۰ برای ترکیب آغازگری M4/ E36 تا ۰/۳۳ برای ترکیب آغازگری M14/ E6 برآورد گردید. متوسط درصد چندشکلی ۸۱/۵۸ بود. بیشترین درصد چندشکلی متعلق به ترکیب‌های آغازگری M3/E10 با ۸۸/۸۸٪ چند شکلی و کمترین آن مربوط به ترکیب آغازگری M14/E6 با ۷۳/۶۸٪ بود. بیشترین و کمترین مقدار شاخص شانون به ترتیب در ترکیب آغازگری M14/ E6 (۰/۵۱) و M59/E36 (۰/۲۸) بدست آمد. همچنین ترکیب‌های آغازگری M3/ E36 و M4/ E11 به ترتیب دارای حداکثر و حداقل شاخص نشانگر بودند (جدول ۳). درصد بالای چندشکلی نشان می‌دهد که ترکیبات آغازگری AFLP استفاده شده در این مطالعه احتمالاً ابزاری مفید و مناسب جهت تمایز ژنوتیپ‌های گلرنگ بوده است. این نتایج با سایر گزارشات در خصوص نشانگرهای AFLP به‌عنوان نشانگر مناسب جهت مطالعه در تمایز یابی ژنوتیپ‌های گلرنگ مطابقت دارد (Ebrahimi et al. 2017; Kumer et al. 2015). نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب آغازگری M3/ E36 از مقادیر بالا شاخص‌های درصد چندشکلی، MI، PIC و شانون برخوردار است. بنابراین این ترکیب مفیدترین ترکیب در تمایز یابی ژنوتیپ‌های گلرنگ می‌باشد.

جدول ۳. شاخص‌های مولکولی برای هشت ترکیب آغازگری AFLP در ۱۷ ژنوتیپ گلرنگ

Table 3. Molecular Indexes for eight AFLP primer combinations in 17 genotypes of safflower

ترکیب آغازگری Primer combination	شاخص شانون Shanoon Index	تعداد باند چندشکل Polymorphic bands	تعداد کل باند Total Band	درصد چندشکلی Polymorphic percentage	شاخص نشانگر (MI) Marker index	محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) Polymorphic information content
M14/ E11	0.38	22	26	84.61	4.84	0.22
M14/ E6	0.51	14	19	73.68	4.62	0.33
M59/ E36	0.28	17	23	73.91	2.72	0.16
M4/ E36	0.34	22	25	88.00	4.40	0.20
M4/ E10	0.45	9	12	75.00	2.70	0.30
M3/ E36	0.47	31	35	88.57	9.61	0.31
M3/ E10	0.38	24	27	88.88	5.52	0.23
M4/ E11	0.43	8	10	80.00	2.32	0.29
میانگین	0.40	18.37	-	81.58	4.59	0.26

تنوع ژنتیکی: در این مطالعه جهت انتخاب روش خوشه‌ای، ضریب همبستگی کوفنتیک بر اساس معیار مربع فاصله اقلیدسی و جاگرد و دو روش الگوی خوشه‌بندی اتصال متوسط (UPGMA) و اتصال کامل (Complete linkage) محاسبه گردید. بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک (۰/۸۵) بر اساس روش الگوبندی UPGMA و معیار جاگرد بدست آمد. بنابراین تجزیه و تحلیل کلاستر بر اساس روش الگوبندی UPGMA و معیار جاگرد انجام شد. بر اساس دندروگرام حاصل ۱۷ ژنوتیپ گلرنگ به دو گروه تقسیم شدند (شکل ۲). کلیه ارقام خارجی در یک قرار گرفتند. ارقام محلی اصفهان نیز در گروه دوم قرار گرفتند. کمترین میزان شباهت بین رقم محلی بناب و رقم TN79670 از آمریکا مشاهده شد. تلاقی بین ارقامی که کمترین تشابه را دارند (بیشترین فاصله)، بهترین نتیجه را در دستیابی به هیبریدها و یا دستیابی به حداکثر تفکیک در نسلهای پس از F1 خواهد شد (Esposito et al. 2013). نتایج گروه‌بندی لاین‌ها بر اساس تشابه ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مولکولی AFLP بیانگر تشابه زیاد ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشد. تفاوت ژنتیکی کم بین ژنوتیپ‌ها و قرار گرفتن آنها در یک گروه می‌تواند ناشی از نزدیک بودن زمان پیدایش، مبدأ جغرافیایی یکسان، قرابت‌های ژنتیکی، خویشاوندی‌های احتمالی و داشتن اجداد مشترک باشد (Amini et al. 2008; Mahasi et al. 2009).



شکل ۲. گروه‌بندی ۱۷ ژنوتیپ گلرنگ با استفاده از روش UPGMA

Figure 2. Classification of 17 safflower genotypes using UPGMA method

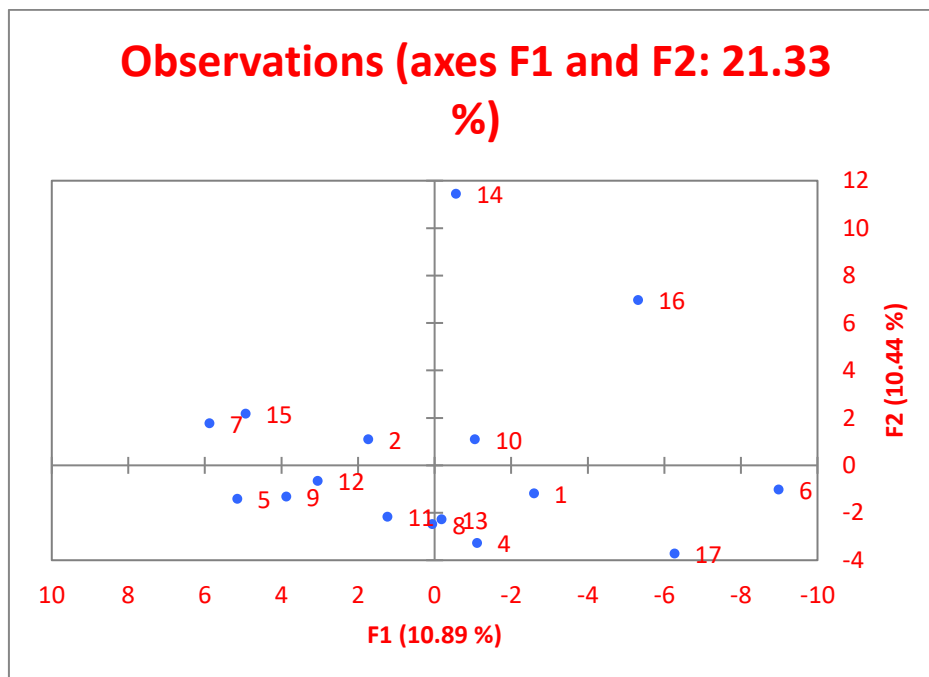
نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی بر پایه ماتریس فاصله مربع اقلیدسی نشان داد که ده مؤلفه اول در مجموع ۷۷/۶۸ درصد از کل تغییرات را توجیه نمود. که سهم مؤلفه اول و دوم به ترتیب ۱۰/۸۹ و ۱۰/۴۴ می‌باشد (جدول ۴). در صورتی که نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شوند و همبستگی آنها کم باشد، تعداد مؤلفه بیشتری برای توجیه کل تغییرات لازم است و بهترین حالت آن است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسبی در ژنوم داشته باشند و بتوانند از تمام ژنوم نمونه‌برداری کنند. اطلاعات بدست آمده از تجزیه مؤلفه‌های اصلی مؤید این مطلب است که ترکیبات آغازگری نشانگر AFLP به کار رفته در این تحقیق پراکندگی نسبتاً خوبی در سطح ژنوم دارند. همانطور که از شکل ۳ نیز مشخص است دو مؤلفه اول با توجه به درصد توجیه کم از کل تغییرات نتوانسته ژنوتیپ‌ها را به خوبی به گروه‌های مجزا تفکیک کند. تجمع افراد در یک نقطه از پلات نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی آنها است. به‌طوریکه اغلب ارقام خارجی در نمایش سه بعدی در قسمت پایین سمت راست پلات تجمع نمودند. همچنین ارقام محلی اصفهان، بناب و گلمهر با تجمع در یک قسمت پلات تشابه ژنتیکی بالایی را نشان دادند که با نتایج تجزیه کلاستر مطابقت دارد.

جدول ۴. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های نشانگر AFLP در ۱۷ ژنوتیپ گلرنگ

Table 4. The principle component analysis based on AFLP markers data in the 17 safflower genotypes

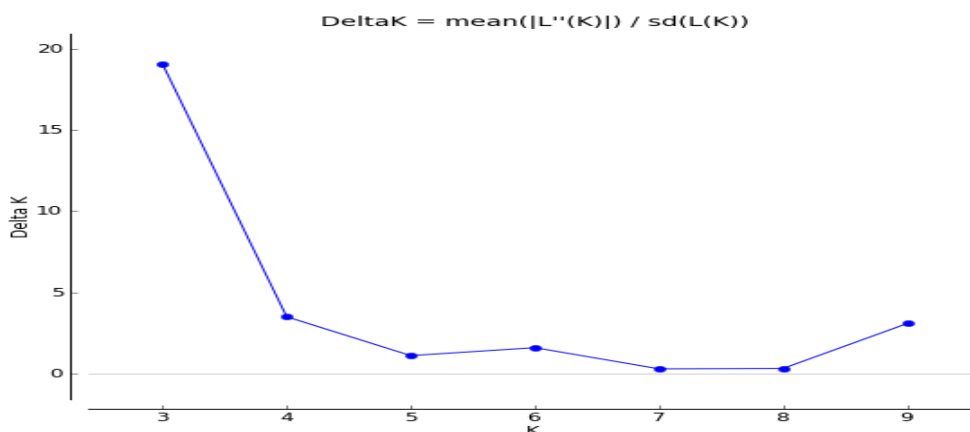
مؤلفه Component										
10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
5.075	5.625	6.056	6.728	6.978	7.551	8.626	9.711	10.443	10.891	درصد percent
										درصد تجمعی
77.683	72.607	66.982	60.927	54.199	47.221	39.670	31.045	21.333	10.891	additive percent

با توجه به نتایج روش اوانو بیشترین مقدار Δk در $K=3$ مشاهده شد (شکل ۴). بنابراین بهترین مقدار K برای جمعیت مورد بررسی برابر با سه انتخاب شد. اختلاط شدید مشاهده شده در این ژرم پلاسما، احتمال این فرض که تبار ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نوع مخلوط باشد را نشان می‌دهد (شکل ۵). یعنی فرد i ممکن است بخش‌هایی از ژنوم خود را از تبار خود در جمعیت k به ارث برده باشد و همچنین فراوانی آلی ممکن است در جمعیت‌های مختلف به علت مهاجرت و یا تبار مشترک مشابه باشد (Mousavi Derazmahalleh et al. 2014). شاخص تثبیت بین ۳ زیر جمعیت حاصل در گلرنگ به ترتیب ۰/۰۱۳، ۰/۸۹۹ و ۰/۰۰۲ بود. مقادیر بالای F_{st} نشان‌دهنده تمایز نسبتاً بالا و جریان ژنی نسبتاً پایین و مقادیر پایین F_{st} بیانگر تنوع پایین بین ارقام می‌باشد.



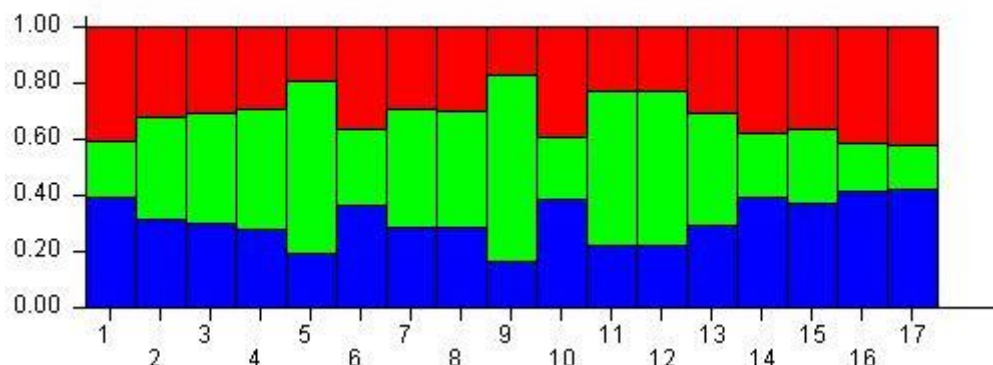
شکل ۳. نمایش دو بعدی تجزیه مؤلفه اصلی بر اساس دو مؤلفه اول و داده‌های نشانگر AFLP در ۱۷ ژنوتیپ گلرنگ

Figure 3. Biplot diagram of the principle component analysis based on the the first two principal components in the 17 safflower genotypes



شکل ۴. نمودار نتایج روش اوانو (Evanno's method) در انتخاب K بهینه

Figure 4. The result of Evanno's method in optimal K selection



شکل ۵. نمودار تجزیه ساختار داده‌های حاصل از هشت ترکیب آغازگری AFLP توسط نرم‌افزار STRUCTURE در ۱۷ ژنوتیپ گلرنگ، اعداد محور افقی و عمودی به ترتیب بیانگر ژنوتیپ و ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر می‌باشد. افراد دارای رنگ مشابه به گروهی مشابه تعلق دارند

Figure 5. Bar plot of structure analysis of eight AFLP Primer Combinations by STRUCTURE software in the 17 safflower genotypes, the numbers on horizontal and vertical axes correspond to the genotypes and the membership coefficient of each individual, respectively. People of the same color type belong to the same group

گزارشات متعدد مبنی بر استفاده از نشانگر AFLP جهت تجزیه ساختار جمعیت در گیاهان متعدد از جمله گلرنگ (Ebrahimi et al. 2017; Kumer et al. 2015) جو (Kraakman et al. 2004)، یولاف (Achleitner et al. 2008) و توتون (Dadras et al. 2014) گزارش شده است.

تجزیه ارتباطی: تجزیه ارتباطی بر اساس مدل GLM و MLM نشان داد که به ترتیب ۴۵ و ۳۹ نشانگر ارتباط معنی‌دار در سطح ۵ درصد با صفات مورد مطالعه داشتند. بر اساس مدل GLM ضریب تبیین نشانگر یا درصد واریانس فنوتیپی توجیه شده توسط هر نشانگر (R^2 نشانگر) از ۲۳/۱۱ تا ۴۸/۱۰ و R^2 مدل از ۳۹/۱۳ درصد تا ۶۷/۸۸ درصد متغیر بود و بر اساس مدل MLM دامنه تغییرات ضریب تبیین نشانگر از ۱۵/۱۳ تا ۳۰ درصد و R^2 مدل از ۶۰/۹۲ تا ۷۹/۲۳ تعیین شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تعداد نشانگرهای مرتبط و معنی‌دار با صفات مورد مطالعه در مدل MLM نسبت به GLM کاهش می‌یابد. ترکیب ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در مدل MLM باعث حذف برخی نشانگرهای دارای ارتباط معنی‌دار دروغین مثبت به دلیل روابط خویشاوندی و در نتیجه کاهش تعداد نشانگر معنی‌دار نسبت به مدل GLM می‌شود (Yu et al. 2006). این نتایج توسط Zhao و همکاران (Zhao et al. 2007)، Dadras و همکاران (Dadras et al. 2014) نیز تأیید شد. همچنین نتایج نشان داد که ضریب تبیین نشانگرها برای هر صفت کاهش قابل ملاحظه‌ای در مدل MLM نسبت به مدل GLM داشت. اچلینتر و همکاران (Achleitner et al. 2008) بیان نمودند ترکیب ساختار جمعیت (Q) و روابط خویشاوندی (K) در مدل

MLM کاهش قابل ملاحظه‌ای در ضریب تبیین نشانگر نسبت به مدل GLM ایجاد می‌نماید و احتمالاً مدل بهتری جهت تصحیح ساختار جمعیت و بررسی روابط نشانگر با صفات می‌باشد. شایان ذکر است که مقدار بسیار بالا R^2 مدل نشان‌دهنده توجیه خوب مدل رگرسیونی MLM نسبت به GLM می‌باشد. مقایسه روش‌های مختلف آماری جهت انجام تجزیه ارتباطی در سال‌های اخیر در گیاهان مختلف از جمله گلرنگ (Ebrahimi et al. 2017)، ذرت (Zhang et al. 2012) و برنج (Vanniarajan et al. 2012) نشان داده است که مدل MLM یکی از بهترین روش‌ها جهت بررسی ارتباط صفت با نشانگر است. بنابراین نشانگرهای AFLP مشخص شده بر اساس مدل MLM می‌تواند به عنوان کاندیدای مناسبی برای مطالعات بعدی گلرنگ باشند. نتایج بر اساس هر مدل GLM و MLM نشان داد که نشانگرهای M14/E6-10، M14/E11-16، M14/E11-13، M3/E10-14 و M4/E36-12 با صفت عملکرد دانه (کیلوگرم در هکتار) ارتباط قوی و معنی‌داری ($P < 0.03$) را نشان دادند (جدول ۵ و ۶). اصلی‌ترین نشانگر، نشانگر M4/E36-12 بود که بیشترین درصد واریانس فنوتیپی این صفت را با مقدار ۳۳/۱۸ و ۲۲/۷۷ به ترتیب بر اساس مدل GLM و MLM توجیه می‌نماید و علاوه بر صفت عملکرد دانه با صفت وزن هزار دانه نیز ارتباط مشترک دارد. همچنین نشانگر M14/E11-13 ارتباط همزمان با نشانگر تعداد دانه در قوزه نشان داد (جدول ۵ و ۶). این امر ناشی از پلیوتروپی یا پیوستگی بین ژن‌های کنترل‌کننده این صفات است. Shi و همکاران (Shi et al. 2009) نیز QTL های مشترک با عملکرد و سایر صفات را مکان‌یابی نمودند و بیان نمودند که عملکرد بوسیله اثرات تجمعی سایر صفات تعیین می‌شود. اغلب ژن‌های کاربردی و عملکردی در ژنوم که به طور مستقیم و غیرمستقیم عملکرد را کنترل می‌کنند اثرات پلیوتروپی بر حداقل یک صفت دیگر نیز دارند. نشانگرهای M4/E36-8، M3/E10-9، M59/E36-21، M14/E11-14 و M14/E11-13 با صفت تعداد دانه در قوزه در هر دو مدل همبستگی بسیار معنی‌دار نشان دادند. نشانگر M14/E11-13 به دلیل ضریب درصد واریانس فنوتیپی بالاتر حدود ۲۲ و ۳۶ درصد به ترتیب در مدل MLM و GLM به عنوان نشانگر مؤثر صفت تعداد دانه در قوزه شناسایی شد (جدول ۵ و ۶).

نتایج این مطالعه نشان داد که از بین پنج نشانگر شناسایی شده همبسته با صفت تعداد قوزه در بوته طبق مدل MLM، نشانگرهای M3/E10-12، M3/E36-29، M59/E36-21 و M14/E11-10 در هر دو مدل با صفت تعداد قوزه در بوته پیوستگی معنی‌دار داشتند. در نشانگرهای AFLP مورد مطالعه، بیشترین میزان درصد توجیه تغییرات فنوتیپی با ۲۷/۵۶٪ و ۴۳/۷۴٪ به ترتیب طبق مدل MLM و GLM برای صفت تعداد قوزه در بوته مشخص شد. نشانگر M14/E11-10 بین صفات تعداد قوزه در بوته و روز تا ۵۰٪ گلدهی و نشانگر M59/E36-21 بین صفات ارتفاع گیاه، تعداد دانه در قوزه، روز تا ۵۰٪ گلدهی و تعداد قوزه در بوته مشترک بود (جدول ۵ و ۶). در پژوهشی Ebrahimi et al. (2017) نیز نشانگرهای مشترک برای صفات عملکرد دانه، تعداد دانه در قوزه و تعداد قوزه در بوته در گلرنگ گزارش نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که نشانگرهای M4/E36-12، M14/E11-1 و M4/E10-1 ارتباط بسیار معنی‌دار با صفت وزن هزار دانه در هر دو مدل دارا بودند و تنها

نشانهگر M4/E36-12 ارتباط مشترک با صفت عملکرد دانه نشان داد (جدول ۵ و ۶). بر اساس نتایج مدل MLM، نشانهگرهای M4/E10-2، M4/E36-21، M3/E36-30، M4/E10-11 و M4/E36-24 با صفت ارتفاع گیاه ارتباط معنی‌دار نشان دادند. در بین این نشانهگرها، نشانهگر M59/E36-21 با اجزای مهم عملکرد گلرنگ شامل تعداد قوزه در بوته و تعداد دانه در قوزه ارتباط مشترک نشان داد (جدول ۶). گزارش شده است که ارتفاع گیاه به عنوان یک صفت مورفولوژیک مهم در گلرنگ با صفات اجزای عملکرد ارتباط دارد (Golkar et al. 2011; Shahbazi & saeidi 2017). بنابراین نشانهگرهای معنی‌دار با ارتفاع گیاه جهت اصلاح ارقام پاکوتاه با شاخص برداشت بالا و انتخاب غیرمستقیم از طریق این صفت در گلرنگ مهم می‌باشند. بر اساس هر دو مدل MLM و GLM نشانهگرهای M3/E36-24، M3/E36-6، M3/E10-20 و M4/E36-18 با صفت قطر قوزه ارتباط بسیار معنی‌دار نشان دادند.

نتایج مدل GLM و MLM بیانگر ارتباط بسیار معنی‌دار نشانهگرهای M14/E11-10، M3/E36-30 و M59/E36-21 با صفت روز تا ۵۰٪ گلدهی بود. همچنین نشانهگرهای M14/E11-10 و M59/E36-21 با صفت روز تا رسیدگی همبستگی معنی‌دار نشان دادند (جدول ۵ و ۶). در پژوهشی Kotcha (1979) نیز در مطالعه خود در گلرنگ همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تعداد روز تا گلدهی با تعداد روز تا رسیدگی گزارش کرد. به طور کلی چندشکلی بالا ترکیب آغازگری AFLP نشان داد که نشانهگرهای AFLP ابزاری مناسب و کارآمد جهت تمایز ژنوتیپ‌ها و در تجزیه و تحلیل ساختار جمعیت مفید بوده است و نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب آغازگری M3/E36 با مقادیر بالا شاخص‌های درصد چندشکلی، PIC، MI و شانون مفیدترین ترکیب در تمایز یابی ژنوتیپ‌های گلرنگ می‌باشد. همچنین با توجه به محدودیت‌های تجزیه پیوستگی از قبیل زمان طولانی و هزینه لازم جهت تهیه جمعیت‌های در حال تفرق، روش تجزیه ارتباطی با از بین بردن این محدودیت‌ها اطلاعات نشانگری مناسبی را فراهم می‌نماید، به طوری که نتایج مطالعه حاضر کارایی استفاده از روش تجزیه ارتباطی بالادکس روش MLM را در شناسایی نشانهگرهای با اثرات بسیار قوی مرتبط با صفات مهم در ژنوتیپ‌های گلرنگ نشان داد. نشانهگرهای AFLP مشخص شده با اثرات قوی در این مطالعه می‌تواند کاندیدهای مناسبی برای انتخاب به کمک نشانهگر در برنامه‌های اصلاحی و تبدیل به نشانهگرهای اختصاصی دیگر همانند SCAR باشند. وجود نشانهگرهای مشترک بین صفات ممکن است به دلیل اثر پلیوتروپی و یا وجود چندین ژن در این نواحی با لینکاژ بسیار قوی باشد که به طور همزمان چندین صفت را کنترل می‌کنند. وجود چنین حالتی در بهنژادی گیاهی از نظر اصلاح همزمان چندین صفت بسیار حائز اهمیت می‌باشد. البته لازم است در جمعیت‌های با سطح تنوع بالاتر و در محیط‌های مختلف نشانهگرهای شناسایی شده با صفات مربوطه مورد مطالعه قرار گیرند تا از ارتباط آنها اطمینان حاصل شود.

جدول ۵. نشانگرهای AFLP پیوسته با صفات زراعی مختلف در گلرنگ بر اساس مدل خطی عمومی

(GLM)

Table 5. AFLP markers associated with different agronomic traits in safflower based on general linear model (GLM)

نشانگر Marker	مقدار P P-Value	ضریب تبیین نشانگر R ² Marker	نشانگر Marker	مقدار P P-Value	ضریب تبیین نشانگر R ² Marker
شاخص برداشت Harvest index			عملکرد دانه Grain yield (Kg ha ⁻¹)		
M3/E36-26	0.0234	0.2669	M14/E11-16	0.0287	0.2317
M3/E36-29	0.0234	0.2669	M3/E10-14	0.0193	0.2684
M59/E36-9	0.0201	0.2777	M14/E6-10	0.0186	0.2606
M59/E36-12	0.0201	0.2777	M14/E11-13	0.0161	0.2702
M4/E36-17	0.0201	0.2777	M4/E36-12	0.0058	0.3318
M3/E10-7	0.0153	0.2972	تعداد قوزه در بوته Number of capitulum per plant		
تعداد دانه در قوزه Number of seeds per capitulum			M4/E36-24	0.0271	0.2765
M4/E36-8	0.0174	0.3045	M59/E36-21	0.0239	0.2865
M14/E11-14	0.0111	0.3371	M3/E10-9	0.0239	0.2865
M59/E36-21	0.0103	0.3429	M3/E36-29	0.0182	0.3076
M3/E10-9	0.0103	0.3429	M3/E10-12	0.017	0.3129
M14/E11-13	0.0074	0.3656	M14/E11-10	0.0028	0.4369
ارتفاع گیاه Plant height			M59/E36-22	0.0028	0.4374
روز تا ۵۰٪ گلدهی Day to 50% flowering			وزن هزار دانه 1000-seed weight		
M3/E36-30	0.0275	0.2884	M4/E36-19	0.027	0.2893
M59/E36-21	0.0257	0.2941	M14/E11-22	0.02	0.3139
M4/E10-2	0.0238	0.3003	M4/E36-12	0.0134	0.3458
M4/E36-24	0.0066	0.3989	M4/E10-1	0.0107	0.3632
روز تا رسیدگی Day to maturity			M14/E11-1	0.0057	0.4089
M3/E36-30	0.0253	0.2311	قطر قوزه Capitulum diameter		
M14/E11-10	0.0104	0.2862	M3/E10-7	0.026	0.261
M59/E36-21	0.0036	0.3443	M3/E36-24	0.0232	0.2695
M14/E11-10	0.0297	0.2523	M59/E36-21	0.0227	0.2708
M4/E36-24	0.0269	0.2595	M3/E10-9	0.0227	0.2708
M59/E36-21	0.000701	0.481	M3/E10-20	0.0211	0.2764
			M4/E36-18	0.0172	0.291
			M3/E36-6	0.0162	0.2954

جدول ۶. نشانگرهای AFLP پیوسته با صفات زراعی مختلف در گلرنگ بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM)

Table 6. AFLP markers associated with different agronomic traits in safflower based on mixed linear model (MLM)

نشانگر Marker	مقدار P P-Value	ضریب تبیین نشانگر R ² Marker	نشانگر Marker	مقدار P P-Value	ضریب تبیین نشانگر R ² Marker
شاخص برداشت Harvest index			عملکرد دانه Grain yield (Kg ha ⁻¹)		
M59/E36-9	0.0201	0.1732	M14/E6-10	0.0232	0.164
M59/E36-12	0.0201	0.1732	M14/E11-16	0.0174	0.1768
M4/E36-17	0.0201	0.1732	M14/E11-13	0.0154	0.182
M3/E36-26	0.0152	0.1853	M3/E10-14	0.0154	0.1821
M3/E36-29	0.0152	0.1853	M4/E36-12	0.0049	0.2277
M3/E10-7	0.0097	0.2042	تعداد قوزه در بوته Number of capitula per plant		
تعداد دانه در قوزه Number of seeds per capitulum			M14/E11-19	0.0268	0.1732
M4/E36-8	0.0285	0.1632	M3/E10-12	0.0177	0.1935
M59/E36-21	0.0183	0.184	M3/E36-29	0.0175	0.1941
M3/E10-9	0.0183	0.184	M59/E36-22	0.0046	0.2529
M14/E11-14	0.0081	0.2197	M14/E11-10	0.0026	0.2756
M14/E11-13	0.0077	0.2219	وزن هزار دانه 1000-seed weight		
ارتفاع گیاه Plant height			M4/E36-19	0.017	0.2059
M4/E10-2	0.0289	0.1812	M4/E36-12	0.0096	0.2335
M59/E36-21	0.0252	0.1885	M14/E11-1	0.0093	0.2352
M3/E36-30	0.0204	0.1996	M4/E10-1	0.0092	0.2354
M4/E10-11	0.0082	0.2445	قطر قوزه Capitulum diameter		
M4/E36-24	0.0054	0.2638	M3/E36-24	0.0245	0.1513
روز تا ۵۰٪ گلدهی Day to 50% flowering			M3/E36-6	0.0191	0.1616
M14/E11-10	0.0138	0.1701	M3/E10-20	0.018	0.1641
M3/E36-30	0.012	0.1754	M4/E36-18	0.0173	0.1657
M59/E36-21	0.0046	0.2096	روز تا رسیدگی Day to maturity		
			M14/E11-10	0.0275	0.1638
			M59/E36-21	0.00079	0.302

منابع

- موسوی دراز محله مهسا؛ زین العابدینی مهرشاد؛ مردی محسن؛ مرعشی حسن؛ ملک زاده سعید؛ کاظمی مهربانو؛ رودبار شجاعی طه؛ زهراوی مهدی (۱۳۹۲) بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت ژرمپلاسم انار شیرین ایران با استفاده از نشانگرهای SSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۴ (۵)، ۱۳۸ - ۱۵۰.
- نقوی محمد رضا؛ قره یاضی بهزاد؛ حسینی سالکده قاسم (۱۳۸۷) نشانگرهای مولکولی. چاپ و انتشارات دانشگاه تهران، ۱۰۹ - ۱۲۱.

References

- Achleitner A, Tinker N, Zechner E, Buerstmayr H (2008) Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits. *Theor Appl Genet* 117, 1041-1053.
- Amini F, Saeidi G, Arzani A (2008) Study of genetic diversity in safflower genotypes using agro-morphological traits and RAPD markers. *Euphytica* 163, 21–30.
- Badfar-Chaleshtori S, Shiran B, Kohgard M et al. (2012) Assessment of genetic diversity and structure of imperial crown (*Fritillaria imperialis* L.) populations in the Zagros region of Iran using AFLP, ISSR and RAPD markers and implications for its conservation. *Biochem Syst Ecol* 42, 35- 48.
- Breseghele F, Sorrells ME (2006) Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Sci* 46, 1323–1330.
- Buckler ES, Thornsberry JM (2002) Plant molecular diversity and applications to genomics. *Curr Opin Plant Biol* 5, 107-111.
- Dadras AR, Sabouri H, Mohammadinejad Gh et al. (2014) Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. *Mol Biol Rep* 41, 3317-3329.
- Ebrahimi F, Majidi MM, Arzani A, Mohammadinejad Gh (2017) Association analysis of molecular markers with traits under drought stress in safflower. *Crop Pasture Sci* 68, 167-175.
- Esposito MA, Gatti I, Cravero VP et al. (2013) Combining abilities and heterotic groups in *Pisum sativum* L. *Aust J Crop Sci* 7, 1634-1641.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611- 2620.

- Gepts P (2006) Plant genetic resources conservation and utilization: The accomplishments and future of a societal insurance policy. *Crop Sci* 46, 2278-2292.
- Golkar P, Arzani A, Rezaei M (2011) Determining relationships among seed yield, yield components and morpho-phenological traits using multivariate analysis in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Ann Biol Res* 2, 162-169.
- Hussain MI, Lyra DA, Farooq M et al. (2016) Salt and drought stresses in safflower. *Agron Sustain Dev* 36, 1- 31.
- Janmohammadi M, Mohammadi N, Shekari F et al. (2017) The effects of silicon and titanium on safflower (*Carthamus tinctorius* L.) growth under moisture deficit condition. *Acta Agric Slovenica* 109, 443-455.
- Johnson RC, Kisha TJ, Evans MA (2007) Characterizing safflower germplasm with AFLP molecular markers. *Crop Sci* 47, 1728-1736.
- Kotcha A (1979) Inheritance and association of six traits in safflower. *Crop Sci* 19, 523-527.
- Kraakman ATW, Niks RE, Van Den Berg PMM et al. (2004) Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics* 168, 435-446.
- Kumar S, Ambreen H, Murali TV et al. (2015) Assessment of genetic diversity and population structure in a global reference collection of 531 accession of *Carthamus tinctorius* L. (safflower) using AFLP markers. *Plant Mol Biol* 33, 1299-1313.
- Lagudah ES, McFadden H, Singh RP et al. (2006) Molecular genetic characterisation of the Lr34/Yr18 slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor Appl Genet* 114, 21-30.
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3, 91-99.
- Mahasi MJL, Wachira FN, Pathak RS, Riungu TC (2009) Genetic polymorphism in exotic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using RAPD markers. *Plant Breed Crop Sci* 1, 8-12.
- Manifesto MM, Schlatter AS, Hopp HE et al. (2001) Quantitative evaluation of genetic diversity germplasm using molecular markers. *Crop Sci* 41, 682-690.
- Mousavi Derazmahalleh SM, Zeinalabedini M, Mardi M et al. (2014) The Survey of Genetic Diversity & Population Structure Analysis of Iranian Sweet Pomegranate (*Punica granatum* L.) Germplasm Using SSR Markers. *Agric Biotech* 4, 139-150 (in Persian).
- Naghavi MR, Gharehyazi B, Hoseini Salekdeh Gh (2008) Molecular markers. University of Tehran Press. UK, pp 109-121 (In Persian).
- Peakall R, Smouse P (2012) GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *J Bioinform* 1, 6- 8.
- Powell W, Morgante M, Andre C et al. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSRP (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breeding* 2, 225- 238.

- Ren N, Timko MP (2001) AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *J Genet* 44, 559-571.
- Rostok N, Ramsay L, MacKenzie K et al. (2006) Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18656-18661.
- Shahbazi E, Saeidi G (2007) Genetic analysis for yield components and other agronomic characters in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Genet Breed* 36, 11- 20.
- Shannon CE (1948) The mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech* 27, 379- 423.
- Shi J, Li R, Qiu D, Jiang C et al. (2009) Unraveling the complex trait of crop yield with quantitative trait loci mapping in *Brassica napus*. *J Genet* 182, 851-861.
- Subudhi PK, Rosenow DT, Nguyen HT (2000) Quantitative trait loci for the stay green trait in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): consistency across genetic backgrounds and environments. *Theor Appl Genet* 101, 733- 741.
- Vanniarajan C, Vinod KK, Pereira A (2012) Molecular evaluation of genetic diversity and association studies in rice (*Oryza sativa* L.). *J Genet* 91, 1-11.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23, 4407- 4414.
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G (2005) Applications of DNA fingerprinting in plant sciences. In 'DNA fingerprinting in plants. Principles, methods and applications'. Weising K, Nybom H, Pfenninger M, Wolff K, Kahl G (eds). pp. 235- 276.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH et al. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38, 203- 208.
- Zhang Y, Uyemoto Jk, Kirkpatrick BC (1998) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J Virol Methods* 71, 45-50.
- Zhang Q, Wu C, Ren F et al. (2012) Association analysis of important traits of agronomical maize inbred lines with SSRs. *Crop Sci* 6, 1131- 1138.
- Zhao W, Wang Y, Chen T et al. (2007) Genetic structure of mulberry from different ecotypes revealed by ISSRs in china: An implications for conservation of local mulberry varieties. *Sci Hortic* 115, 47-55.