Cereal Biotechnology and Biochemistry
Online ISSN: 2783-5170
Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

Effect of selection on germplasm diversity of pure lines of crop sorghum in Iran using IRAP molecular markers and morphological traits

Negar Karimi [1] & Hojjatollah Saeidi [2] ✉

[1] Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
E-mail: negar.karimi.gh@gmail.com

[2] ✉ Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
E-mail: ho.saeidi@sci.ui.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Humans have long sought to select the desirable traits for agriculture and domestication of important and economical crop species around the world. In fact, the human selection is a factor that plays a key role in determining the fate of plant breeding lines, especially cereals. Therefore, the study of genetic diversity and the study of germplasm storage of breeding lines on the one hand and the study of the role and effect of choices made by plant breeders, on the other hand, are key factors in investigating the fate of improved seeds and lines. To conduct such studies, molecular studies using markers that act neutrally and randomly are important. Accordingly, the present study aimed to investigate the effect of selection on seeds of an important crop that has long been under domestication and crop breeding programs. Sixteen pure lines of sorghum grown in the research farm of Agricultural and Natural Resources Research and Training Center of Khorasan Razavi were assessed using retrotransposon-based molecular markers plus desirable morphological traits used in breeding crop sorghums.

Materials and methods: A total of 80 individuals belonging to the first to ninth generations of breeding sorghums were randomly selected, and molecular studies were performed using 8 IRAP primer combinations. Morphological studies were also performed using the measurement of traits related to leaf biomass (the number of leaves at 60 days of plant growth).

Results: The observations showed relatively high intergroup genetic diversity (between breeding generations) (63.5%) in the study group. Among the studied generations, the fifth generation and afterward the seventh and eighth generations showed the highest hereditary diversity, the highest heterozygosity, and the highest number of unique alleles. The first and ninth generations with the highest homozygosity, respectively, were the purest lines studied.

Conclusion: The results of dendrogram trees also confirmed the existence of three completely different clusters in the study group. Accordingly, the existence of gene flow between the breeding lines of sorghum and its occurrence among the individuals of the fifth, sixth and seventh generations was confirmed. However, its decline and decrease in the seventh generation onwards indicated the instability of observed recombination. Finally, it was concluded that the selection of superior and desirable phenotypes during the purification process always acts as a selective sweep and as a directional selection eliminates the variations created by gene flow and thus reduces the genetic diversity in the pure lines of crop sorghum.

Keywords: Breeding, Genetic diversity, Iran, Pure lines, Retrotransposons, Sorghum.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 04/04/2022, **Revised:** 01/05/2022, **Accepted:** 08/05/2022, **Published online:** 28/06/2022

Cite this article: Karimi, N. & Saeidi, H. (2022). Effect of selection on germplasm diversity of pure lines of crop sorghum in Iran using IRAP molecular markers and morphological traits. Cereal Biotechnology and Biochemistry. 1 (2). 140-154. DOI: 10.22126/cbb.2022.7602.1009

© The Author(s).

Publisher: Razi University

10.22126/cbb.2022.7602.1009

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات
شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳
Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

اثر انتخاب بر تنوع ژرم‌پلاسم لاین‌های خالص سورگوم زراعی در ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی IRAP و ویژگی‌های ریخت‌شناختی

نگار کریمی [۱] و حجت اله سعیدی [۲] ✉

[۱] گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه: negar.karimi.gh@gmail.com
[۲] ✉ گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه: ho.saeidi@sci.ui.ac.ir

چکیده

مقدمه: بشر از دیرباز به دنبال اهلی‌سازی گونه‌های زراعی مهم و اقتصادی و انتخاب صفات مطلوب کشاورزی بوده است. در واقع انتخاب توسط بشر، فاکتوری است که نقش اساسی در تعیین سرنوشت لاین‌های اصلاحی گیاهان و به‌ویژه غلات به عهده دارد. از این‌رو، مطالعه تنوع وراثتی و بررسی ذخیره ژرم‌پلاسم لاین‌های اصلاحی از یک سو و مطالعه نقش و اثر انتخاب‌های انجام شده توسط اصلاح کنندگان نبات از سوی دیگر، عوامل کلیدی جهت بررسی سرنوشت بذرهای اصلاح شده به شمار می‌روند. جهت انجام چنین بررسی‌هایی، مطالعات مولکولی با استفاده از نشانگرهایی که به صورت خنثی و تصادفی عمل می‌کنند، حائز اهمیت می‌باشد. بر این اساس، در مطالعه پیش‌رو جهت بررسی اثر انتخاب بر بذر گیاهان زراعی مهمی که مدت‌ها تحت اهلی‌سازی و برنامه های اصلاح نبات قرار گرفته‌اند، از ۱۶ لاین خالص سورگوم زراعی کشت شده در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و با به کارگیری نشانگرهای مولکولی مبتنی بر نواحی رتروترانسپوزون و صفات ریخت‌شناختی مرتبط با افزایش بیوماس گیاه، استفاده شد.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۸۰ فرد متعلق به نسل‌های اول تا نهم اصلاحی انتخاب شد و مطالعات مولکولی با استفاده از هشت زوج آغازگر IRAP و مطالعات ریخت‌شناختی با اندازه‌گیری صفات مربوط به بیوماس برگ انجام شد.

یافته‌ها: مشاهدات حاکی از تنوع بین گروهی (بین نسل‌های اصلاحی) نسبتاً بالا (۶۳.۵٪) در گروه مورد مطالعه بود. از بین نسل‌های مورد مطالعه، نسل پنجم و در مرحله بعد، نسل‌های هفتم و هشتم بیشترین میزان تنوع وراثتی، بیشترین میزان هتروزیگوسیتی و بیشترین میزان آلل‌های منحصر بفرد را به خود اختصاص دادند.

نتیجه‌گیری: بر این اساس وجود جریان ژنی بین لاین‌های اصلاحی سورگوم زراعی و بروز آن در تنوع آللی افراد نسل پنجم، ششم و هفتم تأیید شد. با این حال، کاهش مجدد آن در نسل‌های هفتم به بعد، حاکی از ناپایداری نوترکیبی‌های مذکور بود. در نهایت چنین نتیجه‌گیری شد که انتخاب فنوتیپ‌های برتر و مطلوب طی روند خالص‌سازی همواره به صورت یک جاروی ژنی عمل کرده و به صورت یک انتخاب جهت‌دار باعث حذف تنوعات ایجاد شده حاصل از جریان ژنی و در نتیجه کاهش تنوع وراثتی در لاین‌های خالص سورگوم زراعی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ایران، تنوع وراثتی، رتروترانسپوزون، سورگوم، به نژادی، اصلاح نبات

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۱۵ **اصلاح:** ۱۴۰۱/۰۲/۱۱ **پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۲/۱۸، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۱/۰۴/۰۷

استناد: کریمی، ن. و سعیدی، ح. ا. (۱۴۰۱). اثر انتخاب بر تنوع ژرم‌پلاسم لاین‌های خالص سورگوم زراعی در ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی IRAP و ویژگی‌های ریخت‌شناختی. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات. ۱ (۲). ۱۵۴-۱۴۰. DOI: 10.22126/cbb.2022.7602.1009

ناشر: دانشگاه رازی
© نویسندگان.

مقدمه

انتخاب و اهلی‌سازی گیاهان زراعی و انجام دورگ‌گیری‌های متعدد جهت دستیابی به بهترین ارقام کشاورزی، از دیرباز مورد توجه جوامع بشری بوده است و امروزه از عوامل تأثیرگذار در تأمین غذای انسان و دام محسوب می‌شود. مطالعه فاکتورهایی که چنین انتخاب‌هایی را تحت تأثیر قرار می‌دهند و نیز نتایج و اثرات حاصل از چنین فرآیندهایی، برای اصلاح کنندگان نبات بسیار حائز اهمیت است (Kimber, 2000; Maqbool *et al*., 2001). گونه‌های زراعی از جمله سورگوم، منبع اصلی غذا و انرژی در سراسر جهان به شمار می‌روند و فشارهای انتخابی متنوعی را در طی مراحل اهلی‌سازی تجربه می‌کنند. از این‌رو، گونه‌های مناسبی برای انجام چنین بررسی‌هایی می‌باشند (FAO, 1991).

سورگوم زراعی با نام علمی *Sorghum bicolor* (L.) Moench شناخته می‌شود. این گونه متعلق به قبیله Andropogoneae از خانواده گندمیان (Poaceae) است (APG, 2003). سورگوم گیاهی یکساله با مکانیسم فتوسنتزی اسید کراسولاسه (C4) است. این ویژگی به همراه ویژگی‌هایی نظیر توانایی ایجاد ریشه‌های عمقی جهت دسترسی بیشتر به منابع آب زیرزمینی و هم‌چنین توانایی لوله کردن برگ‌ها در شرایط خشکی جهت جلوگیری از تبخیر آب از سطح پهنک برگ‌ها، آن را غله مناسبی برای کشت در مناطق خشک جهان مبدل کرده است؛ به‌نحوی که از نظر امنیت غذایی در نقاط مختلف جهان با دسترسی محدود به منابع آبی، یک عامل کلیدی به شمار می‌رود (Benson & Rao, 1906).

بر این اساس سورگوم پنجمین غله مهم بشر بعد از برنج، گندم، جو و ذرت محسوب شده و در بسیاری از مناطق جهان با هدف تأمین علوفه دام کشت می‌شود (FAO, 1991). کشور ایران نیز به واسطه قرارگیری در فلات مرکزی ایران و رویارویی با بحران خشکی و کم‌آبی در بسیاری از مناطق، به کشت و پرورش این گیاه زراعی روی آورده است. از همین رو در سال‌های اخیر، مطالعات مبتنی بر اهلی‌سازی زراعی ارقام مختلف سورگوم در ایران، جایگاه ویژه‌ای در مطالعات مرتبط با اصلاح بذر یافته است (Karimi & Saeidi, 2016).

سورگوم گیاهی خودگشن محسوب شده و مطالعات مختلف تا ۸۵ درصد خودگشنی را در انواع زراعی و خودروی آن گزارش کرده‌اند (Burkill, 1937; Jankowski *et al*., 2020). گونه‌های زراعی اولین بار از آفریقا منشأ یافته و دارای سه مرکز تنوع‌زایی در جنوب، شرق و جنوب غرب آفریقا است و به دلیل اهمیت بالای اقتصادی در تمدن‌های قدیمی، این قاره از حدود ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح، مراحل مختلف اهلی‌سازی را تجربه کرده است و امروزه با سه زیرگونه *S. bicolor* subsp. *bicolor*، *S. bicolor* subsp. *drummondii* و *S. bicolor* subsp. *verticilliflorum* شناخته می‌شود. قابلیت بالای تولید

دورگ‌های کاملاً بارور نیز منجر به وجود نژادهای مختلف در بین زیرگونه‌های مختلف آن شده است، به طوری که در حال حاضر پنج نژاد اصلی و ۱۰ نژاد حدواسط برای این گونه شناخته می‌شود (De Wet & Harlan, 1971; Burkill, 1937). تنوع ژرم‌پلاسم بالای ذکر شده موجب شده است سورگوم در مطالعات مختلف مرتبط با تنوع وراثتی نیز مورد توجه بسیاری قرار گرفته و هدف مناسبی برای برنامه‌های اصلاح نبات باشد (Muraya *et al*., 2012).

انتخاب صفات دارای ارزش اقتصادی و حذف صفات نامطلوب تأثیرات معناداری بر غنای وراثتی و ذخیره ژرم‌پلاسم گیاهان اصلاح شده می‌گذارد. در واقع بررسی تأثیر انتخاب و پیامدهای آن بر ذخیره وراثتی گیاهان حائز اهمیت است. انجام چنین مطالعاتی از یک طرف می‌تواند به یافتن ژرم‌پلاسم‌ها و آلل‌های مفید کمک کند و از طرف دیگر پلی بین استراتژی‌های حفاظتی و برنامه‌های اصلاح نژاد ایجاد کند (Wasson *et al*,. 2012). نتایج چنین مطالعاتی این امکان را فراهم می‌کند تا علاوه بر تشخیص ژرم‌پلاسم‌های با ارزش و تلاش برای حفاظت تنوعات وراثتی دست، به انتخاب آلل‌های مفید با صفات مطلوب و مورد انتظار بزنیم. همچنین برآوردی از پتانسیل وراثتی لاین‌های خالص به دست آمده فراهم کرده و امکان ردیابی صفات مطلوب و نتایج انتخاب و اهلی‌سازی را برای ما آشکار می‌سازد (Muraya *et al*., 2012). علاوه بر آن، با به کارگیری چنین بررسی‌هایی می‌توان اثر انتخاب بر ظرفیت ژرم‌پلاسم بذرهای خالص را سنجید و تشخیص داد آیا انتخاب اثری جهت‌دار بر ذخیره ژرم‌پلاسم لاین‌های خالص ایجاد می‌کند یا خیر (Robertson, 1961).

جهت انجام چنین بررسی‌هایی، نواحی از ژنوم با تکامل خنثی حائز اهمیت بالا هستند؛ چرا که در مقایسه با ژن‌های عملکردی، کمتر تحت تأثیر انتخاب و اهلی‌سازی قرار گرفته و نماینده مناسب‌تری از تغییرات، نتایج و عواقب انتخاب می‌باشند (Fedoroff, 1991; Martiwi *et al*., 2020; Ghahramani & Darvishzadeh, 2021). بر این اساس، مناطق تکراری ژنوم مانند رتروترانسپوزون‌ها مناطق ژنومی مناسبی به شمار رفته و نشانگرهای تصادفی مرتبط با این نواحی نظیر IRAP (Inter Retrotransposons Amplified Polymorphism)، نشانگرهای مناسبی به شمار می‌روند. این دسته از نشانگرها به صورت تصادفی عمل کرده و به عنوان نشانگرهای خنثی توزیع شده در سراسر ژنوم عمل می‌کنند و می‌توانند الگوهای غیرعادی تنوعات آللی را آشکار سازند (Feschotte, 2008).

بررسی تأثیر انتخاب با استفاده از صفات ریخت‌شناختی نیز نیازمند به کارگیری صفاتی است که کمتر تحت تأثیر محیط قرار گرفته و پایداری بیشتری نشان دهند. از این‌رو، به‌نژادگران معمولاً در صدد بررسی صفاتی هستند که به طور ژنتیکی روی زیست‌توده (مانند تعداد برگ، تعداد دانه در خوشه، میانگین وزن دانه، وجود برگ پرچمی و...) تأثیر می‌گذارند (Lin *et al*., 2014). مطالعات مختلف در

سورگوم زراعی با اندازه‌گیری میزان بیوماس برگ‌ها و دانه‌ها بیانگر تنوع و ارزش بالای آن صفات در چنین بررسی‌هایی است (Borghi *et al*., 2012; Jankowski *et al*., 2020; Gautam *et al*., 2020).

در این مطالعه از نشانگرهای IRAP و صفات ریخت‌شناختی مرتبط با بیوماس، برای تعیین تنوع و ارزیابی غنای ژرم‌پلاسم توده‌های مختلف سورگوم زراعی کشت شده در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و آزمایش نتیجه انتخاب روی نسل‌های مختلف لاین‌های اصلاح‌شده استفاده شد.

جدول ۱- نام افراد مورد بررسی، شماره نسل و شماره هرباریومی مربوط به نمونه هرباریومی نگه‌داری شده در هرباریوم دانشگاه اصفهان.

Table 1. Accession codes of studied individuals, generation number and herbarium code of individuals deposited at the Herbarium of the University of Isfahan.

ردیف	نام افراد	شماره نسل	کد هرباریومی
Number	Individual name	Generation number	Herbarium code
1	Sb1	F3	HUI-19791
2	Sb2	F3	HUI-19792
3	Sb3	F2	HUI-19793
4	Sb4	F9	HUI-19794
5	Sb5	F7	HUI-19795
6	Sb6	F1	HUI-19796
7	Sb7	F4	HUI-19797
8	Sb8	F5	HUI-19798
9	Sb9	F5	HUI-19799
10	Sb10	F6	HUI-19800
11	Sb11	F6	HUI-19801
12	Sb12	F3	HUI-19802
13	Sb13	F5	HUI-19803
14	Sb14	F8	HUI-19804
15	Sb15	F6	HUI-19805
16	Sb16	F9	HUI-19806
17	Sh63*	-	HUI-19751

* گونه *Sorghum halepense* استفاده شده به عنوان برون گروه

* *Sorghum halepense* used as outgroup

مواد و روش‌ها

جهت انجام بررسی‌ها، مجموعه بذری از سورگوم زراعی از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی دریافت شد. سعی بر آن شد بذرهای دریافت شده نماینده کاملی از فرآیندهای اهلی‌سازی انجام شده (در طول ۶۰ سال اخیر) روی سورگوم زراعی در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی باشد و همچنین موفق‌ترین لاین اصلاحی آن مرکز از جمله لاین خالص منتهی به رقم تجاری پگاه را شامل شود. بر این اساس مجموعه بذرهای انتخاب شده نماینده نسل‌های اول تا نهم سورگوم اصلاحی در مرکز فوق بود. به شکلی که از هر نسل، حداقل یک مجموعه بذر کشت شده انتخاب و در برخی از نسل‌ها که تنوعات قابل توجه مشاهده شد، از هر نسل چند تکرار کاشت (چند مجموعه بذر مربوط به یک نسل) انتخاب شد. بذرها در تابستان سال ۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه اصفهان کشت شد. در پایان فصل گلدهی، گیاهان پرورش یافته مورد بررسی‌های ریخت شناختی قرار گرفت و در مجموع ۸۰ فرد مربوط به نسل‌های اول تا نهم (حداقل ۳ تا ۵ فرد از هر مجموعه بذر) انتخاب شد. سه فرد مربوط به گونه *Sorghum halepense* (L.) Pers. نیز به‌عنوان برون‌گروه به مجموعه داده‌ها اضافه شد. افراد و نمونه‌های مورد نظر در دوره‌های زمانی مختلف جهت شمارش تعداد برگ‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و نهایتاً در اواخر فصل گلدهی جهت تهیه نمونه هرباریومی جمع‌آوری گردیدند. نمونه‌های گیاهی مربوطه در هرباریوم دانشگاه اصفهان (HUI) و نمونه‌های بذر در مجموعه بذر هرباریوم دانشگاه اصفهان قرار گرفتند. شماره هرباریومی، شماره نسل و سایر اطلاعات مربوط به نمونه‌های استفاده شده در جدول ۱ قابل مشاهده است (جدول ۱).

از برگ نمونه‌های انتخابی به صورت توده (bulk) جهت استخراج DNA استفاده شد. استخراج بر اساس روش CTAB (Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide) انجام شد (Gawel & Jarret, 1991) و پس از تست کیفیت سنجی برای انجام PCR آماده شد. بیست و پنج ترکیب مختلف از پرایمرهای IRAP مورد آزمایش قرار گرفت که از بین آن‌ها، هفت ترکیب آغازگر که متمایزترین و قابل شمارش‌ترین باندها را ایجاد کردند، برای مراحل بعدی انتخاب شدند. توالی پرایمرها، منبع رتروترانسپوزون، جهت‌گیری و سایر جزئیات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم کل ۱۵ میکرولیتر انجام شد و در نهایت محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ (w/v) جداسازی و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید شناسایی و عکس‌برداری شدند. با تجزیه و تحلیل باندهای به دست آمده وجود (۱) یا عدم وجود (۰) باندها برای هر فرد و بر اساس هر زوج پرایمر ثبت و ماتریس خام داده‌ها در نرم افزار Microsoft Excel تشکیل داده شد. شباهت‌های ژنتیکی بر اساس ضرایب تشابه

جاکارد (Jaccard, 1908) و تطبیق ساده (Nei & Li, 1979) و با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc محاسبه شد (Rohlf, 2000). دندروگرام با استفاده از دو روش خوشه‌بندی Neighbor-Joining و UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) و با استفاده از ضرایب محاسبه شده به صورت جداگانه رسم شد. به منظور سنجش میزان انطباق دندروگرام‌های رسم شده با ماتریس تشابهات موجود و تخمین دقت و درجه اعتبار روش‌های خوشه‌بندی متفاوت، میزان همبستگی کوفنتیک برای هرکدام از ضرایب و روش‌های خوشه‌بندی فوق محاسبه گردید. از این بین دندروگرام رسم شده با استفاده از روش خوشه‌بندی NJ و ضریب تشابه Jaccard، بیشترین میزان همبستگی کوفنتیک (r=0.86) را نشان داد، از این‌رو، جهت رسم دندروگرام و انجام محاسبات بعدی مرتبط با تعیین فواصل و تشابهات ژنتیکی استفاده شد. در نهایت میزان دقت و اعتبار انشعابات دندروگرام از طریق آزمون بوت‌استرپ و توسط نرم‌افزار PowerMarker محاسبه گردید و از طریق خوشه‌بندی Consensus و با استفاده از مجموعه نرم‌افزاری PHYLIP روی دندروگرام مربوطه منطبق شد (Liu & Muse, 2005).

تجزیه و تحلیل‌های آماری نظیر آنالیز واریانس‌های مولکولی (AMOVA)، میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی، میزان فواصل و تشابهات ژنتیکی و... نیز با استفاده از نرم‌افزار GenAlex انجام شد (Peakall & Smouse, 2006).

جدول ۲- توالی آغازگرهای IRAP استفاده شده در مطالعه، منبع رتروترانسپوزون و جهت آن ها (→ یا ←).

Table 2. Sequences of primers used for IRAP, their retrotransposon source and direction (→ or ←).

ردیف	آغازگر	جهت و منبع رتروترانسپوزون	توالی*
Number	Primer	Retrotransposon source and direction	Sequence*
1	Sukula	Sukula →	GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGA
2	LTR6150	BARE-1 ←	CTGGTTCGGCCCATGTCTATG TATCCACACATGGTA
3	LTR6149	BARE-1 ←	CTCGCTCGCCCACTACATC AACCGCGTTTATT
4	Reverse Ty2	W1, W3, W7, W8 →	TRGTARAGRAGNTGRAT
5	Reverse Ty1	W1, W3, W7, W8 ←	CCYTGNAYYAANGCNGT
6	5’LTR2	BARE-1←	ATCATTGCCTCTAGGGCATAATTC
7	3’LTR2	BARE-1 →	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCCAACA

* Y= C or T; N= A, G, C or T, R= A or G

نتایج

نتایج حاصل از تکثیر قطعات PCR بیانگر وجود ۱۹۹ باند بود که از این بین تعداد ۱۴۸ باند پلی مورف (۷۴/۳۷ درصد) بودند. نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی، بیانگر آن بود که ۶۳/۵ درصد از پلی‌مورفیسم مشاهده شده، مربوط به تنوع بین نسل‌های مختلف است و تنها ۳۶/۵ درصد از پلی مورفیسم اندازه‌گیری شده مربوط به تنوع درون هر نسل است (جدول ۳).

جدول ۳- توزیع تنوع مولکولی بین و درون لاین‌های اصلاحی سورگوم زراعی در ایران (AMOVA).

Table 3. The percentage of variations within and between pure lines of *S. bicolor* in Iran (AMOVA).

بین نسل های مطالعه شده among groups polymorphism	63.5%
درون نسل های مطالعه شده within groups polymorphism	36.5%

بیشترین تعداد آلل‌های منحصربه‌فرد، متعلق به افراد نسل پنجم با مجموع ۱۱ آلل بود (جدول ۴). همچنین، بیشترین تعداد باند چندشکل نیز متعلق به افراد نسل پنجم با تعداد ۵۴ باند در همه اعضا بود. خطوط متعلق به نسل اول، دوم، هفتم و نهم، هیچ آلل منحصربه‌فردی نشان ندادند. درصد جایگاه‌های چندشکل در نسل پنجم بیشترین میزان (۸۳/۵ درصد) به‌دست آمد و کمترین درصد آن مربوط به اعضای نسل اول (۱۹/۶ درصد) بود (جدول ۴).

میزان هتروزیگوسیتی به دست آمده بر اساس معادله شانون ایندکس (Shannon's Information Index = -1* (p * Ln (p) + q * Ln(q))) برابر با HI=0.663 بین اعضای نسل پنجم و با بیشترین میزان محاسبه شده بین نسل‌های مختلف به دست آمد. کمترین میزان هتروزیگوسیتی نیز برابر با HI=0.001 بین اعضای نسل اول و در مراحل بعدی با میزان HI=0.071 و HI=0.079 به‌ترتیب بین اعضای نسل نهم و هشتم محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری بین لاین‌های مختلف بیشترین شباهت ژنتیکی (۸۱٪) را بین لاین‌های sb14 و sb16 متعلق به نسل‌های هشتم و نهم و در مرحله بعد بین لاین‌های sb4 و sb3 متعلق به نسل‌های نهم و دوم نشان داد.

با توجه به مطالعات و گروه‌بندی‌های حاصل از دندروگرام Neighbor Joining (شکل ۱)، گونه *S. halepense* که به‌عنوان برون‌گروه به مطالعه اضافه شده بود، به صورت مجزا و با فاصله مشخص از سایر افراد مطالعه شده قرار گرفت. بعد از آن، افراد مورد مطالعه به دو خوشه اصلی تقسیم شدند. یکی از خوشه‌ها (خوشه C)، همگی افراد متعلق به نسل پنجم را در خود جای داد و سایر نسل‌ها در یک خوشه

مشترک قرار گرفتند و به زیر خوشه‌های فرعی تقسیم شدند. در خوشه‌های فرعی افراد متعلق به نسل‌های F_7 و F_6 خوشه‌ای جدا از دیگر افراد (خوشه B) ایجاد کردند. افراد متعلق به نسل‌های F_1، F_2، F_3 و F_4 نیز یک خوشه مشترک ایجاد کردند (خوشه A) و در نهایت افراد متعلق به نسل‌های F_8 و F_9 موقعیت میانی در دندروگرام ایجاد کرده و به صورت حد واسط بین افراد مربوط به خوشه A و خوشه B نشان دادند.

جدول ۴- تعداد آلل منحصربه‌فرد، تعداد باند به‌دست آمده، تعداد باند پلی‌مورف و درصد پلی‌مورفیسم بررسی شده در نسل‌های مختلف سورگوم زراعی در ایران.

Table 4. Number of unique alleles, number of bands, number of polymorphic bands and percentage of polymorphism in different generations of cultivated *Sorghum* in Iran.

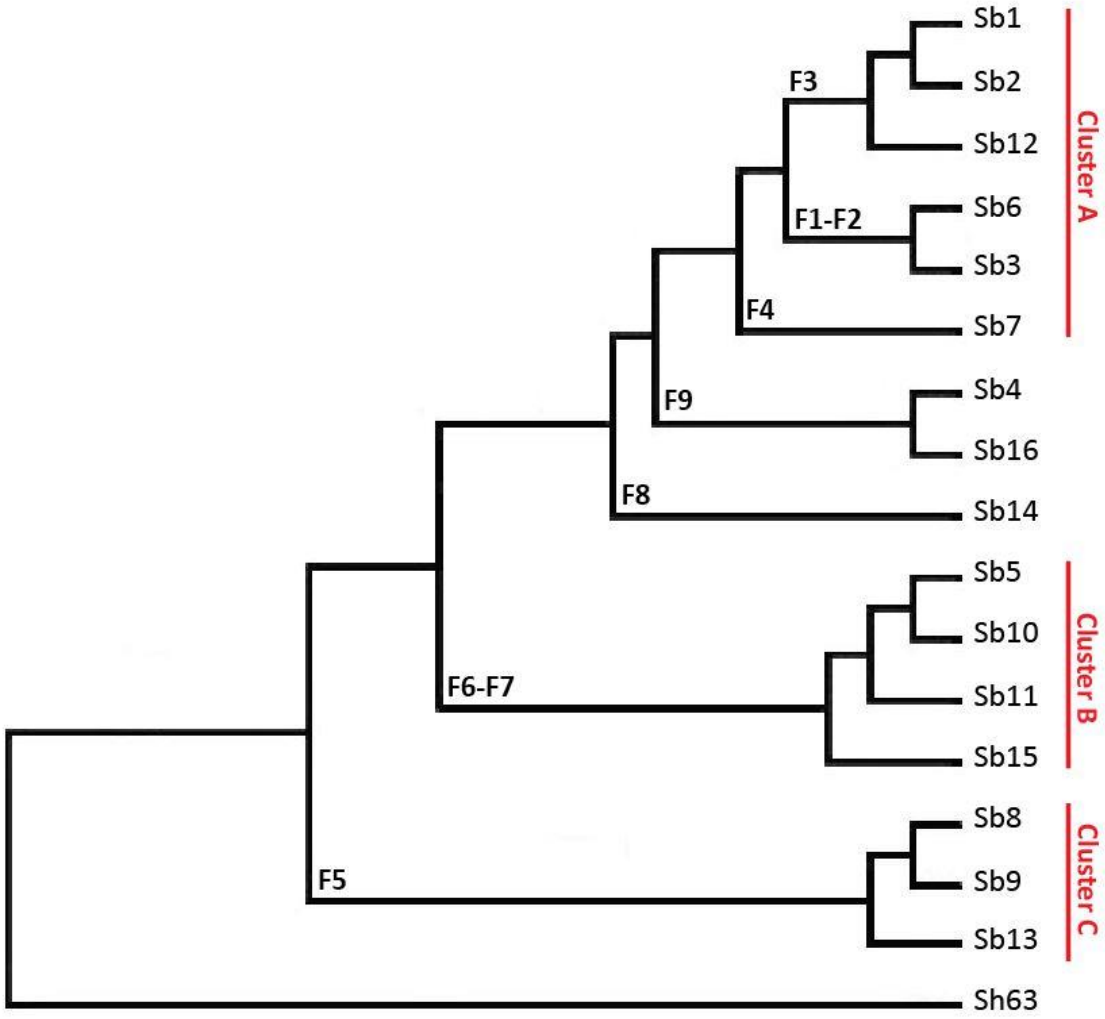
شماره نسل Generation number	تعداد آلل منحصربه‌فرد Number of unique alleles	تعداد باند به دست آمده Number of bands	تعداد باند پلی‌مورف Number of polymorphic bands	درصد پلی‌مورفیسم Percentage of polymorphism
F1	0	48	9.4	19.6%
F2	0	53	33	62.26%
F3	3	54	43	79.62%
F4	7	49	18	36.73%
F5	11	65	54.28	83.5%
F6	2	58	25	43.1%
F7	0	53	18	33.96%
F8	1	61	44	72.13%
F9	0	59	43	72.88%

در نهایت جهت سنجش میزان تأثیر صفات فنوتیپی حاصل از انتخاب بر عملکرد نسل‌های مختلف، بیوماس برگ (تعداد برگ) در ۹۰ روز پس از کشت مبنای بررسی شد. بر این اساس بیشترین بیوماس برگ در افراد نسل نهم مشاهده شد و پس از آن به‌ترتیب نسل‌های هشتم، هفتم، پنجم و چهارم بیشترین میزان بیوماس را به خود اختصاص دادند. کمترین میزان بیوماس نیز به‌ترتیب متعلق به نسل‌های اول، دوم و سوم بود.

بحث

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی، میزان بالای درون زادگیری در سورگوم زراعی تأیید می‌شود که با نتایج سایر مطالعات هم‌راستا است؛ به‌طوری که مطالعات مختلف تا میزان ۸۵ درصد درون زادگیری را در سورگوم زراعی گزارش کرده‌اند (Burkill, 1937; Muraya *et al.*, 2012). بر این اساس، به‌نظر می‌رسد دورگ‌گیری و اهلی‌سازی در نسل‌های مختلف و در طول هر نسل باعث

افزایش تفاوت ژنتیکی بین نسل‌های مختلف شده است. این نتایج با گروه‌بندی‌های حاصل از دندروگرام نیز مطابقت دارد، به گونه‌ای که نتایج حاصل از دندروگرام نیز وجود سه خوشه کاملاً متمایز (با فاصله ژنتیکی بالا) و همچنین یک خوشه با حالت حدواسط را تأیید می‌کند.



شکل ۱- دندروگرام رسم شده با استفاده از ضریب تشابه Jaccard و روش خوشه بندی Neighbor Joining، نمایش‌دهنده روابط موجود بین افراد مربوط به نه نسل مختلف لاین‌های سورگوم زراعی.

Figure 1. Achieved dendrogram using Jaccard similarity coefficient and Neighbor Joining clustering method, showing the relationships between individuals related to nine different generations of crop sorghum lines.

به‌صورت کلی، مشاهده میزان بالای چنین تنوعات بین‌گروهی (بین نسل‌های مختلف) و ایجاد خوشه‌های مجزا در گروه مورد بررسی را می‌توان ناشی از درون‌زادآوری بالای گیاه سورگوم دانست؛ چرا که درون‌زادگیری همواره منجر به کاهش تنوعات درون‌گروهی و افزایش تنوعات بین‌گروهی می‌شود.

از طرف دیگر، قرار گرفتن افراد مربوط به نسل پنجم در یک خوشه کاملاً مجزا نسبت به سایر افراد مطالعه شده، بیانگر فاصله وراثتی قابل توجه در افراد این نسل نسبت به سایر نسل‌ها است. وجود بیشترین تعداد باند چندشکل، بیشترین تعداد آلل‌های منحصربه‌فرد و همچنین بیشترین میزان هتروزیگوسیتی اندازه‌گیری شده برای افراد نسل پنجم تأیید کننده تنوع وراثتی بالای افراد نسل پنجم در مقایسه با سایر افراد و نسل‌های مورد بررسی است. قرار گرفتن افراد نسل‌های ششم و هفتم نیز در خوشه‌ای مجزا از سایر نسل‌ها و در رتبه بعدی، بیانگر نزدیکی تقریبی این افراد به نسل پنجم و فاصله ژنتیکی آن‌ها با نسل‌های دیگر است.

بذرهای کشت شده در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی از کشورهای مختلفی نظیر آفریقا، چین و استرالیا و تحت عنوان رقم خالص اسپیدفید به ایران وارد شده و به عنوان والدین اولیه تحت برنامه‌های اصلاحی مختلف و ترکیب پذیری‌های متعدد (در بازه زمانی تقریبی ۶۰ سال) جهت ایجاد لاین‌های خالص با صفات مورد انتظار قرار گرفته‌اند. بنابراین تنوع وراثتی بالای مشاهده شده در افراد نسل پنجم و در مرحله بعد، در نسل‌های ششم و هفتم می‌تواند به دلیل ایجاد نوترکیبی‌های جدید در این نسل‌ها باشد.

مورایا و همکاران (Muraya *et al.*, 2012) با بررسی تلاقی‌های سه نسل حاصل از دورگ‌گیری بین لاین‌های خالص سورگوم زراعی و خویشاوندان خودروی آن‌ها و بررسی میزان تأثیر این تلاقی‌ها در فنوتیپ زاده‌ها، وجود جریان ژنی بین نسل‌های مختلف سورگوم زراعی را رد کردند. با این حال، نتایج مطالعه حاضر و به کارگیری نسل‌های بیشتر حاصل از تلاقی بیانگر وجود جریان ژنی و تأثیر آن در تلاقی‌های حاصل از نسل‌های پنجم به بعد است. عدم مشاهده تفاوت فنوتیپی در سه نسل اول بررسی شده توسط مورایا و همکاران (Muraya *et al.*, 2012) و سه نسل اول بررسی شده در این مطالعه، می‌تواند به دلیل نرخ پایین برون زادگیری (۱۵٪) سورگوم زراعی باشد. در واقع پایین بودن میزان برون زادگیری موجب کاهش نرخ جریان ژنی شده و بر این اساس، تغییرات ژنتیکی ناشی از جریان ژنی، نیازمند گذشت زمان بیشتر و نسل‌های بیشتری هستند تا تغییرات حاصل از آن، به چنان فراوانی نسبی برسند که بتوانند در فنوتیپ افراد ظاهر شوند.

به هر حال، جدایی نسل‌های F_5، F_6 و F_7 با فاصله قابل توجه از سایر نسل‌ها و پلی‌مورفیسم بیشتر آن‌ها، بیانگر وقوع جریان ژنی بین لاین‌های خالص سورگوم زراعی است و وقوع آن می‌تواند به این دلیل باشد که ترکیب لاین‌های مختلف

خالص وارداتی به کشور از مبدأهای مختلف برای اولین بار منجر به ایجاد نوترکیبی‌های جدید ژنتیکی در نسل‌های اخیر شده است. ترکیباتی که منجر به تنوع وراثتی بالاتر در نسل های F_5، F_6 و F_7 گردیده است. با این حال، عدم پایداری چنین تنوع بالایی و کاهش مجدد آن در گذر به سمت نسل‌های بعدی می‌تواند بیانگر مفید نبودن چنین تنوعاتی باشد. به نظر می‌رسد تنوعات ایجاد شده در نسل پنجم به صورت نوعی فروپاشی هیبرید (hybrid breakdown) عمل کرده است و با ایجاد جهش‌ها و نوترکیبی‌های ناسازگار، موجب نوعی تنوعات وراثتی ناپایدار شده است که با اهلی‌سازی‌های مجدد در نسل‌های بعدی، آلل‌های تازه شکل گرفته و نوترکیبی‌های به وجود آمده، به علت مفید نبودن حذف شده و از بین رفته است.

از طرف دیگر انتخاب فنوتیپ‌های مناسب (زاده‌هایی با بیشترین تعداد برگ) در طول اهلی‌سازی می‌تواند منجر به افزایش تعداد آلل‌های مرتبط با بیوماس و حذف آلل‌های غیرمشابه شود. به بیان دیگر، انتخاب افراد بر اساس صفات فنوتیپی بهینه یا صفات حاصل از اصلاح و اهلی‌سازی، صرفاً باعث انتخاب افرادی با بیشترین نزدیکی ژنتیکی شده و در نتیجه تنوع وراثتی را در طی نسل‌های متمادی بهینه‌سازی به‌شدت کاهش داده است.

مطالعات مختلف بیانگر آن است که فراوانی و افزایش یک آلل خاص در جمعیت‌های یک گونه (نسل‌های مختلف) می‌تواند به صورت یک جاروی ژنی (selective sweep) عمل کرده و آلل‌های غیرمشابه موجود در نواحی مجاور ژنی را حذف یا سرکوب کند و نوعی انتخاب جهت‌دار را در گیاهان رقم بزند (Dean *et al*., 1999; Robertson, 1961). چنین انتخابی در نسل‌های بعدی می‌تواند منجر به کاهش تنوعات وراثتی شده و نوعی پایداری ژنتیکی را در گیاه ایجاد کند. چنین استنباط می‌شود که کاهش تنوع وراثتی در نسل‌های هفتم به بعد می‌تواند ناشی از تأثیر چنین فرایندی در جهت کاهش تنوعات وراثتی و ایجاد لاین‌های خالص و پایدار باشد. به نظر می‌رسد چنین مکانیسم‌هایی می‌تواند در ایجاد دورگ‌های پایدار و مقاوم نسبت به تغییر شرایط محیطی کمک کند. همان‌طور که انتخاب و اهلی‌سازی در نسل‌های متوالی سورگوم زراعی در ایران منجر به ایجاد نوعی پایداری و ثبات ژنتیکی در نسل‌های هشتم و نهم (با بیشترین شباهت ژنتیکی و کمترین میزان هتروزیگوسیتی در هر نسل) شده و نهایتاً موجب معرفی رقم خالص پگاه (نسل نهم حاصل از اهلی‌سازی) در ایران شده است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین استنباط کرد که انتخاب و اهلی‌سازی در نسل‌های مختلف یک دورگ به صورت جهت‌دار (در جهت صفت مورد نظر) عمل کرده و به‌طور چشمگیری تنوع آللی را، هم در ژن هدف و هم در مکان‌های خنثی ژنومی، کاهش می‌دهد. به عبارت دیگر، انتخاب پس از انتخاب به شکل یک جاروی ژنومی انتخابی

روی ژرم‌پلاسم‌ها عمل کرده و منجر به لاین های خاص ژنتیکی می شود. بر این اساس و با توجه به اینکه هدف از ایجاد دورگ بین افراد لاین‌های خالص وارداتی سورگوم در این مطالعه، حفظ صفات مطلوب آن‌ها از جمله تعداد ساقه‌های متعدد از محل رویش، تعداد برگ بیشتر و... و از طرفی اضافه کردن صفات جدید مانند تطابق با آب و هوای کشور و نیاز آبی کمتر بوده است، شباهت ژنتیکی نسل‌های هفتم به بعد، با نسل‌های اولیه، بیانگر موفقیت محققان آن مرکز در ایجاد لاینی خالص همراه با اضافه کردن صفت مورد نظر به آن بوده است. در نهایت با توجه به این نکته که نشانگر مورد استفاده در این بررسی میزان و نحوه تفاوت‌پذیری تنوع ژرم‌پلاسمی در نسل‌های مختلف یک لاین زراعی را به‌خوبی اندازه‌گیری کرده است، می‌توان آن را نشانگری ارزان، سریع و در دسترس جهت انجام بررسی‌های مرتبط با تنوع ژرم‌پلاسمی گیاهان زراعی دانست.

رقم پگاه با دارا بودن بیوماس بالا و صفات مطلوب به‌عنوان یک رقم خالص تجاری در ایران به ثبت رسیده است و به صورت گسترده توسط کشاورزان کشت می‌شود. از آنجا که یکی از عوامل تأثیرگذار در موفقیت ارقام اصلاح شده، کنترل و به حداقل رساندن جریان و تبادلات ژنی رقم اصلاحی با سایر ارقام و گونه‌های خودرو خویشاوند آن است، محدودیت کاشت نسل‌های بعدی رقم پگاه حائز اهمیت است. در واقع با توجه به وقوع جریان ژنی در سورگوم زراعی و ایجاد ناخالصی در لاین‌های خالص تلاش جهت حفظ خلوص و یکنواختی بذرهای اصلاحی توصیه می‌شود. بر این اساس، به نظر می‌رسد استفاده از رقم پگاه تا نسل سوم پاسخگوی نیاز استفاده کنندگان می‌باشد. با این حال استفاده از بذرهای مادر و عدم کشت زاده‌ها بیش از سه نسل متوالی جهت حفظ ویژگی‌های مطلوب توصیه می‌شود. در نهایت، بررسی‌های بیشتر با استفاده از افراد و نسل‌های بیشتر، به کارگیری صفات با وراثت پذیری بالاتر و نشانگرهای اختصاصی جهت مطالعه ارقام اصلاحی سورگوم زراعی در کشور پیشنهاد می‌شود. افراد نسل پنجم سورگوم زراعی موجود در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی نیز با تنوع وراثتی بالا، به‌عنوان نسلی مهم جهت جستجو برای آلل‌های مناسب و حفظ و ارتقای تنوع وراثتی سورگوم زراعی در ایران معرفی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از جناب آقای دکتر علیرضا بهشتی عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی که با فراهم نمودن نمونه‌های بذر سورگوم زراعی در انجام این تحقیق با ما همکاری کردند، قدردانی کرده و از دانشگاه اصفهان بابت فراهم نمودن امکانات انجام پروژه و حمایت مالی پروژه سپاسگزار هستند.

References

APG (Angiosperm Phylogeny Group). 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society, 141, 4, 399-436. https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x

Benson, C., & Rao, C. S.1906. The Great Millet or Sorghum of Madras. Government Press.

Borghi, E., Crusciol, C. A. C., Nascente, A. S., Sousa, V. V., Martins, P. O., Mateus, G. P., & Costa, C. 2013. Sorghum grain yield, forage biomass production and revenue as affected by intercropping time. European Journal of Agronomy, 51, 130-139. https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.08.006

Burkill, I. H. 1937. The races of *Sorghum*. Bulletin of Miscellaneous Information, Royal Botanic Gardens, Kew, 2, 112-119.

Dean, R. E., Dahlberg, J. A., Hopkins, M. S., Mitchell, S. E., & Kresovich, S. 1999. Genetic redundancy and diversity among 'Orange' accessions in the U.S. national sorghum collection as assessed with simple sequence repeat (SSR) markers. Crop Science, 39 (4), 1215-1221. https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900040043x

De Wet, J. M. J., & Harlan, J. R. 1971. The origin and domestication of *Sorghum bicolor*. Economic Botany, 25 (2), 128-135. https://doi.org/10.1007/BF02860074

FAO. 1991. *Sorghum* and millets in human nutrition. Retrieved in, http://faostat.fao.org/docrep/t0818e/T0818E03.htm, accessed 2013.

Fedoroff, N.V. 1991. Maize transposable elements. Perspectives in Biology and Medicine, 35 (1), 2-19. https://doi.org/10.1353/pbm.1991.0065

Feschotte, C. 2008. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. Nature Reviews Genetics, 9 (5), 397-405. https://doi.org/10.1038/nrg2337

Gautam, S., Mishra, U., Scown, C. D., & Zhang, Y. 2020. Sorghum biomass production in the continental United States and its potential impacts on soil organic carbon and nitrous oxide emissions. GCB Bioenergy: Bioproducts for a Sustainable Bioeconomy, 12 (10), 878-890. https://doi.org/10.1111/gcbb.12736

Gawel, N. J., & Jarret, R.L. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. Plant Molecular Biology Reporter, 9 (3), 262-266. https://doi.org/10.1007/BF02672076

Ghahramani, S., & Darvishzadeh, R. 2021. Estimating breeding value of agro-biological traits in maize using IRAP and REMAP markers. Crop Biotechnology, 11 (36), 33-48. https://doi.org/10.30473/CB.2022.62429.1865

Jaccard, P. 1908. Nouvelles Recherches sur la Distribution Florale. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles, 44. 223-270.

Jankowski, K. J., Sokólski, M. M., Dubis, B., Załuski, D., & Szempliński, W. 2020. Sweet Sorghum-Biomass production and energy balance at different levels of agricultural inputs. A six-year field experiment in north-eastern Poland. European Journal of Agronomy, 119, 126119. https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126119

Karimi, A., & Saeidi, H. 2016. Genetic diversity of *Sorghum halepense* (L.) Pers. in Iran as revealed by IRAP markers. Plant Genetic Resources, 14 (2), 132-141. https://doi.org/10.1017/S1479262115000167

Kimber, C. T. 2000. Origins of domesticated *Sorghum* and its early diffusion to India and China. Sorghum: Origin, history, technology, and production, 3-98.

Lin, Z., Hayes, B. J., & Daetwyler, H. D. 2014. Genomic selection in crops, trees and forages: a review. Crop and Pasture Science, 65 (11), 1177-1191. https://doi.org/10.1071/CP13363

Liu, K., & Muse, S. V. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics, 21 (9), 2128-2129. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti282

Maqbool, S. B., Devi, P., & Sticklen, M. B. 2001. Biotechnology: Genetic improvement of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37 (5), 504-515. https://doi.org/10.1007/s11627-001-0089-8

Martiwi, I. N. A., Nugroho, L. H., Daryono, B. S., & Susandarini, R., 2020. Genotypic variability and relationships of *Sorghum bicolor* accessions from Java Island, Indonesia based on IRAP markers. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 21 (12). https://doi.org/10.13057/biodiv/d211220

Muraya, M. M., Geiger, H. H., Sagnard, F., Toure, L., Traore, P., Togola, S., de Villiers, S., & Parzies, H. K. 2012. Adaptive values of wild× cultivated sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) hybrids in generations F_1, F_2, and F_3. Genetic Resources and Crop Evolution, 59 (1), 83-93. https://doi.org/10.1007/s10722-011-9670-0

Nei, M., & Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76 (10), 5269-5273. https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269

Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6 (1), 288-295. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x

Robertson, A. 1961. Inbreeding in artificial selection programmes. Genetics Research, 2 (2), 189-194. https://doi.org/10.1017/S0016672300000690

Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1., New York, Exeter Software.

Wasson, A. P., Richards, R. A., Chatrath, R., Misra, S. C., Prasad, S. S., Rebetzke, G. J., Kirkegaard, J. A., Christopher, J., & Watt, M. 2012. Traits and selection strategies to improve root systems and water uptake in water-limited wheat crops. Journal of Experimental Botany, 63 (9), 3485-3498. https://doi.org/10.1093/jxb/ers111