

## تجزیه‌ی ارتباط مکان‌های ژنی کنترل‌کننده‌ی صفات مورفولوژیک برنج با استفاده از نشانگرهای ISSR در شرایط غرقاب و تنش خشکی

محمد رضا کریم<sup>۱</sup>، حسین صبوری<sup>۲\*</sup>، احمد رضا دادرس<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۰

### چکیده

شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی به ویژه در وضعیت تنش از موضوع‌های مهم حوزه‌ی به نژادی است. پژوهش حاضر در راستای شناسایی نشانگرهای مولکولی که ارتباط معنی‌داری با صفات مرتبط در برنج با استفاده از نشانگر ISSR و ۵۹ ژنوتیپ برنج و ۲۱ صفت زراعی در شرایط غرقاب و تنش خشکی انجام شد. ژنوتیپ‌های مورد بررسی براساس نشانگرهای بین ریزماهورهای در مجموع ۱۴۴ باند با میانگین ۱۴/۴ باند به ازای هر جایگاه نشانگری ایجاد نمود و از ۱۴۴ باند تشکیل شده ۶۹/۱۷ درصد از باندها چندشکل بودند. بیشترین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) را آغازگر ISSR-7 با ۰/۴۹ و آغازگرهایی ISSR-2، ISSR-8، ISSR-9 و ISSR-10 با ۰/۴۷ کمترین مقدار PIC را به خود اختصاص دادند. تجزیه ارتباط با استفاده از ماتریس ساختار جمعیت و با مدل‌های آماری GLM و MLM با استفاده از نرم افزار TASSEL برای ۲۱ متغیر انجام شد. مدل MLM توانست در شرایط نرمال ۹۶ نشانگر و در شرایط تنش خشکی ۸۰ نشانگر معنی‌دار را مرتبط با ۲۱ صفت مورد بررسی در سطح احتمال پنج درصد شناسایی نماید. مطابق نتایج تجزیه ارتباط در شرایط نرمال بالاترین ضریب تبیین (در مدل MLM) مربوط به آلل ISSR7-2 به میزان ۲۹/۲۷ درصد و در شرایط تنش خشکی بالاترین ضریب تبیین (در مدل GLM) مربوط به آلل ISSR1-6 به مقدار ۲۲/۷۷ درصد بود. با توجه به نتایج، پیش‌بینی می‌شود. استفاده از نشانگرهای ISSR ردیابی شده در این پژوهش در صورت تأیید و پس از اختصاصی شدن، با اطمینان زیادی در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر امکان پذیر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تجزیه ارتباط، برنج، تنش خشکی، TASSEL ISSR

### مقدمه

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور تهران  
 ۲. دانشیار گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس  
 \*(نویسنده مسئول: )

۳. استادیار پژوهشی ایستگاه تحقیقات زیتون طارم، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران.

برنج یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان می‌باشد و غذای اصلی و منبع تامین کربوهیدرات بسیاری از مردم جهان بوده که سطح وسیعی از زمین‌های زیر کشت در آسیا را به خود اختصاص داده است (Yashitola *et al.*, 2004). تولید غذای جهان عمدتاً به وسیله تنش‌های محیطی و عوامل بیماری‌زا محدود شده است که در میان انواع تنش‌ها، تنش خشکی دارای اهمیت بسزایی است (Zhang *et al.* 2006). علاوه بر آن تغییرات آب و هوا و افزایش جمعیت جهانی نیز ایجاد این مشکل را گسترده‌تر می‌کند. یکی از راه حل‌های این مشکل ایجاد ارقام با تحمل بیشتر نسبت به تنش خشکی است (Takeda & Matsuoka, 2008). در این راستا اصلاح هدفمند گیاهان برای محیط‌های خشک ممکن است به افزایش معناداری در عملکرد گیاهان منجر شود. البته این موضوع مستلزم تحقیقات پایه‌ای درست و به کارگیری روش‌های جدید و مولکولی در کنار روش‌های سنتی است. بررسی صفات مرتبط با تنش خشکی به دلیل پیچیده بودن توارث بسیار مشکل است. یکی از برنامه‌های کاربردی در مطالعه صفات کمی در دهه اخیر، مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی است. به طور کلی روش‌های به کاررفته در شناسایی و مکان‌یابی جایگاه صفات کمی به دو گروه تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباط تقسیم می‌شوند (Dadras *et al.*, 2014).

در مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی، اغلب از جمعیت‌های مصنوعی حاصل از تلاقی دو والد هموزیگوت استفاده می‌شود و نوترکیبی در چرخه‌های میوزی طی تولید جمعیت‌های در حال تفرق مانند  $F_2$ ، هاپلوئیدی‌های مضاعف، تلاقی برگشتی و لاین‌های اینبرد نوترکیب، درجه ارتباط یک QTL معین و نشانگرهای دور از آن کاهش می‌یابد و بنابراین با توجه به وجود فقط یک چرخه میوزی در تولید جمعیت‌های مانند  $F_2$ ، هاپلوئیدی‌های مضاعف، تلاقی برگشتی، احتمال خطای نوع اول در آن در شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده صفات بالا خواهد رفت. هر چند که در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب وجود چرخه میوزی کافی، میزان عدم تعادل بین مکان‌هایی با پیوستگی ضعیف و خطایی نوع اول را کاهش می‌دهد ولی میزان کاهش، به اندازه تلاقی تصادفی نیست. همچنین برای تولید چنین جمعیت‌های نیاز به زمان طولانی در مقایسه  $F_2$ ، هاپلوئیدی مضاعف و تلاقی برگشتی است. از طرف دیگر، تولید جمعیت‌های مصنوعی به علت عدم امکان انجام تلاقی لازم در تعدادی از گونه‌ها مثل انسان و یا گیاهان دگرگشن مثل درختان عملی نبوده و یا بسیار مشکل است (Gupta *et al.*, 2005). تاکنون تحقیقات بیشماری درباره‌ی تجزیه پیوستگی اجرا شده است، اما زمان‌بر بودن تولید جمعیت‌های مصنوعی و اطلاعات ژنتیکی محدود موجود در جمعیت‌های در حال تفرق تولید شده در مقایسه با اطلاعات جامع‌تر و متنوع‌تر موجود در جمعیت‌های طبیعی سبب شده است تجزیه ارتباط در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای را در تحقیقات به نژادی به خود اختصاص دهد (Abdurakhmonov & Abdugarimov, 2008).

برای غلبه بر این محدودیت‌ها در سال‌های اخیر روش مکان‌یابی ارتباط یا تجزیه ارتباط معرفی شده است که نه تنها امکان مکان‌یابی دقیق ژن‌ها و مکان‌های کنترل‌کننده 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 جمعیت‌های در حال تفرق که نیاز به زمان زیادی دارد نمی‌باشد، ولی بهتر است از داده‌های فنوتیپی چندساله استفاده شود (Breseghello & Sorells, 2006). در تجزیه‌ی ارتباط، رابطه‌ی بین ژنوتیپ و فنوتیپ گیاه مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت با استفاده از نامتعادل بودن پیوستگی موجود در جمعیت‌های طبیعی و مجموعه‌های ژرمپلاسم بررسی می‌شود (Mohammadi, 2008). اگرچه خزانه‌ی ژنتیکی محصولات گیاهی که اکنون استفاده می‌شوند به دلیل اهلی شدن بسیار محدود شده است، استفاده از خویشاوندان وحشی با توجه به تنوع ژنتیکی زیاد، به عنوان مخازن غنی از تنوع ژنتیکی مفید خواهد بود. برای نمونه بازبازی ژن‌های مرتبط با صفات مهم و اقتصادی مانند عملکرد یا مقاومت به بیماری‌ها و تنش‌های غیرزیستی هم‌چون خشکی که ممکن است در روند اصلاح نباتات از دست رفته باشند، با استفاده از گونه‌های وحشی امکان‌پذیر است، هم‌چنین در حل مشکل به نژادگران برای شناسایی ژن‌های مناسب و ورود آنها در جمعیت‌های اصلاحی مفید خواهد بود (Mohammadi, 2005; Fufa et al., 2005; Abdurakhmonov & Abdukarimov, 2008; 2006). بنابراین امروزه لزوم استفاده از جمعیت‌های طبیعی در برنامه‌های به‌نژادی بیش از پیش احساس می‌شود. استفاده از نشانگرهای DNA لازمه‌ی اجرای برنامه‌های مکان‌یابی ژنی است. فناوری نشانگرهای ابزاری برای افزایش کارایی برنامه‌های به‌نژادی است. نشانگر ISSR نشانگر غالب و ارزان قیمتی است که از اصول مندلی تبعیت می‌کند. نشانگر ISSR چندشکلی ژنتیکی بالای را نشان می‌دهد و بر بسیاری از محدودیت‌های تکنیکی نشانگرهای دیگر غلبه می‌کند. میزان تکرارپذیری در نشانگر ISSR بین ۹۲ تا ۹۵ درصد گزارش شده است.

مزایای ISSR شامل تکثیر زیاد، چندشکلی زیاد و به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه درباره‌ی ژنوم آزمایشی و نیز سرعت و درجه‌ی اطمینان بالا، امروزه در تحقیقات ژنتیکی از جمله مکان‌یابی صفات کمی استفاده می‌شود (Reddy et al., 2002). تجزیه‌ی ارتباط در گیاهان بسیاری استفاده شده است. هامزا و همکاران (Hamza et al., 2004) در پژوهشی ۱۷ نشانگر ریزماهوره برای بررسی تنوع ژنتیک ۲۶ گونه‌ی جو و تعیین ارتباط این نشانگرها با برخی صفات مورفولوژیک استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند همبستگی مثبت و معنی‌داری بین برخی از نشانگرها و داده‌های مورفولوژیکی وجود دارد. در ضمن با توجه به پژوهش Achleitner et al., 2008 بر روی ۱۱۴ گونه یولاف، با استفاده از ۷۷ نشانگر چندشکل حاصل از هشت ترکیب آغازگری، تجزیه ارتباط را برای مکان‌یابی عملکرد و اجزای عملکرد انجام دادند؛ درنهایت ۲۳ نشانگر را با پتانسیل بالا و مرتبط با صفات پیچیده برای برنامه‌های اصلاحی بعدی معرفی کردند.

نظر به اهمیت تحقیقات ژنتیکی در ارتباط با تنش خشکی در برنج پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۵۹ ژنوتیپ برنج با استفاده از نشانگرهای ISSR و تجزیه ارتباط آنها به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته به صفات مرتبط با تنش خشکی و غرقاب در برنج طراحی و انجام شد.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط آنها به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته به صفات مرتبط با تنش خشکی و غرقاب ۵۹ ژنوتیپ برنج (جدول ۱) با استفاده ۱۰ نشانگر مولکولی بین ریز ماهواره‌ای ISSR انجام شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دو شرایط جداگانه، بدون تنش (غرقاب) و تنش خشکی در شهرستان علی آباد کتول با طول جغرافیایی ۵۴/۵۱ شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶/۵۴ شمالی با ارتفاع ۱۳۶ متر از سطح دریا، در سال زراعی ۱۳۹۲ انجام شد. این منطقه از نظر آب و هوایی جزء اقلیم معتدل و مرطوب محسوب می‌شود و دارای زمستان‌هایی سرد و تابستان گرم می‌باشد. آزمایش‌های مولکولی در آزمایشگاه اصلاح نباتات و ژنتیک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس انجام گرفت.

جدول ۱: ژنوتیپ‌های مورد بررسی در آزمایش

شماره	ژنوتیپ‌ها	شماره	ژنوتیپ‌ها	شماره	ژنوتیپ‌ها	شماره	ژنوتیپ‌ها
Non	genotypes	Non	genotypes	Non	genotypes	Non	genotypes
1	IR67015-49-2-6	16	IR60080-42	31	IR63372-15	46	IR60080-46A
2	IR 47686-12-5-B-1	17	IR77298-5-6	32	IR63377-08	47	Pegaso
3	Panda	18	IR60080-48	33	IR55423-01	48	IRAT212
4	Way Rarem	19	IRAT170	34	IR63380-08	49	LINE 213
5	IRFAON-308	20	سنگ جو	35	B6144F-MR-6-0-0	50	IR 55411-50
6	IR66421-062-1-1-2	21	USEN	36	CT6510-24-1-2	51	IRAT216
7	IR66417-18-1-1-1	22	IR30	37	AUS196	52	IRGC-15092RT-1031-62
8	IR 53236-342	23	IR62752-07	38	IR57924-24	53	IR70358-84-1-1
9	Caiapo	24	IR62761-20	39	IR66424-1-2-1-5	54	CT6510-24-7-8
10	IR68702-072-1-4-B	25	NONABOKA	40	CT6516-24-3-2	55	DAGADDESHI
11	IR65907-116-1-B	26	CT6510-24-1-2	41	CT13377-4-2-M	56	SAMBA MAHSURI
12	IR55419-04	27	IR7471-199-1-302	42	IR65261-09-1-B	57	UPLRi-7
13	Palawan	28	IR69626B	43	CT13382-8-3-M	58	LINE226
14	IR3441-97	29	عنبر بوی ایلام	44	IRAT177	59	LINE 835
15	IR70360-38-1-B-1	30	IR63371-38	45	WAB638-1		

برای تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک نمونه‌ای از سطح خاک (۰-۳۰ سانتی متر) تهیه و تجزیه آن در آزمایشگاه آب و خاک شهرستان گنبد انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه خاک در جدول (۲) گزارش شده است.

جدول ۲: مشخصات نمونه خاک مزرعه مورد آزمایش

نوع	ماسه (%)	لای (%)	رس (%)	پتاسیم قابل	فسفر قابل	ازت	کربن	مواد	هدایت	درصد	مشخصات
بافت				جذب	جذب	کل (%)	آلی (%)	خنثی	pH	اشباع	نمونه
خاک				(ppm)	(ppm)			شده (%)	(mS/cm)	(sp)	خاک

Soil sample	Saturation (sp)	Electrical conductivity (mS/cm)	pH	Neutral material (%)	Organic carbon (%)	Total nitrogen (%)	Absorbable Phosphorus (ppm)	Absorbable Potassium (ppm)	Clay (%)	Lai (%)	Sand (%)	Type of soil
	79.9	10.5	7.9	4	2.43	0.24	9.8	295	52	36	12	C

بذرها به مدت ۲۴ ساعت در آب معمولی خیسانده شدند، سپس در پارچه‌های نخی قرار داده شدند تا جوانه‌دار شوند. در این مدت، بذرها چندین بار به آرامی تکان داده شدند تا جوانه‌زنی به طور یکنواخت انجام شود و برای خشک نشدن بذرها، چندین بار آب پاشی روی بذرها انجام شد. خزانه به طریق ژاپنی احداث شد، بدین ترتیب که سطح خزانه بالاتر از جوی‌های آبیاری طرفین قرار گرفت، سپس آبیاری خزانه انجام شد و زمانی که سطح آن کاملاً مرطوب شد آب اضافی خارج گردد و در نهایت بذور جوانه‌دار شده در سطح خزانه پاشیده شدند. هم‌زمان با رشد نشاها در خزانه اقدام به آماده سازی زمین اصلی شد. انتقال نشاها به زمین اصلی زمانی که طول گیاهچه‌ها به حدود ۳۰ سانتی متر رسید صورت گرفت.

اندازه واحدهای آزمایشی دو متر مربع به ابعاد (۱×۲) و با فاصله یک متر از یکدیگر در نظر گرفته شده بعد از انتساب تصادفی تیمارها به واحدهای آزمایشی نشاکاری به صورت یک بوته در هر کپه انجام شد. هر ژنوتیپ در پنج ردیف با فاصله ۲۵ سانتی‌متر بین بوته‌ها و ۲۵ سانتی‌متر بین ردیف‌ها در ردیف‌های به طول دو متر کشت شد. آبیاری مزرعه آزمایشی در هر دو محیط غرقاب و تنش، تا مرحله پنجه‌دهی ارقام به طور یکسان به طور غرقاب انجام شد سپس برای ایجاد تنش، آبیاری از ۴۰ روز پس از نشاء (مرحله حداکثر پنجه‌زنی) تا پایان فصل زراعی به فاصله ۲۵ روز انجام شد.

صفات مورد مطالعه؛ شامل طول خوشه (از گره زیر خوشه تا انتهای خوشه بدون در نظر گرفتن ریشک برحسب سانتیمتر)، تعداد خوشه چه، دانه پوک، طول خروج خوشه از غلاف (خروج خوشه‌ها از بالای غلاف برگ پرچم تا گره زیر خوشه در زمان رسیدگی)، طول برگ پرچم (از زیر برگ پرچم تا نوک آن بر حسب سانتیمتر)، عرض برگ پرچم (عرض برگ پرچم از پهن‌ترین قسمت برگ پرچم بر حسب سانتیمتر)، مساحت برگ پرچم (طول و عرض برگ پرچم در ضریب ۰/۷۵)، دانه کل خوشه، ارتفاع بوته (ارتفاع بلندترین پنجه از ناحیه طوقه در سطح خاک تا نوک خوشه بدون احتساب ریشک بر حسب سانتیمتر)، تعداد خوشه بوته، وزن کاه بوته، وزن خوشه، وزن کل بوته، باروری (از تقسیم تعداد دانه بر تعداد کل دانه‌ها)، تعداد دانه پرخوشه، وزن دانه پرخوشه، عملکرد در هکتار (عملکرد شلتوک در یک هکتار برحسب تن)، وزن کاه در هکتار (وزن کاه در یک هکتار برحسب تن)، شاخص برداشت (از تقسیم وزن دانه بر وزن کل گیاه)، تعداد روز تا گلدهی (تعداد روزهای از کاشت نشاها در زمین اصلی تا مرحله ۵۰ درصد گلدهی بوته‌های هر کرت)، تعداد روز تا رسیدگی (تعداد روزهای از کاشت نشاها در زمین اصلی تا مرحله رسیدگی کامل بوته‌های هر کرت)، دوره پر شدن دانه (از تفریق تعداد روز تا گلدهی به تعداد روز تا رسیدگی). برای رکیه صفات از هر واحد آزمایشی ۱۵ بوته به طور تصادفی با حذف اثر حاشیه انتخاب شدند و اندازه گیری انجام شد. برای تجزیه ارتباط از میانگین تکرارهای هر ژنوتیپ استفاده شد.

### استخراج DNA و انجام ISSR

استخراج برگ‌های جوان گیاهچه‌های ۲۱ روزه در مرحله چهار برگ‌گی با استفاده از روش CTAB انجام شد (1990 Doyle & Doyle). برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز آگار ۱ درصد استفاده شد. در این تحقیق برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برنج از ۱۰ نشانگر بین ریز ماهواره (جدول ۳) استفاده شد.

جدول ۳: نشانگرهای بین ریز ماهواره (ISSR) مورد بررسی در آزمایش

نشانگرها Markers	توالی آغازگر (۳-۵) Primer sequences (3-5)	دمای اتصال Annealing temperature	نشانگرها Markers	توالی آغازگر (۳-۵) Primer sequences (3-5)	دمای اتصال Annealing temperature
ISSR-1	(CAG) <sub>4</sub>	59.1	ISSR-6	(ATG) <sub>4</sub>	41.9
ISSR-2	(GAAT) <sub>4</sub>	43.8	ISSR-7	(CCA) <sub>4</sub>	44.7
ISSR-3	(CCTA) <sub>4</sub>	48	ISSR-8	(CT) <sub>8</sub> A	50
ISSR-4	(CT) <sub>8</sub> T	50	ISSR-9	(ACTG) <sub>4</sub>	48
ISSR-5	(CCA) <sub>4</sub>	61.1	ISSR-10	(GT) <sub>6</sub> CC	44

تکثیر قطعه DNA با واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master، ۱۰ میکرولیتر dH<sub>2</sub>O، ۱ میکرولیتر DNA و ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر به همراه یک قطره روغن منیرال برای جلوگیری از تبخیر انجام گرفت. واکنش PCR با دستگاه ترموسایکر با برنامه PCR شامل مراحل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ادامه ۳۵ چرخه به صورت واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ سانتی‌گراد، اتصال آغازگرها به مدت ۶۰ ثانیه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر و مرحله توسعه رشته جدید به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای توسعه نهایی رشته‌های جدید انجام شد و سپس محصولات تکثیر یافته واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از ژل آگار ۱/۵ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شد. ژل‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل (ژل‌داک) قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور فرابنفش مورد مشاهده قرار گرفت. تکرارپذیری باندها به وسیله تکرار عملیات PCR و الکتروفورز مجدد آنها ارزیابی شد. باندهای تکثیر یافته بصورت یک (حضور باند) و صفر (عدم حضور باند) نمره‌دهی شد.

### تجزیه‌های آماری

بعد از امتیازبندی نوارها، آماره تنوع ژنتیکی شامل محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) با استفاده از رابطه یک انجام شد.

$$PIC_i = 2 f_i(1 - f_i)$$

رابطه (۱)

در این رابطه PIC، PICi، نشانگر  $f_i$  فراوانی قطعه نشانگر  $f_i$  نام هنگام وجود و  $(1-f_i)$  فراوانی قطعه نشانگر  $f_i$  نام در حالت عدم وجود نوار است (Roldin-Ruiz *et al.*, 2000) این شاخص با استفاده از نرم افزار Excel محاسبه شد.

سایر آماره‌ها مانند تعداد آلل موثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی، شاخص نشانگری و شاخص شانون (Weaver, 1963) Shannon & (Shannon & Yeh *et al.*, 1997) Pop Gene با استفاده از نرم افزار Pop Gene (Yeh *et al.*, 1997) محاسبه شدند. برای انجام تجزیه ساختار و تفکیک کل جمعیت‌های متمایز از لحاظ ساختار ژنتیکی از نرم افزار STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2002) استفاده شد. از آنجایی که در مورد ساختار جمعیت اطلاعات قبلی در دست نبود تعداد بهینه K با شبیه سازی محاسبه گردید. منظور از K تعداد زیر جمعیت‌های مورد مطالعه در جمعیت مورد نظر با استفاده از نرم افزار STRUCTURE می‌باشد. در حقیقت تعیین تعداد زیر جمعیت‌های ساختار ژنتیکی برای انجام تجزیه‌های آماری مهم مثل تجزیه ارتباط برای تعیین نشانگرهای معنی‌دار واقعی مرتبط با صفات اهمیت زیادی دارد. برای این منظور برای جمعیت مورد استفاده تعداد K از ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و برای محاسبه تعداد زیر جمعیت (K) از روش ایوانو (Evanno *et al.*, 2005) استفاده شد. جدول ۵ آماره‌های محاسبه شده برای تعیین مقدار K برای ژنوتیپ‌های برنج را نشان می‌دهد و شکل ۱ نمودار دو طرفه برای تعیین بهینه K را نشان می‌دهد. در این شکل مقدار  $k$  و  $\Delta K$  از نتایج مربوط به شبیه‌سازی در نرم افزار STRUCTURE استخراج گردید. مقدار بهینه K نقطه اوج منحنی است، که با توجه به نمودار، بهترین K در این مطالعه ۲ است. در واقع تجزیه ساختار نشان داد که تعداد خوشه‌های که پارامتر  $\Delta K$  را به حداکثر می‌رساند برابر ۲ می‌باشد. انتساب افراد به زیر جمعیت نیز مطابق روش (Spataro *et al.* 2011) انجام شد. برای هر فرد در هر گروه درصد عضویت محاسبه شد. مطابق این روش یک ژنوتیپ هنگامی می‌تواند به انتساب یک گروه درآید که درصد عضویت آن ۰/۷ یا بیشتر از آن باشد و در صورتی که درصد عضویت کمتر از ۰/۶۹ باشد به عنوان ژنوتیپ مخلوط در نظر گرفته می‌شود. در بررسی حاضر پس از تعیین تعداد K، ماتریس دودمان افراد یا ماتریس Q براساس آن تشکیل گردید. و برای انجام تجزیه ارتباط وارد نرم افزار TASSEL 4.1.32 (Bradbury *et al.*, 2007) گردید. تجزیه ارتباط با نرم افزار TASSEL با استفاده از ۴ مدل (جدول ۴) انجام گرفت.

جدول ۴: مدل آماری استفاده شده برای انجام تجزیه ارتباط نشانگرهای ISSR و صفات فنوتیپی

مدل Model	مجموعه داده‌های مورد استفاده Used data set
1.GLM <sup>a</sup>	Phenotype + ISSR
2.GLM	Phenotype + ISSR + Q <sup>b</sup>
3.MLM <sup>c</sup>	Phenotype + ISSR + K <sup>d</sup>
4.MLM	Phenotype + ISSR + K + Q

a: GLM: General linear mode

b: Q: Population structure data or Inferred ancestry of individuals

c: MLM: Mixed linear model

d: K: Kinship data derived from general similarity in genetic background arising from shared kinship

a مدل خطی عمومی

b داده‌های ساختار جمعیت یا اصل و نسب استنباط شده از افراد

c مدل خطی مخلوط

D داده‌های خویشاوندی حاصل از تشابه کلی افراد از لحاظ زمینه ژنتیکی ناشی از خویشاوندی

این نرم افزار امکان انجام تمام آزمون‌های مرتبط با مدل‌های و رویه‌های مانند GLM و MLM را فراهم می‌کند. رویه GLM رویه‌ای است که بدون دخالت ساختار جمعیت، ارتباط بین نشانگر و صفات اندازه‌گیری شده را به ما می‌دهد، نمی‌تواند خیلی مورد اعتماد باشد و کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. اخیراً بیشتر از رویه MLM برای درک بهتر ارتباط بین نشانگر و صفت استفاده می‌شود چون در پیدا کردن ارتباط، هم ماتریس‌های ساختار جمعیت و هم خویشاوندی بین افراد دخالت می‌دهد و اثرات ناشی از این عوامل را کم می‌کند و ارتباطات معنی‌دار شناسایی شده بین نشانگر و صفت از اطمینان و اعتبار بیشتری برخوردارند (Agrama *et al.*, 2007).

## نتایج و بحث

ژنوتیپ‌های مورد بررسی براساس ۱۰ نشانگر بین ریزماهواره در مجموع ۱۴۴ باند با میانگین ۱۴/۴ باند به ازای هر جایگاه نشانگری ایجاد نمود و از ۱۴۴ باند تشکیل شده ۶۹/۱۷ درصد از باندها چندشکل بودند. آغازگر 3- ISSR با ۱۹ باند و توالی آغازگری 4- CCTA بیشترین تعداد باند و آغازگر 5- ISSR با ۸ باند و توالی آغازگری 4- CCA کمترین تعداد باند را به خود اختصاص دادند. آغازگر 10- ISSR با توالی آغازگری 6- (GT) CC بیشترین درصد چند شکلی (۸۰ درصد) و آغازگر 9- ISSR با توالی آغازگری 4- ACTG کمترین درصد چند شکلی (۵۵/۵۵) داشتند. نشانگر 10- ISSR با ۳۴/۸ بیشترین شاخص نشانگری (MI) و نشانگر 4- ISSR با ۲۸/۲۳ کمترین مقدار شاخص نشانگری را داشتند.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها و معیار دقیق‌تری از میزان تنوع هر ژن را بیان می‌کند که مستقل از تعداد نمونه مورد مطالعه می‌باشد (Botstein *et al.*, 1980). بیشترین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) را آغازگر 7- ISSR با ۰/۴۹ و آغازگرهایی 2- ISSR، 8- ISSR، 9- ISSR و 10- ISSR با ۰/۴۷ کمترین مقدار PIC را به خود اختصاص دادند. 3- ISSR بالاترین میانگین تعداد آلل موثر (۱/۹۵) بالاترین میانگین شاخص نی (۰/۴۷) و شاخص شانون (۰/۶۷) را به خود اختصاص داده بودند. 9- ISSR کمترین میانگین تعداد آلل موثر (۱/۵۸)، شاخص شانون (۰/۶۳) و شاخص نی (۰/۴۴) را دارا بود. آغازگر 10- ISSR ((GT)<sub>6</sub>CC) با دارا بودن بیشترین درصد چندشکلی (۸۰ درصد) و شاخص نشانگری (۳۸/۴) نشانگر مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برنج بود (جدول ۵). چمنی محمص و همکاران (Chmani Mohassess *et al.*, 2011) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۹ لاین والدینی برنج شامل ۴ لاین ایرانی و ۵ لاین استحصالی از IRRI از ۱۲ نشانگر 24- ISSR و 24- نشانگر SSR استفاده نمودند. مجموع نشانگرهای SSR و ISSR در این تحقیق ۱۵۰ باند تشکیل شد که ۱۲۰ باند چندشکل بودند و مجموع چندشکلی ۶۸ درصد بود. تعداد باند برای هر نشانگر 2 تا ۱۷ متغیر بود و میانگین تعداد باند هر نشانگر معادل ۶/۵ برآورد شد. در مطالعه اعلمی و کرمی (Aalami & Karami, 2016) که بر روی ۴۰ رقم بومی و اصلاح شده



برنج ایرانی با استفاده از نشانگرهای ISSR، IRAP و REMA انجام گرفت با استفاده از این نشانگرها در کل ۳۰۹ نشانگر تشکیل گردید که ۲۷۲ نشانگر چندشکل بودند تعداد نوارها بین ۹ تا ۲۱ نوار متغیر بودند آنها میانگین تنوع ژنی، شاخص شانون و محتوای اطلاعات چند شکلی را به ترتیب ۰/۳۹، ۰/۵۷ و ۰/۳۵ گزارش نمودند. نتایج تحقیق آنها نیز مانند مطالعه حاضر، تکثیر موفق و نوارهای واضح روی ژل بود که به راحتی بین ژنوتیپها قابل نمره دهی و ارزیابی بودند، ضمن اینکه نشانگرهای ISSR در هر دو تحقیق چند شکلی بالایی را نشان دادند که دلالت بر کارایی این نشانگرها برای ارزیابی های ژنتیکی می باشد و همچنین تعداد نوارها تولید شده متغیر تقریباً مشابه بودند.

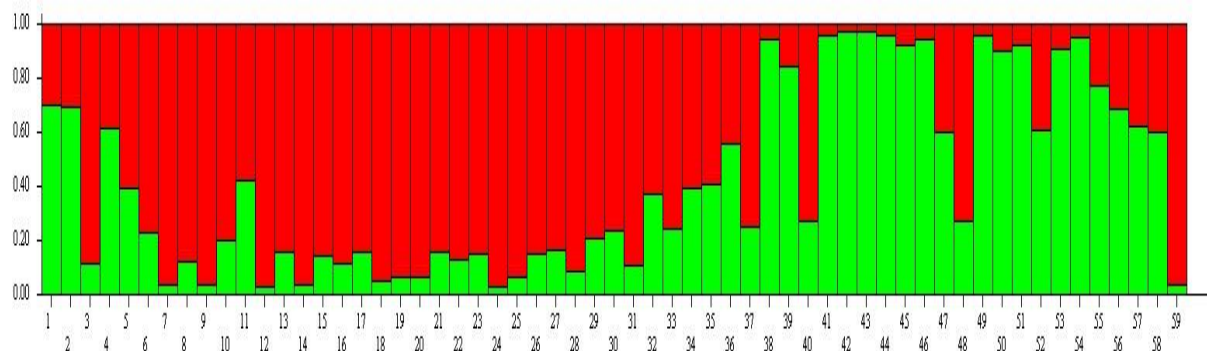
جدول ۵: تعداد آل موثر (NE)، شاخص نی (H)، شاخص شانون (I)، درصد چندشکلی (POL)، محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و شاخص نشانگری (MI) برای هر نشانگر بین ریزماهواره

نشانگرها Markers	NE	H	I	باندهای یک شکل Mono-Bands	باندهای چندشکل Poly-Bands	کل باندها Total bands	POL	PIC	MI
ISSR-1	1.79	0.42	0.61	4	7	11	63.63	0.48	30.54
ISSR-2	1.84	0.45	0.64	3	11	14	78.57	0.47	36.92
ISSR-3	1.95	0.48	0.67	6	13	19	68.42	0.48	32.84
ISSR-4	1.93	0.47	0.67	7	10	17	58.82	0.48	28.23
ISSR-5	1.83	0.44	0.64	2	6	8	75	0.48	36
ISSR-6	1.84	0.45	0.64	4	13	17	76.47	0.48	36.70
ISSR-7	1.85	0.45	0.64	5	12	17	70.58	0.49	34.58
ISSR-8	1.82	0.44	0.63	6	11	17	64.70	0.47	30.40
ISSR-9	1.58	0.34	0.52	4	5	9	55.55	0.47	26.10
ISSR-10	1.67	0.36	0.54	3	12	15	80	0.47	38.4
میانگین	-	-	-	4.4	10	14.4	69.17	0.47	33.07

### تجزیه ساختار ژنتیکی

تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم افزار STRUCTURE، امکان شکستن کل جمعیت به زیر جمعیت های با ساختارهای متفاوت متحمل را فراهم می سازد. زیر جمعیت های تشکیل شده از لحاظ ژنتیکی متمایز از هم می باشند و چنانچه ژنوتیپ های به صورت اختلاط یافته باشند، پس از انجام این تجزیه قابل تشخیص خواهند بود (Dadras, 2012; Pritchard *et al.*, 2000). بر طبق نتایج نرم افزار STRUCTURE، K و  $\Delta K$  که به ترتیب تعداد زیر گروه ها و میزان تغییرات آنها با توجه به شبیه سازی های انجام شده در نرم افزار می باشد، استخراج و نمودار دو بعدی آن رسم شد. شکل ۱ نمودار دو طرفه برای تعیین بهینه K را نشان می دهد که با توجه به نمودار بهترین K در این مطالعه که در واقع نقطه اوج منحنی است، ۲ می باشد. در واقع تجزیه ساختار نشان داد که تعداد خوشه هایی که پارامتر  $\Delta K$  را به حداکثر خود می رساند برابر ۲ می باشد. جدول ۷ درصد عضویت ۵۹ ژنوتیپ برنج را نشان می دهد بر این اساس ۳۲ ژنوتیپ شامل Panda، IR66421-062-1-1-2، IR66417-18-1-1-1، IR66417-18-1-1-1، IR60080-42، IR70360-38-1-B-1، IR3441-97، Palawan، IR55419-04، IR68702-072-1-4-B، Caiapo، 53236-342، IRAT170، سنگ جو، USEN، IR30، IR62752-07، IR62761-20، NONABOKA، CT6510-، IR77298-5-6، IR60080-48، IR69626B، IR7471-199-1-302، 24-1-2، ایلام، IR63371-38، IR63377-08، IR63372-15، IR55423-01، AUS196،





شکل ۲: بار پلات ساختار جمعیت مستخرج از نرم افزار STRUCTURE و نشانگرهای ISSR که در ۲ بخش رنگی تقسیم شده است. نام ژنوتیپ با شماره آنها در جدول ۱ آورده شده است، رنگ قرمز و سبز به ترتیب سهم عضویت در گروه یک و دو را نشان می‌دهد.

جدول ۷: درصد عضویت ژنوتیپ‌ها براساس نتایج مستخرج از نرم افزار STRUCTURE.

شماره	ژنوتیپ	درصد	درصد	شماره	ژنوتیپ	درصد عضویت	درصد
Number	Genotype	عضویت گروه ۱	عضویت گروه ۲	Number	Genotype	Member percentage of group 1	Member percentage of group 2
1	IR67015-49-2-6	0.294	0.706	31	IR63372-15	0.891	0.109
2	IR 47686-12-5-B-1	0.307	0.693	32	IR63377-08	0.626	0.374
3	Panda	0.879	0.121	33	IR55423-01	0.753	0.247
4	Way Rarem	0.379	0.621	34	IR63380-08	0.605	0.395
5	IRFAON-308	0.602	0.398	35	B6144F-MR-6-0-0	0.59	0.41
6	IR66421-062-1-1-2	0.767	0.233	36	CT6510-24-1-2	0.436	0.564
7	IR66417-18-1-1-1	0.961	0.039	37	AUS196	0.743	0.257
8	IR 53236-342	0.874	0.126	38	IR57924-24	0.055	0.945
9	Caiapo	0.962	0.038	39	IR66424-1-2-1-5	0.154	0.846
10	IR68702-072-1-4-B	0.799	0.201	40	CT6516-24-3-2	0.727	0.273
11	IR65907-116-1-B	0.574	0.426	41	CT13377-4-2-M	0.038	0.962
12	IR55419-04	0.968	0.032	42	IR65261-09-1-B	0.026	0.974
13	Palawan	0.84	0.16	43	CT13382-8-3-M	0.028	0.972
14	IR3441-97	0.961	0.039	44	IRAT177	0.041	0.959
15	IR70360-38-1-B-1	0.856	0.144	45	WAB638-1	0.073	0.927
16	IR60080-42	0.88	0.12	46	IR60080-46A	0.056	0.944
17	IR77298-5-6	0.837	0.163	47	Pegaso	0.4	0.6
18	IR60080-48	0.949	0.051	48	IRAT212	0.722	0.278
19	IRAT170	0.934	0.066	49	LINE 213	0.04	0.96
20	سنگ جو	0.934	0.066	50	IR 55411-50	0.099	0.901
21	USEN	0.838	0.162	51	IRAT216	0.077	0.923
22	IR30	0.87	0.13	52	IRGC-15092RT-1031-62	0.392	0.608
23	IR62752-07	0.845	0.155	53	IR70358-84-1-1	0.091	0.909
24	IR62761-20	0.97	0.03	54	CT6510-24-7-8	0.049	0.951
25	NONABOKA	0.929	0.071	55	DAGADDESHI	0.227	0.773
26	CT6510-24-1-2	0.846	0.154	56	SAMBA MAHSURI	0.311	0.689
27	IR7471-199-1-302	0.83	0.17	57	UPLRi-7	0.373	0.627
28	IR69626B	0.908	0.092	58	LINE226	0.399	0.601
29	عنبر بوی ایلام	0.792	0.208	59	LINE 835	0.963	0.037
30	IR63371-38	0.758	0.242				

## تجزیه ارتباط

تجزیه ارتباط با استفاده از نرم افزار TASSEL اجرا شد که در آن از ماتریس Q مستخرج از نرم افزار STRUCTURE استفاده گردید و اگر اثر ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط در نظر گرفته نشود نتایج مثبت کاذب به وجود خواهد آمد (Brescghello & Sorells, 2006).

در این بررسی از ۴ مدل آماری برای تجزیه ارتباط استفاده شد که در جدول ۳ نشان داده شده است. در شرایط نرمال و تنش خشکی برای ۲۱ صفت مورد بررسی در سطح احتمال ۵ درصد به ترتیب ۱۵۹ و ۱۴۸ نشانگر معنی‌دار شدند (جدول‌های ۸، ۹). مدل MLM در کل توانست در شرایط نرمال ۹۶ نشانگر و در شرایط تنش خشکی ۸۰ نشانگر معنی‌دار را مرتبط با ۲۱ صفت مورد بررسی در سطح احتمال ۵ درصد شناسایی نماید، بدیهی است در مدل GLM تعداد زیادی از این نشانگرها در شرایط نرمال و تنش خشکی (به ترتیب ۱۳۰ و ۱۳۹) در سطح احتمال ۵ درصد شناسایی شدند (جدول ۸).

در شرایط نرمال بالاترین ضریب تبیین به نشانگر ISSR7-2 با توجه به تغییرات ۲۹/۲۷ درصد از تغییرات عملکرد با مدل MLM در سطح پنج درصد اختصاص داشت، همچنین نشانگر ISSR7-2 ۲۶/۹۴ درصد از تغییرات وزن دانه پر در خوشه با مدل GLM در سطح پنج درصد را به خود اختصاص داد. در شرایط تنش خشکی بالاترین ضریب تبیین به نشانگر ISSR1-6 با توجه به تغییرات ۲۲/۷۷ درصد از تغییرات روز تا خوشدهی با مدل GLM در سطح پنج درصد اختصاص داشت، همچنین نشانگر ISSR2-6 ۱۴/۲۰ درصد از تغییرات عرض برگ پرچم با مدل MLM در سطح پنج درصد را به خود اختصاص داد. در جدول ۹ برای نشانگرهای معنی‌دار سطح احتمال معنی‌داری به همراه ضریب تبیین نشانگر آورده شده است.

در این پژوهش نشانگرهای ISSR2-3 و ISSR2-7 برای صفت طول خوشه در هر چهار مدل به صورت مشترک در سطح احتمال پنج درصد هم در دو شرایط نرمال و خشکی معنی‌دار به دست آمد و برای صفت تعداد دانه پر در خوشه در شرایط نرمال نشانگرهای ISSR1-1 و ISSR9-5 در چهار مدل معنی‌دار برآورد شد، ولی در شرایط خشکی نشانگرهای ISSR1-6 و ISSR10-8 در چهار مدل به صورت مشترک معنی‌دار برآورد گردیدند. یو و باکلا (Yu and Buckler, 2006) به منظور بهبود بخشیدن به نتایج و کاهش اثر برآورد مثبت دروغین از مدل MLM در بررسی صفتهایی مثل زمان گلدهی، وزن خوشه و قطر خوشه در ذرت استفاده نمودند و نتایج دقیق‌تری را در مقایسه با مدل‌های خطی گزارش کردند. در این مطالعه نیز هم از روش GLM و هم روش MLM برای کاهش نتایج دروغین استفاده گردید. دادرس و همکاران (Dadras et al., 2014). در بررسی خود که بر روی ۵۰ ژنوتیپ توتون با استفاده از نشانگر AFLP انجام دادند برای صفت شاخص سطح برگ نشانگر E110-M160-23 را در هر چهار مدل معنی‌دار گزارش نمودند. در پژوهش حاضر برای صفت وزن خوشه در یک بوته در شرایط نرمال نشانگرهای ISSR3-1، ISSR7-12 و ISSR10-5 در تمامی مدل‌ها معنی‌دار به دست آمد و این در صورتی است که در شرایط تنش خشکی نشانگر ISSR6-11 در تمامی مدل‌ها معنی‌دار به دست آمد.

در شرایط تنش خشکی نشانگر ISSR2-8 بیشترین ضریب تبیین در صفات تعداد دانه پوک، باروری، وزن دانه پر و عملکرد و در شرایط نرمال ISSR7-2 بیشترین ضریب تبیین در صفات تعداد خوشه‌چه، تعداد خوشه در بوته، وزن دانه پر خوشه و عملکرد شناسایی شد. باید خاطر نشان نمود شناسایی نشانگرهای مرتبط با چندین صفت مهم می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی بسیار کاربردی باشد. آگراما و همکاران (Agrama *et al.*, 2007) با استفاده از مکان‌یابی ارتباطی، ارتباط ۱۲۳ نشانگر ریز ماهواره را با صفات مختلف دانه در ۱۰۳ ژنوتیپ برنج مورد بررسی قرار دادند و علاوه بر تایید اعتبار مدل MLM، ارتباط معنی‌دار پنج مکان با صفات عملکرد دانه، عرض دانه نسبت طول به عرض دانه، شش مکان با طول دانه و چهار مکان با وزن دانه را با استفاده از این مدل گزارش نمودند. در مطالعه حاضر صفت عملکرد در هکتار در شرایط نرمال با نشانگر ISSR7-2 در هر چهار مدل معنی‌دار به دست آمد و در شرایط تنش خشکی این صفت با نشانگر ISSR2-8 در هر چهار مدل معنی‌دار به دست آمد.

روی و همکاران (Roy *et al.*, 2010) در تحقیقی برای بررسی تجزیه ارتباط ۵۵ ژنوتیپ جو با ۱۴ صفت زراعی با نشانگرهای SSR، SAMPLE و AFLP انجام دادند. تجزیه ارتباط با استفاده از ۵۱۹ نوار چندشکل مشتق از ۲۰ نشانگر SSR، دو نشانگر SAMPLE و هشت ترکیب آغازگری AFLP انجام شد. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد در کل به ترتیب ۱۳۱، ۴۳ و ۱۶۶ نشانگر SSR، SAMPLE و AFLP حداقل با یکی از ۱۴ صفت ارتباط معنی‌داری دارند. از بین این تعداد با در نظر گرفتن هر دو مدل GLM و MLM در بررسی آن‌ها، تعداد ۵۱ نشانگر به عنوان نشانگرهای مثبت و آگاهی بخش شناسایی شدند و در نهایت اظهار داشتند این نشانگرهای معنی‌دار پس از تایید و اعتبارسنجی می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی بسیار کاربردی باشند. در بررسی که به منظور شناسایی جایگاه صفات کمی و تجزیه ارتباط در ۱۵۵ ذرت اینبرد با ۱۵۳۶ SNP انجام شد. نشان داد که استفاده از مدل MLM ۱/۱۵، ۱/۱۵ و ۱/۶۶ درصد SNP ها ارتباط معنی‌دار با تمامی محتوای توکرفول در دانه ذرت، ارتفاع گیاه و طول دانه در سطح یک درصد داشتند. همچنین این تحقیق نشان داد که برای تمامی صفات استفاده از مدل مبتنی بر K و مدل مبتنی بر Q به تنهایی عملکرد خوبی ندارند اما استفاده از مدل مبتنی بر K و Q به طور مشترک در مدل MLM نتایج بهتری و موثرتری را در بر دارد (Yang *et al.*, 2010).

این پژوهش با استفاده از مجموعه‌ی متنوعی از ژنوتیپ‌های برنج و ۱۰ نشانگر ISSR به شناسایی نشانگرهایی منجر شد که پیوسته به مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مهم برنج در تنش خشکی بودند. این نشانگرها در صورت تأیید ممکن است در برنامه‌های اصلاحی و بهبود صفات در شرایط تنش خشکی بسیار مفید و کارا باشند.

**جدول ۸. نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرهای ISSR و صفات مختلف در شرایط نرمال با ۴ مدل آماری**

نشانگرهای معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (Significant markers in 5% probability level)

صفات traits	نشانگرها Marker	مدل ۱ Model 1		نشانگرها Marker	مدل ۲ Model 2		نشانگرها Marker	مدل ۳ Model 3		نشانگرها Marker	مدل ۴ Model 4	
		سطح احتمال Prob	R <sup>2</sup>		سطح احتمال Prob	R <sup>2</sup>		سطح احتمال Prob	R <sup>2</sup>		سطح احتمال Prob	R <sup>2</sup>
طول خوشه length Panicle	ISSR2-3	0.01809	0.09415	ISSR2-3	0.01665	0.11376	ISSR2-3	0.02463	0.09187	ISSR2-3	0.02652	0.11056
	ISSR2-7	0.00773	0.11799	ISSR2-7	0.02433	0.10135	ISSR2-7	0.01262	0.11437	ISSR2-7	0.03696	0.09714
	ISSR2-10	0.04702	0.06743	ISSR2-10	0.03902	0.08591				ISSR2-10	0.0489	0.0861
تعداد خوشه چه Spikelet number	ISSR5-5	0.02465	0.08547	ISSR3-10	0.008	0.13893	ISSR5-5	0.03529	0.08016	ISSR3-8	0.03919	0.0957
	ISSR7-2	0.02764	0.08226	ISSR4-7	0.04152	0.0847				ISSR3-10	0.03856	0.09635
				ISSR5-2	0.03516	0.09018				ISSR7-2	0.03086	0.10538
				ISSR7-2	0.00701	0.14321				ISSR7-11	0.03239	0.1034
				ISSR7-11	0.04161	0.08463				ISSR9-5	0.04625	0.08911
				ISSR9-5	0.03807	0.08756						
تعداد دانه پوک Number of unfilled grain per panicle	ISSR1-4	0.01483	0.09972	ISSR1-4	0.02423	0.10695	ISSR1-4	0.02564	0.09054	ISSR1-4	0.04401	0.09317
	ISSR2-1	0.00842	0.1156	ISSR2-1	0.03444	0.09483	ISSR2-1	0.01263	0.11434	ISSR7-7	0.03171	0.10666
	ISSR6-3	0.03007	0.0799	ISSR7-7	0.01976	0.11397	ISSR6-11	0.03814	0.07767	ISSR9-2	0.03597	0.10143
	ISSR6-11	0.02689	0.08302	ISSR10-5	0.00128	0.20605	ISSR10-5	0.00248	0.17285	ISSR10-5	0.00335	0.2083
	ISSR7-10	0.04465	0.06887									
	ISSR10-5	6.47E-04	0.18609									
طول خروج خوشه از غلاف length of the panicle	ISSR2-9	0.00854	0.11522	ISSR7-2	0.01943	0.11546	ISSR2-9	0.00965	0.12352	ISSR1-6	0.02551	0.10879
	ISSR6-6	0.02904	0.08087	ISSR7-6	0.02033	0.11389	ISSR7-6	0.01267	0.1141	ISSR6-6	0.03463	0.09674
	ISSR7-6	0.00506	0.12985	ISSR10-1	0.03833	0.09186	ISSR10-1	0.03595	0.07948	ISSR6-9	0.03431	0.09711
	ISSR8-3	0.04901	0.06628	ISSR10-9	0.04453	0.08667				ISSR7-6	0.01775	0.12346
	ISSR10-1	0.02247	0.08806	ISSR10-12	0.03362	0.09642				ISSR10-1	0.0427	0.08867
	ISSR10-12	0.04266	0.07013							ISSR10-7	0.04799	0.08423
طول برگ پرچم Flag leaf length	ISSR2-8	0.0355	0.07525	ISSR2-8	0.01976	0.11202	ISSR2-8	0.04116	0.07525	ISSR2-8	0.02695	0.11202
	ISSR7-3	0.01208	0.10549	ISSR7-3	0.01894	0.11346	ISSR7-3	0.01638	0.10549	ISSR7-3	0.02604	0.11346
عرض برگ پرچم Flag leaf width	ISSR1-7	0.00459	0.13253	ISSR1-5	0.04708	0.08328	ISSR1-7	0.00933	0.12483	ISSR1-7	0.01179	0.1491
	ISSR2-1	0.0272	0.08271	ISSR1-7	0.01056	0.13422	ISSR2-6	0.00615	0.13959	ISSR2-6	0.00537	0.18522
	ISSR2-6	5.95E-04	0.18834	ISSR2-6	0.00165	0.19601	ISSR3-7	0.03341	0.08191	ISSR3-7	0.01985	0.12623
	ISSR2-7	0.04992	0.06577	ISSR3-7	0.01387	0.12494	ISSR10-1	0.03903	0.07693	ISSR3-9	0.02605	0.11462
	ISSR3-7	0.02294	0.08748	ISSR3-9	0.02213	0.10903	ISSR10-2	0.03788	0.07788	ISSR10-1	0.03432	0.10309
	ISSR6-4	0.03357	0.07682	ISSR6-11	0.02711	0.1021						
	ISSR6-9	0.03401	0.07646	ISSR10-1	0.02228	0.1088						
	ISSR7-9	0.03183	0.07831	ISSR10-2	0.04163	0.08746						
تعداد دانه کل خوشه Number of grain per plant	ISSR10-1	0.0118	0.10614									
	ISSR10-2	0.00716	0.12013									
	ISSR10-12	0.03838	0.07308									
	ISSR2-1	0.04764	0.06707	ISSR2-1	0.02257	0.10987	ISSR3-6	0.03687	0.07875	ISSR2-9	0.03268	0.10366
تعداد خوشه در بوته Number of panicle	ISSR5-3	0.0485	0.06657				ISSR5-3	0.00307	0.16488	ISSR3-6	0.03903	0.09645
							ISSR5-5	0.01608	0.10609	ISSR6-8	0.0337	0.10241
							ISSR6-13	0.02526	0.09102	ISSR6-13	0.037	0.09861
							ISSR10-7	0.03258	0.08273	ISSR9-5	0.04388	0.09175
ارتفاع بوته Plant height	ISSR4-7	0.00281	0.14611	ISSR4-7	0.02113	0.11237	ISSR4-7	0.00774	0.13134	ISSR4-7	0.02675	0.11383
	ISSR8-3	0.02967	0.08027	ISSR6-10	0.04889	0.08331	ISSR9-2	0.02406	0.09258	ISSR8-3	0.03998	0.09711
	ISSR9-2	0.01159	0.10665	ISSR7-9	0.04571	0.08563						
				ISSR8-3	0.03265	0.09727						
تعداد خوشه در بوته Number of panicle	ISSR4-3	0.01276	0.10394	ISSR7-2	3.48E-04	0.24976	ISSR4-3	0.01919	0.10013	ISSR7-2	0.00182	0.23795
	ISSR7-2	0.00267	0.1475	ISSR9-1	0.02125	0.11236						
وزن کاه بوته Number of panicle	ISSR9-1	0.03235	0.07785									
	ISSR8-6	0.00609	0.12466	ISSR7-3	0.02308	0.1095	ISSR8-6	0.02398	0.09275	ISSR8-6	0.03389	0.10351
	ISSR8-10	0.00909	0.11347	ISSR8-6	0.01296	0.12954	ISSR8-10	0.02722	0.08859	ISSR8-10	0.02506	0.11614
			ISSR8-10	0.00274	0.18254							

ارتفاع بوته Plant height												
وزن خوشه بوته Panicle weight	ISSR3-1	0.01568	0.09817	ISSR3-1	0.01279	0.12902	ISSR3-1	0.02886	0.08665	ISSR3-1	0.02772	0.11202
	ISSR6-1	0.03106	0.07899	ISSR6-3	0.03649	0.09291	ISSR6-1	0.03422	0.08114	ISSR7-12	0.03695	0.10007
	ISSR6-3	0.01017	0.1103	ISSR7-12	0.01553	0.12236	ISSR6-3	0.03056	0.08478	ISSR10-5	0.01558	0.13682
	ISSR6-5	0.04987	0.0658	ISSR10-5	0.01022	0.1367	ISSR7-12	0.00928	0.12502			
	ISSR7-12	0.00378	0.13795				ISSR10-5	0.00665	0.13677			
وزن کل بوته Total plant weight	ISSR3-1	0.02724	0.08267	ISSR5-1	0.01558	0.12291	ISSR3-1	0.03266	0.08267	ISSR5-1	0.02161	0.12291
	ISSR6-3	0.03535	0.07537	ISSR7-7	0.04495	0.08621	ISSR6-3	0.04101	0.07537	ISSR8-10	0.02077	0.1246
مساحت برگ پرچم Flag leaf area	ISSR1-7	0.00585	0.12577	ISSR1-7	0.01263	0.1257	ISSR1-7	0.01028	0.12147	ISSR1-7	0.02012	0.12346
	ISSR2-1	0.0375	0.07373	ISSR2-6	0.0047	0.15838	ISSR2-1	0.02922	0.08627	ISSR2-6	0.01305	0.14206
تعداد دانه پر در خوشه number of filled Seeds	ISSR2-6	0.00132	0.16693	ISSR6-11	0.02113	0.10851	ISSR2-6	0.01374	0.11148	ISSR6-11	0.04467	0.0907
	ISSR2-7	0.04847	0.06659	ISSR10-1	0.0311	0.09556	ISSR10-2	0.02559	0.0906	ISSR10-1	0.03312	0.10273
	ISSR3-13	0.04448	0.06897									
	ISSR6-4	0.04939	0.06607									
	ISSR7-9	0.03737	0.07382									
	ISSR10-1	0.01459	0.10019									
	ISSR10-2	0.01729	0.09541									
درصد باروری Fertility	ISSR10-12	0.04505	0.06862									
	ISSR1-4	0.04921	0.06616	ISSR1-4	0.02618	0.10356	ISSR5-6	0.03162	0.08371	ISSR1-4	0.03758	0.09974
	ISSR5-6	0.02375	0.0865	ISSR4-1	0.02592	0.10391	ISSR6-11	0.03539	0.08008	ISSR4-10	0.03171	0.10679
	ISSR6-11	0.03015	0.07982	ISSR4-10	0.02636	0.10332	ISSR8-10	0.03833	0.07753	ISSR5-6	0.00775	0.1688
	ISSR8-10	0.02968	0.08027	ISSR5-6	0.00384	0.16861	ISSR10-5	0.01542	0.10755	ISSR10-5	0.03928	0.09792
وزن دانه های پر خوشه Weight of filled grain per panicle	ISSR10-5	0.00939	0.11256	ISSR10-5	0.01308	0.12729						
	ISSR1-1	0.0339	0.07655	ISSR1-1	0.01749	0.11312	ISSR1-1	0.03953	0.07655	ISSR1-1	0.03442	0.09991
	ISSR1-6	0.02574	0.08426	ISSR7-11	0.0166	0.11485	ISSR1-6	0.03109	0.08426	ISSR7-11	0.0332	0.10136
	ISSR2-7	0.02129	0.08957	ISSR9-3	0.02555	0.10063	ISSR2-7	0.02641	0.08957	ISSR9-3	0.02771	0.10868
عملکرد در هکتار Yield per hectare	ISSR9-5	0.02866	0.08124	ISSR9-5	9.43E-04	0.20682	ISSR9-5	0.03413	0.08124	ISSR9-5	0.00397	0.19366
	ISSR10-7	0.03347	0.07691				ISSR10-7	0.03908	0.07691			
تعداد روز تا خوشه دهی Days to Flowering	ISSR2-6	0.00999	0.11082	ISSR2-6	0.03117	0.09556	ISSR2-6	0.01645	0.10525	ISSR7-2	0.00105	0.25797
	ISSR7-2	0.00155	0.1625	ISSR7-2	1.34E-04	0.26944	ISSR7-2	0.00453	0.15048	ISSR7-6	0.03855	0.0955
	ISSR10-2	0.04266	0.07014	ISSR7-6	0.03447	0.09219						
تعداد روز تا رسیدگی Days to maturity	ISSR2-6	0.00564	0.1268	ISSR2-6	0.02129	0.10748	ISSR5-5	0.04394	0.07315	ISSR7-2	4.99E-04	0.29274
	ISSR5-5	0.02669	0.08324	ISSR7-2	3.23E-05	0.30775	ISSR7-2	0.00122	0.19972	ISSR7-6	0.03905	0.09393
	ISSR7-2	2.75E-04	0.2088	ISSR7-6	0.03489	0.09106						
	ISSR1-6	0.0026	0.14822	ISSR1-6	0.00115	0.21115	ISSR1-6	0.00484	0.14821	ISSR1-6	0.00339	0.2079
مدت زمان رسیدگی Grain filling duration	ISSR4-9	0.0314	0.07869	ISSR3-2	0.03746	0.09262	ISSR4-9	0.03697	0.07868	ISSR3-2	0.04435	0.09296
	ISSR6-4	0.03154	0.07857	ISSR6-4	0.0435	0.08743	ISSR6-4	0.03712	0.07855	ISSR6-11	0.02371	0.11907
	ISSR6-11	0.03403	0.07644	ISSR6-11	0.01589	0.12236	ISSR6-11	0.03966	0.07644	ISSR10-5	0.04405	0.09323
	ISSR7-6	0.02494	0.08514	ISSR7-6	0.04633	0.08526	ISSR7-6	0.03027	0.08512			
	ISSR3-12	0.04477	0.06879	ISSR1-6	0.0354	0.09365	ISSR4-10	0.01087	0.11954	ISSR1-6	0.04319	0.09349
شاخص برداشت Harvest index	ISSR4-10	0.00673	0.12187	ISSR2-5	0.01632	0.12025	ISSR6-11	0.03961	0.07648	ISSR2-5	0.02645	0.11374
	ISSR6-11	0.0332	0.07713	ISSR6-11	0.0272	0.1027	ISSR10-5	0.04055	0.07573	ISSR6-11	0.03602	0.1009
	ISSR10-5	0.03325	0.07709	ISSR7-6	0.02996	0.09938				ISSR10-5	0.04091	0.09569
	ISSR10-5			ISSR10-5	0.02856	0.10102						
	ISSR1-6	0.04824	0.06672	ISSR1-2	0.02782	0.09955	ISSR1-7	0.01433	0.11001	ISSR1-2	0.0395	0.09672
	ISSR1-7	0.00849	0.11538	ISSR1-6	0.01416	0.12222	ISSR4-8	0.02329	0.0937	ISSR2-5	0.03744	0.0989
	ISSR3-12	0.02602	0.08395	ISSR2-5	0.02698	0.10059	ISSR5-1	0.02008	0.09862	ISSR3-11	0.01574	0.13548
	ISSR4-8	4.09E-04	0.19831	ISSR2-10	0.03526	0.0916	ISSR5-5	0.0469	0.07112	ISSR6-13	0.03557	0.10099
	ISSR5-1	0.00419	0.13509	ISSR3-11	0.00409	0.16339	ISSR6-7	0.01662	0.10498	ISSR8-11	0.01871	0.128
	ISSR6-4	0.00988	0.11113	ISSR4-8	0.02274	0.10633	ISSR10-11	0.00419	0.15344	ISSR10-11	0.01686	0.13251
	ISSR6-7	1.90E-04	0.21841	ISSR6-7	0.01942	0.11162						
ISSR7-1	0.01591	0.09775	ISSR6-13	0.04396	0.08421							
ISSR7-4	0.04042	0.07164	ISSR7-1	0.02676	0.10087							
ISSR7-5	0.03116	0.0789	ISSR8-4	0.0471	0.08191							
ISSR8-4	0.02333	0.08701	ISSR8-11	0.0159	0.11833							
ISSR9-4	0.03078	0.07924	ISSR10-11	0.01179	0.12835							
ISSR10-9	0.03837	0.07309										
ISSR10-11	0.00514	0.12938										
ISSR2-3	0.0357	0.0751	ISSR3-8	0.0494	0.0831	ISSR6-8	0.03454	0.08084	ISSR7-2	0.03024	0.10697	
ISSR5-5	0.04552	0.06833	ISSR7-2	0.03724	0.09289	ISSR8-10	0.01287	0.11369	ISSR8-10	0.02376	0.117	

ISSR6-8	0.02853	0.08137	ISSR7-3	0.01657	0.12101
ISSR8-10	9.55E-04	0.17561	ISSR8-10	0.00125	0.20855
			ISSR10-5	0.04019	0.09025

**جدول ۹- نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرهای ISSR و صفات مختلف در شرایط تنش خشکی با ۴ مدل آماری**

نشانگرهای معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در Model 1، 2، 3 و 4

صفات	نشانگرها	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4				
		سطح احتمال	R2	سطح احتمال	R2	سطح احتمال	R2	سطح احتمال	R <sup>2</sup>			
طول خوشه length Panicle	ISSR2-3	0.03802	0.07334	ISSR2-3	0.03311	0.08965	ISSR2-3	0.04421	0.073	ISSR2-3	0.04026	0.08965
	ISSR2-7	0.01179	0.10616	ISSR2-7	0.03659	0.08644	ISSR2-7	0.01625	0.10575	ISSR2-7	0.04384	0.08644
				ISSR2-10	0.04736	0.07817						
تعداد خوشه چه Spikelet number	ISSR4-7	0.03358	0.07681	ISSR1-5	0.02684	0.10323	ISSR4-7	0.03206	0.08326	ISSR3-10	0.03017	0.10782
				ISSR3-10	0.00713	0.14862				ISSR4-7	0.01358	0.14202
				ISSR4-7	0.00663	0.15109				ISSR5-2	0.01933	0.12664
				ISSR5-2	0.01336	0.12718				ISSR7-2	0.026	0.11404
				ISSR7-2	0.00656	0.15146				ISSR7-11	0.02586	0.11427
				ISSR7-11	0.03075	0.09855				ISSR9-5	0.02483	0.11599
تعداد دانه پوک Number of unfilled grain per panicle	ISSR2-8	0.00366	0.13878	ISSR2-8	0.00404	0.16779	ISSR2-8	0.00623	0.13914	ISSR2-8	0.01013	0.15283
	ISSR4-10		0.12477	ISSR4-10	0.03703	0.09217		0.00948	0.12432	ISSR4-10	0.03449	0.10083
	ISSR6-11	0.00606	0.07564	ISSR9-4	0.02731	0.10264	ISSR4-10	0.04113	0.07528	ISSR9-4	0.02753	0.11004
	ISSR9-4	0.03502	0.13243	ISSR10-5	0.01417	0.1252	ISSR9-4	0.00759	0.13214	ISSR10-5	0.01844	0.12683
	ISSR10-5	0.00461	0.15116				ISSR10-5	0.0045	0.15087			
طول خروج خوشه از غلاف length of the panicle exertion	ISSR2-1	0.0403	0.07172	ISSR6-6	0.04742	0.08449	ISSR2-1	0.04115	0.0752	ISSR1-6	0.02686	0.09977
	ISSR2-9	0.01541	0.09866	ISSR7-2	0.0113	0.13423	ISSR2-9	0.01607	0.10605	ISSR6-6	0.02345	0.10484
	ISSR6-6	0.02181	0.08891	ISSR7-6	0.02135	0.11217	ISSR6-6	0.03919	0.07675	ISSR6-9	0.02491	0.10257
	ISSR7-6	0.00577	0.12617	ISSR10-1	0.02809	0.10265	ISSR7-6	0.01328	0.11253	ISSR7-6	0.01563	0.12028
	ISSR10-1	0.02038	0.09081	ISSR10-9	0.03604	0.09399	ISSR10-1	0.03305	0.0822	ISSR10-1	0.04146	0.08394
	ISSR10-12	0.04438	0.06903	ISSR10-12	0.03786	0.09229				ISSR10-12	0.03607	0.08895
طول برگ پرچم Flag leaf length	ISSR2-8	0.03141	0.07867	ISSR2-8	0.0217	0.10982	ISSR2-8	0.03697	0.07868	ISSR2-8	0.02974	0.10982
	ISSR7-3	0.01067	0.10896	ISSR7-3	0.02016	0.11233	ISSR7-3	0.01479	0.10896	ISSR7-3	0.02802	0.11233
				ISSR7-7	0.03752	0.09111				ISSR7-7	0.04675	0.09111
عرض برگ پرچم Flag leaf width	ISSR1-7	0.00424	0.13474	ISSR1-7	0.01032	0.13717	ISSR1-7	0.007	0.13498	ISSR1-7	0.02058	0.12759
	ISSR2-6	0.00611	0.12458	ISSR2-6	0.00916	0.14128	ISSR2-6	0.01115	0.11864	ISSR2-6	0.01487	0.14205
	ISSR6-4	0.03381	0.07662	ISSR3-9	0.02237	0.11042	ISSR3-9	0.04838	0.07016	ISSR3-9	0.02605	0.11729
	ISSR7-9	0.01139	0.10714	ISSR6-11	0.0483	0.08376	ISSR7-9	0.02053	0.09789	ISSR6-11	0.04097	0.09806
تعداد دانه کل خوشه Number of grain per plant	ISSR1-6	0.01678	0.09626	ISSR1-6	0.03002	0.09892	ISSR1-6	0.01702	0.10419	ISSR1-6	0.03379	0.10328
	ISSR2-6	0.04249	0.07024	ISSR4-4	0.028	0.1013	ISSR7-2	0.04274	0.07406	ISSR7-2	0.02519	0.11552
	ISSR6-2	0.04775	0.067	ISSR7-2	0.017	0.11838	ISSR10-8	0.02477	0.09168	ISSR7-11	0.02869	0.11007
	ISSR7-2	0.02581	0.08417	ISSR7-11	0.02001	0.11281				ISSR10-8	0.04934	0.08793
ارتفاع بوته Plant height	ISSR4-7	0.00284	0.00284	ISSR4-7	0.02089	0.11275	ISSR4-7	0.00792	0.13054	ISSR4-7	0.02386	0.11879
	ISSR8-3	0.04811	0.04811	ISSR6-4	0.0341	0.09576	ISSR7-9	0.04102	0.07532	ISSR6-10	0.04442	0.09289
	ISSR9-2	0.01542	0.01542	ISSR6-10	0.02635	0.10469	ISSR9-2	0.03071	0.08461			
			ISSR7-9	0.02711	0.10371							



تعداد خوشه	ISSR4-3	0.02206	0.0885 8	ISSR7-2	0.02637	0.10435	ISSR4-3	0.01923	0.10009	ISSR7-6	0.02568	0.11512
بوته	ISSR5-3	0.00461	0.1324 4	ISSR7-6	0.02899	0.10108	ISSR5-3	0.01293	0.11355			
Number of panicle	ISSR7-2	0.02893	0.0809 8									
	ISSR10-2	0.02701	0.0829 1									
وزن کاه بوته	ISSR1-6	0.04523	0.0685 1	ISSR6-11	0.04124	0.08907	ISSR1-6	0.04659	0.07133			
Straw weight	ISSR6-11	0.04959	0.0659 5	ISSR10-3	0.03374	0.09601	ISSR10-3	0.02617	0.08986			
	ISSR10-3	0.01836	0.0937 4	ISSR10-8	0.04633	0.08505						
				ISSR10-10	0.04967	0.08265						
وزن خوشه	ISSR4-4	0.02766	0.0822 4	ISSR4-4	0.04336	0.08739	ISSR3-12	0.02382	0.09292	ISSR6-11	0.04348	0.09368
بوته	ISSR6-11	0.01698	0.0959 4	ISSR6-10	0.04263	0.08798	ISSR6-11	0.00954	0.12402	ISSR7-11	0.04369	0.09348
panicle weight	ISSR10-7	0.04935	0.0660 9	ISSR6-11	0.03419	0.09562				ISSR10-8	0.01035	0.15542
	ISSR10-8	0.00201	0.1553 3	ISSR7-11	0.03699	0.09289						
				ISSR10-7	0.04524	0.08593						
				ISSR10-8	0.00283	0.18096						
وزن کل بوته	ISSR4-8	0.01467	0.1000 4	ISSR2-8	0.0452	0.08611	ISSR4-8	0.03321	0.08213	ISSR10-8	0.0371	0.09952
Total plant weight	ISSR6-11	0.04624	0.0679	ISSR4-8	0.03619	0.09381	ISSR6-11	0.04175	0.07481	ISSR10-10	0.04039	0.09605
	ISSR7-2	0.0401	0.0718 6	ISSR9-1	0.03289	0.09713	ISSR10-8	0.02568	0.09049			
	ISSR8-1	0.0494	0.0660 6	ISSR10-10	0.03125	0.0989						
	ISSR10-3	0.03912	0.0725 5									
مساحت	ISSR1-7	0.00462	0.1323 5	ISSR1-7	0.00774	0.14293	ISSR1-7	0.00925	0.1251	ISSR1-7	0.01302	0.14119
برگ پرچم	ISSR2-6	0.00475	0.1315 8	ISSR2-6	0.01807	0.11451	ISSR2-6	0.02041	0.09805	ISSR2-6	0.03875	0.09573
Flag leaf area	ISSR6-4	0.02654	0.0834	ISSR6-11	0.0223	0.10742	ISSR7-9	0.0145	0.10958	ISSR6-11	0.03758	0.09695
	ISSR6-9	0.03551	0.0752 5	ISSR7-9	0.00647	0.14888				ISSR7-9	0.01072	0.14967
	ISSR7-9	0.0031	0.1434 4	ISSR10-1	0.04872	0.08111						
	ISSR10-1	0.02196	0.0887									
	ISSR10-2	0.0422	0.0704 4									
درصد	ISSR2-6	0.03076	0.0792 7	ISSR2-8	0.02391	0.10714	ISSR2-8	0.00753	0.13242	ISSR2-8	0.0332	0.10451
باروری	ISSR2-8	0.01017	0.1103 3	ISSR4-4	0.02785	0.1019	ISSR4-4	0.02969	0.08576	ISSR4-4	0.04899	0.08863
Fertility	ISSR4-4	0.02779	0.0821 1	ISSR10-8	0.04578	0.08484	ISSR7-3	0.04453	0.07277			
	ISSR6-2	0.04606	0.068				ISSR7-8	0.02785	0.08783			
تعداد دانه پر	ISSR1-6	0.01495	0.0995	ISSR1-6	0.02375	0.10736	ISSR1-6	0.00979	0.12316	ISSR1-6	0.02113	0.12351
در خوشه	ISSR2-8	0.04008	0.0718 7	ISSR1-7	0.04314	0.08686	ISSR6-2	0.03576	0.07974	ISSR6-2	0.0396	0.09718
Number of filled grains												
	ISSR6-2	0.0376	0.0736 6	ISSR4-4	0.04216	0.08765	ISSR7-11	0.03977	0.07635	ISSR7-2	0.02388	0.11827
	ISSR7-2	0.01942	0.0921 5	ISSR7-2	0.0106	0.13502	ISSR10-8	0.04209	0.07455	ISSR7-11	0.0203	0.12523
	ISSR10-8	0.0075	0.1188 4	ISSR7-11	0.01355	0.12663				ISSR10-8	0.03258	0.10522
				ISSR10-8	0.0082	0.14378						
وزن دانه	ISSR1-6	0.04377	0.0694 2	ISSR1-6	0.02988	0.0999	ISSR2-6	0.04982	0.06924	ISSR7-2	0.0031	0.20568
های پر	ISSR2-6	0.0329	0.0773 8	ISSR2-8	0.03883	0.09087	ISSR2-8	0.0154	0.10757			
خوشه	ISSR2-8	0.00853	0.1152 6	ISSR7-2		0.20305	ISSR7-2	0.02056	0.09785			
Grain Weight per panicle	ISSR7-2	0.01521	0.0990 2		0.00142		ISSR9-1	0.01728	0.10368			
	ISSR9-1	0.01267	0.1041 4									
	ISSR10-8	0.04428	0.0691									
عملکرد در	ISSR1-6	0.0285	0.0814	ISSR1-6	0.01006	0.13827	ISSR2-8	0.00729	0.13342	ISSR2-8	0.0209	0.12042
هکتار	ISSR2-8	5.89E-04	0.1886 2	ISSR1-7	0.04318	0.08775	ISSR9-1	0.04417	0.07294	ISSR6-2	0.03744	0.09663
Yield per hectare	ISSR9-1	0.03768	0.0736	ISSR2-4	0.04578	0.08574				ISSR7-2	0.00926	0.15538
	ISSR10-8	0.03633	0.0746 1	ISSR2-8	0.0053	0.16027						
				ISSR4-5	0.03138	0.09883						
				ISSR7-2	0.01262	0.13044						

تعداد روز تا خوشه دهی	ISSR1-6	0.00146	0.1640 5	ISSR1-6	6.76E-04	0.22772	ISSR1-6	0.00314	0.16405	ISSR1-6	0.00333	0.20809
Days to Flowering	ISSR4-9	0.04116	0.0711 3	ISSR3-2	0.04005	0.09002	ISSR4-9	0.04692	0.07113	ISSR3-2	0.0457	0.09143
	ISSR6-4	0.02455	0.0855 8	ISSR6-4	0.0203	0.11353	ISSR6-4	0.02985	0.08558	ISSR6-4	0.03728	0.09971
	ISSR6-11	0.02697	0.0829 5	ISSR6-11	0.01639	0.12091	ISSR6-11	0.03237	0.08295	ISSR6-11	0.03305	0.10468
	ISSR7-6	0.03946	0.0723 1					ISSR7-6	0.04519	0.07231		
تعداد روز تا رسیدگی	ISSR2-5	0.04693	0.0674 9	ISSR1-6	0.01583	0.11924	ISSR4-10	0.01124	0.11839	ISSR1-6	0.02191	0.11944
Days to maturity	ISSR3-12	0.04326	0.0697 5	ISSR2-5	0.03433	0.09309	ISSR6-11	0.03957	0.07651	ISSR2-5	0.04215	0.09269
	ISSR4-10	0.00653	0.1227 1	ISSR6-4	0.04981	0.08055			ISSR6-11	0.03254	0.1031	
	ISSR6-11	0.03145	0.0786 4	ISSR6-11	0.02489	0.10396			ISSR7-6	0.04819	0.0874	
	ISSR9-4	0.04381	0.0694 8	ISSR7-6	0.03788	0.08977						
	ISSR10-5	0.04431	0.0690 8	ISSR10-5	0.04655	0.08283						
مدت زمان رسیدگی	ISSR1-2	0.03136	0.0787 2	ISSR1-2	0.00287	0.1687	ISSR1-2	0.01964	0.0993	ISSR1-2	0.00655	0.16758
Grain filling rate	ISSR2-5	0.01767	0.0948 1	ISSR2-5	0.01856	0.10911	ISSR1-7	0.03628	0.07921	ISSR2-5	0.02585	0.10949
	ISSR3-12	0.00239	0.1506 2	ISSR3-12	0.0135	0.11941	ISSR3-12	0.01911	0.10022	ISSR3-12	0.02201	0.11601
	ISSR4-7	0.03686	0.0742 1	ISSR6-13	0.00768	0.13753			ISSR6-13	0.01234	0.14011	
	ISSR4-8	0.01817	0.0940 3									
	ISSR4-10	0.03733	0.0738 5									
	ISSR5-1	0.02951	0.0804 3									
	ISSR6-5	0.01747	0.0951 2									
	ISSR6-7	0.0105	0.1094 2									
	ISSR7-11	0.03668	0.0743 4									
	ISSR8-4	0.01437	0.1006 2									
	ISSR8-7	0.04469	0.0688 4									
	ISSR8-8	0.02999	0.0799 8									
	ISSR9-4	0.01046	0.1095 1									
	ISSR10-2	0.01692	0.0960 2									
	شاخص برداشت	ISSR4-4	0.01952	0.0920 1	ISSR6-10	0.00229	0.18847	ISSR4-4	0.02272	0.09452	ISSR4-7	0.04317
Harvest index	ISSR6-10	0.01275	0.1039 8				ISSR6-10	0.02118	0.09686	ISSR6-10	0.01029	0.15588
	ISSR10-8	0.04491	0.0687 0.0927				ISSR10-11	0.02095	0.09721			
	ISSR10-11	0.01902	4									

## منابع

- Abdurakhmonov, I.Y. and Abdukarimov, A. (2008). Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources (online). *Int. J. Plant Genomics*, 1-18.
- Achleitner, A., Tinker, N., Zechner, E. and Buerstmayr, H. (2008). Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits. *Theor. Appl. Gene.* 117: 1041-1053
- Agrama, H.A., Eizenga, G.C. and Yan, W. (2007). Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Mol. Breeding* 19: 341-356.

- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y. and Buckler, E.S. (2007). "TASSEL: Software for association mapping of complex traits in divers samples". *Bioinformatics Applications Note* 2633-2635.
- Breseghele, F. and Sorrells, M.E. (2006). Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Sci.* 46: 1323-1330.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Chmani Mohassess, F., Samie zadeh, H., Filing, D. and Rabiei, B. (2011). Genetic variation in rice, (*Oryza sativa* L.) by using molecular markers. *Third National Conference on Agricultural Biotechnology Iran.* 82-84
- Dadras, A.R. (2012). Evaluation of genetic diversity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars using AFLP molecular markers. Iran, Shahid Bahonar University of Kerman. M. Sc. Thesis.
- Dadras, A.R., Sabouri, H., Mohammadi-Nejad, Gh., Sabouri, A. and Shoaie-Daylami, M. (2014). Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. *Mol. Biol. Rep.* 41(5):3317-3329
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15.
- Evanno, G., Reganut, E. and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecology* 14: 2611-2620
- Fufa, H.P., Baenizger, S., Beecher, B.S., Dweikat, I., Graybosch, R.A. and Eskridge, K. M. (2005). Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. *Euphytica* 145: 133-146.
- Gupta, P.K., Rustgi, S. and Kulwal, P.L. (2005). Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology.* 57: 461-485.
- Hamza, S., Ben Hmida, W., Rebai, A. and Harrabi, M. (2004). SSR based genetic diversity assessment among Tunisian Winter Barley and relation sheep with morphological traits. *Euphytica*, 135, 107-118.
- Mohammadi, S.A. (2008). Innovative Approaches in Analysis of Plant Quantitative Traits Genetic Structure. In: proceeding of 10th Iranian Agronomy and Plant Breeding Congress. Seed and Plant Improvement Institute. Pp. 183-201.
- Mohammadi, S.A. (2006) Molecular analysis from viewpoint investigates of genetic variation. The 9th Iranian crop sciences congress.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Rosenberg, N.A. and Donnelly, P. (2000). Association mapping in structured populations. *The American Society of Human Genetics.* 67: 170-181.
- Roy, J.K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, S.H. and Gupta, P.K. (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science* 5: 683-689.
- Reddy, M.P. Sarla, N. and Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Roy, J.K., Smith, K.P., Muehlbauer, G.J., Chao, S., Close, T.J. and Steffenson, B.J. (2010). Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. *Mol. Breeding* 26: 243-256.

- Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti Zeuli, P. and Negri, V. (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor. Appl. Genet.* 122: 1281-1291
- Shannon, C.E. and Weaver, W. (1963). *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, Ill
- Takeda, S. and Matsuoka, M. (2008). Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population change. *Nature* 9: 444-457
- Yashitola, T.M., Sandarm, R., Biradar, S. and Thirumuragau, K. (2004). Sequence specific PCR Marker for distinguishing rice line at the basis of wild abortive cytoplasm for their congenic maintainer line. *Crop Science* 44: 920-924
- Yang, X., Yan, J., Shah, T., Warburton, M.L., Li, Q., Li, L., Gao, Y., Chai, Y., Fu, Z., Zhou, Y., Xu, S., Bai, G., Meng, Y., Zheng, Y. and Li, J. (2010). Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection. *Theor. Appl. Genet.* 121(3):417-31.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.J.B., Ye, Z.H. and Mao, J.X. (1997). POPGENE, The user-friendly shareware for population genetic analysis. Edmonton, Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada
- Yu, J. and Buckler, E.S. (2006). Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology* 17 (2): 155-160.
- Zhang, C. J., G. X. Ghen, X. X. Gao, and C. J. Chu. 2006. Photosynthetic decline in flag leaves of two field-grown spring wheat cultivars with different senescence properties. *South African Journal of Botany.* 72:15-23.

## Association analysis of genes controlling morphological traits in rice using ISSR markers in flooding and drought condition

Mohammad Reza Karim<sup>1</sup>, Hossein Sabouri<sup>2\*</sup>, Ahmad Reza Dadras<sup>3</sup>

### Abstract

Identification of quantitative traits loci, especially in stress, is one of the important issues in plant breeding. The present study was conducted to identify molecular markers that have a significant relationship with related traits in rice using ISSR markers and 59 rice genotypes and 21 agronomic traits in the flooding and drought stress conditions. The genotypes were based on ISSR markers in a total of 144 bands with an average of 14.4 bands for each marker, and 69.17% of the bands were polymorphic. The largest polymorphic information content (PIC) was found for ISSR-7 primer with 0.49 and the ISSR-2, ISSR-8, ISSR-9 and ISSR-10 primers with the 0.47 had the lowest PIC values. The association analysis was performed using population structure matrix with GLM and MLM statistical models using the TASSEL software for 21 variables. The MLM model was able to detect meaningful markers in flooding condition of 96 markers in drought stress conditions and related to 21 traits examined at a probability level of 5%. According to the results of association analysis in flooding conditions, the highest correlation coefficient (in the MLM model) of the ISSR27-2 allele was 29.27% and in the drought stress, the highest correlation coefficient (in the GLM model) was related to the ISSR1-6 allele of 77.7 22 percent. According to the results, it is anticipated that the use of ISSR markers identified in this study, if approved and after being confined, would be highly confident in the selection breeding programs with the help of the molecular marker.

**Keywords:** *Association analysis, Rice, Drought stress, ISSR, TASSEL*

---

1. Msc student of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University of Tehran

2. Associate Professor of Plant Production, College of Agriculture and Natural Resources, University Gonbad

\*(corresponding author: )

3. Research Assistant Professor of Olive Research Station of Taron, Crop and Horticultural Science Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran