

Association Analysis of Agronomic Traits in Common Millet (*Panicum miliaceum*) under Drought Stress Conditions Using AFLP Marker

Zahra Alizadeh

MSc Graduate, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. Email:

Zahra298051@yahoo.com

Fatemeh Ebrahimi

*Assistant Professor, Research & Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. Tel: +989133970869, Email: fa.ebrahimi@uk.ac.ir

Ghasem Mohammadi Nejad

Associate Professor, College of Agriculture and Research & Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. Email: mohammadinejad@uk.ac.ir

Babak Nakhoda

*Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran. Email: b.nakhoda@abrii.ac.ir

Abstract

Objective

The aim of this research was to identify marker loci associated with some agronomic traits under drought stress conditions in Common millet.

Materials and methods

In this study, 30 genotypes of Common millet were planted as augmented design at research farm of Shahid Bahonar University of Kerman in April 2016. In order to induce stress irrigation was stopped at 50% panicing stage. Traits including grain yield, biological yield, 1000- grain weight, number of grain in tiller, number of tiller in plant, panicle length, number of panicle branches, plant height, number of leaf in plant, leaf

length, leaf width and harvest index were measured. The AFLP Technique was performed by the six EcoR1/Mse1 primer combinations.

Results

In total, 246 polymorphic bands were generated and the average percentage polymorphic was 89.13%. Association analysis based on GLM and MLM model indicated that 52 and 64 markers associated to traits under drought stress condition, respectively. Among them, four markers (M4/E10-65, M4/E10-74, M4/E10-67 and M59/E36-105) with grain yield, three markers (M59/E36-84, M10/E1-244 and M10/E1-245) with 1000- grain weight, two markers (M59/E36-106 and M10/E1-224) with number of tiller in plant and five markers (M3/E2-31, M3/E2-35, M3/E2-38, M59/E36-114 and M4/E8-128) with number of grain in tiller showed highly significant and strong relationship under drought stress condition in both models.

Conclusions

In this study, several common genetic locations for the studied traits were identified. The existence of common markers between different traits may be due to pleiotropic effects or to linked genomic regions affecting several traits.

Keywords: polyotopic effects, marker association, population structure., mixed linear model.

Citation: Alizade Z, Ebrahimi F, Mohammadi Negad Gh, Nakhoda B (2019) Association Analysis of Agronomic Traits in Common Millet (*Panicum miliaceam*) under Drought Stress Conditions Using AFLP Marker,

Agricultural Biotechnology Journal 11 (3), 153-174.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (3), 153-174.

DOI: 10.22103/jab.2019.13749.1125

Received: April 9, 2019; Accepted: June 1, 2019

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

تجزیه ارتباطی صفات زراعی در ارزن معمولی (*Panicum miliaceum*) تحت شرایط تنش خشکی با استفاده از نشانگر AFLP

زهرا علیزاده

دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. ایمیل: Zahra298051@yahoo.com

فاطمه ابراهیمی

*استادیار، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. ایمیل: fa.ebrahimi@uk.ac.ir

قاسم محمدی نژاد

دانشیار، دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. ایمیل: mohammadinejad@uk.ac.ir

بابک ناخدا

*استادیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر، کرج، ایران. ایمیل: b.nakhoda@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۱

چکیده

هدف: هدف این پژوهش شناسایی نشانگرهای پیوسته با برخی صفات زراعی ارزن معمولی تحت شرایط تنش خشکی با استفاده از روش تجزیه ارتباطی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۳۰ ژنوتیپ ارزن معمولی (*Panicum miliaceum*) در قالب طرح آگمنت در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان در اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ کشت شدند. تنش در مرحله ۵۰ درصد خوشه دهی با قطع آبیاری اعمال گردید. صفات عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک، وزن هزار دانه، تعداد دانه در خوشه، تعداد خوشه در بوته، طول پانیکول، تعداد انشعابات پانیکول، ارتفاع گیاه، تعداد برگ در بوته، طول برگ، عرض برگ و شاخص برداشت اندازه گیری شد. تکنیک AFLP با استفاده از شش ترکیب آغازگری EcoRI و MseI انجام شد.

نتایج: در مجموع ۲۴۶ باند چند شکل تولید شد و به طور میانگین دارای ۸۹/۱۳ درصد چند شکلی بودند. تجزیه ارتباطی بر اساس مدل‌های GLM و MLM به ترتیب ۶۴ و ۵۲ نشانگر پیوسته به صفات تحت شرایط تنش خشکی نشان داد که در بین آن‌ها چهار نشانگر (M4/E10-65، M4/E10-74، M4/E10-67 و M59/E36-105) با صفت عملکرد دانه، سه نشانگر (M59/E36-84، M10/E1-244 و M10/E1-245) با صفت وزن هزار دانه، دو نشانگر (M59/E36-106 و M10/E1-224) با صفت تعداد خوشه در بوته و پنج نشانگر (M3/E2-31، M3/E2-35، M3/E2-38، M59/E36-114 و M4/E8-128) با صفات تعداد دانه در خوشه در هر دو مدل ارتباط قوی و بسیار معنی‌داری نشان دادند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه چندین مکان ژنی مشترک برای صفات مورد بررسی شناسایی گردید. وجود نشانگرهای مشترک بین صفات ممکن است به دلیل اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد.

کلمات کلیدی: اثرات پلیوتروپی، ارتباط نشانگری، ساختار جمعیت، مدل خطی مخلوط.

مقدمه

گیاه ارزن (*Panicum miliaceum*) گیاهی علفی و یکساله است که در مناطق گرم و خشک رشد می‌کند و به دلیل دارا بودن دانه‌های ریز در بین غلات به غله دانه ریز معروف است. گیاه ارزن پس از گندم (*Triticum aestivum*)، برنج (*Oriza sativa*)، ذرت (*Zea mays*)، جو (*Hordeum vulgare*) و سورگوم (*Sorghum bicolor*) مهم‌ترین گیاه یکساله جهان محسوب می‌گردد (FAO, 2013). گیاهان تحت شرایط طبیعی و زراعی به طور پیوسته در معرض تنش‌های گوناگون قرار دارند و در این میان، کمبود آب مهم‌ترین عامل محدود کننده عملکرد محصولات زراعی در اکثر نقاط جهان و ایران می‌باشد (Akbari et al. 2016). تنش خشکی ۴۰ تا ۶۰ درصد اراضی کشاورزی دنیا را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Okuyama 2004). ایران از لحاظ اقلیمی جزء مناطق نیمه خشک محسوب می‌شود و مسئله کمبود آب باعث بروز مشکلاتی در رابطه با تأمین آب شرب و آب مورد نیاز برای محصولات کشاورزی شده است (Foltz 2002).

نشانگرهای مورفولوژیکی اغلب دارای توارث غالب و مغلوب هستند. متأسفانه مشکلاتی در استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی در برنامه‌های اصلاحی وجود دارد از قبیل: تعداد آن‌ها محدود است، تحت تاثیر مراحل رشد گیاه و فاکتورهای محیطی متعدد می‌باشند (Eagles et al. 2001). نشانگرهای مولکولی به ویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA با ایجاد تعداد نامحدود نشانگر و با حذف اثرات ناشی از عوامل محیطی بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیکی را رفع کرده‌اند (Ahmad et al. 2017). در بین

نشانه‌های مولکولی AFLP^۱ دارای مزایایی از قبیل: چند شکلی بالا، پوشش وسیع و تصادفی در ژنوم، تولید تعداد زیادی نشانگر در یک بررسی، عدم نیاز به اطلاعات در رابطه با توالی DNA الگو برای طراحی آغازگر و دقت و تکرارپذیری بالا می‌باشد (Barbosa et al. 2008; Naghavi et al. 2003). شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات می‌تواند گامی موثر در پیشرفت برنامه‌های اصلاحی باشد. ارتباط بین نشانگر و صفت معمولاً بر مبنای تجزیه پیوستگی انجام می‌شود، در این روش از جمعیت‌های در حال تفرق و مصنوعی مانند دابل هاپلوئید، لاین‌های خالص نوترکیب، لاین‌های تقریباً ایزوژنیک و جمعیت‌های حاصل از تلاقی برگشتی استفاده می‌شود. به دلیل معایب روش تجزیه پیوستگی (تعداد کم والدین، فاصله زیاد بین نشانگر و صفت، تعداد نوترکیبی کم) امروزه پیشنهاد می‌شود که از روش تجزیه ارتباط^۲ مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی استفاده شود. در این روش از جمعیت‌های طبیعی برای بررسی ارتباط بین نشانگر و صفت استفاده می‌شود، در این جمعیت‌ها نوترکیبی تثبیت و از تمام رویدادهای میوزی انباشته شده در طول تاریخچه تکاملی گیاه استفاده شده است. همچنین در مقایسه با جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والدی تنوع ژنتیکی گسترده‌تری مورد بررسی قرار می‌گیرد. در مطالعات نقشه‌یابی ارتباطی در نظر گرفتن ساختار جمعیت به منظور شناسایی واریانت‌های کمیاب در مکان‌هایی که بین جمعیت‌ها متغیر هستند، ولی به طور شایعی درون زیر جمعیت‌ها تثبیت شده‌اند، از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (Cardon and palmer 2003; Rostok et al. 2006). به طور کلی مدل‌های مبتنی بر ماتریس‌های ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی از جمله تجزیه ارتباطی بهتر از بقیه می‌توانند ارتباطات واقعی بین نشانگر - صفت را نشان دهند و منجر به کاهش معنی‌دار نتایج مثبت دروغین شوند (Zhang et al. 2012). بنابراین تجزیه ارتباطی در مقایسه با تجزیه پیوستگی به مراتب دقیق‌تر است (Ataai et al. 2013; Shaaf et al. 2012). نشانگرهای مرتبط با صفات مهم با استفاده از تجزیه ارتباطی در گیاهان مختلف از جمله توتون (Dadras et al. 2014; Hoshyardel et al. 2014)، نخود زراعی (Saeed et al. 2013)، جو (Kraakman et al. 2006)، برنج (Kovi et al. 2015)، سورگوم (Mannai et al. 2011)، آفتابگردان (Fusari et al. 2012; Davar et al. 2012)، پنبه (Abdurakhmonov et al. 2008) گزارش شده است. ۳۴ نشانگر SSR پیوسته با صفات ارتفاع گیاه، عملکرد دانه و عملکرد علوفه در ارزن از طریق تجزیه ارتباطی توسط Kannan و همکاران (Kannan et al. 2014) شناسایی شده است. اگر چه تجزیه پیوستگی^۳ در ارزن انجام شده است اما تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تجزیه ارتباطی صفات زراعی در ارزن معمولی تحت شرایط تنش خشکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی صورت نگرفته است. هدف از این پژوهش شناسایی نشانگرهای مولکولی AFLP مرتبط با صفات زراعی مورد نظر تحت شرایط تنش خشکی در ۳۰ ژنوتیپ ارزن معمولی با استفاده از تجزیه ارتباطی می‌باشد.

1. Amplified fragment length polymorphism
2. Association analysis
3. Linkage analysis

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی صفات زراعی: در این مطالعه ۳۰ ژنوتیپ ارزن معمولی (جدول ۱)، جمع آوری شده از نقاط مختلف ایران در قالب طرح آگمنت در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان در اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ تحت شرایط تنش کشت شدند. ژنوتیپ‌های P50، P74 و C4 که دارای بذر بیشتری بودند به عنوان شاهد در سه تکرار مورد استفاده قرار گرفتند. مزرعه در مختصات جغرافیایی به ترتیب با طول جغرافیایی ۵۶ درجه و ۵۸ دقیقه طول شرقی، عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و ۱۵ دقیقه عرض شمالی واقع شده است، که دارای میانگین بارندگی سالانه ۱۵۰ میلی‌لیتر، ارتفاع ۱۷۵۴ متر از سطح دریا و خاک با بافت لومی و رسی می‌باشد. اطلاعات هواشناسی مربوط به طول دوره رشد ارزن در جدول ۲ ارائه شده است. عملیات تهیه زمین شامل شخم، دیسک، تسطیح و تهیه ردیف‌های کاشت قبل از کاشت در اوایل اردیبهشت ماه به صورت یکنواخت اجرا شد. ژنوتیپ‌ها بر روی خط‌های ۲ متری با فاصله بین ردیف‌ها ۴۰ سانتی‌متر و فاصله بوته‌ها روی ردیف ۸ سانتی متری کشت شدند. دور آبیاری هر هفت روز یکبار مطابق عرف صورت گرفت. براساس آزمون خاک به مقدار ۲۰۰ کیلو گرم کود اوره، ۵۰ کیلوگرم کود سوپر فسفات تریپل و ۱۰۰ کیلوگرم کود سولفات پتاسیم در هکتار قبل از کاشت به زمین داده شد و وجین علف‌های هرز با دست انجام شد. مطابق تحقیقات انجام شده، تنش در مرحله ۵۰٪ خوشه‌دهی با قطع آبیاری اعمال شد (Saghatoleslami et al. 2007; Mahalakshmi and Bidinger 1985). در انتهای دوره رشد با رعایت اثرات حاشیه، برداشت از مساحت معادل یک متر مربع انجام شد و سپس صفاتی چون عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیک در واحد سطح اندازه گیری شد. از تقسیم عملکرد دانه بر عملکرد بیولوژیک شاخص برداشت محاسبه شد. جهت اندازه گیری صفات وزن هزار دانه (گرم)، تعداد دانه در خوشه، تعداد خوشه در بوته، طول پانیکول (سانتی‌متر)، تعداد انشعابات پانیکول، ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)، طول برگ (سانتی‌متر)، عرض برگ (سانتی‌متر) و تعداد برگ از قسمت میانی هر کرت آزمایشی تعداد ۱۰ بوته به طور تصادفی انتخاب و اندازه‌گیری‌های لازم انجام شد.

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش Saghai-Marooof و همکاران (Saghai-Marooof et al. 1994)

با کمی تغییرات (CTAB با غلظت ۱ درصد و NaCl با غلظت ۲/۵ مولار) از برگ‌های جوان صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتوفتومتری مدل one^c و شرکت Thermo Scientific ارزیابی شد.

آنالیز AFLP: تکنیک AFLP براساس روش Vos و همکاران (Vos et al. 1995) با استفاده از شش ترکیب آغازگری

(ساخت شرکت MacroGen) انتخاب شده بر اساس حداکثر تعداد باند چند شکل از بین ۲۰ ترکیب آغازگری انجام شد (جدول ۳). DNA

ژنومی با استفاده از آنزیم EcoRI (5 U) به مدت ۱۶ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم شد. سپس هضم نهایی با آنزیم (5U) MseI در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انجام شد.

قطعات هضم شده به آداپتورهای EcoRI (5 pmol/mL) و MseI (50 pmol/mL) در حجم نهایی ۲۵ میلی لیتر به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligas (1 U) متصل شدند. محصول حاصل به نسبت ۱:۲ رقیق شد و در مرحله پیش تکثیر^۴ نمونه‌ها با جفت پرایمرهای EcoRI/MseI با یک نوکلئوتید انتخابی (EcoRI-A و MseI- C) در انتهای ۳' تکثیر یافتند و محصولات پس از رقیق سازی به نسبت ۱:۱۰ با شش ترکیب آغازگری دارای ۲ نوکلئوتید انتخابی دیگر در انتهای ۳' (جدول ۱)، تحت چرخه‌های حرارتی (شامل ۱۲ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۶۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) که در هر چرخه به میزان ۰/۷ درجه سانتی‌گراد دمای اتصال کاهش یافت و نهایتاً ۲۳ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۵۶ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه)) تکثیر شد. سپس جداسازی و مشاهده قطعات تکثیری محصولات PCR با استفاده از دستگاه کواکسل (QIAGEN, Hilden, Germany) انجام شد. باندها به صورت ماتریس صفر و یک با استفاده از نرم افزار BioCalculator امتیازدهی شدند.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها براساس آمارهای توصیفی شامل حداقل، حداکثر، میانگین، انحراف معیار و ضریب

تغییرات فنوتیپی مربوط به تمام صفات با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه گردید. ضریب تغییرات فنوتیپی با استفاده از فرمول $CVp =$

$$\frac{\sqrt{Vp}}{\bar{X}}$$

محاسبه شد. در این فرمول Vp و \bar{X} به ترتیب واریانس فنوتیپی و میانگین کل است.

آمار توصیفی برای هر ترکیب آغازگری با استفاده از نرم افزار GenAIEx محاسبه گردید، که عبارت اند از:

$$PIC^h = 1 - p^2 - q^2$$

محتوای اطلاعات چند شکلی

$$MI^h = PIC \times \text{number of polymorphic loci}$$

شاخص نشانگر

$$H^y = -1 \times (p \times \ln(p) + q \times \ln(q))$$

شاخص شانون

در معادلات فوق p و q به ترتیب فراوانی آلل غالب و مغلوب هستند که با شمارش آلل‌های صفر و یک در نرم‌افزار GenAIEx به دست آمده‌اند.

4. Pre-amplification
5. polymorphism information content
6. Marker index
7. Shannon index

ساختار جمعیت بر اساس داده‌های حاصل از تلفیق نشانگر AFLP با استفاده از نرم افزار STRUCTURE 2.3.4 در حالت Admixture با ۱۰۰۰۰ طول دوره^۸ و تعداد تکرار (MCMC) ۱۰۰۰۰۰ در مقادیر مختلف K از ۲ تا ۱۰ (۵ تکرار برای هر K) بررسی شد. عدد K بهینه (تعداد زیر جمعیت احتمالی) بر اساس میزان ΔK در روش اوانو و همکاران (Evanno et al., 2005) با استفاده از نرم افزار STRUCTURE HARVESTER تعیین گردید. در این روش حداکثر میزان ΔK نمایانگر K بهینه است. روش اندازه‌گیری میزان ΔK در روش اوانو به طریقه زیر انجام می‌شود:

$$\Delta K = m |L''(K)|/s[L(K)]$$

در معادله فوق $|L''(K)|$ میانگین قدر مطلق لگاریتم احتمال داده‌ها در مقادیر K پشت سر هم و $s[L(K)]$ انحراف استاندارد لگاریتم احتمال داده‌ها برای تکرارهای مختلف در هر K را نشان می‌دهد. در نهایت بر اساس K بهینه تعیین شده به روش اوانو، ماتریس Q (ماتریس ساختار جمعیت) از نتایج ساختار جمعیت استخراج شد. در واقع ماتریس Q ماتریسی است که تعداد سطر آن برابر تعداد افراد جامعه و تعداد ستون آن برابر با زیرگروه‌های جامعه (تعداد K بهینه) است. این ماتریس میزان احتمالی که هر فرد می‌تواند به هر زیرجامعه نسبت داده شود را بیان می‌کند.

برای اندازه‌گیری تمایز زیر جمعیت‌ها از آماره شاخص تثبیت (F_{st})^{۱۰} استفاده شد. شاخص تثبیت از نظر تئوریک در محدوده صفر (عدم وجود تفاوت بین زیر جمعیت‌ها و جمعیت پایه) تا یک (حداکثر تمایز بین زیر جمعیت‌ها و جمعیت پایه یا به عبارت دیگر تثبیت آل‌های متفاوت در جمعیت‌های مختلف) تغییر می‌کند. شاخص تثبیت با استفاده از فرمول $F_{st} = (H_t - H_s)/H_t$ محاسبه گردید (Lynch and Milligan 1994). در این فرمول H_t و H_s به ترتیب هتروزیگوسیتی کل و هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها می‌باشد. تجزیه ارتباطی با استفاده از هر دو روش مدل خطی مخلوط (MLM)^{۱۱} و مدل خطی عمومی (GLM)^{۱۲} با نرم افزار TASSEL 4.2.1 انجام گرفت (Yu et al. 2006). در روش GLM از ماتریس عضویت افراد در زیر جوامع (Q)، ماتریس فنوتیپی و ژنوتیپی استفاده شد. به طوری که ماتریس (Q) به عنوان متغیر کوواریانت وارد مدل شد، اما در روش MLM علاوه بر ماتریس‌های عضویت افراد در زیر جوامع (Q)، ماتریس فنوتیپی و ژنوتیپی از ماتریس خویشاوندی افراد نیز استفاده شد. ماتریس روابط خویشاوندی افراد بر اساس اطلاعات نشانگرها در نرم افزار TASSEL 4.2.1 محاسبه شد. نشانگرهای مرتبط معنی‌دار با صفات مورد مطالعه بر اساس مقادیر P-value در قالب آزمون F تعیین گردید.

-
8. Burn-in
 9. Markov Chain Monte Carlo
 10. Fixation Index
 11. General linear model
 12. Mixed linear model

جدول ۱. ژنوتیپ‌های ارزن معمولی مورد استفاده در این مطالعه.

Table 1. Common millet Genotypes used in this study.

عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	منشأ	کد ژنوتیپ	شماره
Latitude	Longitude	Origin	Genotype code	Number
31.03	61.49	Zabol 2	P9	1
33.59	56.92	Tabas 2	P20	2
32.37	48.39	Dezfol	P21	3
32.32	50.85	Shahrekord 3	P25	4
34.32	47.07	Kermanshah 1	P29	5
34.36	58.67	Gonabad	P32	6
33.86	57.43	boshroye	P40	7
27.09	56.45	Hormozgan	P44	8
38.07	46.28	Tabriz4	P50	9
32.01	51.85	Mahyar Shahreza	P52	10
29.61	52.53	Shiraz 1	P58	11
32.69	47.26	Elam 4	P71	12
38.27	50.36	Gilan 1	P74	13
32.34	51.50	Mobarakeh 1	P75	14
39.38	48.34	Bile Savar	P76	15
38.27	50.36	Gilan 2	P80	16
28.18	55.54	Haje abad	P82	17
32.34	51.50	Mobarakeh 2	P89	18
27.91	57.71	Kahnooj	P98	19
32.15	54.4	Yazd 6	P100	20
28	58	Roodbar jonob	P107	21
30.15	56.58	Kerman 2	P109	22
30.15	56.58	Kerman 3	P111	23
30.12	55.11	Sharbabak	P112	24
27.52	57.88	Ghale Ganj	P118	25
27.40	57.49	Manojan	P122	26
32.33	49.09	Khozestan 5	P126	27
28.06	57.27	Faryab	P132	28
32.33	49.09	Khozestan 8	P133	29
29.88	57.73	Golbaf	C4	30

جدول ۲. اطلاعات هواشناسی طول دوره رشد ارزن معمولی در شهر کرمان.

Table 2. Meteorological information during the growing season of Common millet in kerman.

میزان بارندگی Rainfall (mm)	حداکثر رطوبت نسبی Maximum relative humidity (%)	حداقل رطوبت نسبی Minimum relative humidity (%)	حداکثر دما Maximum Temperature (°C)	حداقل دما Minimum temperature (°C)	ماه month
7.6	98	1	36.6	3.2	اردیبهشت May
0	42	1	37.9	12.2	خرداد June
0	34	3	40.9	12.8	تیر July
2.2	69	2	40.3	10.7	مرداد August
0	34	2	36.3	10.3	شهریور September

جدول ۳. ترکیبات آغازگری مورد استفاده برای تجزیه AFLP در ارزن معمولی.

Table 3. Primer combinations used to analyze AFLP in Common millet.

ترکیب آغازگر MseI/ EcoRI	نام آغازگر Primer name	ترکیب آغازگر MseI/ EcoRI	نام آغازگر Primer name
Primer combination		Primer combination	
CTT /AGG	M4/E8	CTT /AAC	M4/E10
CAA /ACT	M3/E2	CTT/AGC	M4/E11
CTA /ACC	M59/E36	CAT /AAG	M10/ E1

نتایج و بحث

ارزیابی فنوتیپی صفات: نتایج میانگین، حداقل، حداکثر، دامنه تغییرات و ضریب تغییرات فنوتیپی در جدول ۴ ارائه شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود در بین صفات مورد مطالعه، عملکرد دانه با ۸۵/۲۵ درصد بیشترین ضریب تغییرات فنوتیپی را در شرایط تنش خشکی داشت و بنابراین بیشترین تنوع را نسبت به سایر صفات به خود اختصاص داده است. کمترین تنوع در بین ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی مربوط به صفات عرض برگ و طول برگ به ترتیب با ۲۳/۴۵ درصد و ۲۳/۹۲ درصد در شرایط تنش خشکی بود. نتایج این مطالعه بر اساس ارزیابی فنوتیپی و محاسبه شاخص‌های مختلف پراکندگی نشان داد که ژنوتیپ‌های ارزن مورد مطالعه از تنوع بالایی در بیشتر صفات برخوردار می‌باشند و می‌تواند در مطالعه تجزیه ارتباطی مفید واقع شود.

جدول ۴. میانگین، حداقل، حداکثر، دامنه تغییرات و ضریب تغییرات فنوتیپی صفات مورد بررسی در ۳۰ ژنوتیپ ارزن معمولی تحت شرایط تنش خشکی.

Table 4. Mean, Minimum, Maximum, Range and Phenotypic coefficient of variation of assessed traits in 30 Common millet genotypes under drought stress conditions.

Phenotypic Coefficient of variation (%)	Range	Maximum	Minimum	Mean	Trait
56.25	648	774	126	278	تعداد دانه در خوشه Number of grain in Panicle
35.27	16	20	4	9.26	تعداد اشعاعات پانیکول Number of panicle branches
65.74	5060.46	5729.03	668.57	2052.64	عملکرد بیولوژیک Biological yield (Kg ha ⁻¹)
85.25	2705.06	2802.43	97.37	650.83	عملکرد دانه Grain yield (Kg ha ⁻¹)
52	7	8	1	3.74	تعداد خوشه در بوته Number of Panicle in plant
27.05	18.40	27.62	9.22	18.45	طول پانیکول Panicle length (cm)
35.68	34.35	48.91	14.56	30.71	شاخص برداشت Harvest index (%)
32.07	73.90	103.81	29.91	68.90	ارتفاع گیاه Plant height (cm)
53.15	43	48	5	16.03	تعداد برگ در بوته Number of leaf in plant
23.45	1.70	2.50	0.80	1.5	عرض برگ leaf width (cm)
25.42	5.60	8.99	3.39	5.10	وزن هزار دانه 1000-grain weight (g)
23.92	22.67	34.48	11.81	21.89	طول برگ leaf length (cm)

شاخص های نشانگری (تنوع آلی): در مجموع از ۲۷۶ باند حاصل در این مطالعه، ۲۴۶ باند چند شکل ایجاد شد. متوسط

درصد چند شکلی در ترکیبات آغازگری ۸۹/۱۳ بود. این درصد بالای چند شکلی بیانگر این است که این نشانگرها می‌توانند به عنوان یک ابزار قدرتمند در شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌های ارزن معمولی عمل نمایند و استفاده از نشانگرهای AFLP در برنامه‌های اصلاحی ارزن معمولی سودمند می‌باشد. در این مطالعه شاخص PIC بین ۰/۰۹ (M10/E1) تا ۰/۲۱ (M4/E11) متغیر بود (جدول ۵). مقادیر محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از صفر تا یک متغیر است و هر چه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چند شکلی برای آن جایگاه در ژنوتیپ‌های تحت بررسی است (Wei et al. 2005). بنابراین نشانگرهایی با میزان PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک

مفید هستند (Thimmappaiah et al. 2008). از معیارهای دیگر برای ارزیابی کارایی نشانگر در تعیین چندشکلی، شاخص شانون است که مقدار حداکثر و حداقل آن در این مطالعه مربوط به ترکیبات M4/E11 و M10/E1 به ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۱۷ بود. شاخص نشانگری (MI) در ترکیب پرایمری M10/E1 (۴/۲۴) و M4/E11 (۷/۷۵) به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار را نشان داد. بررسی کلی شاخص‌های نشانگری نشان می‌دهد که از بین ۶ ترکیب آغازگری دو ترکیب M3/E2 و M4/E11 نسبت به سایر ترکیبات مقادیر بالاتر از شاخص‌های نشانگری را به خود اختصاص دادند، بنابراین این ترکیبات مفیدترین ترکیب در تمایز ژنوتیپ‌های ارزن می‌باشد. این نتایج با گزارش دیگران در خصوص نشانگرهای AFLP به عنوان نشانگر مناسب جهت مطالعه در تمایز یابی مطابقت دارد (Kumar 2007; Johnson et al. 2015; et al.).

جدول ۵. شاخص‌های مولکولی برای شش ترکیب آغازگری AFLP در ۳۰ ژنوتیپ ارزن معمولی.

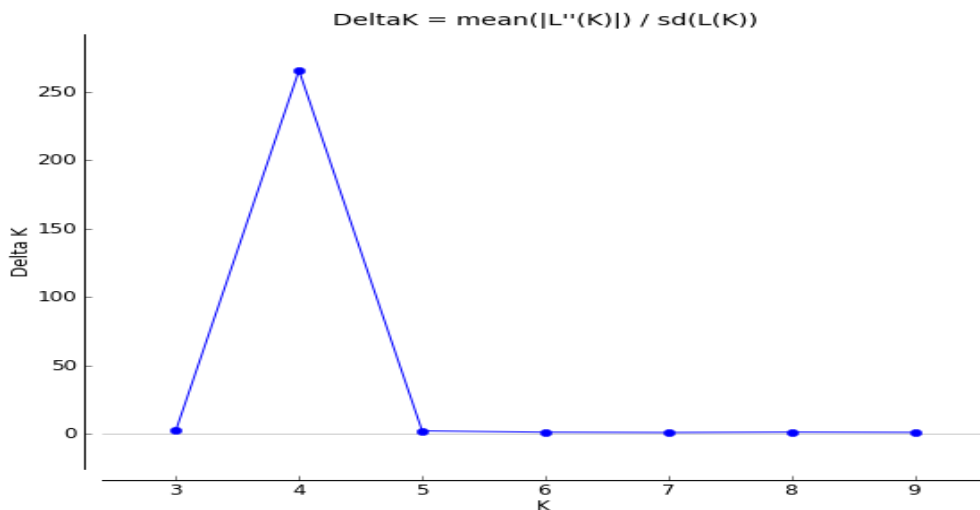
Table 5. Molecular Indexes for six AFLP primer combinations in 30 genotypes of Common mille.

محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) Polymorphic information content	شاخص نشانگر (MI) Marker index	درصد چند شکلی Polymorphic percentage	تعداد کل باند Total Band	تعداد باند چند شکل Polymorphic bands	شاخص شانون Shannon Index	ترکیب پرایمری Primer combination
0.16	6.42	90.69	43	39	0.26	M3/E2
0.15	6.70	89.58	48	43	0.25	M4/E10
0.12	5.12	86.95	46	40	0.23	M59/E36
0.14	6.33	90	50	45	0.25	M4/E8
0.21	7.75	87.80	41	36	0.35	M4/E11
0.09	4.24	89.58	48	43	0.17	M10/E1
0.15	6.09	89.13	46	41	0.25	میانگین

تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت: بر اساس نتایج روش اوانو و همکاران (Evanno et al. 2005)، بیشترین مقدار Δk

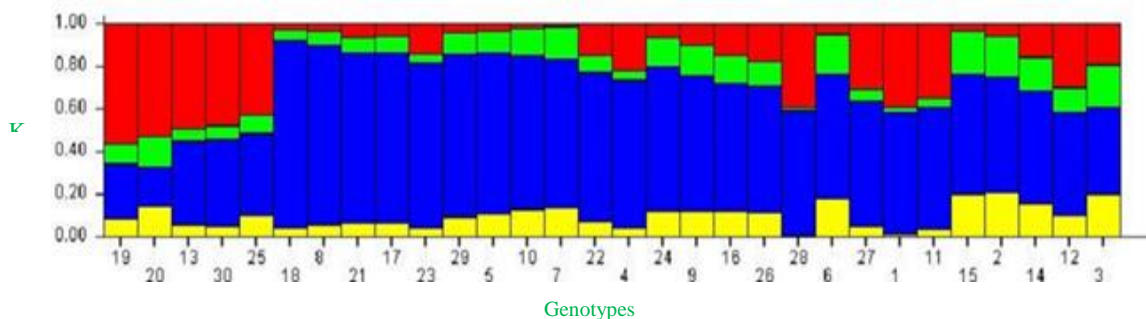
در $k=4$ مشاهده شد (شکل ۱). بنابراین بهترین مقدار K برای جمعیت مورد بررسی برابر با چهار انتخاب شد. شاخص تثبیت بین ۴ زیر جمعیت حاصل در ارزن معمولی ۰/۶۱، ۰/۰۱، ۰/۸۴ و ۰/۰۱ بود. مقادیر بالای F_{st} نشان‌دهنده تمایز نسبتاً بالا و جریان ژنی نسبتاً پایین و مقادیر پایین F_{st} بیانگر تنوع پایین بین ارقام می‌باشد. اختلاط شدید مشاهده شده در این ژرم پلاسما، احتمال این فرض که تبار ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نوع مخلوط باشد را نشان می‌دهد (شکل ۲). یعنی فرد i ممکن است بخش‌هایی از ژنوم خود را از تبار خود در

جمعیت k به ارث برده باشد و همچنین فراوانی آلی ممکن است در جمعیت‌های مختلف به علت مهاجرت و یا تبار مشترک مشابه باشد (Mousavi Derazmahalleh et al. 2014).



شکل ۱. نتایج روش اوانو (Evanno's method) در انتخاب K بهینه.

Figure 1. The result of Evanno's method in optimal K selection



شکل ۲. بارپلات تجزیه ساختار داده‌های حاصل از شش ترکیب پرایمری AFLP توسط نرم‌افزار STRUCTURE، اعداد محور افقی و عمودی به ترتیب بیانگر ژنوتیپ و ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر می‌باشد. افراد دارای رنگ مشابه به گروهی مشابه تعلق دارند.

Figure 2. Bar plot of structure analysis of six AFLP Primer Combinations by STRUCTURE software. The numbers on horizontal and vertical axes correspond to the genotypes and the membership coefficient of each individual, respectively. People of the same color type belong to the same group.

تجزیه ارتباطی: تجزیه ارتباطی بر اساس مدل‌های MLM و GLM نشان داد که به ترتیب ۶۴ و ۵۲ نشانگر با صفات مورد مطالعه ارزن معمولی در شرایط تنش خشکی ارتباط بسیار معنی‌دار داشتند (جدول ۶ و ۷). لازم به ذکر است که حداقل سطح معنی‌دار برای تجزیه ارتباط بین صفات و نشانگر در این پژوهش یک درصد ($p < 0.01$) در نظر گرفته شده است. در مطالعه حاضر تعداد نشانگر معنی‌دار بر اساس مدل MLM نسبت به مدل GLM کاهش یافت. در واقع ترکیب ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در مدل MLM باعث حذف برخی نشانگرهای دارای ارتباط معنی‌دار دروغین مثبت به دلیل روابط خویشاوندی می‌شود. این نتایج توسط دیگران (Yu et al. 2006; Dadras et al. 2014) نیز تایید شده است. بنابراین نشانگرهای AFLP مشخص شده بر اساس مدل MLM می‌تواند کاندیدای موثر و مناسبی برای مطالعات بعدی باشد.

بر اساس مدل GLM ضریب تبیین نشانگر یا درصد واریانس فوتویی توجیه شده توسط هر نشانگر از ۱۸ تا ۵۱ درصد متغیر بود (جدول ۷). همچنین R^2 مدل در این روش از ۲۵ تا ۵۸ درصد تعیین شد. نتایج مدل MLM نشان داد که دامنه تغییرات ضریب تبیین نشانگر ۱۳ تا ۴۷ درصد (جدول ۶) و R^2 مدل ۳۴ تا ۷۹ درصد تعیین شد (نتایج مربوط به R^2 مدل نشان داده نشده است). مقدار بالا R^2 مدل نشان‌دهنده برتری مدل رگرسیونی MLM نسبت به GLM می‌باشد. همچنین ضریب تبیین نشانگر در مدل MLM نسبت به مدل GLM کاهش نشان داد. در مدل MLM ترکیب ساختار جمعیت (Q) و روابط خویشاوندی (K) افزایش ضریب تبیین مدل و کاهش ضریب تبیین نشانگر را نسبت به مدل GLM باعث می‌شود (جدول ۶) و در نتیجه MLM مدل بهتری جهت تصحیح ساختار جمعیت و بررسی روابط نشانگر با صفات می‌باشد. Achleitner و همکاران (Achleitner et al. 2008) بیان نمودند که ترکیب ساختار جمعیت (Q) و روابط خویشاوندی (K) افزایش قابل ملاحظه‌ای در ضریب تبیین مدل MLM نسبت به GLM ایجاد می‌نماید. بنابراین نشانگرهای مرتبط به صفات مهم زراعی انتخاب شده در ارزن معمولی تحت شرایط تنش خشکی بویژه بر اساس مدل MLM ابزاری مفید در انتخاب به کمک نشانگر می‌باشند.

نتایج تجزیه ارتباطی نشان داد که در مدل MLM نشانگرهای M4/E10-67، M4/E10-74، M4/E10-65 و M59/E36-102 با صفت عملکرد دانه به ترتیب با ۲۴، ۲۴، ۱۷ و ۱۴ درصد توجیه واریانس فوتویی و در مدل GLM نشانگرهای مذکور به علاوه نشانگر M59/E36-102 به ترتیب با توجیه ۵۰، ۵۰، ۴۳، ۲۹ و ۲۳ درصد از تغییرات مربوط به عملکرد دانه تحت شرایط تنش خشکی ارتباط بسیار معنی‌دار و قوی ($p < 0.01$) داشتند (جدول ۶ و ۷). ارتباط همزمان نشانگر M4/E10-67 با صفات عملکرد دانه و تعداد برگ در بوته تحت شرایط تنش خشکی در مدل MLM، همچنین ارتباط همزمان نشانگرهای M4/E10-65، M4/E10-74 و M59/E36-102 با صفت عملکرد دانه و شاخص برداشت در هر دو مدل ممکن است به دلیل اثر پلیوتروپی و یا

وجود چندین ژن در این نواحی با لینکاژ بسیار قوی باشد که به طور همزمان چندین صفت را کنترل می‌کنند. وجود چنین حالتی در بهنژادی گیاهی از نظر اصلاح همزمان چندین صفات بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Ebrahimi et al. 2017; Hoshyardel et al. 2014). بر اساس نتایج مدل MLM نشانگرهای M3/E2-19، M3/E2-23، M3/E2-32 و M4/E8-152 به ترتیب با ۱۵، ۱۸، ۱۵ و ۱۹ درصد توجیه تغییرات فنوتیپی ارتباط قوی و بسیار معنی دار ($p < 0.01$) با صفت عملکرد بیولوژیک داشتند (جدول ۶) و در مدل GLM تعداد ۹ نشانگر با صفت عملکرد بیولوژیک در شرایط تنش خشکی ارتباط بسیار معنی‌داری نشان دادند (جدول ۷). نشانگرهای M3/E2-19 و M3/E2-32 علاوه بر صفت عملکرد بیولوژیک با صفت تعداد برگ در بوته نیز در هر دو مدل تحت شرایط تنش خشکی همبستگی نشان داد. اغلب ژن‌های کاربردی و عملکردی در ژنوم که به طور مستقیم و غیر مستقیم عملکرد را کنترل می‌کنند، اثرات پلیوتروپی بر حداقل یک صفت دیگر نیز دارند (Slafer 2003; Shi et al. 2009).

بر اساس مدل MLM، نشانگرهای M59/E36-84، M10/E1-244 و M10/E1-245 ارتباط بسیار معنی‌دار و قوی ($p < 0.01$) به ترتیب با ۱۶، ۲۲ و ۲۲ درصد توجیه با صفت وزن هزار دانه (جدول ۶) و در مدل GLM نشانگرهای فوق بعلاوه نشانگر M3/E2-11 به ترتیب با ۱۸، ۲۵، ۲۵ و ۱۹ درصد توجیه با صفت وزن هزار دانه ارتباط بسیار معنی‌داری در شرایط تنش خشکی نشان دادند (جدول ۷). از آنجایی که صفت وزن هزار دانه یکی از صفات بسیار مهم اجزای عملکرد است، این نشانگرها می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی و انتخاب بر اساس نشانگر در شرایط تنش خشکی مورد استفاده قرار گیرند.

بر اساس هر دو مدل MLM و GLM نشانگرهای M3/E2-31، M3/E2-35، M3/E2-38، M4/E8-114 و M59/E36-128 ارتباط قوی و بسیار معنی‌داری ($p < 0.01$) با صفات تعداد دانه در خوشه تحت شرایط تنش خشکی نشان دادند. همچنین نشانگرها M3/E2-31، M3/E2-35 و M3/E2-38 علاوه بر صفت تعداد دانه در خوشه با ارتفاع گیاه همبستگی داشتند (جدول ۶ و ۷). تجزیه ارتباطی در ژنوتیپ‌های ارزن معمولی تحت شرایط تنش خشکی نشان داد که بر اساس مدل MLM نشانگرهای M59/E36-106، M4/E8-156 و M10/E1-224 و M10/E1-246 جمعاً با ۵۲ درصد توجیه با صفت تعداد خوشه در بوته ارتباط بسیار معنی‌داری ($p < 0.01$) داشتند (جدول ۶). بر اساس مدل GLM نشانگرهای M59/E36-106، M10/E1-224، M4/E10-69، M4/E10-71، M4/E10-72 و M4/E10-76 با صفت تعداد خوشه در بوته تحت شرایط تنش خشکی ارتباط بسیار معنی‌داری ($p < 0.01$) داشتند. در مدل GLM نشانگرهای M4/E10-69، M4/E10-71، M4/E10-72، M4/E10-76 با صفات تعداد برگ و تعداد خوشه در بوته ارتباط همزمان و معنی‌داری نشان دادند (جدول ۷). نشانگرهای M4/E8-137، M4/E8-147، M4/E8-127 و M10/E1-217 در هر دو مدل MLM و GLM با صفت طول پانیکول ارتباط بسیار معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت شرایط تنش خشکی نشان دادند (جدول ۶ و ۷). از بین این نشانگرها می‌توان به نشانگر M4/E8-147 با ۳۶ و ۲۷ درصد توجیه واریانس فنوتیپی به ترتیب در مدل GLM و MLM اشاره کرد که به عنوان بهترین نشانگر مرتبط با صفت طول پانیکول مشخص شد. نتایج مدل MLM

نشان داد که نشانگرها M4/E8-146، M4/E11-194، M4/E11-196، M4/E11-197 و M4/E11-199 ارتباط بسیار معنی‌داری ($p < 0.01$) با صفت تعداد انشعابات پانیکول تحت شرایط تنش خشکی نشان دادند. نشانگرهای مذکور و نشانگر M8/E4-157 در روش GLM با صفت تعداد انشعابات پانیکول نیز ارتباط معنی‌داری ($p < 0.01$) داشتند (جدول ۷).

بر اساس نتایج مدل MLM و GLM، نشانگرهای M3/E2-31، M3/E2-35 و M3/E2-38 تحت شرایط تنش خشکی ارتباط بسیار معنی‌داری ($p < 0.01$) با صفت ارتفاع گیاه دارا بودند (جداول ۶ و ۷). بر اساس نتایج این مطالعه، تعداد ۹ و ۱۱ نشانگر به ترتیب در مدل MLM و GLM با صفت تعداد برگ در بوته ارتباط معنی‌داری تحت شرایط تنش خشکی نشان دادند. از بین این نشانگرها می‌توان به نشانگرهای M3/E2-29، M4/E10-69، M4/E10-71، M4/E10-72 و M4/E10-76 با ضریب تبیین بالا در هر دو مدل اشاره کرد (جداول ۶ و ۷). همچنین نشانگر M4/E8-145 با صفت طول برگ و تعداد ۶ نشانگر با صفت عرض برگ تحت شرایط تنش خشکی در هر دو مدل ارتباط معنی‌داری نشان دادند (جداول ۶ و ۷). تجزیه ارتباطی با استفاده از مدل MLM نشان داد که نشانگرهای M4/E10-70، M4/E10-65، M4/E10-74 و M59/E36-105 دارای ارتباط بسیار معنی‌داری ($p < 0.01$) با صفت شاخص برداشت در شرایط تنش خشکی بودند (جدول ۶). نشانگرهای M4/E10-65، M4/E10-74 و M59/E36-102 و M59/E36-105 بر اساس مدل GLM با صفت شاخص برداشت در شرایط تنش خشکی ارتباط بسیار معنی‌داری ($p < 0.01$) را نشان دادند (جدول ۷).

به طور کلی تجزیه ارتباطی با در نظر گرفتن ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در ۳۰ ژنوتیپ ارزن مورد مطالعه توانست نشانگرهای AFLP با اثرات بسیار قوی و اعتبار بالا در ارزن معمولی تحت شرایط تنش خشکی را مشخص نماید. نشانگرهای با اثرات قوی (ضریب تبیین بالا) می‌تواند کاندیدهایی ایده‌آل برای مطالعات آینده با استفاده از انتخاب به کمک نشانگر باشند (Collard et al. 2005). همچنین می‌توان با تبدیل این نشانگرها به نشانگرهای اختصاصی SCAR یا نواحی تکثیری با توالی مشخص در برنامه‌های اصلاحی ارزن جهت مناطق خشک و نیمه خشک با استفاده از انتخاب به کمک نشانگر بهره برد (Ebrahimi et al. 2017). مقدار کم ضریب تبیین توجیه شده توسط برخی نشانگرها در صفتی مثل ارتفاع گیاه بیانگر کنترل صفات توسط ژن‌هایی با اثرات کم می‌باشد. علاوه بر این مقدار کم R^2 نشانگر برای برخی صفات ممکن است مربوط به عدم تراکم کافی نشانگرها، وجود نشانگرهایی با اثرات کم، آلل‌های نادر و اثر متقابل پیچیده آلی باشد (Debibakas et al. 2014; Yang et al. 2010).

جدول ۶. نشانگرهای AFLP پیوسته با صفات زراعی در ارزیابی معمولی تحت شرایط تنش خشکی بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM).

Table 6. AFLP markers associated with agronomic traits in Common millet under drought stress conditions based on mixed linear model (MLM).

ضریب تبیین نشانگر R ² Marker	مقدار P P-Value	نشانگر Marker	ضریب تبیین نشانگر R ² Marker	مقدار P P-Value	نشانگر Marker
تعداد دانه در خوشه Number of grain in Panicle			تعداد انشعابات پانیکول Number of panicle branches		
0.23	0.002	M3/E2- 31	0.15	0.004	M4/E8- 146
0.23	0.002	M3/E2- 35	0.15	0.004	M4/E11- 194
0.23	0.002	M3/E2- 38	0.15	0.004	M4/E11- 196
0.18	0.007	M59/E36- 114	0.15	0.004	M4/E11- 197
0.25	0.001	M4/E8- 128	0.15	0.004	M4/E11- 199
عملکرد بیولوژیک Biological yield (Kg ha ⁻¹)			عملکرد دانه Grain yield (Kg ha ⁻¹)		
0.15	0.005	M3/E2-19	0.24	0.0002	M4/E10- 65
0.18	0.002	M3/E2- 23	0.17	0.0006	M4/E10- 67
0.15	0.005	M3/E2- 32	0.24	0.0002	M4/E10- 74
0.19	0.001	M4/E8- 152	0.14	0.001	M59/E36- 105
تعداد خوشه در بوته Number of Panicle in plant			طول پانیکول Panicle length (cm)		
0.13	0.006	M59/E36- 106	0.16	0.009	M4/E8- 127
0.13	0.007	M4/E8- 156	0.24	0.005	M4/E8- 137
0.14	0.004	M10/E1- 224	0.27	0.0003	M4/E8- 147
0.12	0.008	M10/E1- 246	0.16	0.009	M10/E1- 217
شاخص برداشت Harvest index			ارتفاع گیاه Plant height (cm)		
0.47	0.00001	M4/E10- 65	0.26	0.001	M3/E2- 31
0.21	0.009	M4/E10- 70	0.26	0.001	M3/E2- 35
0.47	0.00001	M4/E10- 74	0.26	0.001	M3/E2- 38
0.25	0.003	M59/E36- 105			
تعداد برگ در بوته Number of leaf in plant			عرض برگ leaf width (cm)		
0.18	0.001	M3/E2- 19	0.22	0.003	M3/E2- 12
0.24	0.0001	M3/E2- 29	0.23	0.003	M3/E2- 15
0.18	0.001	M3/E2- 32	0.24	0.002	M59/E36- 92
0.13	0.009	M4/E10- 67	0.23	0.003	M4/E8- 148
0.24	0.0001	M4/E10- 69	0.23	0.003	M10/E1- 204
0.24	0.0001	M4/E10- 71	0.23	0.003	M10/E1- 214
0.24	0.0001	M4/E10- 72			
0.24	0.0001	M4/E10- 76			
0.18	0.001	M4/E8- 144			
وزن هزار دانه (g) 1000-grain weight			طول برگ leaf length (cm)		
0.16	0.009	M59/E36- 84	0.23	0.007	M4/E8- 145
0.22	0.001	M10/E1- 244			
0.22	0.001	M10/E1- 245			

جدول ۷. نشانگرهای AFLP پیوسته با صفات زراعی در آرزن معمولی تحت شرایط تنش خشکی بر اساس مدل خطی عمومی (GLM).

Table 7. AFLP markers associated with agronomic traits in Common millet under drought stress conditions based on general linear model (GLM).

ضریب تبیین نشانگر R ² Marker	مقدار P P-Value	نشانگر Marker	ضریب تبیین نشانگر R ² Marker	مقدار P P-Value	نشانگر Marker
تعداد دانه در خوشه Number of grain in Panicle			تعداد انشعابات پانیکول Number of panicle branches		
0.25	0.002	M3/E2- 31	0.25	0.006	M4/E8- 146
0.25	0.002	M3/E2- 35	0.28	0.003	M4/E8- 157
0.25	0.002	M3/E2- 38	0.29	0.002	M4/E11- 194
0.20	0.007	M59/E36- 114	0.29	0.002	M4/E11- 196
0.27	0.001	M4/E8- 128	0.29	0.002	M4/E11- 197
			0.29	0.002	M4/E11- 199
عملکرد بیولوژیک Biological yield (Kg ha ⁻¹)			عملکرد دانه Grain yield (Kg ha ⁻¹)		
0.25	0.006	M3/E2- 15	0.50	0.00003	M4/E10- 65
0.28	0.004	M3/E2- 19	0.43	0.0001	M4/E10- 67
0.36	0.0001	M3/E2- 23	0.50	0.00003	M4/E10- 74
0.28	0.004	M3/E2- 32	0.29	0.003	M59/E36- 105
0.27	0.006	M4/E10- 48	0.23	0.008	M59/E36- 102
0.25	0.006	M4/E8- 148			
0.34	0.001	M4/E8- 152			
0.25	0.006	M10/E1- 204			
0.25	0.006	M10/E1- 214			
تعداد خوشه در بوته Number of Panicle in plant			طول پانیکول Panicle length (cm)		
0.23	0.008	M4/E10- 69	0.21	0.009	M4/E8- 127
0.23	0.008	M4/E10- 71	0.24	0.005	M4/E8- 137
0.23	0.008	M4/E10- 72	0.36	0.0003	M4/E8- 147
0.23	0.008	M4/E10- 76	0.23	0.006	M10/E1- 217
0.27	0.003	M59/E36- 106			
0.26	0.004	M10/E1- 224			
شاخص برداشت Harvest index			ارتفاع گیاه Plant height (cm)		
0.51	0.0001	M4/E10- 65	0.31	0.002	M3/E2- 31
0.51	0.0001	M4/E10- 74	0.31	0.002	M3/E2- 35
0.27	0.003	M59/E36- 105	0.31	0.002	M3/E2- 38
0.24	0.006	M59/E36- 102			
تعداد برگ در بوته Number of leaf in plant			عرض برگ leaf width (cm)		
0.37	0.0005	M3/E2- 19	0.23	0.003	M3/E2- 12
0.46	0.00006	M3/E2- 29	0.24	0.002	M3/E2- 15
0.37	0.0005	M3/E2- 32	0.26	0.001	M59/E36- 92
0.27	0.005	M4/E10- 50	0.24	0.002	M4/E8- 148
0.27	0.005	M4/E10- 59	0.24	0.002	M10/E1- 204
0.28	0.004	M4/E10- 67	0.24	0.002	M10/E1- 214
تعداد برگ در بوته Number of leaf in plant			وزن هزار دانه (g) 1000-grain weight		
0.46	0.00006	M4/E10- 69	0.19	0.007	M3/E2- 11
0.46	0.00006	M4/E10- 71	0.18	0.009	M59/E36- 84
0.46	0.00008	M4/E10- 72	0.25	0.001	M10/E1- 244
0.46	0.00008	M4/E10- 76	0.25	0.001	M10/E1- 245
0.32	0.001	M4/E8- 144			
طول برگ leaf length (cm)					
0.25	0.007	M4/E8- 145			

منابع

- اکبری شیوا؛ کافی محمد؛ رضوان بیدختی شهرام (۱۳۹۴) اثر تنش خشکی بر عملکرد، اجزای عملکرد و آنتی اکسیدان در دو اکوتیپ سیر *Allium sativum L.* با تراکم‌های کاشت مختلف. نشریه بوم شناسی کشاورزی ۸ (۱)، ۹۵-۱۰۶.
- ثقه الاسلامی محمد جواد؛ کافی محمد؛ مجیدی هروان اسلام؛ درویش فرخ؛ نور محمدی قربان (۱۳۸۴) تاثیر کم آبیاری بر عملکرد و بازده استفاده از آب سه گونه ارزن. مجله علمی-پژوهشی علوم کشاورزی ۴ (۱۱)، ۱۲۲-۱۳۰.
- عطایی رضا؛ محمدی ولی اله؛ طالعی علیرضا؛ نقوی محمدرضا (۱۳۹۲) نقشه‌یابی ارتباطی صفات ریشه در جو. مجله علوم گیاهان زراعی ایران ۲ (۴۴)، ۳۴۷-۳۵۷.
- موسوی درازمحله مهسا؛ زین العابدینی مهرشاد؛ مردی محسن؛ مرعشی حسن؛ ملک زاده سعید؛ کاظمی مهربانو؛ رودبار شجاعی طه؛ زهراوی مهدی (۱۳۹۲) بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت ژرم پلاسم انار شیرین ایران با استفاده از نشانگرهای SSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۴ (۵)، ۱۳۸-۱۵۰.
- نقوی محمد رضا؛ قره یاضی بهزاد؛ حسینی سالکده قاسم (۱۳۸۷) نشانگرهای مولکولی، چاپ و انتشارات دانشگاه تهران. ۱۰۹-۱۲۱.
- هوشیاردل فرامرز؛ درویش زاده رضا؛ بصیرینیا اشکان؛ حاتمی ملکی حمید (۱۳۹۵) نقشه‌یابی ارتباطی صفات زراعی در توتون‌های شرقی (*Nicotiana tabacum L.*). پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی ۱۸ (۸)، ۱۳۳-۱۴۳.

References

- Abdurakhmonov IY, Kohel R, Yu JZ et al. (2008) Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum L.* germplasm. *Genomics* 92, 478-487.
- Achleitner A, Tinker N, Zechner E, Buerstmayr H (2008) Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits. *Theor Appl Genet* 117, 1041-1053.
- Ahmad F, Akram A, Farman K et al. (2017) Molecular Markers and Marker Assisted Plant Breeding. Current Status and their Applications in Agricultural Development. *J Environ Agric Sci* 11, 35-50.
- Akbari S, Kafi M, Rezvan Beidokhti S (2016) The effects of drought stress on yield, yield components and antioxidant of two garlic (*Allium sativum L.*) ecotypes with different planting densities. *J Agroecol* 8, 95-106 (in Persian).
- Ataie R, Mohammadi V, Taleai AR, Naghavi MR (2013) Association mapping of root traits in barley. *J Field Crop Sci* 44, 347-357 (In Persian).

- Barbosa AMM, Geraldi IO, Benchimol LL et al. (2003) Relationship of intra- and inter population tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. *Euphytica* 130, 87-99.
- Cardon LR, Palmer LJ (2003) Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 15, 598-604.
- Collard B, Jahufer M, Brouwer J, Pang E (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement. The basic concepts *Euphytica* 142, 169-196.
- Dadras AR, Sabouri H, Mohammadi Nejad Gh et al. (2014) Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. *J Mol Biol* 41, 3317-3329.
- Davar R, Darvishzadeh R, Rezaee Danesh Y et al. (2012) Single sequence repeat markers associated with partial resistance in sunflower to *Phoma macdonaldii*. *J Phytopathol Mediterr* 51, 541-548.
- Debibakas S, Rocher S, Garsmeur O et al. (2014) Prospecting sugarcane resistance to sugarcane yellow leaf virus by genome-wide association. *J Theor Appl Genet* 127, 1719-1732.
- Eagles HA, Bariana HS, Ogonnaya FC (2001) Implementation of markers in Australian wheat breeding. Crop Pas of markers in Australian wheat breeding. *J Crop Pasture Sci* 52, 1349-1356.
- Ebrahimi F, Majidi MM, Arzani A, Mohammadi Nejad Gh (2017) Association analysis of molecular markers with traits under drought stress in safflower. *J Crop Pasture Sci* 68, 167-175.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *J Mol Ecol* 14, 2611- 2620.
- FAO. 2013. FAOSTAT Database. Available online at: [http:// faostat. Fao.org](http://faostat.fao.org).
- Foltz CR (2002) Iran's water crisis: Cultural, political and ethical dimensions. *J Agric Environ Ethics* 15, 357-380.
- Fusari CM, Di Rienzo Ja, Troglia C, et al. (2012) Association mapping in sunflower for *Sclerotinia* head rot resistance. *J BMC Plant Biol* 12, 1-13.
- Hoshyardel F, Darvishzadeh R, Basirnia A, Hatami Maleki H (2014) Association Mapping of Agronomic Traits in Oriental Tobacc (*Nicotiana tabacum L.*) Genotypes. *J Plant Breed* 8, 134-143 (in Persian).
- Johnson RC, Kisha TJ, Evans MA (2007) Characterizing safflower germplasm with AFLP molecular markers. *J Crop Sci* 47, 1728-1736.

- Kannan B, Senapathy S, Gajaraj A et al. (2014) Association Analysis of SSR Markers with Phenology, Grain, Stover-Yield Related Traits in Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) Sci. World J 22, 148-162.
- Kovi MR, Hu Y, Bai X, Xing Y (2015) QTL mapping for thermo-sensitive heading date in rice. Euphytica 205, 51-62.
- Kraakman ATW, Martínez F, Mussiraliev B et al. (2006) Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. J Mol Breed 17, 41-58.
- Kumar S, Ambreen H, Murali TV et al. (2015) Assessment of genetic diversity and population structure in a global reference collection of 531 accession of *Carthamus tinctorius* L. (safflower) using AFLP markers. J Plant Mol Biol 33, 1299-1313.
- Lynch M, BG Milligan (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. J Mol Ecol 3, 91-99.
- Mahalakshmi, V, Bidinger FR (1985) Water stress and time of floral initiation on pearl millet. J Agric Sci 105, 437-445.
- Mannai YE, Shehzad T, Okuno K (2011) Variation in flowering time in sorghum core collection and mapping of QTLs controlling flowering time by association analysis. J Genet Resour Crop Evol 58, 983-989.
- Mousavi Derazmahalleh SM, Zeinalabedini M, Mardi M et al. (2014) The Survey of Genetic Diversity & Population Structure Analysis of Iranian Sweet Pomegranate (*Punica granatum* L.) Germplasm Using SSR Markers. J Agric Biotech 4, 139-150 (in Persian).
- Naghavi MR, Gharehyazi B, Hoseini Salekdeh Gh (2008) Molecular markers. University of Tehran Press. UK, pp 109-121 (In Persian).
- Okuyama LA, Ferizzi LC, Neto JFB (2004) Correlation and path analysis of yield and its components and plant traits in wheat. J Cienc Rural 34, 1701-1708.
- Rostok N, Ramsay L, MacKenzie K et al. (2006) Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbreed crop varieties. J Proc Natl Acad Sci U S A 103, 18656-18661.
- Saeed A, Darvishzadeh R, Basirnia A (2013) Simple sequence repeat markers associated with agromorphological traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). J Zemdirbyste-Agric 100, 433- 440.

- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *J Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 8014-8018.
- Saghatoleslami M, Magidi Haravan M, Nourmohmadi G, Darvish F (2007) Effect of drought stress in growth different stages on yield and water use efficiency of five millet genotypes in South Khorasan. *J Agric Sci* 11, 215-225 (In Persian).
- Shaaf S, Bihamta MR, Taleai AR et al. (2012) Association analysis of single nucleotide variation in flowering time genes PpdH1, HvCO1 and HvGI in the barley. *Modern Genet* 7, 179-191.
- Shi J, Li R, Qiu D, Jiang C et al. (2009) Unraveling the complex trait of crop yield with quantitative trait loci mapping in *Brassica napus*. *Genet* 182, 851-861.
- Slafer GA (2003). Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *J Ann Appl Biol* 142, 117-128.
- Thimmappaiah W, Santhosh G, Shobha D, Melwyn GS (2008) Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *J Sci Hortic* 118, 1-7.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23, 4407- 4414.
- Wei YM, Hou YC, Yan ZH et al. (2005) Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to *Fusarium* head blight. *J Theor Appl Genet* 46, 3-9.
- Yang J, Benyamin B, McEvoy BP et al. (2010) Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *J Nat Genet* 42, 565-569.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH et al. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *J Nat Genet* 38, 203- 208.
- Zhang Q, Wu C, Ren F et al. (2012) Association analysis of important traits of agronomical maize inbred lines with SSRs. *J Crop Sci* 6, 1131- 1138.