

Study of genetic diversity and identification of informative molecular markers related to drought tolerance in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]

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

Identification of associated markers with important agricultural traits is one of the most important methods for accelerating the transfer of desirable traits to other genotypes and their tracking. The aim of this research was to study the genetic diversity and identification of molecular markers related to drought tolerance traits in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.] genotypes using the AFLP molecular marker.

Materials and methods

In this study, 21 genotypes of foxtail millet were studied in three growing seasons (2013, 2014 & 2016). Drought tolerance indices and correlation between them with grain yield and biological yield were calculated. In order to identify molecular markers associated with drought tolerance traits, association analysis was performed by using the Mixed Linear Model (MLM) and 12 primer combinations of AFLP. Also, marker

indices and principal components analysis (PCA) were performed using GenAEx 6.5 software

Results

The primer combinations used in this study generated a total of 443 scorable bands, of which 316 (71%) were polymorphic. The mean of polymorphism information content (PIC) was 0.24, the mean of Shannon index was 0.38, and the mean of Marker index was 6.22. Also, M-CTG/E-ACC, M-CAA/E-ACC and M-CTA/E-AAC were the most efficient combinations in investigating the diversity of genotypes studied. Based on the results of PCA, the first and second components justify 61.13 percent of the changes. The results of this study showed that HARM, GMP, and MP indices were the best indices for differentiation of drought tolerant samples, and M-CAA/E-AAC-14 and M-CTG/E-ACC-283 markers according to Grain yield and M-CTT/E-ACC-264 markers according to biological yield, were related to these indicators.

Conclusions

According to the results of this study, the HARM, GMP and MP indices could be considered as the best indicators for differentiation of drought tolerant foxtail millet samples. Also, molecular markers associated with these indices can be used to evaluate the drought tolerance of other genotypes in future breeding programs.

Keywords: AFLP Marker, Association analysis, foxtail millet, Tolerance indicator

Citation: Aminizadeh A, Mohammadi-Nejad G, Nakhoda B (2019) Study of Genetic Diversity and Identification of Informative Molecular Markers Related to Drought Tolerance in Foxtail Millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]. *Agricultural Biotechnology Journal* 11 (4),193-218.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (4),193-218.

DOI: 10.22103/jab.2019.14384.1149

Received: August 1, 2019; Accepted: September 3, 2019

© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

مطالعه تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات تحمل به خشکی در

ارزن دمروباهی [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]

اکرم امینی زاده

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

09135787820، 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: 09133415937، 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: 09123677137، ایمیل: b.nakhoda@gmail.com

تاریخ دریافت: 1398/05/10، تاریخ پذیرش: 1398/06/12

چکیده

هدف: شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی یکی از مهم ترین روش ها برای تسریع انتقال صفات مطلوب به ژنوتیپ های دیگر و ردیابی آنهاست. هدف از این پژوهش، ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مولکولی اطلاع رسانی مرتبط با صفات تحمل به خشکی در ژنوتیپ های ارزن دمروباهی [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]، با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه، 21 ژنوتیپ ارزن دمروباهی در سه سال زراعی 92، 93 و 95 مورد آزمایش قرار گرفتند. شاخص های تحمل به خشکی و همبستگی بین مقادیر آنها با عملکرد دانه و بیولوژیک محاسبه شد. به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات تحمل به خشکی، از تجزیه ارتباطی با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) و 12 ترکیب آغازگری AFLP استفاده شد. همچنین شاخص های نشانگری و تجزیه به مولفه های اصلی نیز با استفاده از نرم افزار GenAIEx 6.5 انجام گرفت.

نتایج: ترکیبات آغازگری استفاده شده در این مطالعه در مجموع 443 باند قابل تشخیص ایجاد کردند که از این تعداد 316 (71%) باند چندشکل بودند. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی 0/24، میانگین شاخص شانون 0/38 و میانگین شاخص نشانگری 6/22 بدست آمد و ترکیب‌های M-CTG/E-ACC، M-CAA/E-ACC و M-CTA/E-AAC موثرترین ترکیب‌ها در بررسی تنوع ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند. براساس نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی، دو مولفه اول 61/13 درصد از تغییرات را توجیه کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که شاخص‌های HARM، GMP و MP بهترین شاخص‌ها در تفکیک نمونه‌های متحمل به خشکی بودند و نشانگرهای M-CAA/E-AAC-14 و M-CTG/E-ACC-283 با توجه به عملکرد دانه و نشانگر M-CTT/E-ACC-264 با توجه به عملکرد بیولوژیک با این شاخص‌ها در ارتباط بودند.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این پژوهش می‌توان شاخص‌های HARM، GMP و MP را به‌عنوان بهترین شاخص‌ها در تفکیک نمونه‌های ارزن دم‌روباهی متحمل به خشکی، معرفی کرد. همچنین می‌توان از نشانگرهای مولکولی مرتبط با این شاخص‌ها برای بررسی تحمل به خشکی سایر ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های اصلاحی آینده استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ارزن دم‌روباهی، تجزیه ارتباطی، شاخص‌های تحمل به خشکی، نشانگر AFLP

مقدمه

ارزن دم‌روباهی [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.] یکی از مهم‌ترین گونه‌های ارزن در رژیم غذایی برخی مردم دنیا است و همچنین نقش بسیار مهمی را در برخی کشورهای توسعه‌یافته و پیشرفته در زمینه کشاورزی و غذا به دلیل قابلیت رشد در شرایط گرمای شدید و محدود بودن میزان بارندگی ایفا می‌کند (Upadhyayaa et al. 2011). ارزن دم‌روباهی به عنوان یک محصول دانه‌ای به طور گسترده در شمال چین و هند رشد می‌نماید. مواد مغذی ارزن مشابه و یا حتی بیشتر از سایر غلات مثل گندم و برنج است. دانه ارزن دم‌روباهی حاوی 12/3% پروتئین، 4/7% چربی و 60/6% کربوهیدرات است. محتوای پروتئین آن بیشتر از برنج و قابل قیاس با گندم است. مقدار چربی آن به ترتیب 8 و 3 برابر بیشتر از برنج و گندم می‌باشد. میزان مواد معدنی، ویتامین‌ها و اسیدآمین در دانه آن بالاست و دارای میزان بالایی از فیبرهای غذایی و پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای است. رشد سریع، تطابق بالا در نواحی گرمسیری، مقاومت نسبی در مقابل خشکی و شوری، درصد بالای پروتئین، پربرگی، خوش خوراکی و عدم وجود اسید پروسیک، چهارکربنه بودن، توانایی تولید بالای آن در نواحی گرم و خشک و بالا بودن کارایی مصرف آب آن نسبت به گونه‌های سه کربنه، همگی باعث شده که به عنوان گیاه علوفه‌ای ایده آل برای کشت در نواحی گرم و خشک محسوب گردد (Kusaka et al. 2005).

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محدودکننده رشد و تولید گیاهان است که منجر به کاهش بیش از 50 درصدی میانگین تولید اکثر محصولات در سرتار جهان می‌شود (Lata et al. 2011). اصلاح و توسعه کاشت گیاهان مقاوم به خشکی می‌تواند یک راهکار سودمند به منظور اجتناب از وارد آمدن خسارت تنش خشکی به گیاهان باشد (Vitkauskaitė & Venskaityte 2011). به منظور انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی، شاخص‌های مختلفی بر اساس عملکرد در شرایط تنش و غیرتنش معرفی شد که می‌توانند به‌عنوان معیار مناسب جهت انتخاب ژنوتیپ در شرایط تنش مورد استفاده قرار گیرند. این شاخص‌ها عبارتند از: شاخص تحمل (TOL^1) که از اختلاف عملکرد در شرایط تنش و بدون تنش به دست می‌آید و مقادیر بیشتر آن نشان‌دهنده پایداری کمتر ژنوتیپ در محیط‌های مختلف است. شاخص حساسیت به تنش (SSI^2)، که مقادیر پایین آن نشان‌دهنده پایداری بیشتر در شرایط مختلف محیطی است. شاخص تحمل به تنش (STI^3) معیار مناسبی برای انتخاب ژنوتیپ‌ها جهت دستیابی به عملکرد بالا تحت شرایط تنش می‌باشد. این شاخص، ژنوتیپ‌هایی که دارای عملکرد بالا در شرایط تنش و بدون تنش هستند را از سایر گروه‌ها جدا می‌کند. شاخص میانگین حسابی بهره‌وری (MP^4) نیز به‌صورت متوسط جمع جبری عملکرد یک ژنوتیپ در شرایط تنش و بدون تنش تعریف می‌شود. شاخص دیگری که ارائه شد، میانگین هندسی بهره‌وری (GMP^5) است. این شاخص در مقایسه با MP در تفکیک رقم‌ها از قدرت بالاتری برخوردار است (Fernandez 1992). همچنین شاخص پایداری عملکرد (YSI^6)، عملکرد یک رقم در شرایط تنش را نسبت به عملکرد غیرتنش ارزیابی می‌کند و می‌تواند شاخص مناسبی برای شناسایی ارقام متحمل به تنش باشد، بنابراین انتظار می‌رود ارقامی با YSI بالاتر عملکرد بیشتری در هر دو شرایط داشته باشند (Bousslama 1984). شاخص عملکرد (YI^7) ارقام را فقط براساس عملکرد در شرایط تنش رتبه‌بندی می‌کند، بنابراین رقم‌های با عملکرد بالا در هر دو شرایط تنش و عدم تنش را تشخیص نمی‌دهد (Gavuzzi 1997).

موفقیت یک برنامه اصلاحی به طبیعت و یا حجم و تنوع موجود در مواد ژنتیکی بستگی دارد. وجود حداکثر تنوع، بزرگترین شانس برای نائل شدن به موفقیت در گزینش محسوب می‌شود (Mishra et al. 2007). برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی و ژنتیکی از جمله گروه‌بندی لاین‌ها و جمعیت‌ها، مطالعه تکامل خوشه‌بندی و وحشی، بهبود شجره‌ها، بررسی تغییرات فراوانی آلل‌ها و حفاظت از منابع ژنتیکی دارد. همچنین آگاهی داشتن از تنوع

1. Tolerance

2. Stress Susceptibility Index

3. Stress Tolerance Index

4. Mean Productivity

5. Geometric Mean Productivity

6. Yield Stability Index

7. Yield Index

ژنتیکی در گونه‌های گیاهی برای انتخاب والدین مناسب در دورگ‌گیری‌ها و تولید نتایج مناسب اهمیت دارد (Mohammadi & Prasanna 2003). از این رو می‌توان گفت تنوع، اساس اکثر برنامه‌های اصلاح نباتات می‌باشد. تکنیک‌های مبتنی بر نشانگرهای DNA قادر به شناسایی چندشکلی مربوط به تفاوت در توالی‌های DNA می‌باشد. این روش‌ها مکمل روش‌های کلاسیک ارزیابی تنوع هستند. مزیت عمده آنها این است که تنوع را در سطح DNA مورد بررسی قرار داده و مستقل از شرایط محیطی می‌باشند (Rao 2004). مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که دارای کاربردهای متعددی از جمله امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی، شناسایی آلل‌های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرمپلاسما، تسهیل مکان‌یابی دقیق QTL ها و تایید ژن‌های کاندیدای مسئول صفات کمی می‌باشد (Gebhardt et al. 2004).

در سال‌های اخیر تحقیقاتی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط نشانگرهای مولکولی با صفات مختلف زراعی در ارزن دمروباهی انجام شده است. در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی 3 ژنوتیپ اهلی و 9 ژنوتیپ وحشی ارزن در آمریکا و کانادا با استفاده از نشانگر AFLP بررسی شد. 8 ترکیب آغازگری AFLP تعداد 39 قطعه DNA پلی‌مورف را شناسایی کرد. تجزیه خوشه‌ای ارزن‌ها را به دو گروه متمایز تقسیم‌بندی کرد که 6 ژنوتیپ از ارزن‌های وحشی با 3 ژنوتیپ ارزن اهلی در یک گروه و 3 ژنوتیپ وحشی دیگر در گروه دیگری قرار گرفتند (Karam et al. 2004). در پژوهشی دیگر 916 ژنوتیپ ارزن دمروباهی در 5 محیط مختلف کشت و صفات مورفولوژیکی آنها اندازه‌گیری شد. در این مطالعه با استفاده از نشانگر SNP، 512 مکان ژنومی مرتبط با 47 صفت زراعی شناسایی شد (Jia et al. 2013). همچنین در بررسی ارتباط بین شاخص‌ها و نشانگرهای مولکولی در برنج با استفاده از 10 شاخص و 189 مکان ژنی حاصل از 36 جفت نشانگر SSR و 144 مکان ژنی حاصل از 10 جفت نشانگر ISSR بر روی 59 ژنوتیپ برنج در شرایط تنش و بدون تنش، شاخص‌های SSI، STI، MP، GMP، HM و YI به عنوان شاخص‌های برتر در هر دو شرایط تنش و بدون تنش انتخاب شدند. براساس نتایج مولکولی در مجموع 57 و 44 نشانگر آگاهی‌بخش مرتبط با شاخص‌ها شناسایی شد که بیشترین توجه تغییرات براساس داده‌های ریزماهواره مربوط به شاخص تحمل به تنش (STI) و بیشترین توجه تغییرات براساس داده‌های بین ریزماهواره مربوط به شاخص عملکرد (YI) بود (Karim Koshte & Sabour 2017). به‌منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با شاخص‌های تحمل به خشکی در گندم نان (*Triticum aestivum*) در مطالعه‌ای از نشانگرهای ISSR استفاده شد. 18 نشانگر مورد استفاده، 99 مکان در 92 ژنوتیپ گندم نان تولید کردند. نشانگرهای UBC-867، is9، s11، is15 و is5 بیشترین ارتباط را با شاخص‌های تحمل به خشکی مورد بررسی نشان دادند (Yaghoutipour et al. 2019). مطالعه‌ای دیگر ارتباط بین نشانگرهای مولکولی با صفات مرتبط با تحمل به تنش غرقابی در جو بررسی شد. مطابق نتایج تجزیه ارتباطی در شرایط نرمال بالاترین ضریب تبیین به نشانگر E100-M160-27 مرتبط با تغییرات قطر ریشه و در شرایط تنش به

نشانگر E80-M150-1 مرتبط با شاخص GMP و نشانگر E100- M150-22 مرتبط با وزن خشک اندام هوایی اختصاص داشت (Heydari et al. 2013). هدف از این پژوهش، ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مولکولی اطلاع‌رسان مرتبط با صفات تحمل به خشکی در 21 ژنوتیپ ارزن دمروباهی، با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سه سال زراعی 1392، 1393 و 1395 در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان اجرا شد. این مزرعه با ارتفاع 1754 متر از سطح دریا و طول جغرافیایی، 56 درجه و 58 دقیقه شمالی و عرض جغرافیایی 30 درجه و 15 دقیقه شمالی در فلات مرکزی کشور ایران واقع شده است. در این آزمایش، 21 ژنوتیپ ارزن دمروباهی (جدول 1) در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو تکرار به مدت سه سال زراعی در دو سطح تنش و بدون تنش رطوبتی، کشت شدند. در مرحله ظهور کامل گل آذین حدود 15 سانتیمتر از ابتدا و انتهای هر خط به عنوان حاشیه در نظر گرفته شد و از 70 سانتی‌متر باقی مانده نمونه‌برداری انجام شد. در هر اندازه‌گیری ابتدا 10 بوته به صورت تصادفی انتخاب گردید، سپس صفات مورد بررسی اندازه‌گیری شدند. صفات تعداد ساقه بارور، ارتفاع بوته، طول برگ پرچم، عرض برگ پرچم، تعداد برگ، طول گل آذین، وزن بذر تک بوته، عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیک پس از برداشت اندازه‌گیری شدند.

شاخص‌های تحمل به خشکی از طریق روابط زیر محاسبه شدند:

$$TOL = Y_p - Y_s \quad \text{رابطه 1}$$

$$SI = 1 - \frac{Y_s}{Y_p} \quad \text{رابطه 2}$$

$$SSI = \frac{1 - \frac{Y_s}{Y_p}}{SI} \quad \text{رابطه 3}$$

$$STI = \frac{Y_p \times Y_s}{(Y_p)^2} \quad \text{رابطه 4}$$

$$MP = \frac{(Y_p + Y_s)}{2} \quad \text{رابطه 5}$$

$$GMP = \sqrt{Y_p \times Y_s} \quad \text{رابطه 6}$$

$$HARM = \frac{2(Y_p \times Y_s)}{Y_p + Y_s} \quad \text{رابطه 7}$$

$$\%R = \frac{Y_p - Y_s}{Y_p} \times 100 \quad \text{رابطه 8}$$

در این روابط Y_p و Y_s به ترتیب عملکرد یک ژنوتیپ در شرایط تنش و بدون تنش و Y_p و Y_s به ترتیب میانگین عملکرد کل ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش و بدون تنش می‌باشد. پس از محاسبه شاخص‌های فوق همبستگی بین مقادیر این

شاخص‌ها و عملکرد دانه و بیولوژیک، در شرایط تنش و بدون تنش خشکی محاسبه شد تا بهترین شاخص‌ها برای شناسایی و انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی مشخص شوند.

به منظور استخراج DNA، نمونه‌گیری از برگ‌های تازه 5 بوته از هر ژنوتیپ صورت گرفت. استخراج DNA از برگ و با روش Saghai Maroof (1984) با کمی تغییر انجام گرفت. برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز آگار 1 درصد استفاده شد. آزمایشات AFLP بر اساس پروتکل Vos et al. (1995) با کمی تغییر انجام گرفت. برای انجام این کار از دو آنزیم برشی *EcoRI* و *MseI* استفاده شد. در مرحله تکثیر انتخابی از 20 ترکیب آغازگری استفاده شد که از میان آنها 12 ترکیب که بیشترین چندشکلی را دارا بودند انتخاب شدند (جدول 2). به منظور مشاهده و تفکیک دقیق تر باندها از دستگاه DNA QiAXEL استفاده گردید. باندها با نرم افزار Biocalculator محاسبه شدند. به منظور بررسی ساختار جمعیت از نرم افزار Structure 2.3.4 در حالت Admixture با 10000 Burn-in و 100000 MCMC استفاده شد که در این نرم‌افزار بین 1 تا 10 زیرجمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها 5 تکرار منظور گردید. این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند به گونه‌ای که در هر زیرجمعیت میزان تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. در نهایت بر اساس K بهینه تعیین شده به روش (2005) Evano et al. 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 نرم‌افزار 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 نرم‌افزار Tassel به صورت مدل خطی (MLM) اجرا شد و نشانگرهای مرتبط با صفات مورد مطالعه با توجه به مقادیر P-value کمتر از 0/01 انتخاب شدند. همچنین شاخص‌های نشانگری با استفاده از برنامه GenAIX 6.5 طبق فرمول‌های زیر محاسبه شدند. همچنین تجزیه به مولفه‌های اصلی و رسم نمودار دوبعدی نیز با استفاده از این نرم‌افزار انجام گرفت.

$$PIC = 1 - p^2 - q^2 \quad \text{رابطه 9}$$

$$Ne = 1/(p^2 + q^2) \quad \text{رابطه 10}$$

$$I = -1 \times (p \times \ln(p) + q \times \ln(q)) \quad \text{رابطه 11}$$

$$MI = PIC \times \text{شکل چند نواریهای تعداد} \quad \text{رابطه 12}$$

جدول 1. فهرست نمونه‌های ارزن دم‌روباهی (*Setaria italica*) مورد مطالعه شامل کد و نام (منشا) نمونه‌ها

Table 1. Origin of foxtail millet (*Setaria italica*) genotypes used in this study

ردیف	کد نام (منشا)	ردیف	کد نام (منشا)	ردیف	کد نام (منشا)
Number	ژنوتیپ	Number	ژنوتیپ	Number	ژنوتیپ
	Origin Code		Origin Code		Origin Code
1	شیراز-1 s6	8	مشهد-1 s36	15	مازندران-2 s97
2	کرمان-3 s11	9	مشهد-2 s38	16	یزد-2 s104
3	کرمان-4 s12	10	مشهد-3 s39	17	یزد-3 s105
4	بیرجند-4 s16	11	تبریز-4 s55	18	اصفهان-1 s123
5	بیرجند-3 s18	12	شیراز-2 s60	19	اصفهان-2 s126
6	شهرکرد-2 s30	13	شیراز-3 s66	20	خوزستان-2 s136
7	شهرکرد-4 s33	14	ایلام-1 s68	21	خوزستان-4 s140
	Shiraz-1		Mashhad-1		Mazanderan-2
	Kerman-3		Mashhad-2		Yazd-2
	Kerman-4		Mashhad-3		Yazd-3
	Birjand-4		Tabas-4		Esfahan-1
	Birjand-3		Shiraz-2		Esfahan-2
	Shahrekord-2		Shiraz-3		Khozestan-2
	Shahrekord-4		Ilam-1		Khozestan-4

نتایج و بحث

برای بررسی 21 نمونه ارزن دم‌روباهی از 12 ترکیب آغازگری AFLP استفاده شد که در مجموع 443 باند قابل تشخیص ایجاد شد. که از این تعداد 316 باند چندشکل بودند. تعداد باندهای چندشکل ایجاد شده توسط هر ترکیب آغازگری در دامنه بین 17 برای ترکیب M-CAA/E-ACC و 40 برای ترکیب M-CTA/E-AAC متغیر بود. اکثر نشانگرها چندشکلی بالایی را نشان دادند به طوری که متوسط درصد چندشکلی برای نشانگرهای مورد بررسی 71/23 بود. با توجه به درصد چندشکلی بالایی ترکیبات آغازگری M-CTG/E-AAC و M-CTA/E-AAC می‌توان انتظار داشت این ترکیبات بتوانند به عنوان یک ابزار قدرتمند در

شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌های ارزن دمروباهی عمل نمایند. محتوای اطلاعات چندشکلی از 0/20 تا 0/29 متغیر بود. محتوای اطلاعات چندشکلی در حقیقت احتمال جداسازی چندشکلی بین دو ژنوتیپ تصادفی را توسط یک ترکیب آغازگری اندازه می‌گیرد (Pritchard 2000). متوسط تعداد آل‌های مؤثر برای آغازگرهای مختلف 1/38، در دامنه 1/30 تا 1/48 به دست آمد. نزدیک بودن این عدد به تعداد آل واقعی یعنی 2، دلیلی بر تأثیر خوب آل‌ها در چندشکلی بالا و برآورد تنوع ژنتیکی است. از میان ترکیب‌های آغازگری مورد بررسی، ترکیب M-CTG/E-ACC و M-CAA/E-ACC بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی، تعداد آل مؤثر در هر مکان ژنی و شاخص شانون را نشان دادند. بالا بودن میزان این شاخص‌ها بیانگر قدرت بالای تفکیک و تمایز این ترکیب‌ها می‌باشد. همچنین ترکیب M-CAA/E-AAC کمترین میزان این شاخص‌ها را دارا بود. شاخص نشانگری (MI) نیز از تعداد مکان‌های ژنی چندشکل حاصل از آغازگر در برآورد کارایی و قدرت تفکیک آن‌ها استفاده می‌کند که بیشترین مقدار آن به میزان 9/61 از ترکیب آغازگری M-CTA/E-AAC حاصل شد. قدرت تفکیک در دامنه بین 4/54-9/61 قرار گرفت که میزان بالای آن نشانه کارایی و کفایت این نشانگر در تمایز گروه‌های مختلف مورد بررسی بود.

در مطالعه‌ای بر روی ارزن دمروباهی متعلق به سه کشور چین، کره و پاکستان با استفاده از 28 نشانگر SSR، در مجموع 298 آل با میانگین 10/6 مشاهده شد. همچنین متوسط اطلاعات چند شکلی برای ژنوتیپ‌های متعلق به کره، چین و پاکستان به ترتیب 0/621، 0/653 و 0/438 بدست آمد (Ji Kim et al. 2012). همچنین در بررسی تنوع ژنتیکی گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای AFLP، مقدار میانگین PIC برابر با 0/3 اعلام شد (Mardi et al. 2011). مقادیر عملکرد دانه و بیولوژیک در شرایط بدون تنش (Y_{pi}) و در شرایط تنش (Y_{si}) و شاخص‌های ارزیابی تحمل به خشکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در جدول 4 و 5 ارائه شده است. نتایج این پژوهش نشان داد که بر مبنای شاخص تحمل (TOL) و با توجه به عملکرد دانه ژنوتیپ‌های S30، S123، S18 و S140 از حساسیت کمتری در برابر خشکی برخوردار بودند و بر اساس شاخص حساسیت به خشکی (SSI) ژنوتیپ‌های S30، S123، S18، S140 و S55 دارای کمترین مقدار بوده و در گروه ژنوتیپ‌های با حساسیت کمتر به تنش خشکی قرار گرفتند. پایین بودن مقدار شاخص SSI، نشان‌دهنده تحمل بیشتر ژنوتیپ‌ها به تنش است. به‌طور کلی ژنوتیپ‌های دارای شاخص حساسیت بیشتر از یک، حساس قلمداد می‌شوند. انتخاب بر اساس این شاخص باعث گزینش ژنوتیپ‌هایی با عملکرد نسبتاً پایین در شرایط عادی و عملکرد بالا در شرایط تنش می‌گردد (Fernandez & Reynolds 2000). درصد کاهش عملکرد (R%)، یک شاخص مهم جهت ارزیابی میزان تغییرات عملکرد یک رقم در شرایط تنش نسبت به عملکرد آن در شرایط عدم تنش می‌باشد. در واقع هر چقدر مدت و شدت تنش بیشتر و رقم حساس‌تر باشد درصد این تغییر بیشتر است و هر چقدر این درصد کمتر باشد آن رقم متحمل‌تر می‌باشد. نتایج نشان داد که از لحاظ این معیار، ژنوتیپ‌های S30، S123، S18، S140 و S55 دارای کمترین درصد کاهش عملکرد (R%) بودند.

جدول 2. ترکیبات آغازگری مورد استفاده برای تجزیه AFLP در ارزن دمروباهی

Table 2. Primer combinations used for AFLP analysis in foxtail millet

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

بررسی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه براساس شاخص‌های SSI، TOL و R% با توجه به عملکرد بیولوژیک نشان داد که ژنوتیپ‌های S97، S123، S105، S30 و S68 نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها دارای کمترین میزان این شاخص‌ها می‌باشند. براساس شاخص‌های HARM، MP و GMP برای عملکرد دانه ژنوتیپ‌های S55، S104، S68، S136، S39، S66، S12، S17 و S38 و برای عملکرد بیولوژیک ژنوتیپ‌های S11، S60، S66، S104، S17 و S140 در برابر تنش خشکی از تحمل نسبی بالاتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برخوردار بودند. از سوی دیگر، شاخص STI گروه‌بندی متفاوتی را نسبت به شاخص‌های HARM، MP و GMP نشان داد. بر اساس این شاخص برای عملکرد دانه ژنوتیپ‌های S30، S123، S18، S140 و S55 و برای عملکرد بیولوژیک ژنوتیپ‌های S97، S123، S105، S68، S30 و S18 بالاترین مقدار را داشتند. بنابراین نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتر بوده و تحمل بیشتری به تنش خشکی نشان دادند.

جدول 3. شاخص‌های نشانگری 12 مارکر AFLP در 21 ژنوتیپ ارزن دم‌روباهی مورد مطالعه

Table 3. Diversity statistic for 12 AFLP primer combinations in 21 foxtail millet genotypes

ترکیب آغازگری	تعداد کل	تعداد باند چند	درصدباندهای چند	محتوای اطلاعات	شاخص	شاخص	تعداد آل موثر
Primer	باند	شکل	شکل	(PIC) چند شکلی	شانون	نشانگری	(Ne)
Combination	Total	Polymorphic	Polymorphic	Polymorphism	Shannon	(MI)	No. of
	Bands	Bands	percentage	information	index	Marker	Effective
				content	index	index	Alleles
M-CAA/E-AAC	41	23	56.09	0.20	0.33	4.54	1.30
M-CTT/E-AAC	42	28	66.66	0.24	0.39	6.70	1.38
M-CTG/E-AAC	37	32	86.48	0.23	0.38	7.52	1.37
M-CTA/E-AAC	48	40	83.33	0.24	0.39	9.61	1.36
M-CAA/E-AGC	31	23	74.19	0.22	0.36	5.03	1.32
M-CTT/E-AGC	40	27	67.50	0.24	0.38	6.46	1.38
M-CTG/E-AGC	46	34	73.91	0.21	0.34	7.03	1.32
M-CTA/E-AGC	35	23	65.71	0.26	0.40	5.98	1.43
M-CAA/E-ACC	29	17	58.62	0.28	0.45	4.84	1.43
M-CTT/E-ACC	40	28	70.00	0.22	0.36	6.18	1.35
M-CTG/E-ACC	26	21	80.77	0.29	0.45	6.14	1.48
M-CTA/E-ACC	21	20	71.43	0.23	0.36	4.58	1.38
Total	443	316	854.72	2.86	4.60	74.60	16.51
Mean	36.9	26.33	71.23	0.24	0.38	6.22	1.38

همبستگی بین شاخص‌های تحمل به خشکی و عملکرد می‌تواند به عنوان معیاری مناسب برای انتخاب بهترین ژنوتیپ‌ها و شاخص‌ها به کار رود. مناسب‌ترین شاخص برای گزینش ارقام متحمل به تنش، شاخصی است که دارای همبستگی نسبتاً بالایی با عملکرد در هر دو شرایط تنش و بدون تنش باشد. براساس ضرایب همبستگی، ارتباط مثبت و معنی‌داری بین Ys و Yp مشاهده شد که نشان دهنده این است که عملکرد بالا در شرایط بدون تنش منجر به عملکرد بالا در شرایط تنش می‌شود. در مواردی، گزینش براساس عملکرد بالا در شرایط بدون تنش تا حدودی می‌تواند به‌طور غیرمستقیم موجب افزایش عملکرد در شرایط تنش خشکی شود (Cattivelli et al. 2008). در تحقیقی بر روی گندم، ارتباط مثبت و غیر معنی‌داری بین Yp و Ys مشاهده شد (Anwar et al. 2011). در مطالعه دیگری نتایج نشان داد که در هر دو محیط، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین YP با شاخص‌های انتخاب TOL، MP، GMP، STI، SSI و HM وجود دارد. همبستگی YS با GMP، STI و HM نشان

دهنده این است که انتخاب براساس این شاخص‌ها می‌تواند منجر به افزایش عملکرد در شرایط تنش شود (Majidi et al. 2011). نتایج ضرایب همبستگی نشان داد که همبستگی TOL با عملکرد دانه در شرایط تنش و بدون تنش و با عملکرد بیولوژیک در شرایط تنش غیر معنی‌دار بود (جدول 6 و 7).

همبستگی مثبت و معنی‌دار TOL با عملکرد بیولوژیک در شرایط بدون تنش نشان می‌دهد که انتخاب براساس TOL منجر به کاهش عملکرد بیولوژیک در شرایط آبیاری می‌شود. همچنین همبستگی شاخص‌های STI، SSI و R% با عملکرد دانه در شرایط تنش معنی‌دار و منفی است. همبستگی منفی این شاخص‌ها نشان‌دهنده این است که با افزایش عملکرد در شرایط تنش، میزان این شاخص‌ها کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج ضرایب همبستگی، شاخص‌های HARM، GMP و MP دارای بیشترین میزان همبستگی با عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیک در شرایط تنش و بدون تنش بودند. بنابراین می‌توان این شاخص‌ها را به عنوان شاخص‌های برتر در هر دو شرایط تنش و بدون تنش در نظر گرفت. زیرا این شاخص‌ها در هر دو محیط دارای همبستگی بالایی با عملکرد می‌باشند و قادرند ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا در هر دو شرایط را شناسایی کنند. براساس این نتایج می‌توان ژنوتیپ‌های S55، S104، S68، S136، S39، S66، S12، S17 و S38 برای عملکرد دانه و S11، S60، S66، S104، S17 و S140 برای عملکرد بیولوژیک را که براساس این شاخص‌ها در رده بالایی قرار داشتند به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های S60، S33، S126 و S105 برای عملکرد دانه و S123، S97 و S105 برای عملکرد بیولوژیک که کمترین میزان این شاخص‌ها را دارا بودند به‌عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها در این تحقیق معرفی کرد. در مطالعه‌ای شاخص‌های HARM، GMP و STI به‌عنوان بهترین شاخص‌ها در تفکیک نمونه‌های ارزن دمروباهی متحمل به خشکی، معرفی شدند (Nakhaei et al. 2014). همچنین در مطالعه دیگری عملکرد در شرایط بدون تنش (Yp) با شاخص‌های TOL، MP، GMP، STI ارتباط داشت و نشان داد که این معیارها در شناسایی ارقام با بازده بالا در شرایط رطوبتی مؤثر است (Farshadfar et al. 2012).

تجزیه به مختصات اصلی یا PCoA¹ یکی از روش‌های مطالعه روابط ژنتیکی است و در آن هر مختصات درصدی از تغییرات کل را توجیه می‌کند. در داده‌های مولکولی ماتریس شباهت یا فاصله بین افراد به‌عنوان ورودی PCoA استفاده می‌شود. در این مطالعه از تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی 21 ژنوتیپ مورد بررسی، برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی بر پایه ماتریس فاصله اقلیدوسی نشان داد که سه مولفه اول در مجموع 61/13 درصد از کل تغییرات را توجیه نمودند. که سهم هر کدام به ترتیب 23/60، 21/86 و 15/66 درصد می‌باشد (جدول 8).

1. Principal Coordinate Analysis

بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مربوط به نشانگرهای DNA، بهترین حالت آن است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسبی در ژنوم داشته باشند و بتوانند از تمام ژنوم نمونه برداری کنند.

جدول 4. میانگین سه ساله عملکرد دانه ژنوتیپ‌های ارزن دمروباهی و شاخص‌های تنش در شرایط تنش و

بدون تنش

Table 4. Three-year mean of grain yield and drought indices of Foxtail millet accessions under drought stress and normal irrigation conditions

%R	HARM	STI	GMP	SSI	MP	TOL	Ys	Yp	Genotype
28.46	1742.87	0.72	1767.38	0.85	1792.22	594.78	1494.83	2089.61	s104
38.09	632.07	0.62	650.32	1.14	669.10	314.83	511.69	826.51	s105
64.46	691.46	0.36	786.03	1.94	893.54	849.86	468.61	1318.47	s11
23.65	1129.17	0.76	1139.46	0.71	1149.85	308.37	995.66	1304.03	s12
14.32	945.17	0.86	947.99	0.43	950.83	146.67	877.49	1024.16	s123
54.71	564.42	0.45	609.26	1.64	657.67	495.29	410.02	905.32	s126
27.64	1251.12	0.72	1267.51	0.83	1284.13	411.78	1078.24	1490.02	s136
15.80	922.52	0.84	925.93	0.47	929.36	159.48	849.62	1009.10	s140
35.80	1084.55	0.64	1111.29	1.08	1138.69	496.60	890.39	1386.99	s17
15.77	924.12	0.84	927.53	0.47	930.94	159.32	851.28	1010.60	s18
11.96	823.84	0.88	825.51	0.36	827.18	105.24	774.56	879.80	s30
55.25	434.34	0.45	469.92	1.66	508.42	388.16	314.34	702.50	s33
43.85	719.80	0.56	749.97	1.32	781.41	438.85	561.99	1000.84	s36
37.54	1003.40	0.62	1031.31	1.13	1060.01	489.90	815.05	1304.96	s38
40.94	1162.46	0.59	1202.99	1.23	1244.93	640.85	924.51	1565.36	s39
19.01	1872.39	0.81	1882.80	0.57	1893.27	397.68	1694.43	2092.11	s55
58.31	705.85	0.42	774.47	1.75	849.76	699.39	500.06	1199.45	s6
55.95	421.17	0.44	457.06	1.68	496.01	385.33	303.35	688.68	s60
27.33	1197.78	0.73	1213.07	0.82	1228.55	388.91	1034.10	1423.01	s66
24.13	1552.83	0.76	1567.65	0.72	1582.62	434.25	1365.49	1799.74	s68
37.42	938.33	0.63	964.22	1.12	990.83	456.15	762.75	1218.90	s97

TOL= شاخص تحمل، SSI= شاخص حساسیت به تنش، STI= شاخص تحمل به تنش، MP= شاخص میانگین حسابی

بهره‌وری، GMP= میانگین هندسی بهره‌وری، HARM= میانگین هارمونیک YS= عملکرد دانه در شرایط تنش، YP= عملکرد

دانه در شرایط نرمال

TOL= Tolerance, SSI= Stress Susceptibility Index, STI= Stress Tolerance Index, MP= Mean Productivity, GMP= Geometric Mean Productivity, HARM= harmonic mean YS= Grain yield under drought conditions, YP= Grain yield under normal conditions

جدول 5. میانگین سه ساله عملکرد بیولوژیک ژنوتیپ‌های ارزن دم‌روباهی و شاخص‌های تنش در شرایط

تنش و بدون تنش

Table 5. Three-year mean of biological yield and drought indices of Foxtail millet accessions under drought stress and normal irrigation conditions

%R	HARM	STI	GMP	SSI	MP	TOL	Ys	Yp	Genotype
24.26	14.04	0.76	14.18	1.12	14.32	3.95	12.34	16.29	s104
5.06	4.61	0.95	4.61	0.23	4.62	0.24	4.50	4.74	s105
57.39	10.14	0.43	11.07	2.66	12.10	9.74	7.23	16.96	s11
19.66	12.68	0.80	12.75	0.91	12.83	2.80	11.43	14.23	s12
2.49	7.53	0.98	7.53	0.12	7.53	0.19	7.44	7.63	s123
20.97	6.34	0.79	6.38	0.97	6.43	1.51	5.67	7.18	s126
12.15	10.70	0.88	10.73	0.56	10.75	1.39	10.05	11.44	s136
28.67	8.52	0.71	8.64	1.33	8.77	2.93	7.30	10.23	s140
25.24	10.72	0.75	10.84	1.17	10.95	3.16	9.37	12.53	s17
9.68	11.07	0.90	11.09	0.45	11.10	1.13	10.54	11.67	s18
5.98	10.70	0.94	10.71	0.28	10.71	0.66	10.38	11.04	s30
17.94	6.73	0.82	6.76	0.83	6.80	1.34	6.13	7.47	s33
14.78	7.50	0.85	7.52	0.68	7.55	1.20	6.95	8.15	s36
17.13	10.43	0.83	10.48	0.79	10.53	1.97	9.54	11.51	s38
21.96	11.30	0.78	11.39	1.02	11.47	2.83	10.06	12.89	s39
32.09	7.20	0.68	7.33	1.49	7.47	2.86	6.04	8.90	s55
15.44	10.47	0.85	10.51	0.71	10.55	1.76	9.66	11.43	s6
35.08	11.30	0.65	11.57	1.62	11.84	5.04	9.32	14.36	s60
34.46	9.29	0.66	9.50	1.60	9.71	4.04	7.69	11.73	s66
6.43	7.95	0.94	7.96	0.30	7.96	0.53	7.70	8.23	s68
0.15	9.52	1.00	9.52	0.01	9.52	0.01	9.51	9.52	s97

TOL= شاخص تحمل، SSI= شاخص حساسیت به تنش، STI= شاخص تحمل به تنش، MP= شاخص میانگین حسابی

بهره‌وری، GMP= میانگین هندسی بهره‌وری، HARM= میانگین هارمونیک بهره‌وری، YS= عملکرد دانه در شرایط تنش، YP= عملکرد

دانه در شرایط نرمال

TOL= Tolerance, SSI= Stress Susceptibility Index, STI= Stress Tolerance Index, MP= Mean Productivity, GMP= Geometric Mean Productivity, HARM= harmonic mean YS= Grain yield under drought conditions, YP= Grain yield under normal conditions

بنابراین در صورتی که نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنومات انتخاب شوند و همبستگی آنها کم باشد تعداد مؤلفه‌های

بیشتری برای توجیه کل تغییرات لازم است. اطلاعات بدست آمده از تجزیه به محتصات اصلی نشان دهنده این مطلب است که

ترکیبات آغازگری AFLP استفاده شده در این تحقیق پراکندگی نسبتاً خوبی در سطح ژنوم دارند. شکل 1 نشان دهنده توزیع و

پراکنش ژنوتیپ‌ها براساس دو مولفه اول و دوم است. تجمع افراد در یک نقطه از پلات نشان دهنده تشابه ژنتیکی آنهاست. به منظور بررسی ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و شاخص‌های تحمل به خشکی، ساختار جمعیت بر اساس داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی با استفاده از روش غیر پارامتری ارائه شده توسط اوانو و همکاران (Evanno et al. 2005) بررسی شد.

جدول 6. همبستگی شاخص‌های تحمل به خشکی و عملکرد دانه در شرایط تنش (Ys) و عدم تنش خشکی (Yp) در ژنوتیپ‌های ارزن دم‌روباھی

Table 6. Correlation coefficient between tolerance and sensitivity indices and grain yield of Foxtail millet accessions under drought stress and normal irrigation treatments

%R	HARM	STI	GMP	SSI	MP	TOL	Ys	Yp	
								1	Yp
							1	0.88**	Ys
						1	-0.08 ^{ns}	0.38 ^{ns}	TOL
					1	0.16 ^{ns}	0.97**	0.97**	MP
				1	-0.49*	0.74**	-0.68**	-0.28 ^{ns}	SSI
			1	-0.54*	0.99**	0.10 ^{ns}	0.98**	0.96**	GMP
		1	0.54*	-0.99**	0.49*	-0.74**	0.68**	0.29 ^{ns}	STI
	1	0.58**	0.99**	-0.58**	0.99**	0.05 ^{ns}	0.99**	0.94**	HARM
1	-0.58**	-0.99**	-0.54*	0.99**	-0.48*	0.74**	-0.68**	-0.28 ^{ns}	%R

^{ns}، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد

جدول 7. همبستگی شاخص‌های تحمل به خشکی و عملکرد بیولوژیک در شرایط تنش (Ys) و عدم تنش خشکی (Yp) در ژنوتیپ‌های ارزن دمر و باهی

Table 7. Correlation coefficient between tolerance and sensitivity indices and biological yield of Foxtail millet accessions under drought stress and normal irrigation treatments

%R	HARM	STI	GMP	SSI	MP	TOL	Ys	Yp	
								1	Yp
							1	0.71**	Ys
						1	0.07 ^{ns}	0.75**	TOL
					1	0.52*	0.89**	0.95**	MP
				1	0.35 ^{ns}	0.95**	-0.09 ^{ns}	0.60**	SSI
			1	0.28 ^{ns}	0.99**	0.44*	0.92**	0.92**	GMP
		1	-0.28 ^{ns}	-0.99**	-0.35 ^{ns}	-0.95**	0.09 ^{ns}	-0.60**	STI
	1	-0.21 ^{ns}	0.99**	0.21 ^{ns}	0.98**	0.37 ^{ns}	0.95**	0.89**	HARM
1	0.21 ^{ns}	-0.99**	0.28 ^{ns}	0.99**	0.35 ^{ns}	0.95**	-0.09 ^{ns}	0.60**	%R

^{ns}، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد

شاخص تثبیت (Fst) بین 6 زیر جمعیت این مطالعه به ترتیب برابر با 0/001، 0/706، 0/597، 0/451، 0/0017 و 0/893 بود و در نهایت ماتریس Q مورد نیاز برای استفاده در تجزیه ارتباطی تشکیل شد. در تجزیه ارتباطی، رابطه بین ژنوتیپ و فنوتیپ گیاه مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت با استفاده از نامتعادل بودن پیوستگی موجود بررسی می‌شود. در این مطالعه برای بررسی ارتباط بین نشانگر و صفات دو روش مدل خطی کلی (GLM¹) و مدل خطی مختلط (MLM¹)

¹ . General linear model

مورد استفاده قرار گرفتند. روش MLM، اطلاعات حاصل از ماتریس K (ضریب خویشاوندی افراد) و ماتریس Q (ضرایب ساختار جمعیت) را با هم تلفیق می‌کند و بر اساس اطلاعات ماتریس Q، ماتریس K، اطلاعات فنوتیپی و اطلاعات نشانگرها، همبستگی نشانگرها و صفات را در یک مدل رگرسیونی چندگانه بررسی می‌کند. اما در روش GLM فقط ماتریس Q و اطلاعات فنوتیپی و نشانگرها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین روش MLM در مقایسه با مدل‌های خطی رایج در تجزیه‌ی ارتباطی روش برتری است (Yu et al. 2006).

روش GLM و MLM به‌طور کلی در مورد ژنوتیپ‌های مورد بررسی به ترتیب 45 و 20 نشانگر مرتبط با عملکرد دانه و شاخص‌های تحمل به تنش و 26 و 13 نشانگر مرتبط با عملکرد بیولوژیک و شاخص‌های تحمل به تنش را شناسایی کردند که این نشان‌دهنده کاهش تعداد نشانگرهای مرتبط با صفات مورد نظر، در مدل MLM نسبت به مدل GLM است. این امر می‌تواند ناشی از توانایی این مدل در شناسایی و حذف نشانگرهایی با همبستگی کاذب باشد. با توجه به پایداری نتایج در مدل MLM، در این پژوهش، نتایج این مدل در ارتباط با صفات مختلف مورد بحث قرار می‌گیرد. لازم به ذکر است که در این پژوهش حداقل سطح معنی‌داری برای تجزیه ارتباطی بین صفات و نشانگرها یک درصد ($P < 0.01$) در نظر گرفته شد. توزیع نشانگرها به وسیله میزان ضریب تبیین R^2 نشانگر در مدل رگرسیونی نیز مورد بررسی قرار گرفت. دامنه تغییرات R^2 نشانگرها با توجه به عملکرد دانه بین 0/18-0/29 و با توجه به عملکرد بیولوژیک بین 0/21-0/34 متغیر و در سطح 1% معنی‌دار بود (جدول 7). نتایج تجزیه ارتباطی با توجه به عملکرد دانه نشان داد، شاخص TOL با 5 نشانگر ارتباط معنی‌دار دارد که این نشانگرها با سایر شاخص‌ها ارتباطی را نشان ندادند نشانگر M-CAA/E-AAC تنها نشانگری بود که در جایگاه کروموزومی شماره 1 با شاخص‌های SSI، STI و R% در ارتباط بود و با سایر شاخص‌ها ارتباطی نداشت.

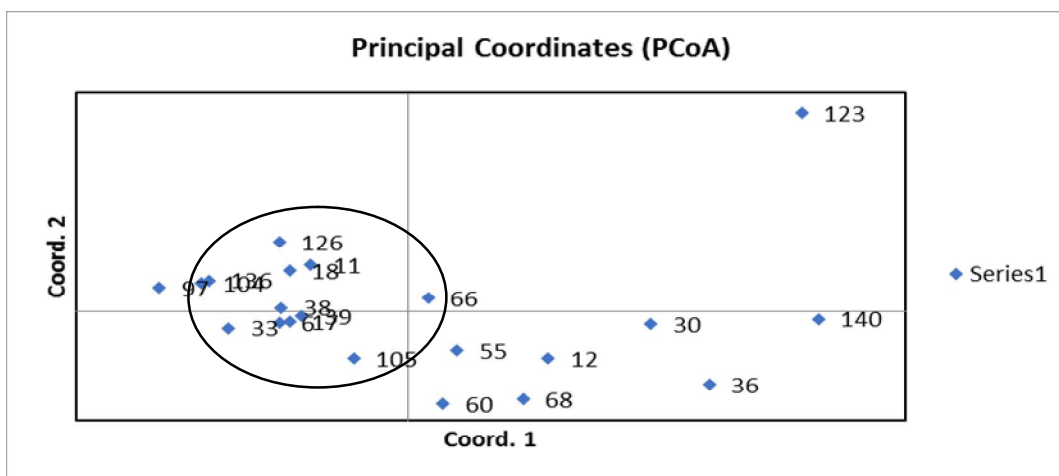
نتایج براساس عملکرد بیولوژیک نیز ارتباط بین نشانگرهای M-CTG/E-ACC در جایگاه کروموزومی شماره 295 و M-CTT/E-AAC در جایگاه کروموزومی شماره 43 را تنها با شاخص‌های TOL، SSI، STI و R% نشان داد. بنابراین می‌توان گفت این نشانگرها مختص به این شاخص‌ها می‌باشند. همچنین براساس عملکرد دانه، نشانگرهای M-CAA/E-AAC در جایگاه کروموزومی شماره 14 و M-CTG/E-ACC در جایگاه کروموزومی شماره 283 و براساس عملکرد بیولوژیک، نشانگر M-CTT/E-ACC در جایگاه کروموزومی شماره 264 با شاخص‌های Yp، Ys، MP، GMP و HARM مرتبط بودند همانگونه که نتایج نشان داد برخی از نشانگرها با چندین شاخص در ارتباط بودند که این نتیجه با توجه به همبستگی بین شاخص‌ها دور از انتظار نبود.

¹ . Mixed linear model

جدول 8. تجزیه به مختصات اصلی داده‌های AFLP در ژنوتیپ‌های ارزن دم‌روباهی

Table 8. Principal component analysis of foxtail millet based on AFLP marker

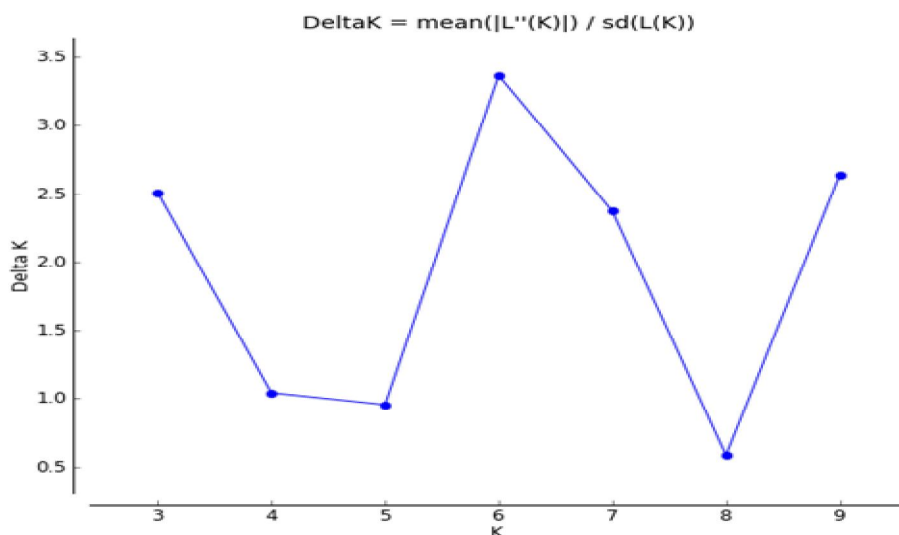
درصد تجمعی واریانس Percentage of Cumulative variance	درصد واریانس مربوطه Percentage of variance	مولفه Factor
23.60	23.60	PC1
45.47	21.86	PC2
61.13	15.66	PC3



شکل 1. نمایش دو بعدی تجزیه مؤلفه اصلی بر اساس مؤلفه اول و دوم داده‌های نشانگر AFLP

Figure 1. Biplot based on the first two dimensions of the principal component analysis (PCA)

با توجه به مطابقت این نتایج با نتایج ضرایب همبستگی می‌توان این نشانگرها را با صفات تحمل به خشکی مرتبط دانست. احتمالاً محل قرارگیری این نشانگرها در داخل ژنوم مناطقی است که کنترل کننده ژن‌های مربوط به صفات تحمل به خشکی در ارزن می‌باشد. به نظر می‌رسد که نشانگرهای مورد بررسی توانستند ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی را از سایر ژنوتیپ‌ها تفکیک کنند. بنابراین می‌توان از این نشانگرها به عنوان معیار گزینش برای تحمل به خشکی استفاده کرد. 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. در نتیجه می‌توان از این نشانگرها برای بررسی تحمل به خشکی ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود.



شکل 2. نمودار نتایج روش اوانو در انتخاب K بهینه

Figure 2. Delta K values from the method by Evanno, *et al* (2005)

نتیجه گیری: براساس نتایج این پژوهش، چند شکلی بالای ترکیب‌های آغازگری AFLP نشان داد که نشانگرهای AFLP ابزاری مناسب جهت تمایز ژنوتیپ‌های ارزن دم‌روپاهی بوده و ترکیب‌های آغازگری M-CTT/E-AAC، M-CTG/E-ACC، M-CTA/E-AAC، M-CTG/E-AGC، M-CAA/E-AAC و M-CTT/E-AAC مفیدترین ترکیب‌ها در تمایز یابی ژنوتیپ‌های ارزن دم‌روپاهی از نظر تحمل به خشکی بودند. همچنین نتایج نشان داد که نشانگر AFLP برای تجزیه و تحلیل ساختار جمعیت مفید بوده و تجزیه ارتباطی با در نظر گرفتن ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در 21 ژنوتیپ ارزن دم‌روپاهی مورد مطالعه، نشان داد که برخی از آغازگرهای مورد بررسی با شاخص‌های نشانگری HARM، GMP و MP در ارتباط بودند. با توجه به نتایج ضرایب همبستگی، می‌توان شاخص‌های نشانگری HARM، GMP و MP را به‌عنوان بهترین شاخص‌ها در تفکیک نمونه‌های ارزن دم‌روپاهی متحمل به خشکی معرفی کرد زیرا این شاخص‌ها به دلیل داشتن همبستگی بالا با عملکرد در هر دو شرایط تنش و بدون تنش، قادر به انتخاب ژنوتیپ‌هایی با پتانسیل عملکرد بالا می‌باشند. بنابراین می‌توان از نشانگرهای مولکولی مرتبط با این شاخص‌ها برای بررسی تحمل به خشکی سایر ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های اصلاحی آینده استفاده نمود. همچنین ژنوتیپ‌های با پتانسیل عملکرد بالا و متحمل به تنش خشکی معرفی شده در این پژوهش، می‌توانند به‌عنوان ژنوتیپ‌های امید بخش در معرفی ارقام جدید متحمل به خشکی در برنامه‌های اصلاحی آینده به‌کار روند. استفاده از سایر ژنوتیپ‌های ارزن در مناطق مختلف می‌تواند، نتایج به‌دست آمده از این تحقیق را کامل تر نماید.

جدول 9. تجزیه ارتباطی برای شاخص‌های تحمل به خشکی با توجه به عملکرد بیولوژیک در 21 ژنوتیپ

ارزن دم‌روباهی براساس مدل MLM

Table 9. Association analysis for tolerance and sensitivity indices and biological yield in 21 foxtail millet genotypes based on MLM model

R ²	P value	نشانهگر Marker	صفت Trait
0.2287	0.0058	M-CTA/E-ACC-308	Ys
0.2123	0.0085	M-CTT/E-ACC-264	
0.3494	0.0004	M-CTG/E-ACC-295	TOL
0.2913	0.0019	M-CTT/E-AAC-43	
0.2403	0.005	M-CTT/E-ACC-264	MP
0.3235	0.0009	M-CTG/E-ACC-295	SSI
0.272	0.0032	M-CTT/E-AAC-43	
0.2389	0.005	M-CTT/E-ACC-264	GMP
0.3162	0.0011	M-CTG/E-ACC-295	STI
0.2732	0.0031	M-CTT/E-AAC-43	
0.2343	0.0055	M-CTT/E-ACC-264	HARM
0.3224	0.0009	M-CTG/E-ACC-295	%R
0.2712	0.0032	M-CTT/E-AAC-43	

جدول 10. تجزیه ارتباطی برای شاخص‌های تحمل به خشکی با توجه به عملکرد دانه در 21 ژنوتیپ ارزن

دم‌روباهی براساس مدل MLM

Table 10. Association analysis for tolerance and sensitivity indices and seed yield in 21 foxtail millet genotypes based on MLM model

R ²	P value	نشانهگر Marker	صفت Trait
0.2642	0.0036	M-CAA/E-AAC-14	Yp
0.2389	0.0063	M-CTG/E-ACC-283	
0.2912	0.0019	M-CAA/E-AAC-14	Ys
0.2763	0.0027	M-CTG/E-ACC-283	
0.2364	0.0065	M-CTA/E-AAC-91	
0.2097	0.0049	M-CTT/E-AAC-52	TOL
0.2027	0.0059	M-CTG/E-AAC-79	
0.1941	0.0073	M-CTT/E-AGC-175	
0.1941	0.0073	M-CTT/E-ACC-267	
0.1897	0.0082	M-CTG/E-AGC-197	
0.2938	0.0019	M-CAA/E-AAC-14	MP
0.272	0.0032	M-CTG/E-ACC-283	
0.2171	0.0054	M-CAA/E-AAC-1	SSI
0.2921	0.002	M-CAA/E-AAC-14	GMP
0.2727	0.0031	M-CTG/E-ACC-283	
0.2162	0.0055	M-CAA/E-AAC-1	STI
0.2891	0.0021	M-CAA/E-AAC-14	HARM
0.2718	0.0031	M-CTG/E-ACC-283	
0.2199	0.0095	M-CTA/E-AAC-91	
0.2168	0.0054	M-CAA/E-AAC-1	%R

منابع

- حیدری راویه، صبوری عاطفه، صبوری حسین و همکاران (1393) شناسایی نشانگرهای AFLP مرتبط با صفات تحمل به تنش غرقابی در جو. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی 2، 41-60.
- کریم کشته رضا، صبوری حسین (1397) ارزیابی کمی و مولکولی تحمل به تنش خشکی ژنوتیپ‌های برنج. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی 26، 195-206.
- نخعی آرزیتا، عباسی محمدرضا، آرمجو الیاس، آذری علی (1393) ارزیابی تحمل تنش خشکی انتهای فصل در نمونه‌های *Setaria Italica*. مجله علوم زراعی ایران 16، 25-38.
- یاقوتی پور آرزیتا، فرشادفر عزت اله، سعیدی محسن (1395) تجزیه ارتباط برای شاخص‌های تحمل به خشکی در گندم نان با استفاده از نشانگرهای ISSR. به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی 1، 183-199.

References

- Anwar J, Subhani GM, Hussain M et al. (2011) Drought tolerance indices and their correlation with yield in exotic wheat genotypes. Pak J Bot 43, 527-1530.
- Bousslama M, Schapaugh WT (1984) Stress tolerance in soybean. I: Evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. Crop Sci 24, 933-937.
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW et al. (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. Field Crop Res 115, 1-14.
- 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.
- Farshadfar E, Jamshidi B, Aghaee M (2012) Biplot analysis of drought tolerance indicators in bread wheat landraces of Iran. Int J Agr Crop Sci 4, 226-233.
- Fernandez GCJ (1992) Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance, In: Adaptation of food crop temperature and water stress. Proceeding of 4th international symposium. Ed. Kus, E.G. Asian Vegetable Research and Department Center, Shanhua, Taiwan, pp. 257-270.
- Fernandez RJ, Reynolds JF, (2000) Potential growth and drought tolerance of eight desert grasses. J Ecologia 123, 90-98.
- Gavuzzi P, Rizza F, Palumbo M et al. (1997) Evaluation of field and laboratory predictors of drought and heat tolerance in winter cereals. Can J Plant Sci 77, 523-531.

- 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.
- Heydari R, Sabouri A, Sabouri H et al. (2013) Identification of AFLP markers related to tolerance to flooding stress in barley. *J Agric Biotech* 2, 41-60.
- Ji Kim E, Jin Sa K, Park KC, Kyong Lee J (2012) Study of genetic diversity and relationships among accessions of foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.] in Korea, China, and Pakistan using SSR markers. *Genes Genom* 34, 529-538.
- 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.
- Karam D, Westra P, Nissen SJ et al. (2004) Diversidade genética entre biótipos de proso millet (*Panicum miliaceum*) revelada pela técnica de AFLP. *Planta Daninha* 22, 167-174.
- Karim Koshte R, Sabouri H (2017) Relationship between ISSR and SSR markers indicators of drought tolerance in rice genotypes. *J Crop Breed* 26, 195-206 (in Persian).
- Kusaka M, Lalusin AG, Fujimura T (2005) The maintenance of growth and turgor in pearl millet (*Pennisetum glaucum* L. Leeke) cultivars with different root structures and osmoregulation under drought stress. *Plant Sci* 168, 1-14.
- Lata C, Sarita JH, Prasad M, Sreenivasulu N (2011) Differential antioxidative responses to dehydration-induced oxidative stress in core set of foxtail millet cultivars. *Protoplasma* 248, 817-828.
- Majidi M, Tavakoli V, Mirlohi A, Sabzalian MR (2011) Wild safflower species (*Carthamus oxyacanthus* Bieb.): A possible source of drought tolerance for arid environments. *Aust J Crop Sci* 5, 1055-1063.
- Mardi M, Naghavi MR, Pirseyedi SM et al. (2011) Comparative assessment of SSAP, AFLP and SSR markers for evaluation of genetic diversity of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *J Agr Sci Tech* 13, 905-920.
- Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plant salient statistical tools and considerations. *Crop Sci* 43, 1235-1248.
- Nakhaei A, Abbasi MR, Arazmjoo E, Azari MA (2014) Evaluation of terminal drought tolerance in Foxtail millet (*Setaria italica*) accessions. *Iran J Crop Sci* 16, 25-38. (In Persian).

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *J. Genet* 155, 945-959.
- Rao NK (2004) Plant genetic resources: Advancing conservation use through biotechnology. *Afr J Biotechnol* 3, 136-145.
- 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 U S A* 91, 5466-5470.
- Upadhyaya HD, Ravishankar CR, Narasimhudu Y et al. (2011) Identification of trait-specific germplasm and developing a mini core collection for efficient use of foxtail millet genetic resources in crop improvement. *Field Crops Res* 124, 459-467.
- Vitkauskaitė G, Venskaitytė L (2011) Differences between C3 (*Hordeum vulgare* L.) and C4 (*Panicum miliaceum* L.) plants with respect to their resistance to water deficit. *J. Agric* 98, 349-356.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23, 4407-4414.
- Yaghoutipour A, Farshadfar E, Saeidi M (2019) Association analysis for drought tolerance indices in bread wheat using ISSR. *Breed Agro Hort Crop* 1, 183-199 (in Persian).
- 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.

