



Association Analysis of Agronomic Traits of Foxtail Millet Germplasm using AFLP Marker

Akram Aminizadeh

Post graduate student of Plant Breeding Department, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Tel: +989135787820, Email: akram.aminizadeh@yahoo.com

Ghasem Mohammadi-Nejad

Associate Professor of Plant Breeding, Faculty of Agriculture & Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid-Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Tel: +989133415937, Email: mohammadinejad@yahoo.com

Babak Nakhoda

*Corresponding Author: Assistant professor of molecular physiology research department, Agricultural Biotechnology Research Institute, Iran Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Tel: +989123677137, Email: b.nakhoda@gmail.com

Abstract

Objective

Considering the importance and application of informative markers in the plant breeding programs, the current research aimed to identify the markers related to morphological traits using the association analysis in foxtail millet genotypes.

Materials and methods

The current study attempts to identify molecular markers relevant to morphological traits of 30 foxtail millet (*Setaria italica* L.) genotypes by applying an association analysis through a Mixed Linear Model (MLM). In order to avoid false linkage, a population structure study was first performed and 9 probable subgroups were observed in the studied genotypes.

Results

Association analysis, having taken the structure of the population and kinship relations into consideration in the 30 foxtail millet genotypes in question, represented 38 points of linkage with 12 morphological traits. The coefficient of determination at a highly significant level ($P < 0.01$) was variable from 0.102 and 0.328. The results showed that among the 12 primer combinations of AFLP used in this study, M-CTG/E-AAC, M-CTT/E-AAC and M-CTA/E-AAC were the most efficient in investigating the variety of the genotypes. Also, a number of markers such as M-CAA/E-AAC, M-CTG/E-AGC and M-CTT/E-AAC were connected to several traits such as height, leaf length and width, number of tillers, 1000- seed weight and grain yield, among which the highest connection was with M-CTT/E-AAC.

Conclusion

Identifying joint markers is of paramount importance in plant breeding plans because they make simultaneous selection of several traits possible. These markers can be used in screening germplasms in the presence of close linkages with the controlling genes. They also can be used in QTL identification programs in genotyping of foxtail millet cross populations. Therefore, the findings of this study can be applied in primary selection and breeding plans of foxtail millet using a Marker-Assisted Selection (MAS) process.

Keywords: AFLP marker, association analysis, Foxtail millet

Citation: Aminizadeh A, Mohammadi-Nejad G, Nakhoda B (2019) Association analysis of agronomic traits of foxtail millet germplasm using AFLP marker. *Agricultural Biotechnology Journal* 11(2), 173-189.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (2), 173-189.

DOI: 10.22103/jab.2019.12104.1051

Received: February 21, 2019; Accepted: June 9, 2019

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

تجزیه ارتباطی صفات مهم زراعی ژرم پلاسما ارزن دمروباهی با استفاده از نشانگر AFLP

اکرم امینی زاده

دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، تلفن:

۰۹۱۳۵۷۸۷۸۲۰، ایمیل: akram.aminizadeh@yahoo.com

قاسم محمدی نژاد

دانشیار اصلاح نباتات، بخش اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

کرمان، ایران، تلفن: ۰۹۱۳۳۴۱۵۹۳۷، ایمیل: mohammadinejad@yahoo.com

بابک ناخدا

* نویسنده مسئول: عضو هیات علمی بخش تحقیقات فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی ایران، کرج، ایران، تلفن: ۰۹۱۲۳۶۷۷۱۳۷، ایمیل: b.nakhoda@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۱

چکیده

هدف: با توجه به اهمیت و کاربرد نشانگرهای اطلاع‌رسان در برنامه‌های اصلاحی گیاهان زراعی، این تحقیق با هدف شناسایی

نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک با استفاده از روش تجزیه ارتباطی در ژنوتیپ‌های ارزن دمروباهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات زراعی در ۳۰ ژنوتیپ ارزن دمروباهی (ارزن ایتالیایی

Setaria italica L.)، از تجزیه ارتباطی با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) استفاده شد. جهت اجتناب از لینکاژ دروغین،

ابتدا مطالعه ساختار جمعیت انجام و ۹ زیرگروه احتمالی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شد.

نتایج: تجزیه ارتباطی با در نظر گرفتن ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی، ۳۸ مکان پیوسته با ۱۲ صفت زراعی را نشان داد.

ضریب تبیین نشانگر در سطح بسیار معنی‌داری از ۰/۱۰۲ تا ۰/۳۲۸ متغیر بود. نتایج نشان داد که از میان ۱۲ ترکیب آغازگری

AFLP استفاده شده در این مطالعه، ترکیبات آغازگری M-CTG/E-AAC، M-CTT/E-AAC و M-CTA/E-AAC

موثرترین ترکیب‌ها در بررسی تنوع ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند. همچنین تعدادی از نشانگرهای مورد بررسی نظیر M-

CAA/E-AAC، M-CTG/E-AGC و M-CTT/E-AAC با چندین صفت نظیر ارتفاع، طول و عرض برگ، تعداد پنجه، وزن هزاردانه و عملکرد دانه در ارتباط بوده که بیشترین ارتباط با ترکیب آغازگری M-CTT/E-AAC مشاهده شد.

نتیجه گیری: شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان دارد زیرا گزینش همزمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌کنند. این نشانگرها می‌توانند در صورت لینکاژ نزدیک با ژن‌های کنترل‌کننده، در غربال ژرم‌پلاسم استفاده شوند. همچنین در برنامه‌های شناسایی QTL در ژنوتیپ‌یابی جمعیت‌های حاصل از تلاقی ارزن مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین اطلاعات حاصل از این مطالعه می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی، جهت اصلاح به کمک نشانگر (MAS) در ارزن دم‌روبه‌ای مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: ارزن دم‌روبه‌ای، تجزیه ارتباطی، نشانگر AFLP

مقدمه

ارزن دم‌روبه‌ای یکی از قدیمی‌ترین گیاهان اهلی شده در جهان است که حدود ۸۰۰۰ سال پیش در ارتفاعات مرکزی چین اهلی شده است و از آنجا به هند و اروپا انتقال یافته و هم‌اکنون در سراسر جهان یافت می‌شود (Sapkota et al. 2016; Brink 2006). ارزن دم‌روبه‌ای به دلیل داشتن ژنوم کوچک و دیپلوئید، مقاومت در برابر خشکی، خویش‌امیزی، چرخه زندگی کوتاه و همچنین وجود مجموعه‌ای گسترده از ژرم‌پلاسم، به یک گیاه ایده‌آل برای تحقیقات ژنتیکی و مولکولی تبدیل شده است (Qi X et al. 2013; Jia XP et al. 2007). اندازه ژنوم ارزن دم‌روبه‌ای تقریباً ۴۹۰ Mb است که توسط موسسه ژنوم مشترک (JGI) وزارت انرژی آمریکا توالی‌یابی شده است. مشخص شدن ساختار ژنوم ارزن دم‌روبه‌ای باعث شده که بتوان سایر گیاهان را با آن مقایسه و تفسیر کرد. ارزن دم‌روبه‌ای مدلی است ارزشمند برای بررسی گیاهان C4 به ویژه آنهایی که به عنوان منابع زیست‌توده برای تولید سوخت‌های زیستی توسعه می‌یابند (Doust et al. 2009).

بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم موجود در سطح DNA با تنوع موجود در صفات فنوتیپی، ابزاری مهم در برنامه‌های اصلاح‌نباتات می‌باشد (Sakiroglu et al. 2012). مطالعه روابط بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی دارای کاربردهای متعددی است که می‌توان به برخی از آنها از جمله: امکان بررسی سایر ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای اطلاع‌رسان در سنجش پلی‌مورفیسم، شناسایی آلل‌های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرم‌پلاسمی، تسهیل مکان‌یابی دقیق آلل‌های صفات کمی و تأیید ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات کمی اشاره کرد (Gebhardt et al. 2004). شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات کمی بر مبنای عدم تعادل پیوستگی است و به دو روش اصلی، تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباطی صورت می‌گیرد. در روش تجزیه پیوستگی اغلب از جمعیت‌های ساختگی مانند F₂، تلاقی برگشتی و هاپلوئیدهای مضاعف استفاده می‌شود که در آنها عدم تعادل پیوستگی در بیشترین حد خود است. این روش بر مبنای همبستگی خویشاوندان از نظر نواحی

کروموزومی بدست آمده از اطلاعات جوامع در حال تفرق بنا شده است. روش تجزیه ارتباطی نیز برای شناسایی مکان‌های ژنی دخیل در صفات کمی استفاده می‌شود. در این روش برخلاف تجزیه پیوستگی، ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ افراد مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت استفاده می‌شود (Gupta et al. 2005). در این راستا استفاده از تجزیه ارتباطی به عنوان یک رهیافت برای آشکارسازی ارتباط بین صفت و نشانگر می‌تواند مکمل مناسبی برای مطالعات اصلاح کلاسیک باشد.

تجزیه ارتباطی به طور موفقیت‌آمیزی در محصولات مختلف برای شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با انواع صفات به کار گرفته شده است (Berger et al. 2013). در مطالعه‌ای ۱۸۴ گونه از ارزن دمروباهی با استفاده از نشانگر SSR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که هشت نشانگر SSR که روی کروموزوم‌های مختلفی قرار و با ۹ صفت زراعی ارتباط معنی‌داری داشتند. همچنین ارزیابی اطلاعات نقشه‌یابی ژنتیکی و زراعی ۸ نشانگر SSR نشان دهنده ارتباط قوی ۲ نشانگر واقع در کروموزوم شماره ۵ با عرض برگ‌پرچم و عملکرد دانه بود (Serika Gupta et al. 2013). در مطالعه‌ای دیگر به منظور شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با صفات زراعی و ارزیابی توانایی آلل‌های نشانگر SSR برای شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با صفات عملکرد دانه و علوفه ارزن معمولی از تجزیه ارتباطی استفاده شد که در مجموع ۱۵۹ آلل SSR شناسایی شد. نتایج نشان داد مناطق ژنومی مرتبط با زمان گلدهی بر روی گروه لینکاژی ۶ و مناطق ژنومی مرتبط با ارتفاع گیاه بر روی گروه‌های لینکاژی LG4، LG6 و LG7 قرار داشتند. همچنین آلل‌های LG6 با عملکرد علوفه و آلل‌های LG7 با عملکرد دانه در ارتباط بودند (Baskaran et al. 2014). با توجه به اهمیت و کاربرد نشانگرهای اطلاع‌رسان در برنامه‌های اصلاحی گیاهان زراعی، این تحقیق با هدف شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک با استفاده از روش تجزیه ارتباطی در ژنوتیپ‌های ارزن دمروباهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۳۰ ژنوتیپ ارزن دمروباهی از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری شد (جدول ۱) و در سال زراعی ۱۳۹۵ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان با طول جغرافیایی، ۵۶ درجه و ۵۸ دقیقه شمالی و عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و ۱۵ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۷۵۴ از سطح دریا در قالب طرح آگمنت با چهار بلوک، بر روی خطوطی به طول ۲ متر و به فاصله بین ردیف ۴۰ سانتی‌متر و فاصله بوته‌ها روی ردیف ۸ سانتی‌متر کشت شدند. ده بوته از هر کرت به‌طور تصادفی انتخاب شد و صفات زراعی شامل ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، طول پانیکول (سانتی‌متر)، تعداد پانیکول در بوته، تعداد دانه در پانیکول، وزن کل بوته (گرم)، وزن دانه در بوته (گرم)، وزن هزاردانه (گرم)، طول و عرض برگ (سانتی‌متر)، تعداد پنجه در بوته، تعداد برگ، ورس (به‌صورت درصدی برحسب مشاهده در کرت)، رنگ ریشک، رنگ دانه، عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک (کیلوگرم در هکتار) و شاخص

برداشت اندازه‌گیری شدند (جدول ۲). همچنین به منظور بررسی مولکولی، از ۲۰ ترکیب آغازگری نشانگر AFLP استفاده شد که در نهایت ۱۲ ترکیب با بیشترین چندشکلی انتخاب شدند و مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۴).

جدول ۱. فهرست نمونه‌های ارزن دم‌روباهی مورد مطالعه شامل کد و نام (منشا) نمونه

Table 1. Origin of foxtail millet genotypes used in this study

ردیف	کد ژنوتیپ	نام (منشا)	ردیف	کد ژنوتیپ	نام (منشا)	ردیف	کد ژنوتیپ	نام (منشا)
Number	Code	Origin	Number	Code	Origin	Number	Code	Origin
1	s6	شیراز-۱ Shiraz-1	11	s36	مشهد-۱ Mashhad-1	-	S85	-
2	s11	کرمان-۳ Kerman-3	12	s37	-	22	s97	مازندران-۲ Mazanderan-2
3	s12	کرمان-۴ Kerman-4	13	s38	مشهد-۲ Mashhad-2	23	s104	یزد-۲ Yazd-2
4	s16	بیرجند-۴ Birjand-4	14	s39	مشهد-۳ Mashhad-3	24	s105	یزد-۳ Yazd-3
5	s17	بیرجند-۲ Birjand-2	15	S44	-	25	s123	اصفهان-۱ Esfahan-1
6	s18	بیرجند-۳ Birjand-3	16	S54	-	26	s124	-
7	s22	طبس-۴ Tabas-4	17	s55	تبریز-۴ Tabas-4	27	s126	اصفهان-۲ Esfahan-2
8	s29	طبس-۶ Tabas-6	18	s60	شیراز-۲ Shiraz-2	28	s135	خوزستان-۶ Khuzestan-6
9	s30	شهرکرد-۲ Shahrekord-2	19	s66	شیراز-۳ Shiraz-3	29	s136	خوزستان-۲ Khuzestan-2
10	s33	شهرکرد-۴ Shahrekord-4	20	s68	ایلام-۱ Ilam-1	30	s140	خوزستان-۴ Khuzestan-4

جدول ۲. آمار توصیفی ژنوتیپ‌های ارزن دم‌روباھی

Table 2. Descriptive statistics of foxtail millet genotypes

ضریب تنوع (%) CV (%)	حداکثر Max	حداقل Min	انحراف معیار SD	میانگین Mean	
20.95	123.00	44.75	19.16	91.48	ارتفاع (cm) Plant height (cm)
43.56	4.00	1.00	1.13	2.60	تعداد پنجه Number of fertile tillers
42.14	20.85	5.36	5.33	12.66	تعداد برگ Number of leaves
24.28	2.56	0.95	0.42	1.75	عرض برگ (cm) Leaf width (cm)
27.32	40.00	13.70	7.24	26.51	طول برگ (cm) Leaf length (cm)
37.87	29.46	5.77	6.04	15.95	طول پانیکول (cm) Panicle length (cm)
47.17	4.00	1.00	0.92	1.96	تعداد پانیکول Number of panicles per plant
56.90	28.17	3.22	6.87	12.08	وزن تک بوته (g) Plant weight (g)
53.08	12.18	1.86	2.65	4.99	وزن دانه تک بوته (g) Grain weight per plant (g)
19.61	4.26	1.68	0.55	2.85	وزن هزار دانه (g) 1000-Grain weight (g)
33.90	2.00	1.00	0.50	1.50	رنگ دانه Grain color
31.14	2.00	1.00	0.49	1.60	رنگ ریشک Bristle color
-	0.40	0.00	0.09	0.046	ورس Plant lodging
45.97	2028.79	223.0	500.13	1087.80	تعداد دانه در پانیکول Number of grains per panicle
44.14	2499.17	340.86	517.52	1172.22	عملکرد دانه (kg/h) Grain yield (kg/ha)
44.28	13578.78	2631.28	3075.97	6945.22	عملکرد بیولوژیک (kg/h) Biological yield (kg/ha)
50.62	53.73	9.30	9.62	19.02	شاخص برداشت Harvest index

جدول ۳. ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مختلف ارزیابی شده در ژنوتیپ‌های ارزن دم‌روباهی

Table 3. Result of coefficient of correlation between evaluated traits in foxtail millet genotypes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Plant height ارتفاع	1	1											
Number of fertile tillers تعداد پنجه	2	0.06	1										
Number of leaves تعداد برگ	3	0.14	0.74**	1									
Leaf width عرض برگ	4	0.49**	0.002	0.08	1								
Leaf length طول برگ	5	0.60**	-0.007	0.009	0.52**	1							
Panicle length طول پانیکول	6	0.32	-0.15	-0.006	0.45*	0.33	1						
Number of panicles تعداد پانیکول per plant	7	0.13	0.78**	0.66**	0.029	0.02	-0.2	1					
1000-Grain weight وزن هزاردانه	8	0.47**	-0.17	-0.17	0.24	0.05	0.02	-0.13	1				
Number of grains per panicle تعداد دانه در پانیکول	9	0.16	0.08	0.16	0.47**	0.33	0.37*	-0.04	-0.09	1			
Grain yield عملکرد دانه	10	0.41*	0.38*	0.52**	0.49**	0.37*	0.25	0.36*	0.15	0.68**	1		
Biological yield عملکرد بیولوژیک	11	0.44*	0.55**	0.56**	0.58**	0.45*	0.22	0.52**	-0.03	0.56**	0.76**	1	
Harvest index شاخص برداشت	12	-0.028	-0.33	-0.15	-0.19	0.10	0.10	-0.3	0.25	0.10	0.17	-0.42*	1

به منظور استخراج DNA، نمونه‌گیری از برگ‌های تازه ۵ بوته از هر ژنوتیپ در تیر ماه سال ۱۳۹۵ صورت گرفت. نام و تاریخ نمونه‌گیری بر روی بسته‌های حاوی نمونه یادداشت و داخل ازت مایع قرار داده شد و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. استخراج DNA از برگ و با روش (Saghai Maroof (1984) با کمی تغییر انجام شد. برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی از ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ استفاده شد. آزمایشات AFLP بر اساس پروتکل (Vos et al. (1995) با کمی تغییر انجام شد. برای انجام این کار از دو آنزیم برشی *MseI* و *EcoRI* استفاده گردید. در مرحله تکثیر انتخابی از ۲۰ ترکیب آغازگری استفاده شد که از میان آنها ۱۲ ترکیب با بیشترین چندشکلی انتخاب شدند. به منظور مشاهده و تفکیک دقیق‌تر باندها از دستگاه DNA QiAXEL استفاده گردید. این روش جایگزینی برای روش ژل پلی‌اکریل‌آمید می‌باشد.

جدول ۴. ترکیبات آغازگری مورد استفاده برای تجزیه AFLP در ارزن دم‌روباهی

Table 4. Primer combinations used for AFLP analysis in foxtail millet

آغازگرهای مربوط به <i>EcoRI</i>	آغازگرهای مربوط به <i>MseI</i>	شماره
Primer combination <i>EcoRI</i>	Primer combination <i>MseI</i>	Number
<i>EcoRI</i> + AAC	<i>MseI</i> + CAA	1
<i>EcoRI</i> + AGC	<i>MseI</i> + CAA	2
<i>EcoRI</i> + ACC	<i>MseI</i> + CAA	3
<i>EcoRI</i> + AAC	<i>MseI</i> + CTT	4
<i>EcoRI</i> + AGC	<i>MseI</i> + CTT	5
<i>EcoRI</i> + ACC	<i>MseI</i> + CTT	6
<i>EcoRI</i> + AAC	<i>MseI</i> + CTG	7
<i>EcoRI</i> + AGC	<i>MseI</i> + CTG	8
<i>EcoRI</i> + ACC	<i>MseI</i> + CTG	9
<i>EcoRI</i> + AAC	<i>MseI</i> + CTA	10
<i>EcoRI</i> + AGC	<i>MseI</i> + CTA	11
<i>EcoRI</i> + ACC	<i>MseI</i> + CTA	12

در این روش به حجم 15 μ l از محصول PCR نیاز است. دستگاه کپاکسل توانایی تفکیک قطعات ۱۲ نمونه DNA را در ۳ دقیقه با وضوح بالا بدون نیاز به آگارز دارد. و در هر دفعه می‌تواند ۹۶ نمونه را همزمان اجرا کند. الکتروفورز نمونه‌ها با کیت High Resolution Cartridge انجام شد. باندها با نرم افزار BIoCalculator محاسبه شدند و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار جمعیت با استفاده از نرم افزار Structure 2.3.4 در حالت Admixture با ۱۰۰۰۰ بار Burn-in و ۱۰۰۰۰۰ بار MCMC در مقادیر مختلف K از ۱ تا ۱۰ (با ۵ بار تکرار برای هر K) بررسی شد. در نهایت بر اساس K بهینه تعیین شده به روش (Evano et al. 2005)، ماتریس Q (ماتریس ساختار جمعیت) از نتایج ساختار جمعیت حاصل از نرم افزار Structure استخراج شد. برای مشخص نمودن ارتباط بین نشانگرها با صفات مورفولوژیک از نرم افزار Tassel 2.1 استفاده شد. روش Q+K برای بررسی ارتباط نشانگرها و صفات استفاده شد که هم اطلاعات حاصل از K (ضریب خویشاوندی افراد) و هم Q (ضرایب ساختار جمعیت) را با هم تلفیق می‌کند و معلوم شده که این روش در مقایسه با مدل‌های خطی رایج در تجزیه‌های ارتباطی روش بهتری است (Yu et al. 2006). این روش در نرم افزار Tassel به صورت مدل خطی (MLM) اجرا شد و نشانگرهای مرتبط با صفات مورد مطالعه با توجه به مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۱ انتخاب شدند. همچنین شاخص‌های نشانگری با استفاده از برنامه GenAlEx 6.5 طبق فرمول‌های زیر محاسبه شدند.

$${}^1 \text{PIC} = 1 - p^2 - q^2 \quad \text{رابطه (۱)}$$

$${}^2 \text{Ne} = 1/(p^2 + q^2) \quad \text{رابطه (۲)}$$

$${}^3 I = -1 \times (p \times \ln(p) + q \times \ln(q)) \quad \text{رابطه (۳)}$$

$${}^4 \text{MI} = \text{PIC} \times \text{تعداد نوار چند شکلی} \quad \text{رابطه (۴)}$$

نتایج و بحث

از مجموع ۲۰ ترکیب آغازگری استفاده شده، ۱۲ ترکیب آغازگری با بیشترین باند پلی مورف انتخاب شدند. تعداد ۱۲ ترکیب آغازگری AFLP در ۳۰ ژنوتیپ ارزن دمروباهی ۳۳۵ باند چندشکل ایجاد کرد که متوسط تعداد باند برای هر ترکیب آغازگری ۲۷/۹۱ باند بود. بیشترین تعداد باند پلی مورف در ترکیب آغازگری M-CTA/E-AAC با ۴۰ باند و کمترین تعداد باند پلی مورف در ترکیب آغازگری M-CAA/E-ACC با ۱۷ باند مشاهده شد. متوسط شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برابر با ۰/۲۳۶ بود و بیشترین میزان آن ۰/۳۰۹ و متعلق به ترکیب M-CAA/E-ACC و کمترین میزان آن ۰/۱۸۶ و متعلق به ترکیب M-CAA/E-AAC بود. بالا بودن میزان محتوای اطلاعات چند شکلی نشان دهنده سطح بالای تمایز می باشد (Acharya et al. 2011). دامنه درصد چندشکلی بین ۵۸/۶۳ (برای ترکیب M-CAA/E-ACC) تا ۸۶/۴۸ (برای ترکیب M-CTG/E-AAC) و میانگین آن برابر با ۷۵/۳۱ بود. با توجه به درصد بالای چندشکلی ترکیبات آغازگری M-CTG/E-AAC، M-CTT/E-AAC و M-CTA/E-AAC می توان انتظار داشت این ترکیبات بتوانند به عنوان یک ابزار قدرتمند در شناسایی و تفکیک ژنوتیپ های ارزن دمروباهی عمل نماید. شاخص نشانگری (MI) کارایی و قدرت تفکیک نشانگرها را با استفاده از تعداد مکان های ژنی چندشکل حاصل از آغازگر محاسبه می کند. ترکیب آغازگری M-CTA/E-AAC دارای بیشترین میزان شاخص نشانگری (۹/۱۷) و ترکیب M-CTA/E-ACC دارای کمترین میزان این شاخص (۴/۷۳) بودند. همچنین ترکیب های آغازگری M-CAA/E-ACC و M-CAA/E-AAC به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان شاخص شانون و نی بودند (جدول ۵). بر اساس مطالعه ای بر روی ارزن، با استفاده از ۳۴ نشانگر SSR، متوسط اطلاعات چند شکلی را ۰/۴۵ و بیشترین میزان آن را ۰/۸۰ و کمترین میزان آن را ۰/۱۳ بدست آمد (Baskaran et al. 2014).

1. Polymorphism content information

2. No. of Effective Alleles

3. Shannon index

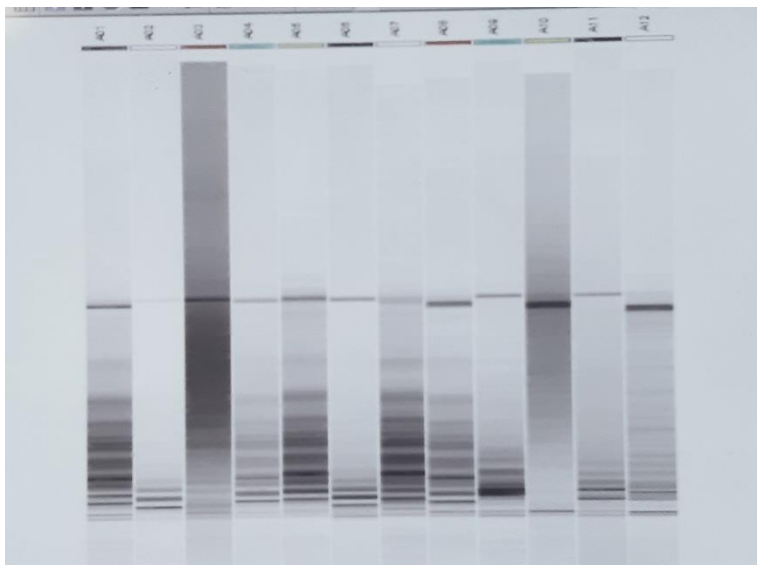
4. Marker index

جدول ۵. شاخص‌های نشانگری در ۳۰ ژنوتیپ ارزن دم‌روباهی مورد مطالعه

Table 5. Diversity statistic for 12 AFLP primer combinations in 30 foxtail millet genotypes

تعداد آل موثر (Ne)	شاخص نشانگری (MI)	شاخص شانون (I)	محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)	درصدباند‌های چند-شکل (Polymorphic percentage)	تعداد باند چند شکل (Polymorphic bands)	تعداد کل باند (Total Bands)	ترکیب آغازگری (Primer combination)
No. of Effective Alleles	Marker index	Shannon index	Polymorphism content information	Polymorphic percentage	Polymorphic bands	Total Bands	Primer combination
1.27	4.83	0.314	0.186	63.41	26	41	M-CAA/E-AAC
1.35	8.35	0.384	0.238	83.33	35	42	M-CTT/E-AAC
1.39	8.07	0.403	0.252	86.48	32	37	M-CTG/E-AAC
1.35	9.17	0.374	0.229	83.33	40	48	M-CTA/E-AAC
1.31	5.03	0.348	0.209	77.41	24	31	M-CAA/E-AGC
1.36	6.20	0.369	0.229	67.50	27	40	M-CTT/E-AGC
1.34	7.57	0.353	0.216	76.08	35	46	M-CTG/E-AGC
1.39	6.22	0.378	0.239	74.28	26	35	M-CTA/E-AGC
1.49	5.26	0.478	0.309	58.62	17	29	M-CAA/E-ACC
1.32	6.52	0.345	0.210	77.50	31	40	M-CTT/E-ACC
1.47	5.98	0.442	0.285	80.76	21	26	M-CTG/E-ACC
1.36	4.73	0.360	0.225	75.00	21	21	M-CTA/E-ACC
16.46	77.98	4.55	2.83	903.74	335	443	Total
1.37	6.49	0.38	0.24	75.31	27.9	36.9	Mean

در این مطالعه تجزیه خوشه‌ای براساس روش UPGMA و معیار فاصله اقلیدوسی بدست آمد. شکل ۱ نشان دهنده دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۳۰ ژنوتیپ ارزن دم‌روباهی براساس داده‌های مولکولی است. براساس این دندروگرام ژنوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم شدند. در گروه اول ۱۵ ژنوتیپ، گروه دوم ۵ ژنوتیپ و گروه سوم ۱۰ ژنوتیپ قرار داشتند. همچنین واریانس بین کلاسترها ۸۶/۵۴٪ و واریانس درون کلاسترها ۱۳/۴۶٪ بود (شکل ۲). ساختار جمعیت بر اساس داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی با استفاده از روش غیر پارامتری ارائه شده توسط (Evanno et al. 2005) بررسی شد. عدد K بهینه (K=9) مشخص شد. شاخص تثبیت (Fst) بین ۹ زیر جمعیت این مطالعه به ترتیب برابر با ۰/۵۸۶، ۰/۸۸۷، ۰/۰۲۷، ۰/۵۴۶، ۰/۰۱۲، ۰/۲۲۳، ۰/۰۰۱، ۰/۶۵۶ و ۰/۱۱۳ بود. در نهایت ماتریس Q یا ساختار موردنیاز برای استفاده در تجزیه ارتباطی تشکیل شد. به منظور بررسی روابط بین نشانگرها و صفات فنوتیپی از روش MLM استفاده شد.



شکل ۱. نمونه عکس ژل شبیه سازی شده توسط دستگاه QIAxcel برای ترکیب M-CTT/E-AAC

Figure 1. Sample photo gel simulated by QIAxcel for combining M-CTT/E-AAC

در روش MLM بر اساس اطلاعات ماتریس عضویت افراد در زیر جوامع (Q)، ماتریس خویشاوندی افراد (K)، اطلاعات فنوتیپی و اطلاعات نشانگرها در یک مدل رگرسیونی چندگانه، همبستگی نشانگرها و صفات بررسی شد. مبنای انتخاب نشانگر همبسته وجود میزان $P \text{ value} = 0/01$ قرار داده شد. توزیع نشانگرها به وسیله میزان ضریب تبیین R^2 نشانگر در مدل رگرسیونی نیز مورد بررسی قرار گرفت. میزان R^2 به نوع صفت وابسته بود. علی‌رغم اینکه میزان R^2 در اکثر صفات ناچیز بود، این پدیده دور از انتظار نبود زیرا ماهیت QTLها به نحوی است که چندین جایگاه در یک صفت درگیر هستند و ضریب تبیین بالا برای یک نشانگر دور از انتظار است. تجزیه ارتباطی بر اساس مدل MLM نشان داد که تعداد ۳۸ نشانگر در سطح ۱٪ معنی‌دار شد و ضریب تبیین نشانگر در سطح معنی‌دار کمتر از ۰/۰۱ از ۰/۱۰۲ تا ۰/۳۲۸ درصد متغیر بود که حد بالا و حد پایین آن به ترتیب مربوط به صفت تعداد دانه در پانیکول و ارتفاع بود. علی‌رغم اینکه میزان ضریب تبیین یا R^2 در اکثر صفات ناچیز بود (جدول ۶)، این پدیده دور از انتظار نبود زیرا ماهیت QTLها به نحوی است که چندین جایگاه در یک صفت درگیر هستند و ضریب تبیین بالا برای یک نشانگر دور از انتظار است. ضریب تبیین مدل نشان دهنده میزان توجیه مدل رگرسیونی است. R^2 برای مدل MLM دارای میانگین ۰/۵۱۱ و حداکثر میزان ۰/۸۵۱ بود. نشانگرهای مشخص شده به وسیله مدل MLM دارای اثرات بسیار قوی (P Value پایین) می‌باشند و بنابراین نشانگرهای مشخص شده بر اساس مدل MLM می‌توانند نشانگرهای مناسبی برای مطالعات بعدی باشند. نتایج بر اساس مدل MLM نشان داد M-CAA/E-AAC با صفات ارتفاع در لوکوس شماره ۶، عرض برگ در لوکوس شماره ۳۶، طول برگ و وزن هزار دانه در لوکوس شماره ۱۳ ارتباط دارد. نشانگر M-CTT/E-AAC نیز در لوکوس شماره ۲۹ با ارتفاع، لوکوس ۲۷ با عرض و طول برگ، لوکوس ۱۰ با تعداد دانه در پانیکول و در لوکوس های شماره

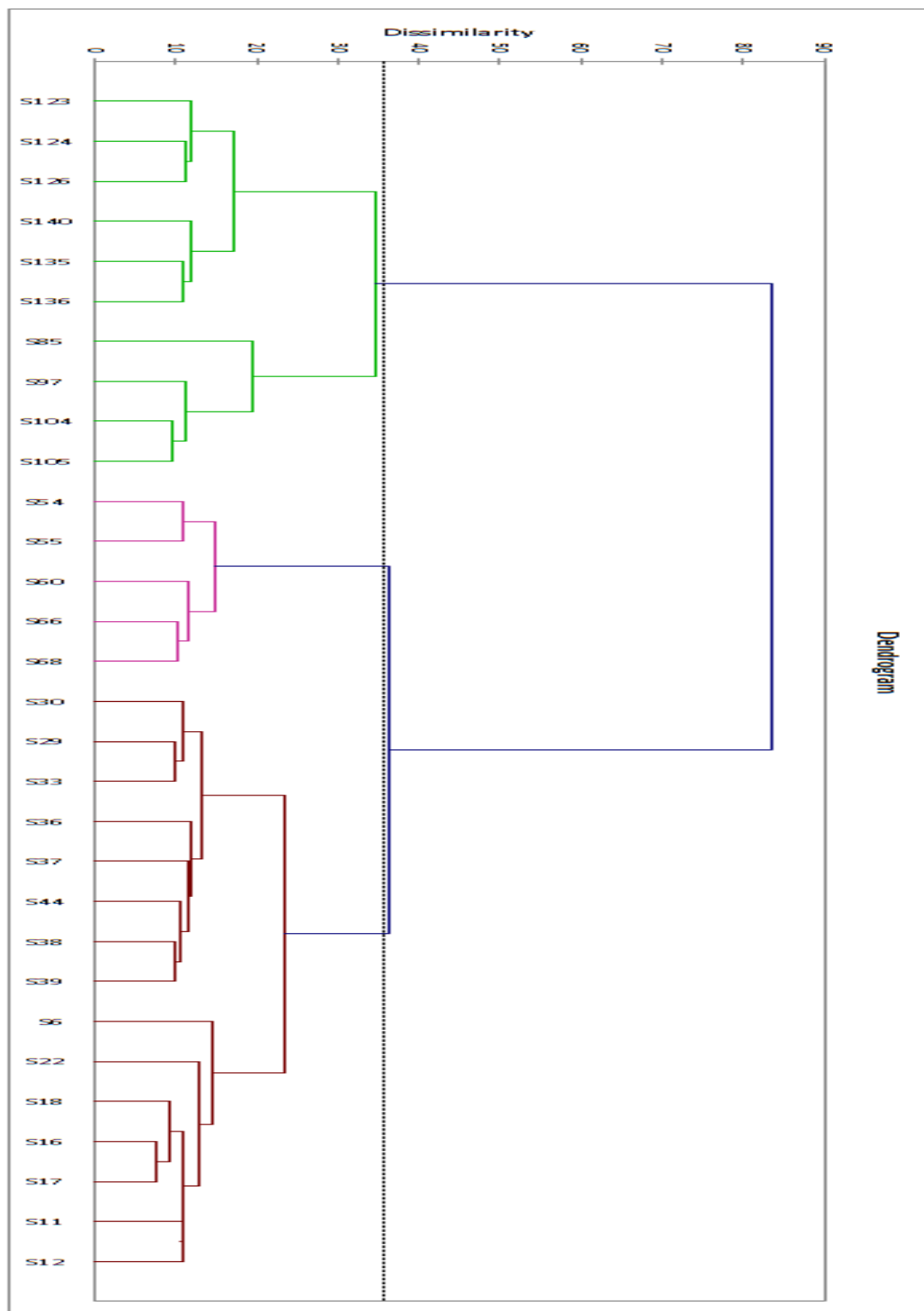
۲۰، ۲۲، ۲۴ و ۳۲ با تعداد پنجه در ارتباط بود که در بین صفات، تعداد پنجه بیشترین ارتباط را با نشانگر M-CTT/E-AAC نشان داد. صفات وزن دانه تک بوته و عملکرد بیولوژیک با نشانگر M-CTG/E-AAC به ترتیب در لوکوس های شماره ۱۳ و ۳ و صفات وزن دانه تک بوته و وزن کل تک بوته با نشانگر M-CTG/E-ACC به ترتیب در لوکوس های شماره ۱۴ و ۷ ارتباط معنی داری را نشان دادند. صفات ارتفاع (لوکوس ۱۰ و ۱۲)، تعداد پنجه (لوکوس ۱۲)، طول برگ (لوکوس ۲۲)، وزن دانه تک بوته (لوکوس ۱۳) و عملکرد دانه (لوکوس ۶ و ۱۰) با نشانگر M-CTG/E-AGC مرتبط بودند. همچنین عملکرد دانه با لوکوس ۲ نشانگر M-CAA/E-ACC نیز ارتباط معنی داری را نشان داد. نشانگر M-CTT/E-AGC با صفات تعداد پانیکول، وزن هزار-دانه و شاخص برداشت و نشانگر M-CTA/E-AAC با صفات وزن کل تک بوته و شاخص برداشت ارتباط معنی داری را نشان داد. همچنین شاخص برداشت با لوکوس ۶ نشانگر M-CTA/E-ACC نیز ارتباط داشت. صفت عرض برگ نیز با نشانگر M-CTA/E-ACC و M-CTA/E-AGC در ارتباط بود (جدول ۶). همچنین نتایج نشان داد که تعدادی از آغازگرهای مورد بررسی با چندین صفت در ارتباط بوده و بیشترین ارتباط با آغازگر M-CTT/E-AAC مشاهده شد. وجود نشانگرهای مشترک میان برخی صفات بررسی شده می تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد (Jun et al. 2008). تجزیه ارتباطی به طور موفقیت آمیزی در محصولات مختلف برای شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با انواع صفات به کار گرفته شده است (Berger et al. 2013). در مطالعه ای ۹۱۶ ژنوتیپ ارزن دمروباهی در ۵ محیط مختلف کشت و صفات مورفولوژیکی آنها اندازه گیری شد. در این مطالعه از نشانگر SNP استفاده شد و ۵۱۲ مکان ژنومی مرتبط با ۴۷ صفت زراعی شناسایی شد (Jia et al. 2013). علاوه بر این، تلاش های قابل توجهی برای ردیابی ژن های مسئول صفات مهم زراعی انجام شد. در مطالعاتی تعدادی QTL برای صفات زراعی در ارزن دمروباهی شناخته شده است که شامل صفات پنجه زنی، ارتفاع گیاه، طول پانیکول، تعداد گره ساقه و ریزش دانه است (Mauro et al. 2013; Doust et al. 2004).

جدول ۶. تجزیه ارتباطی برای صفات مهم زراعی در ۳۰ ژنوتیپ ارزن دم‌روباهی براساس مدل MLM
Table 6. Association analysis for important agronomic traits in 30 foxtails millet genotypes based on MLM model

R ²	P value	نشانگر Marker	صفت Trait
0.102	0.0088	M-CAA/E-AAC-6	ارتفاع Plant height
0.119	0.004	M-CTT/E-AAC-29	
0.118	0.0042	M-CTG/E-AGC-10	
0.105	0.0076	M-CTG/E-AGC-12	
0.127	0.0071	M-CTT/E-AAC-20	تعداد پنجه No. of tiller per plant
0.152	0.0025	M-CTT/E-AAC-22	
0.132	0.0056	M-CTT/E-AAC-24	
0.133	0.0055	M-CTT/E-AAC-32	
0.124	0.0078	M-CTG/E-AAC-13	
0.151	0.0027	M-CTA/E-AGC-12	عرض برگ Leaf width
0.194	0.0036	M-CAA/E-AAC-36	
0.163	0.0089	M-CTT/E-AAC-27	
0.194	0.0036	M-CTA/E-AGC-32	
0.167	0.008	M-CTA/E-ACC-35	طول برگ leaf length
0.227	0.0026	M-CAA/E-AAC-13	
0.210	0.0041	M-CTT/E-AAC-27	
0.220	0.0031	M-CTG/E-AGC-22	تعداد پانیکول No. of panicle per plant
0.190	0.007	M-CTT/E-AGC-24	

جدول ۶. تجزیه ارتباطی برای صفات مهم زراعی در ۳۰ ژنوتیپ ارزن دم‌روباهی براساس مدل MLM
Table 6. Association analysis for important agronomic traits in 30 foxtail millet genotypes based on MLM model

R ²	P value	نشانگر Marker	صفت Trait
0.121	0.00062	M-CTA/E-AAC-30	شاخص برداشت harvest index
0.107	0.0017	M-CTT/E-AGC-6	
0.108	0.0016	M-CTA/E-ACC-6	
0.175	0.0042	M-CAA/E-AGC-46	وزن هزار دانه 1000- Grain weight
0.175	0.0052	M-CAA/E-AGC-48	
0.175	0.0052	M-CAA/E-AGC-49	
0.166	0.0068	M-CTT/E-AGC-28	
0.277	0.0014	M-CTT/E-AAC-10	تعداد دانه در پانیکول No. of Grains per panicle
0.328	0.00035	M-CTT/E-ACC-3	
0.197	0.0099	M-CTT/E-ACC-18	
0.158	0.0089	M-CAA/E-AAC-13	وزن دانه تک بوته Grain weight per plant
0.217	0.0014	M-CTG/E-AAC-13	
0.197	0.0028	M-CTG/E-ACC-14	
0.145	0.0027	M-CAA/E-AAC-13	وزن کل تک بوته Plant weight
0.126	0.0089	M-CTA/E-AAC-26	
0.122	0.0071	M-CTG/E-ACC-7	
0.165	0.0068	M-CTG/E-AGC-6	عملکرد دانه Grain yield (kg/ha)
0.175	0.0044	M-CTG/E-AGC-10	
0.154	0.0095	M-CAA/E-ACC-2	
0.121	0.0094	M-CTG/E-AAC-3	عملکرد بیولوژیک Biological yield



شکل ۲. گروه بندی ۳۰ ژنوتیپ ارزن دمروباهی براساس داده‌های مولکولی با استفاده از روش UPGMA

Figure 2. Classification of 30 foxtail millet genotypes using UPGMA method.

نتیجه گیری

ارزیابی ژرمپلاسم یک گونه گیاهی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ابزار ارزشمندی برای پیش‌بینی سایر ژنوتیپ‌های ژرمپلاسم و شناسایی ژنوتیپ‌های مطلوب حتی در شرایط آزمایشگاهی خواهد بود. این مطالعه اولین گزارش در زمینه استفاده از تجزیه ارتباطی برای شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات زراعی در ژنوتیپ‌های ارزن دم‌روبه‌ای در ایران می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که ۳۰ ژنوتیپ مورد مطالعه که به طور تصادفی از مجموعه ژرمپلاسم ارزن دم‌روبه‌ای انتخاب شدند، از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردار بودند. این مطلب بیانگر تنوع در مجموعه ژرمپلاسم مورد نظر می‌باشد که می‌تواند برای برنامه‌های اصلاحی بسیار مفید باشد. همچنین نتایج نشان داد که آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق با صفات مورد مطالعه در ارتباط بودند، بنابراین احتمال دارد بتوان از این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی ارزن دم‌روبه‌ای به‌منظور شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید استفاده کرد. چنانچه از ترکیبات آغازگری بیشتر و جمعیت‌های بزرگتر و متنوع‌تر استفاده شود می‌توان نشانگرهای دارای همبستگی بالا و قابل اعتمادتری را با صفات مورد مطالعه شناسایی و از آنها در پژوهش‌های بعدی استفاده کرد. با توجه به شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی، انتظار می‌رود با مطالعات مولکولی دقیق بتوان ژن‌های کاندید مرتبط با صفات موثر را شناسایی نمود. در نهایت می‌توان گفت تجزیه ارتباطی می‌تواند روش کارآمد، کم‌هزینه و سریع در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی باشد.

References

- Acharya L, Mukherjee Ak, Panda PC (2011) Separation of the genera in the subtribe Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae) using molecular markers. *Acta Bot Brasilica* 25, 223-233.
- Baskaran K, Senthilvel S, Arcot Gajaraj BR, et al. (2014) Association Analysis of SSR Markers with Phenology, Grain, and Stover-Yield Related Traits in Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.). *Sci World J Journal Volume*, Article ID 562327, 1-14.
- Berger GL, Liu S, Hall MD et al. (2013) Marker-trait associations in Virginia Tech winter barley identified using genome-wide mapping. *Theor Appl Genet* 126, 693-710.
- Brink M, *Setaria italica* (L.) P. Beauv. Record from Protabase. Brink M, Belay G (2006) PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales del'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands.
- Doust AN, Devos KM, Gadberry MD et al. (2004) Genetic control of branching in foxtail millet. *Proc. Natl Acad Sci* 101, 9045-9050.
- Doust AN, Kellogg EA, Devos KM, Bennetzen JL (2009) Foxtail Millet: A Sequence-Driven Grass Model System. *Plant Physiol* 149, 137-141.

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611-2620.
- Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B et al. (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.
- Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Mol Biol* 57, 461-485.
- Jia G, Huang X, Zhi H et al. (2013) A haplotype map of genomic variations and genome-wide association studies of agronomic traits in foxtail millet (*Setaria italica*). *Nat Genet* 45, 957-961.
- Jia XP, Shi YS, Song YC (2007) Development of EST-SSR in foxtail millet (*Setaria italica*). *Genet Resour Crop Evol* 54, 233-236.
- Jun TH, Van K, Kim MY et al. (2008) Association analysis using SSR markers to find QTL for Grain protein content in soybean. *Euphytica* 162, 179-191.
- Mauro-Herrera M, Wang X, Barbier H et al. (2013) Genetic control and comparative genomic analysis of flowering time in *Setaria* (Poaceae). *G3* 3, 283-295
- Qi X, Xie S, Liu Y et al. (2013) Genome-wide annotation of genes and noncoding RNAs of foxtail millet in response to simulated drought stress by deep sequencing. *Plant Mol Biol* 83, 459-473.
- Saghai Maroof MA, Biyashev Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1984) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal location, population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5466-5470.
- Sakiroglu M, Sherman-Broyles S, Story A et al. (2012) Patterns of linkage disequilibrium and association mapping in diploid alfalfa (*M. sativa* L.). *Theor Appl Genet* 125, 577-590.
- Sapkota M, Pandey M, Thapa D (2016) Agromorphological Characterisation of Foxtail Millet (*Setaria italica* L. Beauv) at Rampur, Chitwan, Nepal. *Int. J Appl Sci Biotechnol* 4, 298-307.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acid Res* 23, 4407-4414.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH et al. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38, 203-208.