استفاده از رگرسیون گام به گام برای شناسایی نشانگرهای مولکولی ISSR مرتبط با صفات زراعی در اکوتیپ‌های اسفرزه

مهدی رحیمی

دریافت: ۱۳۹۶/۳/۷/ ویرایش: ۱۳۹۷/۱/۱۲/ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۴/ انتشار: ۱۳۹۷/۶/۲۹

گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکدهٔ علوم‌محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم‌محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
پست الکترونیکی نویسنده: me.rahimi@kgut.ac.ir

چکیده. در این مطالعه، ارتباط بین نشانگرهای ISSR با برخی از صفات زراعی در ۲۲ توده اسفرزه با استفاده از تجزیه و تحلیل رگرسیون گام‌به‌گام انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج رگرسیونی، ارتباط معنی‌داری بین صفات و برخی از جایگاه‌های نشانگر تحت مطالعه نشان داد. برای بعضی صفات بیش از یک نشانگر آگاهی بخش تشخیص داده شد. در مجموع ۹۰ نشانگر آگاهی بخش ISSR مشخص شد که با توجه به ارتباط بعضی از نشانگرها در کنترل چندین صفت، در نهایت ۴۸ نشانگر ارتباط معنی‌داری با صفات نشان دادند. نشانگرهای UBC816-2، UBC826-2 و UBC826-3 با عمل کرد همبستگی معنی‌داری نشان دادند و ۵۳/۵ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند. در میان آغازگرهای ISSR، توجه ویژه‌ای باید به آغازگر UBC811 و همچنین نشانگر UBC813-11 شود چرا که بیشترین ارتباط بین این آغازگر و این قطعه با صفات تحت مطالعه بود. برخی از این نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط داشتند که نشان‌دهندهٔ پیوستگی نزدیک این صفات یا کنترل این صفات توسط اثرات پلیوتروپی است. این آغازگرها برای بهبود و اصلاح اسفرزه مفید هستند.

واژه‌های کلیدی. ارتباط، بارهنگیان، تنوع فنوتیپی، عمل کرد دانه، نشانگر آگاهی‌بخش

Using stepwise regression to identify ISSR molecular markers associated with agronomic traits in ispaghula (*Plantago ovata* Forssk.) ecotypes

Mehdi Rahimi

Received 28.05.2017/ Revised 01.04.2018/ Accepted 24.04.2018/ Published 20.09.2018

Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
Email: me.rahimi@kgut.ac.ir

Abstract. In this study, the associations between ISSR markers with some agronomic traits in 22 Ispaghula ecotypes were assessed using stepwise regression analysis. The results of stepwise regression analysis showed a significant association between traits and some of loci marker positions. More than one informative marker was detected for some traits. Totally 90 informative ISSR markers were distinguished. Ultimately 48 markers were revealed to be significantly associated with traits due to the association of some markers in the control of several traits. The UBC816-2, UBC826-2 and UBC826-3 markers showed a significant correlation with grain yield and controlled 53.5% of the phenotypic variation. Among the ISSR primers, special attention should be paid to the UBC811 primer as well as the UBC813-11 marker, since the closest relationship was found to be between the primer and this segment with the traits studied. Some of these markers were associated with more than one trait. This shows the close linkage among these traits or possibly the control of these traits by pleiotropic effects. These primers have been found to be useful for the improvement of Ispaghula.

Keywords. association, grain yield, informative markers, phenotypic diversity, Plantaginaceae

مقدمه

کشور ایران با موقعیت خاص آب و هوایی، بیش از ۷۵۰۰ گونهٔ گیاهی را در خود جای داده است که ۳-۲ برابر پوشش گیاهی تمامی قارهٔ اروپاست و احتمالاً بیش از ۷۵۰ گونهٔ دارویی در پوشش گیاهی ایران وجود داشته باشد (Kurian & Sankar, 2007; Sharafzadeh & Alizadeh, 2012). اسفرزه از سرده *Plantago* L. و متعلق به تیرهٔ بارهنگیان Plantaginaceae حدود ۲۵۰ گونه دارد. این سرده پراکنش جهانی دارد اما منشاء اولیهٔ آن هند و پاکستان است (Kurian & Sankar, 2007; Singh, 2011). یکی از گونه‌های مهم اسفرزه با اسم علمی *Plantago ovata* Forssk. است که گیاهی یک‌ساله و پوشیده از کرک‌های کم و بسیار نرم است. ساقه گیاه کوتاه و غالبا خمیده است. برگ‌ها کامل خطی باریک یا سرنیزه‌ای هستند. اسامی رایج این گیاه شامل Blond psyllium، Indian wheat، Spogel و Ispaghula است (Khan & Abourashed, 2011). این گونه در ایران در نواحی شمال (قزوین، منجیل، رودبار، فیروزکوه)، غرب (همدان، مهران)، جنوب (بندرعباس، میمه، بین بوشهر و شیراز، کرمان) و شرق (خراسان) گسترش دارد (Karimzadeh & Omidbaigi, 2004). بخش مورد استفاده این گیاه دانه‌های رسیده آن است. پوستهٔ سطحی این دانه‌های قهوه‌ای تا صورتی رنگ که Husk نام دارد دارای بیش از ٪۴۰ موسیلاژ است. همچنین دانه‌ها دارای روغن ثابت، پروتئین و مقدار کمی ایریدوئید از جمله آکوبین هستند. موسیلاژها به‌علت دارابودن ویژگی‌های با ارزش مانند پایدارکنندگی، سوسپانسیون‌کنندگی و امولسیون‌کنندگی در صنعت و داروسازی کاربردهای گسترده‌ای دارند. همچنین در ترکیبات غذایی نیز کاربرد داشته و به عنوان تغلیظ‌کننده و تثبیت‌کننده دسرها به کار می‌روند. علاوه بر آن در تهیه فراورده-های آرایشی و محلول‌های پوستی، در صنایع رنگ‌آمیزی پارچه، کاغذسازی، تهیه مرکب چاپ، تهیه واکس و صنایع نظامی (تهیه مواد منفجره ضدآب) نیز استفاده زیادی دارند (Naghdi Badi *et al.*, 2004).

ازآنجایی که هدف اساسی ژنتیک، مرتبط ساختن ژنوتیپ به فنوتیپ است، مکان‌یابی ارتباطی در جستجوی شناسایی متغیرهای کاربردی خاص (یعنی مکان‌های ژنی، آلل‌ها) مرتبط با اختلافات فنوتیپی در یک صفت بوده تا با یافتن چند شکلی‌های توالی DNA برای صفت، انتخاب و اصلاح گیاه را تسهیل نماید (Oraguzie & Wilcox, 2007). در ۲۰ سال گذشته تلاش اصلی در اصلاح گیاهان تغییر از روش سنتی انتخاب شجره‌ای براساس فنوتیپ به انتخاب براساس نشانگرهای ژنتیکی با تأکید بر شناسایی صفات کمی (QTL) و انتخاب براساس نشانگر (MAS) است. مطالعات موفقیت‌آمیز زیادی روی گیاهان زراعی و در جمعیت‌های مختلف (F1, F2, BIL, RIL, NIL) بر این اساس گزارش شده است (Collard & Mackill, 2008; Hormaza *et al.*, 1998). در دسترس بودن تعداد بسیار زیادی از نشانگرها و صفات مورفولوژیکی می‌تواند به مطالعهٔ تجزیهٔ رگرسیونی بین این نشانگرها و صفات مورفولوژیکی کمک کند. برای غلبه بر این محدودیت‌ها، شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت ازطریق رگرسیون مناسب به‌نظر می‌رسد. تحلیل رگرسیونی چندمتغیره (Multiple regression analysis, MRA) بر پایه رابطه بین نشانگرهای مولکولی (به‌عنوان متغیر مستقل) و صفات ریخت‌شناسی (به‌عنوان متغیر وابسته) روش مناسبی برای شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت است. این تحلیل ضریب تبیین (R^2) را تعیین می‌کند که این ضریب میزان رابطهٔ صفت ریخت‌شناسی را با نشانگر مولکولی نشان می‌دهد (Gomez & Gomez, 1984; Ruan, 2010).

استفاده از نشانگرهای مولکولی در تعیین نشانگرهای وابسته به صفت در برخی از گیاهان استفاده شده است و نتایج خوبی گزارش شده است. به‌عنوان مثال رابطهٔ بین داده‌های حاصل از تکنیک‌های مولکولی مختلف با صفات بیوشیمیایی در برخی گونه‌های سردهٔ *Morus* L. (Kar *et al.*, 2008)، مارتیغال (Shokrpour *et al.*, 2008) و گونهٔ *Valeriana jata-mansi* Jones (Jugran *et al.*, 2013) بررسی شده است. همچنین رابطهٔ این نشانگرها با صفات ریخت‌شناسی در گونه‌هایی مانند فندق (Mohammadzedeh *et al.*, 2014)، خرما (Marsafari *et al.*, 2014)، انگور (Dolati Baneh *et al.*, 2014)، انار (Bas-aki *et al.*, 2011) و گیلاس (Ganopoulos *et al.*, 2011) بررسی شده‌است. در مطالعه‌ای در انار ۲۳ باند به‌دست‌آمده از نشاگرهای ریزماهواره با پنج صفت مورفولوژیکی تحت ارزیابی رگرسیونی قرار گرفت. با هر صفت چند نشانگر همبستگی نشان دادند که نشانگر دارای بالاترین R^2 به‌مثابهٔ مؤثرترین نشانگر برای آن صفت در نظر گرفته شد. R^2 در واقع میزان همراهی هر نشانگر با صفت را نشان می‌دهد. همه صفات ارزیابی‌شده در این تحقیق با آلل‌های مربوط به نشانگر MPO26

ارتباط معنی‌داری نشان دادند (Basaki *et al.*, 2011).

از آنجایی که هنوز در مورد اصلاح این گیاه کار زیادی نشده است و این گیاه از گیاهان دارویی و مهم است، بنابراین، بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم در این گیاه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است تا بتوان در اصلاح این گیاه گام مؤثری برداشت. در این مطالعه ارتباط نشانگرهای ISSR با صفات زراعی در توده‌های مختلف اسفرزه گونهٔ *Plantago ovata* بررسی شده تا در نهایت با انتخاب نشانگرهای مناسب در جهت اصلاح اسفرزه گامی مؤثر برداشت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، تعداد ۲۲ اکوتیپ اسفرزه گونهٔ *Plantago ovata* که از بخش ذخایر توارث گیاهی ملی ایران تهیه شده بود (جدول ۱) در قالب طرح بلوک‌های کاملا تصادفی با سه تکرار در مزرعه کشت شدند. بذرهای ۲۲ اکوتیپ اسفرزه به‌طور مستقیم و با توزیع تصادفی کشت شدند. هر واحد آزمایش متشکل از ۳ خط ۲ متری با فاصله خطوط ۵۰ سانتی‌متر و فاصله بین بوته‌ای ۲۵ سانتی‌متر بود. پس از کاشت اسفرزه تا زمان سبز شدن بذرهای، هر سه روز یک‌بار و پس از ین مرحله هر هفت روز یکبار آبیاری به روش غرقابی انجام گرفت. تمامی صفات تحت ارزیابی در ۵ بوته از هر واحد آزمایشی اندازه‌گیری شدند و عبارت‌اند از: تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی، تعداد روز تا رسیدگی کامل، ارتفاع بوته، تعداد سنبله، طول سنبله، تعداد دانه در سنبله، وزن سنبله، وزن هزار دانه و عمل‌کرد دانه. آمار توصیفی صفات با نرم‌افزار SPSS انجام شد. استخراج DNA از نمونه‌های برگ جوان اکوتیپ‌های مختلف اسفرزه با استفاده از روش CTAB مورای و تامپسون (Murray & Thompson, 1980) با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۰/۶درصد استفاده شد. دراین آزمایش از ۱۲ آغازگر ISSR (جدول ۳) که در گیاهان دیگر تعداد نوار بیشتری داده بودند (Bahari *et al.*, 2015; Mohsen-Zade *et al.*, 2012; ShazdehAhmadi & Kharrazi, 2016) برای تکثیر انتخاب و استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای آغازگرهای ISSR در حجم ۱۰ میکرولیتر با اجزای ۲ میکرولیتر DNA الگو ۵۰ نانوگرم، ۱/۲ میکرولیتر از هر آغازگر (۵ µM)، ۰/۶ میکرولیتر مخلوط dNTP، ۰/۴۸ میکرولیتر کلریدمنیزیم، ۱ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۱۴ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5U/µl) و ۴/۵۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده انجام شد. چرخهٔ حرارتی شامل ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴°C، سپس ۳۵ سیکل انجام شد که هر سیکل به این صورت بود که واسرشته‌سازی در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد سپس مرحله اتصال آغازگر در دمای TM (بسته به آغازگر متفاوت بود) به‌مدت ۳۰ ثانیه بود و در نهایت مرحلهٔ بسط در دمای ۷۲°C به‌مدت ۲ دقیقه انجام شد و در نهایت بعد از ۳۵ سیکل ۵ دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲°C انجام شد و سپس در دمای ۴°C نگهداری شد. محصولات PCR هر آغازگر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با توان ۷۵W برای مدت ۶۵ دقیقه توسط الکتروفورز بارگذاری شدند و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید، ژل مذبور دو یا سه مرتبه با آب معمولی شست‌وشو داده شد. سپس ژل به دستگاه (Photo-Print (Vilber Lourmat IP-008-SD منتقل شد. پس از مشاهده باندها در زیر نور UV از ژل عکس‌برداری شد. الگوهای نواربندی حاصل به‌صورت وجود یا عدم وجود نوار امتیازدهی شدند. همچنین برای هر الل نشانگر در اکوتیپ‌های تحت‌مطالعه به صورت ۱، ۲، ۳ و غیره نام‌گذاری و برای برآورد فراوانی آللی و پارامترهای ژنتیکی هر جایگاه استفاده شدند. تجزیه و تحلیل ارتباط بین داده‌های مولکولی (به‌عنوان متغیرهای مستقل) و داده‌های کمی (به‌عنوان متغیر وابسته) با استفاده از رگرسیون چندگانه انجام شد تا نشانگرهای مؤثر مرتبط با صفات زراعی شناسایی شوند. رگرسیون چندگانه با استفاده از روش چند مرحله‌ای و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد (SPSS-Inc, 2013). تجزیه بر پایهٔ مدل چندگانه، که تغییرات در متغیر وابسته (Y میانگین ژنوتیپ برای یک صفت کمی) به یک تابع خطی از مجموعه‌ای از متغیرهای مستقل mj که نشان‌دهنده‌ی نشانگرهای RAPD بود (Virk *et al.*, 1996) انجام شد که در آن bj نشان‌دهندهٔ ضرایب جزیی رگرسیون است که روابط آزمایشی مشخص بین Y و mj را نشان می‌دهد. همچنین d نشان‌دهندهٔ خطای بین اکوتیپ‌ها بعد از رگرسیون و e خطای تصادفی Y است که شامل تنوع محیطی نیز می‌شود (Virk *et al.*, 1996). برای انتخاب متغیرهای مستقل برای تابع رگرسیون، از F با احتمال ۰/۰۴۵ و ۰/۰۹۹ به‌ترتیب برای وارد کردن و خارج کردن متغیرها استفاده شد.

نتایج

بررسی ضرایب تغییرات فنوتیپی صفات (جدول ۲) نشان داد که

جدول ۱- اسامی و مناطق جمع‌آوری اکوتیپ‌های مختلف *Plantago ovata*.

Table 1. Different collected *Plantago ovata* ecotypes.

ردیف No.	استان State	منطقه Region	ارتفاع Height	شماره در بانک ژن Number gene bank	ردیف No.	استان State	منطقه Region	ارتفاع Height	شماره در بانک ژن Number gene bank
1	ایلام	دهلران	150	3328	12	لرستان	بروجرد	1550	14559
2	ایلام		780	10752	13	لرستان	خرم آباد	1147	14810
3	ایلام	ایلام	1387	14617	14	یزد	شاهدیه	1220	15482
4	گلستان	مینودشت	400	4273	15	یزد	طبس	730	33930
5	گلستان	کلاله	410	12860	16	یزد	شاهدیه	1210	37249
6	گلستان	اینچه برون	900	13794	17	مرکزی		1895	13561
7	گلستان	آق قلا	8	13924	18	مرکزی	اراک	1708	14628
8	گلستان	گنبد	15	19932	19	خوزستان	بهبان	361	35665
9	هرمزگان	حاجی آباد	1100	31488	20	اصفهان	فریدون شهر	2530	11223
10	هرمزگان	بندرعباس	1300	31563	21	فارس	شیراز	1519	12298
11	هرمزگان	میناب	50	22867	22	همدان		1400	12614

صفت وزن خشک و به دنبال آن درصد اسانس بالاترین ضریب تغییرات فنوتیپی را دارا بود. همچنین کمترین ضریب تغییرات فنوتیپی مربوط به صفات روز تا گلدهی و وزن تر بود. در این پژوهش استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR، در مجموع ۱۲۹ باند را نتیجه داد که از بین آنها ۹۱ باند چندشکل بودند و میانگین مکان‌های چندشکل به ازای هر آغازگر معادل ۷/۵۸ به‌دست آمده است (جدول ۳). از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر UBC814 با تعداد ۱۴ باند و بعد از آن، آغازگرهای UBC811، UBC813 و UBC817 با تعداد ۱۳ باند بیشترین تعداد باند و آغازگرهای UBC824 و UBC876 با تعداد ۷ باند کمترین تعداد را داشتند (جدول ۳). همچنین تعداد ۱۱ باند چندشکل برای آغازگر UBC813 و ۱۰ باند چندشکل برای آغازگر UBC811 مشاهده شد. کمترین تعداد باند برای آغازگر UBC824 با ۴ باند مشاهده شد. درصد چندشکلی به‌دست‌آمده در اکوتیپ‌ها از ۵۷/۱۴ درصد برای UBC824 تا ۸۴/۶۲ درصد برای UBC813 متغییر بود. درصد چندشکلی به‌دست‌آمده در این تحقیق ۶۹/۹۱ درصد، تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌ها را توجیه می‌کند (جدول ۳). محتوای اطلاعات چندشکل، به تفکیک برای هر یک از آغازگرهای تحت مطالعه محاسبه و نتایج مربوطه در جدول ۳ ارائه شد. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) در این تحقیق بین ۰/۲۶ تا ۰/۴۵ و میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۳۷ بود (جدول ۳). بالاترین میزان PIC در آغازگر UBC813 به‌میزان ۰/۴۵ و بعد از آن UBC876 به میزان ۰/۴۲ تعیین شد که نشان دهندهٔ کارایی بالای این آغازگرها در تمایز اکوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق است. به‌منظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) محاسبه شد. بیشترین میزان (EMR) برای آغازگر UBC811 (۸/۲۳) و کمترین میزان برای آغازگر UBC824 (۲/۳۱) بود (جدول ۳). میزان MI بین ۰/۹ تا ۴/۱۳ متغیر بود. آغازگرهای UBC813، UBC811، UBC815 و UBC823 به‌ترتیب با ۴/۱۳، ۲/۶۷، ۲/۶۲ و ۲/۲۱ واحد دارای بیشترین شاخص نشانگری (MI) بودند که کارایی بالا این آغازگرها را در بروز چندشکلی نشان می‌دهد (جدول ۳). تعداد آلل‌های مؤثر در بین نشانگرهای مطالعه شده متفاوت بود. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر در کل جمعیت ۱/۵۹ بهدست آمد و ۱/۳۸ تا ۱/۷۷ متغیر بود (جدول ۳). بیشترین تعداد آلل مؤثر به ترتیب مربوط به آغازگرهای UBC813، UBC876، UBC815 و UBC824 در بین کل اکوتیپ‌ها بود (جدول ۳). برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی از ۰/۴۵ تا ۰/۶۲ متغیر بود (جدول ۳) و آغازگرهای UBC813، UBC876، UBC824، UBC815 و UBC825 به ترتیب بیشترین تنوع ژنی را نشان دادند. آغازگر UBC814کمترین میزان تنوع ژنی را نشان داد. میانگین تنوع ژنی در جمعیت تحت مطالعه ۰/۵۳ بود. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل رگرسیون گام به گام نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین صفات و برخی از جایگاه تحت مطالعه وجود دارد (جدول ۴). در این مطالعه، از تجزیه و

جدول ۲- آمار توصیفی صفات تحت‌مطالعه در اکوتیپ‌های *Plantago ovata*.

Table 2. Descriptive statistics of studied traits in *Plantago ovata* ecotypes.

آماره های توصیفی Descriptive statistics	صفات- Traits								
	تعداد روز تا ۵۰درصد گلدهی Days to 50% flowering	تعداد روز تا رسیدگی کامل Days to maturity	ارتفاع بوته Plant height	تعداد سنبله Number of spikes	طول سنبله Spikes length	تعداد دانه در سنبله Number of grains per spike	وزن سنبله Spike weight	وزن هزار دانه 1000-Grain weight	عمل‌کرد دانه Grain yield
میانگین Average	68.44	95.23	19.66	4.52	2.30	85.87	75.50	1.64	388.45
خطای میانگین Std. Error of Av.	1.20	1.00	0.59	0.07	0.06	1.42	0.99	0.07	13.75
انحراف معیار Std. Deviation	5.63	4.71	2.78	0.31	0.30	6.64	4.67	0.32	64.48
واریانس Variance	31.67	22.22	7.71	0.09	0.09	44.16	21.78	0.10	4158.24
دامنه Range	21.00	15.66	8.90	1.08	1.08	22.10	17.94	1.08	256.45
مینیمم Minimum	59.33	88.67	15.77	4.06	1.84	74.48	65.47	1.21	295.97
ماگزیمم Maximum	80.33	104.33	24.67	5.14	2.92	96.58	83.41	2.29	552.42
ضریب تغیرات فنوتیپی (درصد) Phenotypic CV (%)	8.22	4.95	14.12	6.77	13.01	7.74	6.18	19.56	16.60

جدول ۳- خصوصیات نشانگرهای ISSR مورد استفاده در این مطالعه.

Table 3. ISSR markers characteristics used in this study.

ردیف No.	آغازگرها Primers	تعداد کل باند Total bands	تعداد باند چندشکل No. of Polymorphic bands	درصد چندشکلی درصد Polymorphism	محتوای اطلاعات چندشکل PIC	نسبت چندگانه مؤثر EMR	شاخص نشانگری Marker index	تعداد آلل مؤثر No. of effective allel	تنوع ژنی نی Nei	شاخص شانون Shannon
1	UBC811	13	10	76.92	0.37	8.23	2.67	1.55	0.51	0.39
2	UBC812	11	8	72.73	0.31	5.94	1.69	1.43	0.49	0.32
3	UBC813	13	11	84.62	0.45	9.86	4.13	1.77	0.62	0.43
4	UBC814	14	9	64.29	0.26	5.92	1.62	1.38	0.45	0.17
5	UBC815	10	8	80	0.40	6.35	2.62	1.69	0.55	0.28
6	UBC816	11	7	63.64	0.33	4.52	1.50	1.50	0.52	0.34
7	UBC817	13	9	69.23	0.32	6.33	1.91	1.44	0.47	0.27
8	UBC823	11	8	72.73	0.38	5.71	2.21	1.62	0.54	0.31
9	UBC824	7	4	57.14	0.41	2.31	0.90	1.69	0.57	0.36
10	UBC825	8	5	62.50	0.38	3.18	1.19	1.63	0.55	0.37
11	UBC826	11	7	63.64	0.38	4.39	1.78	1.64	0.55	0.30
12	UBC876	7	5	71.43	0.42	3.58	1.51	1.72	0.58	0.31
میانگین Average		10.75	7.58	69.91	0.37	5.53	1.98	1.59	0.53	0.32

تحلیل رگرسیون گام به گام برای تخمین ارتباط بین نشانگرهای ISSR با برخی از صفات زراعی در ۲۲ توده اسفرزه استفاده شد. تجزیه و تحلیل نتایج ارتباط معنی‌داری بین صفات و برخی از جایگاه‌های تحت مطالعه نشان داد. برای بعضی صفات بیش از یک نشانگر آگاهی بخش تشخیص داده شد. در مجموع ۶۸ نشانگر آگاهی بخش برای جایگاه ISSR مشخص شد که در نهایت با توجه به اینکه بعضی جایگاه‌ها بیشتر از یک صفت را کنترل می‌کردند، ۴۸ جایگاه صفات تحت مطالعه را کنترل می‌کردند. همچنین بعد از

جدول ٤- تجزیهٔ رگرسیون گام به گام برای صفات (متغیر وابسته) و نشانگرهای ISSR (متغیر مستقل) در اکوتیپ‌های *Plantago ovata*.

Table 4. Stepwise regression analysis of traits (dependent variable) and ISSR markers (independent variables) in *Plantago ovata* ecotypes.

صفات Traits	تعداد نشانگر آگاهی‌بخش No. of Informative marker	نشانگرهای آگاهی‌بخش Informative marker	R^2 adjusted (%)	مهمترین نشانگر The most important marker	B استاندارد شده Standard B
تعداد روز تا ۵۰درصد گلدهی Days to 50% flowering	12	UBC825-2, UBC813-3, UBC815-6, UBC826-7, UBC811-6, UBC811-2, UBC823-7, UBC811-9, UBC813-11, UBC812-5, UBC817-1, UBC824-4	0.992	UBC813-3	-0.689
تعداد روز تا رسیدگی کامل Days to maturity	2	UBC823-1, UBC813-9	0.479	UBC823-1	0.546
ارتفاع بوته Plant height	5	UBC813-4, UBC812-5, UBC813-11, UBC815-8, UBC814-7	0.756	UBC812-5	0.511
تعداد سنبله Number of spikes	13	UBC811-3, UBC813-11, UBC812-4, UBC814-4, UBC814-7, UBC814-9, UBC876-2, UBC825-3, UBC826-3, UBC812-1, UBC814-2, UBC812-5, UBC814-1	0.999	UBC811-3	-0.875
طول سنبله Spikes length	16	UBC811-3, UBC813-11, UBC812-4, UBC814-4, UBC814-7, UBC814-9, UBC876-4, UBC825-3, UBC826-4, UBC826-5, UBC825-4, UBC811-2, UBC811-5, UBC823-1, UBC814-6, UBC815-1	0.999		-0.851
تعداد دانه در سنبله Number of grains per spike	4	UBC816-7, UBC812-8, UBC815-5, UBC813-8	0.730	UBC812-8	-0.633
وزن سنبله Spike weight	10	UBC813-6, UBC826-1, UBC876-5, UBC826-5, UBC824-4, UBC816-7, UBC876-1, UBC815-6, UBC815-3, UBC817-1	0.977	UBC876-1	-0.957
وزن هزار دانه 1000-Grain weight	3	UBC811-3, UBC816-3, UBC813-11	0.647	UBC811-3	-0.644
عمل‌کرد دانه Grain yield	3	UBC816-2, UBC826-2, UBC826-3	0.535	UBC826-2	1.125

اینکه نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات با مدل رگرسیونی گام به گام شناسایی شد. دوباره برای هرکدام از آن نشانگر با صفت مربوطه یک رگرسیون ساده یک متغیره بین نشانگر به عنوان متغیر مستقل و صفت به‌عنوان متغیر وابسته گرفته شد که نشانگرها دوباره ارتباط معنی‌داری را برای هر صفت نشان دادند و و نشانگرهایی که در هر دو مدل رگرسیونی ساده و چندمتغییره معنی‌دار بودند به عنوان نشانگر آگاهی‌بخش معرفی شدند (نتایج رگرسیون ساده برای هر نشانگرنشان داده نشد).

بحث

اولین قدم برای شروع هر برنامه به‌نژادی، آگاهی از میزان و وضعیت تنوع گیاه مورد نظر است و این تنوع ممکن است طبیعی یا مصنوعی باشد. در برخی از صفات تنوع زیاد و در بعضی صفات تنوع کمی وجود دارد. مسلما هر چه تنوع موجود در صفات بیشتر باشد انتخاب در آنها به پاسخ به گزینش بهتری خواهد منجر شد و با توجه به ضریب تغییرات فنوتیپی (تنوع فنوتیپی) بالای بعضی صفات، می‌توان از این صفات در به نژادی استفاده نمود و گزینش‌های مؤثری در بین ارقام تحت مطالعه جهت بهبود و اصلاح این صفات انجام داد. همچنین ضریب تغییرات فنوتیپی کم برای بعضی صفات دیگر نشان می‌دهد که اصلاح این صفات نسبت به صفات با ضریب تغیرات فنوتیپی بالا از طریق گزینش در جمعیت تحت مطالعه با موفقیت کمتری همراه خواهد بود. با توجه به مقادیر ضریب تغییرات فنوتیپی بین صفات مشاهده می‌شود که تنوع مطلوبی در بین صفات برای اکثر آنها وجود دارد و لازم است نسبت به گسترش ژرم پلاسم و تنوع ژنتیکی آنها اقدام شود. از آنجایی که یکی از معیارهای مهم در انتخاب آغازگرهای مناسب و سودمند، تعداد آلل‌های مؤثر است،

می‌توان از این آغازگرها برای مطالعات بعدی به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های اسفرزه استفاده کرد. یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ارقام و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی (Nei's gene diversity index) است. ضریب شانون مبین میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها است (Shannon, 2001). در این تحقیق میانگین ضریب شانون ۰/۳۲ بود که نشان‌دهندهٔ تنوع متوسط در اکوتیپ‌های تحت بررسی است. آغازگرهای UBC813، UBC811، UBC825 و UBC824 دارای بیشترین شاخص شانون بودند، این نشان می‌دهد که آغازگرهای تحت اشاره می‌تواند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کند و آغازگر UBC814دارای کمترین شاخص شانون است (جدول ۳). در مطالعه Vahabi و همکاران (2008) نیز ۳۵ آغازگر تصادفی RAPD، 142 باند پلی‌مورفیک تولید کردند که به‌طور متوسط ۴/۰۵ باند برای هر اغازگر بود. همچنین در مطالعات دیگری نیز میانگین درصد چندشکلی نشانگرها ۶۵/۵درصد به‌دست آمد (Rohilla *et al.*, 2012).

نشانگرهای UBC816-2، UBC826-2 و UBC826-3 با عمل‌کرد همبستگی معنی داری نشان دادند و ۵۳/۵ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند. همچنین نشانگر UBC813-11 با صفات تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی، ارتفاع بوته، تعداد سنبله، طول سنبله و وزن هزار دانه ارتباط داشت، بنابراین، می‌توان از این نشانگر در به نژادی اسفرزه و بهبود این صفات استفاده نمود. در تحقیقات Mohammadzedeh و همکاران (2014) که ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مهم میوه در فندق را بررسی کردند، نشان داده شد که درصد مغز با ۱۳ نشانگر ارتباط داشته و ۹۵ درصد تغیرات آن توسط این نشانگرها توجیه شد. AghAali و همکاران (2016) نیز در بررسی خود روی کرچک با استفاده از صفات ریخت‌شناسانه و نشانگرهای مولکولی ISSR نشان دادند که ۲۷ نشانگر با ۱۷ صفت ریخت شناسانه ارتباط داشته و مقدار R^2 در محدوده ۱۲/۴ (UBC857-5) تا ۲۸/۱ درصد (UBC844-2) متغییر بود. تمامی نشانگرهای که در این جدول با صفات ارتباط معنی‌دار نشان دادند از PIC نسبتا بالایی برخوردار هستند. از مزایای مهم روش تجزیهٔ ارتباطی این است که در این روش نیازی به تهیه جمعیت در حال تفرق که نیاز به زمان زیادی دارد نیست، اگر چه بهتر است از داده‌های فنوتیپی چندساله استفاده شود. از طرف دیگر کراسینگ اورهایی که در حین تهیه جمعیت‌های در حال تفرق صورت می‌گیرد، محدود است که این امکان مکان‌یابی دقیق را فراهم نمی‌سازد (Breseghello & Sorrells, 2006). همچنین کارایی این روش برای شناسایی و مکان یابی ژن‌های کنترل‌کنندهٔ صفات مندلی نیز نشان داده شده است (Breseghello & Sorrells, 2006). با توجه به اینکه اکثر مکان‌های تحت مطالعه بر صفات تحت مطالعه مؤثر بودند بنابراین، احتمال دارد بتوان از این مکان‌های ریزماهواره در برنامه‌های اصلاحی برای شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و تهیهٔ ارقام هیبرید استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

ذخایر ژنتیک گیاهی به عنوان گنجینه‌های گران‌بها در دست بشر و در خدمت نیازهای او است. برخی از این ذخایر به صورت طبیعی و وحشی وجود داشته و برخی با دستکاری انسان طی هزاران سال شکل گرفته‌اند. اطلاعاتی که انسان در خصوص کاربردها و مصارف گیاهان، نحوه یا مکان و زمان جمع‌آوری آنها و یا روش‌های کشت و تولید زراعی آنها طی قرن‌ها در مناطق مختلف جهان کسب کرده نیز گنجینه‌های پرارزشی را به وجود آورده است. پایش تنوع ژنتیکی و حفاظت از این ذخایر ژنتیکی بوسیله بانک‌های ژن انجام می‌گیرد. تنوع مبنای همه گزینش‌ها بوده و انتخاب ژنوتیپی نیز نیازمند تنوع است. بدیهی است که با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه حدود انتخاب نیز وسیع‌تر می‌شود. انتخاب براساس نشانگرهای مولکولی یک روش سریع در برنامه اصلاحی بوده و اطلاعات ژنتیکی به‌دست‌آمده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. نتایج این بررسی حاکی از وجود تنوع بالا در بین جمعیت‌های تحت بررسی اسفرزه است. با توجه به اینکه اکوتیپ‌های اسفرزه از مناطق مختلف جغرافیایی هستند و ترکیبات اسانس آنها متفاوت است، وجود تنوع ژنتیکی تأییدکنندهٔ این مطلب است که اختلافات فیتوشیمیایی اکوتیپ‌ها تنها به واسطه اثر محیطی نیست، بلکه توسط عوامل ژنتیکی هم کنترل می‌شوند. بنابراین، شناسایی قطعات آگاهی‌بخش برای اصلاح گیاهان ضروری است. قطعات آگاهی‌بخش می‌توانند با موفقیت شناسایی، کلون و تعیین توالی شوند و برای انتخاب به کمک نشانگر (MAS) در برنامه‌های به‌نژادی اسفرزه مورد استفاده قرار گیرند. در برنامه‌های اصلاحی، تلاقی بین افرادی که فاصله ژنتیکی زیادی دارند شانس به‌وجود آمدن نتاج خارج از رنج والدینی را افزایش می‌دهند. بنابراین، از این

نشانگرها می‌توان برای شناسایی این والدین استفاده نمود. قطعه UBC813-11 برای آغازگر ISSR بالاترین ارتباط با صفات را نشان دادند. بنابراین، این نشانگرها می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی و تجزیهٔ ارتباط در مطالعات اصلاحی اسفرزه گونهٔ *Plantago ovata* مورد استفاده قرار بگیرند و از آنها در انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم‌محیطی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان برای تأمین مالی و امکانات آزمایشی قدردانی می‌شود.

RFERENCES

AghAali, Z., Darvishzadeh, R. and Goodarzi, F. 2016. Association analysis of morphological traits in castor (*Ricinus communis* L.) by using ISSR markers. –Iran. J. Rang. For. Pl. Breed. Gen. Res. 24: 79-91.

Bahari, Z., Shojaeiyan, A., Rashidi Monfared, S., Mirshekari, A., Nasiri, K. and Amiriyan, M. 2015. Investigation of genetic diversity among some Iranian dill (*Anethum graveolens* L.) landraces, using ISSR markers. – J. Pl. Gen. Res. 2: 11-22.

Basaki, T., Choukan, R., Khayam-Nekouei, S., Mardi, M., Majidi, E., Faraji, S. and Zeinolabedini, M. 2011. Association analysis for morphological traits in pomegranate (*Punica geranatum* L.) using microsatellite markers. – Mid. East J. Sci. Res. 9: 410-417.

Breseghello, F. and Sorrells, M.E. 2006. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. – Crop Sci. 46: 1323-1330.

Collard, B.C. and Mackill, D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. – Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sci. 363: 557-572.

Dolati Baneh, H., Mohammadi, S., Abdollahi Mandoulakani, B. and Rahmanpour, S. 2014. Association analysis for morphological traits in grapevine using SSR and AFLP markers. – J. Agri. Biotech. 6: 45-60.

Ganopoulos, I.V., Kazantzis, K., Chatzicharisis, I., Karayiannis, I. and Tsaftaris, A.S. 2011. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers. – Euphytica 181: 237-251.

Gomez, K.A. and Gomez, A.A. 1984. Statistical procedures for agricultural research. – John Wiley & Sons, New York, USA. pp 680.

Hormaza, J., Plnney, K. and Polito, V. 1998. Genetic diversity of pistachio (Pistacia vera, Anacardiaceae) germplasm based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. – Econ. Bot. 52: 78-87.

Jugran, A., Rawat, S., Dauthal, P., Mondal, S., Bhatt, I.D. and Rawal, R.S. 2013. Association of ISSR markers with some biochemical traits of *Valeriana jatamansi Jones*. - Ind Crops Prod. 44: 671-676.

Kar, P.K., Srivastava, P.P., Awasthi, A.K. and Urs, S.R. 2008. Genetic variability and association of ISSR markers with some biochemical traits in mulberry (Morus spp.) genetic resources available in India. – Tree Genetics & Genomes 4: 75-83.

Karimzadeh, G. and Omidbaigi, R. 2004. Growth and seed characteristics of isabgol (*Plantago ovata* Forsk) as influenced by some environmental factors. – J. Agri. Sci. Tech. 6: 103-110.

Khan, I.A. and Abourashed, E.A. 2011. Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs and cosmetics. – John Wiley & Sons, pp 810.

Kurian, A. and Sankar, M.A. 2007. Medicinal plants. – New India Publishing, pp 356.

Marsafari, M., Mehrabi, A.A. and Tahmasebi, Z. 2014. The identification of RAPD and ISSR informative markers with some quality traits of fruit in some of Iranian date palm. – Int. J. Pl. An. Env. Sci. 4: 714-722.

Mohammadzedeh, M., Fattahi Moghadam, R., Zamani, Z. and Khadivi Khub, A. 2014. Study of association between molecular markers and fruit characters in hazelnut using multiple regression analysis. – J. Cell & Tiss. 5: 289-299.

Mohsen-Zade, M., Samizade-Lahiji, M., Alami, A., Shoayi-Deylami, M. and Talesh-Sasani, S. 2012. Study of genetic diversity of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genotypes using ISSR and retrotransposon markers. – Iran. J. Field Crop Sci. 43: 371-380.

Murray, M. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. – Nucleic Acids Res. 8: 4321-4326.

Naghdi Badi, H., Dastpak, A. and Ziai, S. 2004. A review of psyllium plant. – J. Med. Pl. 1: 1-14.

Oraguzie, N.C. and Wilcox, P.L. 2007. *An overview of association mapping*. -In: Oraguzie, N., Rikkerink, E., Gardiner, S. and De Silva, H. (eds.). Association mapping in plants pp. 1-9. – Springer-Verlag, New York.

Rohilla, A.K., Kumar, M., Sindhu, A. and Boora, K. 2012. Genetic diversity analysis of the medicinal herb *Plantago ovata* (Forsk.). – Afr. J. Biotechnol. 11: 15835-15842.

Ruan, C. 2010. Germplasm-regression-combined marker-trait association identification in plants. – Afr. J. Biotechnol. 9.

Shannon, C.E. 2001. A mathematical theory of communication. – ACM SIGMOBILE Mob. Comput. Commun. Rev. 5: 3-55.

Sharafzadeh, S. and Alizadeh, O. 2012. Some medicinal plants cultivated in Iran. – J. Appl. Pharm. Sci. 2: 134-137.

ShazdehAhmadi, M. and Kharrazi, M. 2016. Application of ISSR molecular markers for genetic diversity study of some tobacco genotypes. – J. Pl. Gen. Res. 2: 33-46.

Shokrpour, M., Mohammadi, S., Moghadam, M., Ziaei, S. and Javanshir, A. 2008. Analysis of morphologic association, phytochemical and AFLP markers in milk thistle (*Silybum marianum* L.). – Iran. J. Med. Aro. Pl. 24: 278-292.

Singh, R.J. 2011. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: medicinal plants. – CRC Press, London, pp 1098.

SPSS-Inc. 2013. IBM SPSS Statistics 22 Core System User's Guide. SPSS Inc., an IBM Company Headquarters, USA.

Vahabi, A., Lotfi, A., Solouki, M. and Bahrami, S. 2008. Molecular and morphological markers for the evaluation of diversity between *Plantago ovata* in Iran. – Biotechnol. 7: 702-709.

Virk, P.S., Ford-Lloyd, B.V., Jackson, M.T., Pooni, H.S., Clemeno, T.P. and Newbury, H.J. 1996. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. – Heredity 76: 296-304.

*****

How to cite this article:

Rahimi, M. 2018. Using stepwise regression to identify ISSR molecular markers associated with agronomic traits in ispaghula (*Plantago ovata* Forssk) ecotypes. – Nova Biologica Rep. 2018: 128-136.

رحیمی، م. ۱۳۹۷. استفاده از رگرسیون گام به گام برای شناسایی نشانگرهای مولکولی ISSR مرتبط با صفات زراعی در اکوتیپ‌های اسفرزه. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۳۹۷: ۱۳۶-۱۲۸.