"مجله علوم زراعی ایران"
جلد دوازدهم، شماره ۴ زمستان ۱۳۸۹

تجزیه ارتباط برای صفات مورفولوژیک در بادام زمینی (*Arachis hypogea* L.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers

بابک عبدالهی مندولکانی[۱]، علی اعلمی[۲] و مسعود اصفهانی[۳]

چکیده

عبدالهی مندولکانی، ب.، ع. اعلمی و م. اصفهانی. ۱۳۸۹. تجزیه ارتباط برای صفات مورفولوژیک در بادام زمینی (*Arachis hypogea* L.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. **مجله علوم زراعی ایران. ۱۲ (۴) ۵۱۹-۵۱۰.**

به منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات وضعیت شبکه‌بندی غلاف‌ها، وضعیت شکم در غلاف ها، طول غلاف، عرض غلاف، تعداد دانه در غلاف، نسبت وزن دانه به وزن غلاف، وزن دانه، طول دانه، عرض دانه، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در بوته، وزن غلاف در بوته و وزن دانه در بوته در ژرم پلاسم بادام زمینی ایران، از نشانگرهای ریزماهواره استفاده شد. ۱۳ جفت آغازگر مورد استفاده، ۸۰ الل در ۶۸ ژنوتیپ بادام زمینی تولید کرد. میانگین تعداد اللها ۶/۱۵ الل برای هر مکان ریزماهواره بود. میانگین میزان اطلاعات چندشکل برای جایگاه‌ها ۰/۸۰ و از ۰/۴۷ (نشانگرpPGPseq-2C11) تا ۰/۹۵ (نشانگر PM183) متغیر بود. برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک مورد مطالعه، تجزیه رگرسیون گام به گام بین داده‌های مولکولی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورفولوژیک به عنوان متغیرهای وابسته انجام گرفت. نشانگرهای مرتبط با تعداد دانه در بوته و وزن غلاف در بوته یکسان بودند. جایگاه های Ah4-4، Lec و PM210 با هر دو صفت طول و عرض دانه مرتبط بودند. بیشترین تغییرات مربوط به صفت طول دانه (۸۸ درصد) توسط نشانگرهای Ah4-4، A4-26، Lec، PM3، PM36، PM50، PM183، PM210، pPGPseq-2D12B و Ah51 تبیین شدند، در حالیکه سه مکان Ah4-4، Lec و PM210 فقط ۲۶ درصد از تغییرات مربوط به صفت عرض دانه را تبیین کردند. با توجه به اینکه همه مکان‌های مورد مطالعه بجز pPGPseq-2C11 روی صفات مورد مطالعه موثر بودند، بنابراین احتمال دارد بتوان از این مکان‌ها همراه با اطلاعات مربوط به صفات مورفولوژیک در اصلاح بادام زمینی برای شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت های در حال تفرق و تولید ارقام هیبرید استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی : بادام زمینی، تجزیه ارتباط، صفات مورفولوژیک و نشانگرهای ریزماهواره.

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.11.4]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۵

[۱] استادیار دانشکده کشاورزی و گروه بیوتکنولوژی کشاورزی پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه ارومیه (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: b.abdollahi@urmia.ac.ir)

[۲] استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

[۳] دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

مقدمه

بادام زمینی (*Arachis hypogea*) یکی از گیاهان روغنی است که در ۹۶ کشور جهان کشت می‌شود. بادام زمینی خودبارور، آلوتتراپلوئید (۲n= ۴x =۴۰) و بومی منطقه آمریکای جنوب شرقی است و در صورت عدم دسترسی به گوشت می‌تواند بخش عمده‌ای از پروتئین غذایی را تامین کند (Upadhaya *et al*., 2003). علیرغم تنوع مورفولوژیکی بالا در ژرم‌پلاسم بادام زمینی، این تنوع به اندازه کافی در برنامه‌های اصلاحی بادام زمینی مورد استفاده قرار نگرفته است و بسیاری از ارقام زراعی موجود معمولا بر پایه یک یا چند والد مشترک تولید شده‌اند. این موضوع شاید به علت عدم وجود اطلاعات کافی در مورد صفات مورفولوژیکی و زراعی بادام زمینی باشد (Badigannavar *et al*., 2002). بنابراین برای بهره برداری از تنوع موجود در ژرم پلاسم بادام زمینی، ارزیابی صفات مورفولوژیکی و زراعی آن ضروری است.

در سال‌های اخیر نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA برای اهداف متنوعی در علوم گیاهی و جانوری مورد استفاده قرار گرفته‌اند، ولی مطالعات ژنومی در بادام زمینی نسبت به سایر گونه های زراعی به علت تحقیقات مولکولی کمتر و در واقع کمیابی نشانگرهای DNA چندشکل و موثر، به کندی پیش رفته است (Gimenes *et al*. 2007;Cunha *et al*. 2008; Moretzsohn *et al*., 2009). مکان یابی ژن‌های کنترل کننده صفات مورفولوژیک در بادام زمینی براساس تجزیه‌های مبتنی بر پیوستگی (Linkage-based analysis) و با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام گرفته است (Herselman *et al*., 2004; Moretzsohn *et al*., 2009; Selvaraj *et al*., 2009). در برخی از این مطالعات، نشانگرهای پیوسته با صفات که با استفاده از مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی در گذشته انجام گرفته است، فاصله ژنتیکی زیادی را با صفات مورد مطالعه داشته و برای گزینش به کمک نشانگر و همسانه سازی بر اساس نقشه مفید نبودند. به علاوه 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 می شوند که این خود محدودیت دیگری را ایجاد می‌کند، 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 مکان یابی ارتباطی (Association mapping) یا تجزیه ارتباطی (Association analysis) معرفی شده است که نه تنها امکان مکان یابی دقیق و مطمئن ژن‌ها و مکان‌های کنترل کننده صفات کمی را فراهم می‌کند، بلکه امکان شناسایی نواحی کروموزومی دیگری که در مطالعات مبتنی بر پیوستگی امکان پذیر نیستند را نیز میسر می‌سازد. در این روش نیازی به تهیه جمعیت در حال تفرق که نیاز به زمان زیادی دارد نمی‌باشد، ولی بهتر است از داده‌های فنوتیپی چند ساله استفاده شود. از طرف دیگر کراسینگ اورهایی که در حین تهیه جمعیت‌های در حال تفرق صورت می‌گیرد، محدود می‌باشد که این امکان مکانی یابی دقیق را فراهم نمی‌سازد (Breseghello and Sorrells, 2006). کارایی این روش در انسان برای شناسایی و مکان یابی ژن‌های کنترل کننده صفات مندلی نشان داده شده است (Breseghello and Sorrells, 2006; Crossa *et al*. 2007; Jun *et al*., 2009). در علوم گیاهی نیز این روش رو به گسترش است. روی و همکاران (Roy *et al*., 2006) با استفاده از تجزیه ارتباط بر اساس رگرسیون چند متغیره در ۵۵ لاین گندم، ۵۵ نشانگر SSR، ۳۸ نشانگر SAMPL و ۵۴ نشانگر AFLP را شناسایی کردند که حداقل با یکی از ۱۴ صفت زراعی مورد مطالعه مانند عملکرد بیولوژیکی و وزن هزار دانه مرتبط بوده و به عنوان نشانگرهای مثبت برای برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر این صفات معرفی شدند. تجزیه ارتباط

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.11.4]

در خزانه ژنی سیب زمینی با ۶۰۰ رقم نشان داد که ارتباط معنی داری بین نشانگرهای PCR مبتنی بر ژن R1 (یک ژن عمده دخیل در مقاومت به بلایت دیررس سیب زمینی) و مقاومت به بلایت دیررس سیب زمینی و رسیدگی وجود دارد (Gebhardt *et al.*, 2004). ایواندیک و همکاران (Ivandic *et al.*, 2002) با استفاده از ۳۳ نشانگر SSR و روش تجزیه ارتباط، نشانگرهای مرتبط با زمان گلدهی تحت رژیم‌های مختلف رشدی را در جو شناسایی کردند. جون و همکاران (Jun *et al.*, 2008) با استفاده از تجزیه ارتباط و نشانگرهای SSR، یازده QTL (Quantitative trait loci) را برای صفت محتوای پروتئین در ۹۶ نمونه سویا شناسایی کردند که برخی از این QTLها قبلا شناسایی نشده بودند. شالینی و همکاران (Shalini *et al.*, 2007) با استفاده از روش تجزیه ارتباط و نشانگرهای SSR و RAPD پنج نشانگر مرتبط با مقاومت به کرم پنیر را در نارگیل شناسایی کردند که می‌توانند در برنامه‌های بهنژادی نارگیل مورد استفاده قرار گیرند. خدارحمی و همکاران (Khodarahmi *et al.*, 2009) با استفاده از روش تجزیه ارتباط، ۵ نشانگر SSR مرتبط با سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و ۴ نشانگر مرتبط با ضریب آلودگی نهایی را در گندم برای مقاومت به زنگ زرد معرفی کردند.

مکان‌های ژنی کنترل کننده برخی صفات در بادام زمینی با استفاده از روش‌های مبتنی بر تجزیه پیوستگی و نشانگرهای مولکولی شناسایی شده است (Herselman *et al.*, 2004; Moretzsohn *et al.*, 2009; Selvaraj *et al.*, 2009) ولی هنوز استفاده از تجزیه ارتباط در بادام زمینی برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک گزارش نشده است. در این آزمایش شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با برخی صفات مورفولوژیک مهم در ژرم پلاسم بادام زمینی ایران با استفاده از روش تجزیه ارتباط صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی شامل کلیه ژنوتیپ‌های بادام زمینی موجود در ژرم‌پلاسم بانک ژن گیاهی ملی ایران بود. همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نوع تیپ ایستاده بودند که مشخصات آن‌ها در جدول شماره یک ارائه شده است.

آزمایش‌های مزرعه‌ای

با توجه به بررسی‌های بعمل آمده در بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، ایستگاه لشت نشاء گیلان، رقم NC2 با عملکرد ۲۵۸۰ کیلوگرم دانه در هکتار نسبت به سایر ارقام برتری نشان داده و به همین دلیل در حال حاضر به عنوان رقم غالب در استان گیلان کشت و کار می‌شود و بر این اساس ۶۸ نمونه بادام زمینی از انواع مختلف آجیلی و روغنی دریافت شده از بانک ژن گیاهی ملی ایران همراه با رقم NC2 (به عنوان شاهد) در سال زراعی ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو تکرار کشت شدند. پس از شخم و دیسک زمین در بهار، مقدار ۷۰ کیلوگرم کود نیتروژن از منبع اوره و ۱۰۰ کیلوگرم کود فسفر از منبع سوپر فسفات تریپل در هکتار در مزرعه پخش شده و با دیسک‌زنی مجدد با خاک مخلوط شدند. خاک مزرعه به دلیل درصد بالای رس (حدود ۱۸ درصد)، با افزودن ماسه و کود حیوانی به صورت موضعی اصلاح شد و سپس بذرها به صورت ردیفی (۲۰×۶۰ سانتیمتر) کشت شدند. پس از سبز شدن بذرها ضمن انجام عملیات معمول داشت از جمله تنک کردن بوته‌ها، آبیاری، وجین و خاک‌دهی پای بوته‌ها، صفات مورفولوژیک بر اساس دستورالعمل اندازه‌گیری و ثبت صفات بادام زمینی که توسط انستیتو تحقیقات بین‌المللی گیاهان زراعی مناطق گرمسیری نیمه‌خشک (ICRISAT) تنظیم شده است، در ۵ بوته بطور تصادفی از هر نمونه و در هر

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.11.4]

جدول ۱ - اسامی ژنوتیپ‌های بادام زمینی مورد مطالعه بر اساس تقسیم بندی ایکریسات

Table1. Name of peanut genotypes according to ICRISAT classification

	ژنوتیپ Genotype		ژنوتیپ Genotype		ژنوتیپ Genotype		ژنوتیپ Genotype
1	ICGV 92046	19	ICGV 92027	37	ICGV 94216	55	TN.48-106
2	ICGV 92050	20	ICGV 92028	38	ICGV 94217	56	ICGV 91155
3	ICGV 92052	21	ICGV 92033	39	ICGV 94222	57	ICGV 92195
4	ICGV 92054	22	ICGV 92035	40	TN.48-90	58	ICGV 92217
5	ICGV 92064	23	ICGV 92040	41	ICGV 92109	59	ICGV 92218
6	ICGV 92071	24	ICGV 93128	42	ICGV 92113	60	ICGV 92222
7	ICGV 92076	25	ICGV 93133	43	ICGV 92116	61	ICGV 92267
8	ICGV 93152	26	ICGV 93134	44	ICGV 92118	62	ICGV 93382
9	ICGV 93155	27	ICGV 93135	45	ICGV 92120	63	ICGV 93388
10	ICGV 93162	28	ICGV 93136	46	ICGV 92126	64	ICGV 93392
11	ICGV 93163	29	TN.48-75	47	ICGV 93232	65	ICGV 93420
12	ICGV 93164	30	ICGV 92173	48	ICGV 93233	66	ICGV 94361
13	ICGV 93171	31	ICGV 93030	49	ICGV 93255	67	Chico
14	TN.48-59	32	ICGV 93057	50	ICGV 93260	68	NC2
15	ICGV 92004	33	ICGV 93095	51	ICGV 93261		
16	ICGV 92015	34	ICGV 93104	52	ICGV 93269		
17	ICGV 92022	35	ICGV 94198	53	ICGV 93277		
18	ICGV 92023	36	ICGV 94205	54	ICGV 86635		

تکرار اندازه گیری و ثبت شدند. صفات مورد نظر در ۲ گروه کیفی (توصیفی) و کمی دسته‌بندی شدند که صفات کیفی بر اساس نمره‌دهی مندرج در دستورالعمل فوق و صفات کمی بر اساس اندازه‌گیری یا شمارش مشخص و ثبت شدند. صفات توصیفی شامل وضعیت شبکه‌بندی غلاف‌ها و وضعیت شکم در غلاف‌ها و صفات کمی شامل طول غلاف، عرض غلاف، تعداد دانه در غلاف، نسبت وزن دانه به وزن غلاف، وزن دانه، طول دانه، عرض دانه، تعداد غلاف در گیاه، تعداد دانه در گیاه ، وزن غلاف در گیاه و وزن دانه در گیاه بود.

استخراج DNA ی ژنومی و تجزیه ریزماهواره‌ها

بذرها در گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در گلدان‌های کوچک با قطر ۱۰ سانتی متر شامل مخلوطی از خاک و ورمیکولیت کشت شدند. DNA ژنومی از گیاهچه های ۱۰ تا ۱۵ روزه با استفاده از روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1983) استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین و سپس به غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر برای انجام واکنش‌های PCR رقیق سازی شد. ۱۳ جفت آغازگر ریزماهواره بر اساس محتوای اطلاعات چندشکل آنها در گزارشات قبلی (Hopkins *et al.*, 1999; He *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2004b; Gemenes *et al.*, 2007) انتخاب شده و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). واکنش زنجیره ای پلیمراز در ترموسایکلر بیورد (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) در حجم ۱۵ میکرولیتری شامل ۱۰ نانوگرم DNAی ژنومی، بافر PCR یک برابر pH = ۸/۳، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، تریس- اسیدکلریدریک ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۲ میکرومول از هر dNTP، ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر انجام گرفت. چرخه دمایی شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۱۰ چرخه به صورت تاچ داون (Touch down) (۹۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۸/۵- ۵۸/۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه) و ۲۵ چرخه به صورت (۹۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸/۵ درجه به

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.11.4]

مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه) و بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت هفت دقیقه بود. محصولات تکثیری ابتدا روی ژل آگارز دو درصد ارزیابی شده و سپس با حجم مساوی از بافر بارگذاری شامل فرمامید ۹۸ درصد مخلوط شده و پنج میکرولیتر از نمونه ها روی ژل پلی اکریل آمید شش درصد واسرشت ساز بارگذاری گردید. ژل ها با نیترات نقره رنگ آمیزی (Bassam *et al.*, 1991) و با اسکنر مدل SP Scanjet 4890 اسکن شدند. برای تعیین اندازه نوارها نیز از نشانگر اندازه DNA ladder VIII (Roche) استفاده شد.

تجزیه آماری داده‌ها

الگوهای نواری بصورت یک و صفر بر اساس وجود و عدم وجود باند در هر مکان امتیازدهی شدند. شاخص PIC با استفاده از فرمول $PIC= 1-\sum P_i^2$ محاسبه شد. در این فرمول P_i فراوانی الل i ام در یک مکان مشخص می‌باشد. تعداد آلل‌های موثر نیز به کمک نرم افزار Popgene نسخه ۱/۳۱ (Yeh *et al.*, 1999) محاسبه شد. برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک مورد مطالعه، تجزیه رگرسیون گام به گام با در نظر گرفتن مکان‌های نشانگری به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورفولوژیک به عنوان متغیرهای وابسته با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ (Levesque, 2007) انجام گرفت.

نتایج و بحث

همه مکان‌های ریزماهواره‌ای مورد استفاده الگوی نواری چندشکل بین ژنوتیپ‌های مورد استفاده تولید کردند. در کل ۸۰ الل در جمعیت مورد مطالعه تولید شد. تعداد الل‌ها از سه برای جایگاه‌های Ah4-26، pPGPseq-2A05و pPGPseq-2C11) تا ۱۴ برای جایگاه Lec متغیر بود. میانگین تعداد الل‌ها ۶/۱۵ بود. دامنه اندازه الل‌ها از ۸۲ (جایگاه Ah4-4) تا ۳۱۰ جفت باز (جایگاه‌های pPGPseq-2C11 و pPGPseq-2G04) متغیر بود. بیشترین فراوانی اللی (۰/۷۳) برای یکی از الل‌های جایگاه pPGPseq-2C11 مشاهده شد. تعداد الل‌های موثر از ۱/۱ (جایگاه‌های PM183 و PM50) تا ۱/۶ (جایگاه PM3) متغیر بود. میزان اطلاعات چندشکل از ۰/۴۷ تا ۰/۹۵ به ترتیب برای جایگاه‌های pPGPseq-2C11 و PM183 متغیر بود. میانگین میزان اطلاعات چندشکل برای مکان‌های مورد مطالعه ۰/۸۰ بود (جدول ۲). میانگین PIC نشان داد که نشانگرهای SSR ابزار مناسبی برای تمایز ژنوتیپ‌های بادام زمینی هستند. ماس و همکاران (Mace *et al.*, 2007) در ارزیابی تنوع کلکسیون بادام زمینی، دامنه تغییرات ۰/۱۳۱ تا ۰/۶۶۹ را با میانگین ۰/۳۸۶ برای PIC گزارش نمودند که در مقایسه با آزمایش حاضر پایین است. مکان‌های SSR مورد استفاده در پژوهش حاضر بر اساس میزان اطلاعات چندشکل و قدرت تمایز آنها در مطالعات قبلی(Hopkins *et al.* 1999; He *et al.* 2003; Ferguson *et al.* 2004b; Gimenes *et al.* 2007) انتخاب شده بودند که این موضوع می‌تواند دلیلی برای مقادیر بالای PIC حاصله در این آزمایش باشد. تعداد بالای الل‌های تکثیر شده در این آزمایش با استفاده از ۱۳ نشانگر نشان می‌دهد که تعداد کمی از مکان‌های SSR با PIC بالا می‌توانند تعداد زیادی نمونه را تفکیک کنند. هی و همکاران (He *et al.*, 2003) در ارزیابی ۲۴ رقم بادام زمینی با استفاده از نشانگرهای SSR میانگین ۴/۲۵ الل را گزارش کردند. ماس و همکاران (Mace *et al.*, 2007) ۱۰۱ الل چند شکل را در ارزیابی ۴۶ رقم بادام زمینی گزارش نمودند.

تجزیه ارتباط نشان داد که مکان ریز ماهواره‌ای Lec با بیشترین تعداد صفات مرتبط بود. این مکان بیشترین تعداد الل (۱۴) را در جمعیت نشان داد. مکان pPGPseq-2A05 با تغییرات دو صفت وضعیت شکم در غلاف‌ها و تعداد دانه در غلاف ارتباط داشت. این مکان ۳ الل در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد. بیشترین تعداد نشانگر مثبت برای صفت طول دانه شناسایی شد.

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.11.4]

جدول ۲- دامنه اندازه آلل‌ها، تعداد الل‌های تکثیر شده، تعداد الل‌های موثر و مقادیر PIC برای مکان‌های ریزماهواره‌ای مورد استفاده در این مطالعه

Table 2. Size range of alleles, number of amplified alleles, number of effective alleles and polymorphic information content (PIC) values of tested simple sequence repeat (SSR) primers

محتوای اطلاعاتی حاصل از چند شکلی PIC	تعداد آلل‌های موثر No. of effective alleles	تعداد آلل‌ها No. of alleles	دامنه اندازه آلل‌ها (جفت باز) Size range of alleles (bp)	آغازگر Primer
0.94	1.2	6	82-100	Ah4-4
0.85	1.5	3	156-213	Ah4-26
0.87	1.2	14	218-261	Lec
0.60	1.6	5	200-220	PM3
0.73	1.3	8	190-240	PM36
0.93	1.1	8	94-110	PM50
0.95	1.1	8	100-150	PM183
0.90	1.2	7	180-190	PM210
0.83	1.5	3	252-270	pPGPseq-2A05
0.47	1.2	3	264-310	pPGPseq-2C11
0.76	1.3	5	265-280	pPGPseq-2D12B
0.73	1.3	4	289-310	pPGPseq-2G04
0.90	1.2	6	154-165	Ah51
0.80	1.3	6.15		میانگین Average

مکان‌های مرتبط با دو صفت تعداد دانه در بوته و وزن غلاف در بوته یکسان بودند (Ah4-4, Lec, PM36, M183, Ah51). اعلمی و همکاران (Alami *et al.*, 2007) همبستگی معنی داری را برای دو صفت مذکور گزارش کردند. سه مکان Ah4-4، Lec و PM210 با هر دو صفت طول و عرض دانه مرتبط بودند. مکان‌های مشترک برای برخی صفات در این آزمایش شاید ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی مکان‌های مربوطه باشد. سلواراج و همکاران (Selvaraj *et al.*, 2009) نیز QTLهای مشترکی را برای طول دانه، طول غلاف و وزن ۱۰۰ دانه گزارش نمودند. بیشترین تغییرات مربوط به صفت طول دانه (۸۸ درصد) توسط مکان‌های ریزماهواره‌ای Ah4-4، A4-26، Lec، PM3، PM36، PM50، PM183، PM210، pPGPseq-2D12B و Ah51 تبیین شدند، در حالیکه سه مکان Ah4-4، Lec و PM210 فقط ۲۶ درصد از تغییرات مربوط به صفت عرض دانه را تبیین کردند. مکان ریز ماهواره‌ای PM36 با بسیاری از صفات مورد مطالعه از جمله طول غلاف، عرض غلاف، تعداد دانه در غلاف، نسبت وزن دانه به وزن غلاف، وزن غلاف در بوته، تعداد دانه در بوته، طول دانه و وزن دانه مرتبط بود. با توجه به اینکه این نشانگر بر اساس نقشه ژنوم B بادام زمینی (Moretzsohn *et al.*, 2005) در انتهای گروه پیوستگی پنجم قرار دارد، بنابراین احتمالا این ناحیه در کنترل صفات مذکور دخیل است. مکان نشانگری PM3 در ناحیه میانی گروه پیوستگی ۳، با صفات طول غلاف، عرض غلاف، نسبت وزن دانه به وزن غلاف، طول دانه و تعداد غلاف در بوته مرتبط بود. این مکان بیشترین نسبت تعداد الل‌های موثر به تعداد الل‌ها برای هر نشانگر را دارا بود. با توجه به اینکه همه مکان‌های مورد مطالعه بجز pPGPseq-2C11 بر روی صفات مورد مطالعه موثر بودند بنابراین احتمال دارد بتوان از این مکان‌های ریز ماهواره در برنامه‌های اصلاحی برای شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه یابی و تهیه ارقام هیبرید استفاده کرد.

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.11.4]

جدول ۳- نتایج حاصل از رگرسیون گام به گام بین صفات مورفولوژیک و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مثبت در ارقام مورد مطالعه

Table 3. Results of stepwise regression between morphological and molecular data to define informative markers in studied genotypes

Plant characteristics	صفات گیاهی	مکان ژنی Locus	R^2 تصحیح شده Adjusted R^2	سطح معنی داری P-value
Lattice shape of pod	وضعیت شبکه بندی غلاف	Ah4-4,Lec, pPGPseq-2D12B, pPGPseq-2G04	0.48	0.018
Belly shape in pod	وضعیت شکم در غلاف	PM50, PM183, pPGPseq-2A05, pPGPseq-2G04, Ah51	0.75	0.028
Pod length	طول غلاف	Ah4-4, PM3, PM36, PM50,PM183, pPGPseq-2D12B, pPGPseq-2G04, Ah51	0.82	0.036
Pod width	عرض غلاف	Ah4-4, Lec, PM3, PM36, PM183, PM210	0.70	0.031
Grain No. pod^{-1}	میانگین تعداد دانه در غلاف	Ah4-4,Lec, PM36, PM210, pPGPseq-2A05, Ah51	0.68	0.041
Grain weight: Pod weight	نسبت وزن دانه به وزن غلاف	Lec, PM3, PM36, pPGPseq-2D12B	0.40	0.011
Grain weight	وزن دانه	Lec, PM36, PM50, pPGPseq-2D12B	0.61	0.003
Grain length	طول دانه	Ah4-4, Ah4-26, Lec, PM3, PM36, PM50, PM183, PM210, pPGPseq-2D12B, Ah51	0.88	0.033
Grain width	عرض دانه	Ah4-4, Lec, PM210	0.262	0.025
Pod No. plant^{-1}	میانگین تعداد غلاف در بوته	Ah4-26, PM3, PM50, pPGPseq-2D12B, Ah51	0.67	0.048
Grain No. plant^{-1}	میانگین تعداد دانه در بوته	Ah4-4, Lec, PM36, PM183, Ah51	0.50	0.01
Pod weight. Plant^{-1}	میانگین وزن غلاف در بوته	Ah4-4, Lec, PM36, PM183, Ah51	0.50	0.01
Grain weight. Plant^{-1}	میانگین وزن دانه در بوته	Lec, PM50, Ah51	0.40	0.019

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.11.4]

سپاسگزاری

بدین وسیله نگارندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه ارومیه که امکانات لازم برای انجام تحقیق را فراهم نمودند اعلام می‌نمایند. از بانک ژن گیاهی ملی ایران که نمونه‌های بادام زمینی را در اختیار گذاشتند، قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

References

Aalami, A., B. Abdollahi Mandoulakani, M. Esfahani and J. Mozaffari. 2007. Assessment of genetic diversity in groundnut (*Arachis hypogea* L.) germplasm using morphological traits. Iran. J. Crop Sci. 8: 357-367. (In Persian with English abstract).

Badigannavar, A. M., D. M. Kale and G. S. S. Murty. 2002. Genetic base and diversity in groundnut genotypes, Plant Breed. 121: 348-355.

Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P. M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Annual Rev. Biochem. 196: 80-83.

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

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.

Cunha, F. B., P.M. Nobile, A. A. Hoshino, M. C. Moretzsohn, C. R. Lopes and M. A. Gimenes. 2008. Genetic relationships among *Arachis hypogaea* L. (AABB) and diploid *Arachis* species with AA and BB genomes. Genetic Resourc. Crop Evol. 55: 15-20.

Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol. Biol Rep.1:19-21.

Ferguson, M. E., M. D. Burow, S. R. Schulze, P. J. Bramel, A. H. Paterson, S. Kresovich and S. Mitchell. 2004b. Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.). Theor. Appl. Genet. 108: 1064-1070.

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. Mol. Breed. 13: 93–102.

Gimenes, M. A., A. A. Hoshino1, V. G. A. Barbosa1, D. A. Palmieri1 and R. C. Lopes. 2007. Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). BMC Plant Biol. 7: 1-13.

He, G., R. Meng, M. Newman, G. Gao, R. N. Pittman and C. S. Prakash. 2003. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). BMC Plant Biol. 3: 3 [http://www.biomedcentral.com/ 1471-2229/3/3].

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.11.4]

Herselman, L., R. Thwaites, F. M. Kimmins, B. Courtois, P. J. A. van der Merwe and S. E. Seal. 2004. Identification and mapping of AFLP markers linked to peanut (*Arachis hypogaea* L.) resistance to the aphid vector of groundnut rosette disease. Theor. Appl. Genet. 109: 1426–1433.

Hopkins, M. S., A. M. Casa, T. Wang, S. E. Mitchell, R. E. Dean, G. D. Kochert and S. Kresovich. 1999. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. Crop Sci. 39: 1243-1247.

Ivandic, V, C. A. Hackett, E. Nevo, R. Keith, W. T. B. Thomas and B. P. Forster. 2002. Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time. Plant Mol. Biol. 48: 511–527.

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 62: 179–191.

Khodarahmi, M., S. A. Mohammadi and M. R. Jalal-Kamali. 2009. Identification of informative markers for yellow rust resistance related characters. The 6th National Biotechnology Congress of Iran, 13-15 Aug, 2009, Milad Tower Conference Hall, Tehran, Iran.

Levesque, R. 2007. SPSS Programming and Data Management: A Guide for SPSS and SAS Users, Fourth Edition, SPSS Inc., Chicago.

Mace, E. S., W. Yuejin, L. Boshou, H. Upadhyaya, S. Chandra and J. H. Crouch. 2007. Simple sequence repeat (SSR)-based diversity analysis of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to bacterial wilt. Plant Genet. Resour. 5: 27-36.

Moretzsohn, M. C., A. V. G. Barbosa, D. M. T. Alves-Freitas, C. Teixeira, C. M. S. Leal-Bertioli, P. M. Guimarães, R. W. Pereira, C. R. Lopes, M. M. Cavallari, J. F. M. Valls, D. J. Bertioli and M. A. Gimenes. 2009. A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. BMC Plant Biol. 40: 1-10.

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 Sci. 5: 683-689.

Selvaraj, M. G., M. Narayana, A. M. Schubert, J. L. Ayers, M. R. Baring and M. D. Burow. 2009. Identification of QTLs for pod and kernel traits in cultivated peanut by bulked segregant analysis. Electron. J. Biotech. 2: 1-10.

Shalini, K. V., S. Manjunatha, P. Lebrun, A. Berger, L. Baudouin, N. Pirany, R. M. Ranganatha and D. Theertha Prasad. 2007. Identification of molecular markers associated with mite resistance in coconut (*Cocos nucifera* L.). Genome 50: 35-42.

Upadhyaya, H.D., R. Oritz, P. J. Bramel and S. Singh. 2003. Development of a groundnut core collection using taxonomical, geographical and morphological descriptors. Genetic Resour. Crop. Evol. 50: 139-148.

Yeh, F. C., T. Boyle, Y. Rongcai, Z. Ye and J. M. Xian. 1999. POPGENE version 3.1. http://www.ualberta.ca/-fyeh/fyeh.

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.11.4]

"مجله علوم زراعی ایران"، جلد دوازدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹

Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers

Abdollahi Mandoulakani[1], B., A. Alami[2] and M. Esfahani[3]

ABSTRACT

Abdollahi Mandoulakani, B., A. Alami and M. Esfahani. 2010. Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. **Iranian Journal of Crop Sciences. 12 (4) 510-519. (In Persian)**

Microsatellite markers were used to identify informative markers associated with traits lattice shape of pod, belly shape in pod, pod length, pod width, grain number per pod, grain weight, grain weight/pod weight, grain length, grain width, pod number per plant, grain number per plant, pod weight per plant, grain weight per plant in peanut. Thirteen SSR primer pairs amplified 80 alleles among 68 peanut genotypes, with an average of 6.15 alleles per locus. Polymorphic information content ranged from 0.47 (Locus pPGPseq-2C11) to 0.95 (Locus PM183), with an average of 0.80. 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. SSR loci associated with number of grains per plant and weight of pod per plant were the same. Loci Ah4-4, Lec and PM210 were associated with both grain length and width. The most variation of grain length (88%) was accounted by Ah4-4, Ah4-26, Lec, PM3, PM36, PM50, PM183, PM210, pPGPseq-2D12B and Ah51 markers while Ah4-4, Lec and PM210 markers were accounted for 26% of the variation of the grain width. Since all the used SSR loci except pPGPseq-2C11 showed significant association with the studied traits, therefore, it is possible to use these markers along with morphological traits in peanut breeding programs for identification of suitable parents to produce mapping populations and hybrid varieties.

Key words: Association analysis, Morphological traits, Microsattelite markers and Peanut.

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.11.4]

Received: March, 2010 **Accepted: May, 2010**

1-Assistant prof., Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding author)
(Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir)
2- Assistant prof., Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran
3- Associate prof., University of Guilan, Rasht, Iran