

مطالعه‌ی شاخص‌های تحمل به خشکی و ارتباط آن‌ها با نشانگرهای ISSR در برخی ارقام کلزا (*Brassica napus* L.)

سارا مطلبی‌نیا^۱، امید سفالیان^{۲*}، علی اصغری^۲، علی رسول‌زاده^۳ و بهرام فتحی^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۲- دانشیار، گروه اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۳- دانشیار، گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۴- دانشیار، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۲۲)

چکیده

در تحقیق حاضر، به منظور ارزیابی شاخص‌های تحمل به خشکی در ارقام کلزا و ارتباط آن‌ها با نشانگرهای ISSR، ۱۲ ژنوتیپ با استفاده از آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ سطح آبیاری (شاهد و آبیاری بعد از تخلیه ۶۰ و ۸۵ درصد رطوبت) در گلخانه‌ی دانشگاه محقق اردبیلی مورد بررسی قرار گرفتند. ارزیابی ژنوتیپ‌ها از نظر تحمل به خشکی توسط شاخص‌های کمی شامل میانگین حساسی (MP)، میانگین هندسی (GMP)، حساسیت به تنش (SSI)، تحمل به تنش (STI) و شاخص تحمل (TOL) صورت گرفت. تجزیه واریانس در هر پنج شاخص محاسبه شده مورد بررسی بر اساس طرح کاملاً تصادفی در دو سطح تنش، بین ارقام اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. با توجه به نتایج مقایسه میانگین در هر دو سطح تنش، رقم SLMO46 با داشتن بیشترین مقدار شاخص‌های MP و STI و میزان پایین TOL به عنوان مقاوم‌ترین و رقم کارون با داشتن بیشترین مقدار شاخص SSI، حساس‌ترین رقم شناخته شد. با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه به عامل‌ها نیز در سطح اول ژنوتیپ ساری گل ۳۲ و تا حدودی ژنوتیپ کارون و در سطح دوم رقم طلایه و تا حدودی رقم ساری گل ۳۲ به عنوان ژنوتیپ‌های حساس و در هر دو سطح ژنوتیپ SLMO46 مقاوم به تنش شناخته شدند. همبستگی فنوتیپی عملکرد دانه در شرایط تنش و بدون تنش خشکی در دو سطح با ۵ شاخص بررسی گردید. در شرایط تنش اول عملکرد دانه با شاخص‌های بهره‌وری متوسط، میانگین هندسی بهره‌وری و شاخص تحمل تنش همبستگی مثبت و معنی‌دار نشان داد. در شرایط تنش دوم نیز شرایط مانند تنش اول بود با این تفاوت که همبستگی معنی‌داری بین شاخص‌های تحمل و تحمل خشکی به دست نیامد. تجزیه همبستگی کانونیک در رابطه با شاخص‌های خشکی و نشانگرهای مولکولی در پنج نشانگر (۵، ۹، ۱۱، ۱۴ و ۱۹) که دارای بیشترین درصد چندشکلی بودند با استفاده از ضرایب تابع اول انجام شد. از تکنیک ISSR-PCR برای شناسایی برخی از نشانگرهای مولکولی مرتبط با شاخص‌های تحمل خشکی استفاده شد. در مجموع از ۱۸ آغازگر ISSR استفاده گردید که ۱۰۶ نوار واضح و قابل امتیازدهی تولید کردند و از این میان ۶۰ نوار (۵۳/۱۶۸ درصد) چندشکل بودند. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده، از نشانگرهای مذکور می‌توان در برنامه‌های پرورش کلزا در جهت تحمل خشک‌سالی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: تنش خشکی، شاخص تحمل خشکی، کلزا، نشانگرهای ISSR

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: sofalian@uma.ac.ir

مقدمه

پیش از نیمه‌ی اول قرن بیستم در زمینه‌ی کشاورزی، سازگاری محیطی بزرگ‌ترین دغدغه‌ی کشاورزان به حساب می‌آمد که این امر منجر به عدم توجه به پیشرفت گونه‌های گیاهی توأم با پیشرفت در زمینه‌ی مقاومت یا تحمل تنش‌های زیستی و غیرزیستی گردید. پس از چندین دهه مداخله‌ی انسان، کشاورزی از یک فعالیت کم اثر به یک تهدید برای حفظ محیط تبدیل شده است. طبیعت پایدار گیاهان آن‌ها را به‌طور مداوم در معرض انواع گوناگونی از شرایط محیطی قرار می‌دهد که اغلب این شرایط نیز تنش‌زا و غیرمطلوب هستند (Boyer, 1982). تنش یا استرس واژه‌ای است که اولین بار توسط دانشمندان علوم بیولوژیک بکار برده شد. تنش دارای توان آسیب‌زایی است که در نتیجه‌ی یک متابولیسم و فعل و انفعال غیرعادی اتفاق می‌افتد و اثر آن به صورت‌های مختلف در گیاه نمود می‌یابد (Moaveni and Changizi, 2007). هرچند تنش‌های زنده و غیرزنده بیشترین عامل کاهش تولید هستند؛ تنش خشکی مهم‌ترین عامل محدود کننده تولید محصولات کشاورزی در سیستم‌های کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک است (Molasadeghi and Shahryari, 2011). دانه‌های روغنی پس از غلات دومین گروه ذخایر غذایی جهان به شمار می‌روند که علاوه بر دارا بودن ذخایر غنی از اسیدهای چرب، حاوی پروتئین هم هستند. کلزا پس از سویا و نخل روغنی سومین منبع تولید روغن نباتی جهان است (Thiyam-Holländer et al., 2012). کلزا (*Brassica napus* L.) دارای سازگاری بالا در شرایط مختلف محیطی به‌خصوص تحت تنش خشکی، شوری و درجه حرارت است (Yadava and Singh, 2004). کاهش عملکرد، نگرانی اصلی تولیدکنندگان است و از این‌رو بر عملکرد در شرایط تنش تأکید می‌شود. شاخص‌های تحمل خشکی میزان خشک‌سالی را بر اساس کاهش عملکرد در شرایط تحت تنش نسبت به شرایط طبیعی فراهم می‌کند، به‌همین دلیل برای غربالگری ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی استفاده

می‌شوند (Mitra, 2001). روزلی و هامبلین (Rosille and Hambilin, 1981) تحمل تنش (TOL) را به‌عنوان معیاری برای تفاوت در عملکرد بین شرایط تنش و عدم تنش و میانگین بهره‌وری (MP) را به‌عنوان عملکرد متوسط ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش و بدون تنش تعیین کردند. متوسط بهره‌وری هندسی (GMP) اغلب توسط پرورش‌دهندگان علاقه‌مند به عملکرد نسبی استفاده می‌شود، زیرا تنش خشکی در طول سال‌ها می‌تواند در محیط‌های مختلف شدت متفاوتی داشته باشد (Fernandez, 1992). فیشر و مورر شاخص حساسیت تنش (SSI) را برای اندازه‌گیری ثبات عملکرد پیشنهاد کردند که تغییرات در عملکرد بالقوه و حقیقی را در محیط‌های مختلف نشان می‌دهد (Fischer and Maurer, 1978). شاخص تحمل به استرس (STI) نیز به‌عنوان یک ابزار مفید برای تعیین پتانسیل تحمل به تنش و پایداری ژنوتیپ‌ها (Fernandez, 1992) تعریف شد. زبرجدی و همکاران بر پایه تجزیه و تحلیل همبستگی در ژنوتیپ‌های کلزا، ارتباط قوی میان Y_p ، Y_s ، STI، MP و GMP را گزارش کردند (Zebarjadi et al., 2011). با توجه به نتایج تجزیه به عامل‌ها، یارنیا و همکاران در برخی ارقام کلزا زمستانه نشان دادند که STI و GMP دو شاخص برتر برای شناسایی ارقام مقاوم در برابر خشک‌سالی هستند (Yarnia et al., 2011). مشاهده شده است که در کلزا، STI به دلیل بالاترین همبستگی با عملکرد دانه در شرایط تنش و عدم تنش مناسب‌ترین شاخص برای ارزیابی تحمل به تنش خشکی است (Shirani rad, 2012). آگاهی از تنوع ژنتیکی برای تولید ارقام جدید کلزا (*Brassica napus* L.) بسیار مهم است و استفاده از نشانگر ISSR به دلیل مزایای بسیار آن در این مسیر بسیار متداول می‌باشد (Havlíčková et al., 2014; Amiri et al., 2017; Ramezani and Rahimi, 2017). این مطالعه جهت بررسی شاخص‌های تحمل خشکی، در کنار دستیابی به نشانگرهای مولکولی خاص مرتبط با این شاخص‌ها، با استفاده از ISSR-PCR در ژنوتیپ‌های کلزا

تحت تنش خشکی برای تسهیل ارزیابی ارقام مقاوم صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مکان و مواد گیاهی: پژوهش حاضر در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی در دمای ۱۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. هر تکرار، یک گلدان (۱۲ کیلویی) با ۶ گیاهچه کلزا در نظر گرفته شد. در این آزمایش دوازده رقم کلزا از مواد ژنتیکی موجود در بانک ژن گیاهی ایران از نظر تحمل تنش کم‌آبی مورد بررسی قرار گرفتند. سطوح مختلف آبیاری شامل آبیاری کامل (نگهداری رطوبت در حد ظرفیت مزرعه) به‌عنوان شاهد و آبیاری بعد از تخلیه ۶۰ و ۸۵ درصد رطوبت قابل نگهداری در خاک به‌عنوان دو سطح تنش در نظر گرفته شدند. جهت تعیین سطوح تنش برای گیاه کلزا از نشریه ۵۶ فائو (Allen et al., 1998) استفاده گردید.

در سطح شاهد، آبیاری بر اساس نیاز گیاه از کاشت تا زمان برداشت صورت گرفت. برای دو سطح تنش نیز بعد از تخلیه ۶۰ و ۸۵ درصد رطوبت قابل نگهداری در خاک، کمبود آب تا نقطه ظرفیت زراعی، با توجه به عمق ریشه

در هر مرحله از رشد گیاه جبران گردید. اندازه‌گیری رطوبت گلدان‌ها در سطوح تنش با استفاده از دستگاه رطوبت‌سنج خاک (Moisture Probe Meter مدل MPM-160-B (12-bit Resolution) AUSTRALIA صورت گرفت. دستگاه پیش از استفاده کالیبره گردید. اعمال تنش پس از استقرار کامل گیاه (۵-۴ برگچه‌ای) صورت گرفت و تا زمان برداشت محصول ادامه یافت. اندازه‌گیری شاخص‌های کمی خشکی با استفاده از عملکرد دانه گیاهان در شرایط تنش و بدون تنش خشکی برای هر ژنوتیپ محاسبه شد. استفاده از شاخص‌های خشکی در جهت بررسی گیاهان تحت تنش با استفاده از آزمایش‌های گلدانی مشابه در کلزا (Naderi and Emam, 2014)، گندم دوروم (Ahmadizadeh et al., 2012) و پسته (Esmaeilpour et al., 2015) انجام گرفته است. تمامی شاخص‌ها در شرایط تنش در قالب دو سطح متوسط (۶۰ درصد) و شدید (۸۵ درصد) تنش محاسبه شدند که به ترتیب با اعداد ۱ و ۲ مشخص شده‌اند. تجزیه واریانس شاخص‌های محاسبه شده در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

جدول ۱- اسامی، منشأ و تیپ رشدی ژنوتیپ‌های کلزا

Table 1. Name, origin and growth types of oilseed rape genotypes

نام ژنوتیپ Genotype	ردیف Number	منشأ (Origin)	نوع ژنوتیپ (Type of genotype)
Karaj1	1	ایران (Iran)	لاین خالص (Pure line)
Karaj2	2	ایران (Iran)	لاین خالص (Pure line)
Tassillo	3	آلمان (Germany)	رقم هیبرید (Hybrid cultivar)
Zarfam	4	ایران (Iran)	رقم گرده‌افشان (Pollinator cultivar)
Talaye	5	آلمان (Germany)	رقم گرده‌افشان (Pollinator cultivar)
Cooper	6	آلمان (Germany)	رقم هیبرید (Hybrid cultivar)
Adriana	7	آلمان (Germany)	رقم هیبرید (Hybrid cultivar)
Karun	8	آلمان (Germany)	رقم هیبرید (Hybrid cultivar)
Sarigol32	9	آلمان (Germany)	رقم گرده‌افشان (Pollinator cultivar)
Licord	10	آلمان (Germany)	رقم گرده‌افشان (Pollinator cultivar)
Hyola401	11	استرالیا (Australia)	رقم هیبرید (Hybrid cultivar)
SLMO46	12	آلمان (Germany)	رقم گرده‌افشان (Pollinator cultivar)

جدول ۲- مشخصات فیزیکی خاک گلدان‌ها

Table 2. Physical properties of the soil

بافت خاک Soil texture	درصد شن Sand percentage	درصد سیلت Salt percentage	درصد رس Clay percentage	جرم مخصوص ظاهری (ρ_b)	رطوبت در نقطه ظرفیت زراعی FC (g.g^{-1})	رطوبت در نقطه پژمردگی PWP (g.g^{-1})
لومی شنی Sandy-loamy	58.16	26	15.84	1.22	28.17	13.47

شاخص حساسیت به تنش (SSI) به شرح زیر محاسبه گردید:

$$\text{رابطه (۱)} \quad \text{SSI} = [1 - (Y_s/Y_p)] / \text{SI}$$

$$\text{رابطه (۲)} \quad \text{SI} = 1 - (\bar{Y}_s / \bar{Y}_p)$$

در این فرمول Y_p , $\bar{Y}_s$, $\bar{Y}_p$ و SI به ترتیب عملکرد هر ژنوتیپ تحت شرایط تنش، بدون تنش، میانگین عملکرد ژنوتیپ‌ها تحت شرایط تنش، بدون تنش و شدت تنش را نشان می‌دهند. شاخص تحمل و هم‌چنین متوسط محصول‌دهی یک ژنوتیپ در هر دو شرایط تنش و غیر تنش بر اساس روابط زیر محاسبه شدند (Rosille and Hambilin, 1981).

$$\text{رابطه (۳)} \quad \text{TOL} = Y_p - Y_s$$

$$\text{رابطه (۴)} \quad \text{MP} = (Y_p + Y_s) / 2$$

شاخص میانگین هندسی (GMP) و شاخص تحمل به تنش (STI) به شرح زیر محاسبه شدند (Fernandez, 1992).

$$\text{رابطه (۵)} \quad \text{GMP} = \sqrt{(Y_p \cdot Y_s)}$$

$$\text{رابطه (۶)} \quad \text{STI} = [(Y_p \times (Y_s / (Y_p)^2)]$$

برای محاسبات آماری، نرم‌افزارهای SAS و SPSS v.19 مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی مولکولی: پس از نمونه‌برداری از برگ‌های جوان گیاه و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، استخراج DNA به روش CTAB با اندکی تغییرات انجام شد (Saghai-Maroo et al., 1984). جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA از دو روش استفاده گردید. جهت اطمینان از عدم وجود شکستگی در DNA استخراج شده، از الکتروفورز

ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. نمونه‌های دارای کیفیت بالا، انتخاب شدند. در روشی دیگر از اسپکتروفتومتری جهت تعیین کیفیت خلوص DNAهای استخراج شده استفاده شد. PCR با استفاده از ISSR روشی است که مشکلاتی از قبیل هزینه‌ی بالای AFLP، تکرارپذیری پایین RAPD و توالی‌های جانبی را برای ساخت آغازگرهای اختصاصی هر گونه برای چندشکلی SSR را برطرف می‌کند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در تجزیه ISSR که ساخت شرکت Metabion کره بودند، در جدول ۴ آمده است. توالی‌های مذکور با بررسی پژوهش‌های مشابه انجام شده در جنس Brassica از منابع معتبر انتخاب شدند (Safari et al., 2013; Tamura et al., 2009; Huangfu et al., 2005). واکنش PCR برای آغازگرهای ISSR طبق برنامه زیر توسط دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت TECHNE اجرا گردید. چرخه‌های حرارت واکنش PCR به‌صورت زیر بود: در مرحله اول، واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مرحله دوم شامل ۴۰ چرخه (الف: واسرشته‌سازی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد. ب: اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو به مدت ۱ دقیقه در دمای مناسب برای هر آغازگر (دمای اتصال برای هر آغازگر تعیین گردید). ج: بسط رشته DNA توسط پلیمراز به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در نهایت مرحله سوم، بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. برای آشکارسازی فرآورده‌های PCR حاصل از تجزیه ISSR، از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. هر قطعه DNA تولید شده به‌عنوان یک متغیر گسسته، با استفاده از ۱ برای نشان دادن حضور و ۰ برای

در جدول (۵) آمده است. در هر پنج شاخص مورد بررسی در دو سطح بین ارقام اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. این اختلاف نشان دهنده‌ی عکس‌العمل متفاوت ارقام نسبت به تنش رطوبتی و وجود تنوع ژنتیکی بین ارقام کلزا از این نظر می‌باشد.

عدم وجود باند در هر نمونه امتیازدهی شد. تحلیل و آنالیز داده‌های مولکولی با استفاده از نرم‌افزارهای NTSYSpc2، Popgen 1.32 و GenAlex 6.3 انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس شاخص‌های مقاومت به خشکی

جدول ۳- اجزای واکنش PCR برای تکثیر نمونه‌های DNA با استفاده از آغازگرهای ISSR

Table 3. PCR reaction components for DNA replication using ISSR primers

محلول‌های پایه Base solutions	حجم در یک واکنش (میکرولیتر) Volume in one reaction (μl)
آغازگر (۵ میکرومول) Primer (5μm)	1.6
DNA (۲۵ نانوگرم در میکرولیتر) DNA (25 ng / μl)	4
آب خالص Pure water	4.4
مستر میکس Master mix	10
حجم نهایی Final volume	20

جدول ۴- توالی و دمای اتصال آغازگرهای ISSR مورد استفاده

Table 4. Sequence and annealing temperature of ISSR primers

ردیف No.	توالی پرایمر Sequence of primers (5'-3')	دمای اتصال Annealing temperature (°C)	ردیف No.	توالی پرایمر Sequence of primers (5'-3')	دمای اتصال Annealing temperature (°C)
1	GAGAGAGAGAGAGAG	42	13*	AGAGAGAGAGAGAGAGT	43
2*	ACACACACACACACCA	45	14*	CTCTCTCTCTCTCTA	42
3*	AGAGAGAGAGAGAGAGAA	45	15	CACACACACACACACAT	43
4*	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	45	16*	TCTCTCTCTCTCTCTCC	42
5*	AGAGAGAGAGAGAGAGC	42	17*	ACACACACACACACACT	43
6*	AGAGAGAGAGAGAGAGG	42	18*	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	43
7*	GAGAGAGAGAGAGAGAA	42	19*	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	43
8*	AGAGAGAGAGAGAGACT	42	20*	GAGAGAGAGAGAGAGACC	43
9*	AGAGAGAGAGAGAGACTA	43	21*	CACACACACACACACAAC	44
10	GAGAGAGAGAGAGAGATT	43	22	CTCCTCCTCCTCCTCTC	46
11*	TGTGTGTGTGTGTGTGGG	46	23*	GGAGAGGAGAGGAGA	42
12	TCCTCCTCCTCCTCC	42			

*: آغازگرهایی که تولید نوارهای چند شکل کردند در تجزیه مورد استفاده قرار گرفتند.

*: Primers that produce polymorphic bands were used in the analysis.

جدول ۵- تجزیه واریانس شاخص‌های مقاومت به تنش خشکی در ارقام کلزا

Table 5. Analysis of variance for indices of drought stress in canola cultivars

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات Mean Squares									
		STI2	STI1	GMP2	GMP1	MP2	MP1	TOL2	TOL1	SSI2	SSI1
ژنوتیپ (Genotype)	11	3.33**	4.20**	86.09**	100.17**	93.94**	105.65**	55.96**	32.97**	0.621**	0.724**
خطا (Error)	24	0.006	0.008	0.208	0.090	0.180	0.097	0.356	0.374	0.063	0.104
ضریب تغییرات (CV %)		9.51	8.93	6.04	3.56	5.31	3.63	13.97	20.16	27.37	36.18

*: به دلیل غیرمعنی‌دار بودن منبع تکرار، تجزیه بر اساس طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

*: Due to non-significance of replication source, the analysis performed by completely randomized design.

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

** : Significant at 1% probability level

همواره هدف از تهیه ارقام متحمل به خشکی، معرفی ارقامی بوده که به‌طور نسبی در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها تنش را بهتر تحمل کرده و در شرایط یکسان افت عملکرد کمتری داشته باشند (Srivastava, 1987). شاخص‌های متفاوتی برای ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها در شرایط محیطی مختلف و تعیین تحمل و حساسیت آن‌ها ارائه شده است. مقدار بالای TOL نشانه‌ی حساسیت ژنوتیپ به تنش است، بنابراین انتخاب ژنوتیپ‌ها بر اساس مقادیر کم TOL صورت می‌گیرد. ژنوتیپ‌های پایدارتر دارای مقادیر بالاتر STI هستند.

مقایسه میانگین شاخص‌های تحمل خشکی در سطح احتمال ۵ درصد به روش چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. با توجه به نتایج در سطح اول تنش (۶۰ درصد تخلیه‌ی مجاز) رقم SLMO46 با داشتن بیشترین مقدار شاخص‌های MP و STI و کمترین میزان TOL به‌عنوان مقاوم‌ترین رقم و ارقام کارون و ساری‌گل ۳۲ با داشتن بیشترین مقدار شاخص SSI، حساس‌ترین ارقام شناخته شدند. در سطح دوم تنش نیز رقم SLMO46 با داشتن بیشترین مقدار شاخص‌های MP و STI و میزان پایین TOL به‌عنوان مقاوم‌ترین رقم و ارقام ساری‌گل ۳۲، طلایه، آدریانا و کارون با داشتن بیشترین مقدار شاخص SSI، حساس‌ترین ارقام شناخته شدند.

درک روابط داخلی صفات و تعیین عامل‌های توجیه‌کننده خصوصیات مورد بررسی برای پیشبرد هر پروژه اصلاحی امری اجتناب‌ناپذیر است. تکنیک تجزیه به عامل‌ها برای درک عمیق ساختار داده‌های چند متغیره مفید می‌باشد. تجزیه به عامل‌ها در دو سطح تنش به‌طور جداگانه انجام شد. جهت به حداقل رساندن تعداد متغیرهایی که بالاترین ضریب را روی یک عامل دارند و نیز بهبود قابلیت تفسیر عامل‌ها از روش واریماکس برای چرخش عاملی ارتوگونال استفاده شد. با توجه به اینکه دو عامل بیش از ۹۷ درصد واریانس را توجیه کردند، از این دو عامل برای تفسیر نتایج استفاده شد. با توجه به ضریب عامل‌ها در ماتریس چرخشی به روش واریماکس (جدول ۶) شاخص‌های Y_s ، MP، GMP و STI در عامل اول و

شاخص‌های SSI و TOL در عامل دوم بیشترین ضریب را داشتند. در نتیجه با توجه به دو عامل مورد بررسی برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از دو مؤلفه‌ی اول استفاده شد. مقدار کفایت نمونه‌گیری یا ضریب KMO (۰/۸۳۵) و نیز معنی‌داری آزمون کروی بودن بارتلت بیانگر کافی بودن مقادیر همبستگی متغیرهای اولیه برای انجام تجزیه به عامل‌ها بود. در این سطح اولین مؤلفه ۷۴/۲۸ درصد از تغییرات کل داده‌ها را بیان نمود و همبستگی مثبت و بالایی با تمامی شاخص‌ها به‌جز SSI داشت. از این بابت به نام مؤلفه‌ی پتانسیل و پایداری عملکرد و تحمل به خشکی نام‌گذاری گردید. با توجه به این‌که میزان بالای این شاخص‌ها مطلوب است، بنابراین روی بای‌پلات حاصله با توجه به مقادیر مثبت و بالای این مؤلفه می‌توان ژنوتیپ‌هایی را که دارای عملکرد بالا در شرایط تنش و شاخص‌های STI، GMP و MP بالا هستند، انتخاب کرد. دومین مؤلفه ۲۳/۲۴ درصد از کل تغییرات داده‌ها را بیان نمود و همبستگی منفی بالا با عملکرد در شرایط تنش و همبستگی مثبت بالا با شاخص‌های حساسیت و STI داشت. از این‌رو به نام مؤلفه‌ی حساسیت به تنش خشکی و پایداری عملکرد نام‌گذاری گردید. این مؤلفه می‌تواند ژنوتیپ‌های با پایداری عملکرد پایین و پتانسیل عملکرد متوسط را انتخاب کند و از آنجاکه مقادیر کم شاخص‌های حساسیت مطلوب است پس اگر در بای‌پلات نواحی با میزان پایین این مؤلفه در نظر گرفته شود، می‌توان ژنوتیپ‌های با Y_s بالا و شاخص‌های حساسیت پایین را انتخاب کرد. به‌طوری‌که ژنوتیپ‌هایی در درون گروه‌های مشخص قرار گرفتند (شکل ۱) که ارتباط آن‌ها با عملکردهای تنش و شاخص‌های مورد بحث به‌خوبی مشهود است. همان‌گونه که در (شکل ۱) ملاحظه می‌گردد ژنوتیپ‌های SLMO46، ساری‌گل ۳۲ و تا حدودی ژنوتیپ طلایه در ناحیه‌ی پتانسیل و پایداری عملکرد و تحمل به خشکی در مجاورت شاخص‌های تحمل به خشکی و ژنوتیپ کارون در نزدیکی ناحیه حساسیت به تنش خشکی و عملکرد پایین در مجاورت شاخص حساسیت قرار گرفته و این عکس‌العمل‌های متفاوت

نشانگر تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها نسبت به شرایط خشکی است.

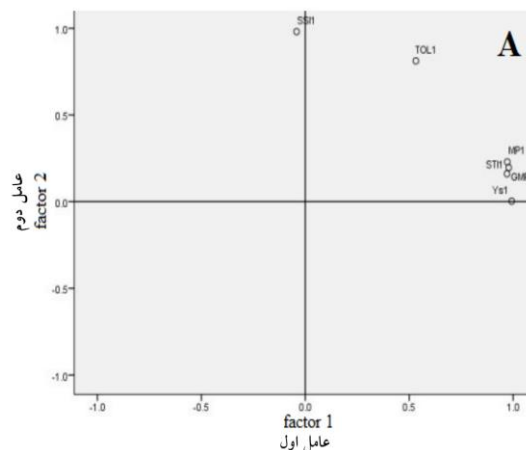
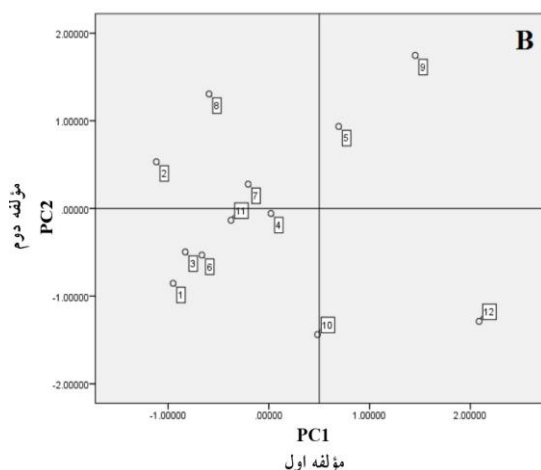
در تنش دوم نیز پس از انجام تجزیه به مؤلفه‌های اصلی روی پنج شاخص و صفت عملکرد در شرایط تنش در ۱۴ ژنوتیپ‌های مورد بررسی ملاحظه می‌گردد (جدول ۷) دو مؤلفه اول با داشتن مقادیر ویژه بزرگ‌تر از یک در مجموع ۹۸/۳۱۴ درصد از تغییرات کل داده‌ها را بیان نمودند. لذا

ترسیم دو بعدی بر اساس دو مؤلفه اول انجام شد. در این سطح اولین مؤلفه ۷۰/۳۳۲ درصد از تغییرات کل داده‌ها را بیان نمود و با تمامی شاخص‌ها به جز SSI هم‌بستگی مثبت داشت و دومین مؤلفه ۲۷/۹۸ درصد از تغییرات کل داده‌ها را بیان کرد. در این سطح رقم طلایه به‌عنوان ژنوتیپ حساس، SLMO46 و تا حدودی رقم ساری‌گل ۳۲ به‌عنوان مقاوم شناخته شدند.

جدول ۶- مقادیر ویژه، سهم تجمعی و بردارهای ویژه شاخص‌های مقاومت به خشکی و عملکرد کلزا پس از چرخش عامل‌ها به روش واریماکس در تنش اول

Table 6. Eigenvalues, cumulative percentage and specific vectors of drought resistance indices and canola yield after turning agents by Varimax in first level of stress

after turning agents by "Parmax" in first level of stress								
مؤلفه	مقادیر	سهم	حساسیت به عملکرد تحت		تحمل	میانگین	میانگین	تحمل
Component	ویژه	تجمعی (%)	تنش	تنش	TOL	حسابی	هندسی	به تنش
	Eigenvalues	Cumulative %	Y _s	SSI		MP	GMP	STI
1	4.457	74.28	0.993	-0.042	0.532	0.972	0.978	0.970
2	1.396	97.52	0.003	0.981	0.813	0.230	0.197	0.161



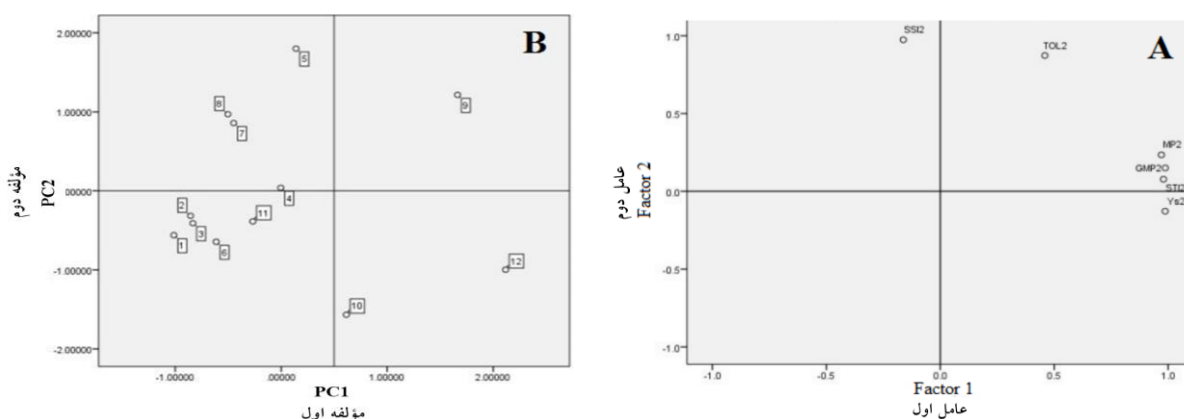
شکل ۱- نمودارهای دوبعدی پراکنش شاخص‌های خشکی (A) بر اساس عامل‌های اصلی و ارقام کلزا (B) بر اساس مؤلفه‌های اصلی در تنش اول (۱: کرچ ۱؛ ۲: کرچ ۲؛ ۳: تاسیلو؛ ۴: زرفام؛ ۵: طلایه؛ ۶: کوپر؛ ۷: آدریانا؛ ۸: کارون؛ ۹: ساری‌گل ۳۲؛ ۱۰: لیکورد؛ ۱۱: هایولا ۴۰۱؛ ۱۲: SLMO46)

Figure 1. Two-dimensional graphs of the distribution of drought indices (A) and cultivars (B) based on the main factors and main components in the first level of stress (1: Karaj1; 2: Karaj2; 3: Tossillo; 4: Zarfam; 5: Talaye; 6: Cooper; 7: Adriana; 8: Karun; 9: Sarigol32; 10: Licord; 11: Hyola401; 12: SLMO46)

جدول ۷- مقادیر ویژه، سهم تجمعی و بردارهای ویژه شاخص‌های مقاومت به خشکی و عملکرد کلزا پس از چرخش عامل‌ها به روش واریماکس در تنش دوم

Table 7. Eigenvalues, cumulative percentage and specific vectors of Drought resistance indices and canola yield after turning agents by Varimax in second level of stress

مؤلفه	مقادیر ویژه	سهم تجمعی (%)	عملکرد تحت تنش	حساسیت به تنش	تحمل	میانگین حسابی	میانگین هندسی	تحمل به تنش
Component	Eigenvalues	Cumulative %	Y_s	SSI	TOL	MP	GMP	STI
1	4.220	70.33	0.987	-0.162	0.459	0.970	0.987	0.979
2	1.679	98.31	-0.127	0.975	0.874	0.235	0.150	0.087



شکل ۲- نمودارهای دوبعدی پراکنش شاخص‌های خشکی (A) و ارقام کلزا (B) براساس عامل‌های اصلی و مؤلفه‌های اصلی در تنش دوم (۱: کرج؛ ۲: کرج؛ ۳: تاسیلو؛ ۴: زرفام؛ ۵: طلایه؛ ۶: کوپر؛ ۷: آدریانا؛ ۸: کارون؛ ۹: ساری گل ۳۲؛ ۱۰: لیکورد؛ ۱۱: هایولا ۴۰۱؛ ۱۲: SLMO46)

Figure 2. Two-dimensional graphs of the distribution of drought indices (A) and cultivars (B) based on the main factors and main components in the second level of stress (1: Karaj1; 2: Karaj2; 3: Tossillo; 4: Zarfam; 5: Talaye; 6: Cooper; 7: Adriana; 8: Karun; 9: Sarigol32; 10: Licord; 11: Hyola401; 12: SLMO46)

در هر دو شرایط تنش و بدون تنش همبستگی بالا و یکسان داشته باشد، به‌عنوان بهترین شاخص محسوب می‌گردد (Fernandez, 1992). با توجه به وضعیت همبستگی عملکرد دانه در دو شرایط تنش و غیرتنش (تنش اول: $r = 0.918$, $P \leq 0.01$ و تنش دوم: $P \leq 0.01$, $r = 0.824$) مشخص گردید که به‌طور کلی گزینش بر اساس عملکرد در هر دو شرایط می‌تواند ژنوتیپ‌های پرمحصول و با پایداری عملکرد خوب را حاصل نماید. مناسب‌ترین شاخص برای گزینش ارقام متحمل به تنش، شاخصی است که دارای همبستگی نسبتاً بالایی با عملکرد دانه در هر دو شرایط بدون تنش و تنش باشد. بنابراین با ارزیابی میزان همبستگی بین شاخص‌های تحمل تنش و عملکرد دانه در دو محیط، شناسایی مناسب‌ترین شاخص امکان‌پذیر می‌باشد. از این‌رو در هر دو سطح تنش، شاخص GMP با میزان عملکرد در شرایط تنش و MP با میزان عملکرد در شرایط بدون تنش بیشترین همبستگی مثبت نشان داد، بنابراین، با در نظر گرفتن نتایج مقایسه میانگین، رقم SLMO46 با داشتن بیشترین میانگین در شاخص‌های مذکور و رقم ساری گل ۳۲ با شاخص MP نتایج به‌دست آمده از روش PCA تأیید گردید و این دو رقم به‌عنوان ارقام مقاوم معرفی و پیشنهاد می‌شوند.

استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و نمودار بای‌پلات برای انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی با مطالعات نادری و امام در کلزا (Naderi and Emam, 2014)، احمدی و همکاران (Ahmadi et al., 2000) در گیاه ذرت، سلیمانی و همکاران (Soleimani et al., 2017) در گیاه جو و یوسفی‌آذر و رضایی در گندم (Yusefi Azar and Rezai, 2008) در تطابق است.

همبستگی فنوتیپی عملکرد دانه در شرایط تنش و بدون تنش خشکی در دو سطح با ۵ شاخص در جداول ۸ و ۹ نشان داده شده است. در شرایط تنش اول عملکرد دانه با شاخص‌های بهره‌وری متوسط، میانگین هندسی بهره‌وری و شاخص تحمل تنش همبستگی مثبت و معنی‌دار نشان داد. همبستگی مثبت بین عملکرد دانه و کلیه شاخص‌ها به‌جز شاخص حساسیت به تنش در شرایط عادی مشاهده گردید. شاخص حساسیت به تنش تنها با شاخص تحمل همبستگی مثبت نشان داد. رابطه مثبت و معنی‌دار بین شاخص‌های بهره‌وری متوسط، میانگین هندسی بهره‌وری و شاخص تحمل خشکی با تمامی شاخص‌ها جز شاخص حساسیت به تنش به دست آمد. در شرایط تنش دوم نیز شرایط مانند تنش اول بود با این تفاوت که همبستگی معنی‌داری بین شاخص‌های تحمل و تحمل خشکی به دست نیامد. بدیهی است هر شاخصی که با عملکرد دانه

جدول ۸- همبستگی شاخص‌های خشکی در سطح اول تنش

Table 8. Correlation between drought indices at the first level of stress

شاخص خشکی Drought index	حساسیت به تنش SSI	تحمل TOL	میانگین حسابی MP	میانگین هندسی GMP	تحمل به تنش STI	عملکرد در شرایط نرمال Y _p	عملکرد تحت تنش Y _s
حساسیت به تنش SSI	1						
تحمل TOL	0.730**	1					
میانگین حسابی MP	0.188	0.700*	1				
میانگین هندسی GMP	0.158	0.673*	0.999**	1			
تحمل به تنش STI	0.115	0.649*	0.970**	0.970**	1		
عملکرد در شرایط نرمال Y _p	0.323	0.808**	0.986**	0.980**	0.950**	1	
عملکرد تحت تنش Y _s	-0.019	0.507	0.971**	0.979**	0.951**	0.918**	1

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

جدول ۹- همبستگی شاخص‌های خشکی در سطح دوم تنش

Table 9. Correlation between drought indices at the second level of stress

شاخص خشکی Drought index	حساسیت به تنش SSI	تحمل TOL	میانگین حسابی MP	میانگین هندسی GMP	تحمل به تنش STI	عملکرد در شرایط نرمال Y _p	عملکرد تحت تنش Y _s
حساسیت به تنش SSI	1						
تحمل TOL	0.752**	1					
میانگین حسابی MP	0.070	0.652*	1				
میانگین هندسی GMP	-0.012	0.582*	0.996**	1			
تحمل به تنش STI	-0.078	0.511	0.957**	0.969**	1		
عملکرد در شرایط نرمال Y _p	0.280	0.807**	0.974**	0.950**	0.898**	1	
عملکرد تحت تنش Y _s	-0.274	0.331	0.931**	0.959**	0.945**	0.824**	1

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and **: Significant at 5% and 1% probability level, respectively

تولید شدند (جدول ۱۰) که نشان از تنوع بین ژنوتیپ‌ها و توانایی خوب آغازگرهای ISSR در تفکیک ژنوتیپ‌ها بود. میزان PIC برای ۱۸ آغازگر مورد استفاده در تجزیه ISSR بین ۰/۳۶۵ در آغازگر شماره‌ی ۹ تا ۰/۸۱ در آغازگر شماره‌ی ۴، با میانگین ۰/۲۰۷ متغیر بود که نشان از توانایی آن‌ها در اندازه‌گیری سطح متوسطی از تنوع

تجزیه مولکولی ISSR: در این بررسی به منظور تشخیص و ارزیابی تنوع بین ژنوتیپ‌های گیاه روغنی کلزا از آغازگر مولکولی ISSR استفاده شد که از بین ۲۳ آغازگر اولیه پس از غربالگری، ۱۸ آغازگر الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند. در مجموع از بین ۱۰۶ نوار قابل امتیازدهی، ۶۰ نوار چند شکل در ارقام مورد مطالعه

ژنتیکی است؛ بنابراین آغازگر شماره‌ی ۹ با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر آغازگرهای به‌کار رفته توانست تنوع ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کند. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) به عواملی مانند تعداد آلل هر جایگاه، محتوای نوکلئوتیدهای G و T در نواحی تکرار شونده (که همبستگی مثبتی با میزان چندشکلی دارد) و طول توالی تکراری وابسته است (Roder *et al.*, 1998) و یکی از شاخص‌های مهم جهت تعیین قدرت تمایز آغازگرهای مولکولی است (Tatikonda *et al.*, 2009; Thudi *et al.*, 2010). آغازگر حاوی PIC بیشتر انتخابی مناسب برای تعیین تنوع ژنتیکی است. در واقع، انتخاب آن برای پژوهش‌های آینده امکان‌پذیر است. شاخص آغازگری (MI) نیز که به‌عنوان یک معیار کارایی در تعیین چندشکلی استفاده می‌گردد، محاسبه شد. شاخص آغازگر (MI) از ۱/۸۸۱ برای آغازگر شماره‌ی ۹ و ۰/۰۱۶ برای آغازگر شماره‌ی ۴، با میانگین ۰/۵۴۷ متغیر بود. این شاخص پتانسیل هر آغازگر را در تولید نوار بیش‌تر نشان می‌دهد (Powell *et al.*, 1996). میانگین تعداد قطعات DNA تکثیر شده یا شناسایی شده در هر ژنوتیپ با استفاده از یک سیستم نشانگر به‌عنوان نسبت چندگانه مؤثر (EMR) در نظر گرفته می‌شود. آغازگرهای دارای چندشکلی بالا، EMR بیشتری داشتند. این شاخص از ۵/۱۴ برای آغازگر شماره‌ی ۹ تا ۰/۲ برای آغازگر شماره‌ی ۴ (میانگین: ۲/۰۹) متغیر بود. در تحقیقی بر روی زردآلو با استفاده از نشانگر ISSR، شاخص MI، ۳/۴۷ و شاخص EMR، ۴/۸ به دست آمد (Kumar *et al.*, 2009). برآورد شاخص RP از ۴/۴۶ برای آغازگر شماره‌ی ۱۷ تا ۰/۲۸۵ آغازگر شماره‌ی ۴ با میانگین ۲/۰۱ متغیر بود. سه آغازگر (۱۷، ۹ و ۵) که دارای مقادیر بالای RP (۴/۴۶، ۳/۹۲ و ۳/۷۸) بودند کارآمدترین نشانگرها برای تفکیک ژنوتیپ‌ها معرفی می‌شوند. یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی (Nei, 1972) است. برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی بین ۰/۰۸۱ تا ۰/۳۶۵ متغیر بود. ضریب شانون بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌هاست (Shannon, 1948).

میانگین ضریب شانون ۰/۳۲۵ می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی تنوع متوسط در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. میانگین تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (Hs)، ۰/۱۳۴۴ و تنوع ژنتیکی کل (Ht)، ۰/۱۹۸۲ محاسبه شد. میانگین درجه تمایز ژنی (Gst) بین ارقام کلزای مورد مطالعه در تمام مکان‌ها ۰/۳۲۱۸ برآورد شد. این نتیجه حاکی از آن است که سهم بیشتری از تنوع کل مربوط به تنوع درون ارقام است. از میان ۲۳ آغازگر استفاده شده، ۱۸ آغازگر امتیازدهی شده و در محاسبات مولکولی داخل شدند که در جدول شماره ۴ با علامت * مشخص شدند و در محاسبات پیش رو به ترتیب شماره‌گذاری اولیه در مقاله مورد بررسی قرار گرفته و اعداد مربوط به آغازگرهای نامطلوب حذف شدند.

تجزیه همبستگی کانونی یک تکنیک چندمتغیره است که ارتباط بین دو گروه از متغیرها را از طریق برآورد همبستگی بین ترکیبات خطی یک گروه از متغیرها با ترکیبات خطی گروه دوم متغیرها برآورد می‌کند و این می‌تواند به‌عنوان روشی به‌حساب آید که روابط چندگانه را در تعداد کمی رابطه معنی‌دار گردهم آورد (Johnson and Wichern, 2002). این تکنیک همبستگی موجود بین دو مجموعه صفت را شناسایی و برآورد می‌کند (Lorencetti *et al.*, 2006). تجزیه همبستگی کانونی متغیرهای جدیدی از ترکیب خطی یک سری متغیر اصلی حاصل می‌کند و معیار مطلوب سازی این تجزیه به حداکثر رساندن ارتباط بین دو گروه متغیر می‌باشد، به‌جای این‌که مقدار تنوع توضیح داده شده توسط متغیرهای جدید را به حداکثر برساند (Nicolas *et al.*, 2005). در حقیقت این روش تعمیم‌یافته‌ی روش رگرسیون گام به گام بوده و به‌جای یک y به چند x ، رابطه‌ی چند y به چند x را بررسی می‌کند. به‌منظور پی بردن به وجود ارتباط بین صفات اندازه‌گیری شده و پارامترهای ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه از تجزیه همبستگی کانونیک استفاده گردید. نتایج تجزیه همبستگی کانونیک در رابطه با شاخص‌های خشکی با پنج نشانگر (۵، ۹، ۱۱، ۱۴ و ۱۹) که بیشترین درصد چندشکلی را داشتند در جداول ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ آمده است.

جدول ۱۰- نشانگرهای ISSR مورد مطالعه و شاخص‌های به‌دست آمده

Table 10. ISSR markers and obtained indicators

شماره پرایمر Primer number	توالی پرایمر Primer sequence (5'-3')	تعداد کل نوارها Total bands	نوارهای چند شکل Polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphism (%)	شاخص* Index				
					PIC	MI	RP	MRP	EMR
2	ACACACACACACACCA	3	1	33.30	0.153	0.051	0.714	0.714	0.330
3	AGAGAGAGAGAGAGAA	5	3	60.00	0.170	0.306	2.138	0.712	1.800
4	AGAGAGAGAGAGAGGCC	5	1	20.00	0.082	0.016	0.285	0.285	0.200
5	AGAGAGAGAGAGAGAGC	6	5	83.30	0.291	1.211	3.783	0.756	4.160
6	AGAGAGAGAGAGAGAGG	4	1	25.00	0.122	0.030	0.571	0.571	0.250
7	GAGAGAGAGAGAGAGAA	5	3	60.00	0.247	0.444	1.214	0.404	1.800
8	AGAGAGAGAGAGAGACT	4	1	25.00	0.125	0.031	0.500	0.500	0.250
9	AGAGAGAGAGAGAGACTA	7	6	85.70	0.366	1.881	3.923	0.653	5.140
11	TGTGTGTGTGTGTGGG	9	6	66.70	0.227	0.907	1.996	0.332	4.000
13	AGAGAGAGAGAGAGAGT	4	3	75.00	0.302	0.679	2.076	0.692	2.250
14	CTCTCTCTCTCTCTA	6	4	66.70	0.264	0.702	2.642	0.660	2.660
16	TCTCTCTCTCTCTCTCC	6	2	33.30	0.124	0.082	1.357	0.678	0.660
17	ACACACACACACACACT	10	7	70.00	0.282	1.380	4.460	0.637	4.900
18	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	7	4	57.10	0.233	0.533	1.855	0.463	2.280
19	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	8	5	62.50	0.283	0.885	3.141	0.628	3.120
20	GAGAGAGAGAGAGAGACC	8	4	50.00	0.216	0.431	2.498	0.624	2.000
21	CACACACACACACAAC	3	1	33.30	0.087	0.028	0.846	0.846	0.330
23	GGAGAGGAGAGGAGA	6	3	50.00	0.165	0.247	2.356	0.785	1.500
مجموع (Total)		106	60						

* EMR: نسبت چندگانه موثر؛ MI: شاخص نشانگری؛ PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی؛ RP: قدرت تفکیک؛ MRP: میانگین قدرت تفکیک

*: EMR: Effective multiplex ratio; MI: Marker index; PIC: Polymorphism information content; RP: Resolving power; MRP: Mean resolving power

جدول ۱۱- پارامترهای تنوع ژنتیکی براساس نشانگرهای ISSR

Table 11. Genetic diversity parameters based on ISSR markers

شماره پرایمر Primer number	توالی پرایمر Primer sequence (5'-3')	تعداد کل آلل مشاهده شده Observed number of alleles	تعداد آلل موثر Effective number of alleles	تنوع ژنی نی (He) Nei's gene diversity	شاخص شانون (I) Shannon's information index
2	ACACACACACACACCA	1.330	1.280	0.153	0.217
3	AGAGAGAGAGAGAGAA	1.600	1.250	0.170	0.270
4	AGAGAGAGAGAGAGGCC	1.200	1.130	0.018	0.119
5	AGAGAGAGAGAGAGAGC	1.830	1.480	0.290	0.437
6	AGAGAGAGAGAGAGAGG	1.250	1.240	0.122	0.170
7	GAGAGAGAGAGAGAGAA	1.600	1.450	0.246	0.357
8	AGAGAGAGAGAGAGACT	1.250	1.250	0.125	0.137
9	AGAGAGAGAGAGAGACTA	1.850	1.660	0.365	0.526
11	TGTGTGTGTGTGTGGG	1.660	1.360	0.226	0.345
13	AGAGAGAGAGAGAGAGT	1.750	1.520	0.301	0.442
14	CTCTCTCTCTCTCTA	1.660	1.470	0.263	0.386
16	TCTCTCTCTCTCTCTCC	1.330	1.220	0.124	0.183
17	ACACACACACACACACT	1.700	1.480	0.281	0.413
18	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	1.570	1.410	0.233	0.339
19	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	1.620	1.520	0.283	0.403
20	GAGAGAGAGAGAGAGACC	1.500	1.380	0.215	0.310
21	CACACACACACACAAC	1.330	1.110	0.086	0.143
23	GGAGAGGAGAGGAGA	1.500	1.250	0.165	0.253
میانگین (Mean)		1.560	1.380	0.221	0.325

شاخص‌ها توسط مکان‌های ژنی آغازگر ۵ توجیه می‌شود؛

بنابراین از این تابع برای تفسیر همبستگی دو مجموعه

نشانگر شماره‌ی ۵: با توجه به اینکه مقدار ویژه برای تابع

اول ۹۷٪ بود، در نتیجه ۹۷ درصد تغییرات مربوط به

متغیر مورد بررسی در این مطالعه، استفاده شد. با توجه به نتایج ژنوتیپ‌هایی که مکان‌ژنی X6 را داشته باشند شاخص‌های خشکی TOL، MP، GMP و STI بیشتری نیز خواهند داشت و می‌توانند به‌عنوان ارقام متحمل در برنامه‌های کشت کلزا مورد استفاده قرار گیرند.

نشانگر شماره‌ی ۹: با توجه به مقدار ویژه در تابع اول، ۹۹ درصد تغییرات مربوط به شاخص‌ها توسط مکان‌های ژنی آغازگر ۹ توجیه می‌شود. با توجه به نتایج ژنوتیپ‌هایی که مکان‌ژنی X6 را داشته باشند شاخص‌های خشکی TOL و SSI بیشتری نیز خواهند داشت که به منزله حساسیت این ارقام نسبت به خشکی است.

نشانگر شماره‌ی ۱۱: با توجه به مقدار ویژه در تابع اول، ۸۸ درصد تغییرات مربوط به شاخص‌ها توسط مکان‌های ژنی آغازگر ۱۱ توجیه می‌شود. با توجه به نتایج ژنوتیپ‌هایی که مکان‌ژنی X4 را داشته باشند شاخص

خشکی TOL بیشتری نیز خواهند داشت که نشانگر تحمل تنش در این ارقام می‌باشد.

نشانگر شماره‌ی ۱۴: با توجه به مقدار ویژه در تابع اول، ۹۵ درصد تغییرات مربوط به شاخص‌ها توسط مکان‌های ژنی آغازگر ۱۴ توجیه می‌شود. با توجه به نتایج ژنوتیپ‌هایی که مکان‌ژنی X6 را داشته باشند شاخص خشکی SSI بیشتری داشته و نسبت به اعمال تنش حساسیت بیشتری خواهند داشت.

نشانگر شماره‌ی ۱۹: با توجه به مقدار ویژه در تابع اول، ۸۷ درصد تغییرات مربوط به شاخص‌ها توسط مکان‌های ژنی آغازگر ۱۹ توجیه می‌شود. با توجه به نتایج ژنوتیپ‌هایی که مکان‌ژنی X6 و X3 را داشته باشند شاخص خشکی SSI و حساسیت بیشتری در شرایط تنش خواهند داشت.

جدول ۱۲- همبستگی کانونی بین نشانگر شماره ۵ و شاخص‌های خشکی

Table 12. Canonical correlation between marker number 5 and drought indices

0.986						همبستگی تابع اول
						The correlation of the first function
0.973						مربع همبستگی کانونی
						Squared canonical correlation
(Locus) مکان‌ژنی						نشانگر ۵
X6	X5	X4	X3	X2	X1	Primer number 5
0.404	-0.266	0.230	-0.876	0.103		تابع ۱
						Function 1
تحمل به تنش						شاخص‌های خشکی
STI						Drought indices
0.836						تابع ۱
						Function 1

جدول ۱۳- همبستگی کانونی بین نشانگر شماره ۹ و شاخص‌های خشکی

Table 13. Canonical correlation between marker number 9 and drought indices

0.999							همبستگی تابع اول
							The correlation of the first function
0.999							مربع همبستگی کانونی
							Squared canonical correlation
(Locus) مکان‌ژنی							نشانگر ۹
X7	X6	X5	X4	X3	X2	X1	Primer number 9
-0.493	0.537	0.178	.	0.103	-0.049	0.321	تابع ۱
							Function 1
تحمل به تنش							شاخص‌های خشکی
STI							Drought indices
0.002							تابع ۱
							Function 1

جدول ۱۴- همبستگی کانونی بین نشانگر شماره ۱۱ و شاخص‌های خشکی

Table 14. Canonical correlation between marker number 11 and drought indices

0.999									همبستگی تابع اول
									The correlation of the first function
0.999									مربع همبستگی کانونی
									Squared canonical correlation
(Locus) مکان‌ژنی									نشانگر ۱۱
X9	X8	X7	X6	X5	X4	X3	X2	X1	Primer number 11
		0.037	-0.037		0.869	-0.290	-0.344	-0.344	تابع ۱
									Function 1
تحمل به تنش	میانگین هندسی	میانگین حسابی				تحمل	حساسیت به تنش	شاخص‌های خشکی	
STI	GMP	MP				TOL	SSI	Drought indices	
0.200	0.226	0.261				0.466	0.345	تابع ۱	
									Function 1

جدول ۱۵- همبستگی کانونی بین نشانگر شماره ۱۴ و شاخص‌های خشکی

Table 15. Canonical correlation between marker number 14 and drought indices

0.986						همبستگی تابع اول The correlation of the first function
0.973						مربع همبستگی کانونی Squared canonical correlation
مکان ژنی (Locus)						نشانگر ۱۴
X6	X5	X4	X3	X2	X1	Primer number 14
0.911	0.065	.	.	0.574	-0.432	تابع ۱ Function 1
تحمل به تنش STI	میانگین هندسی GMP	میانگین حسابی MP		تحمل TOL	حساسیت به تنش SSI	شاخص‌های خشکی Drought indices
-0.794	-0.671	-0.650		-0.204	0.094	تابع ۱ Function 1

جدول ۱۶- همبستگی کانونی بین نشانگر شماره ۱۹ و شاخص‌های خشکی

Table 16. Canonical correlation between marker number 19 and drought indices

0.999									همبستگی تابع اول
									The correlation of the first function
0.999									مربع همبستگی کانونی
									Squared canonical correlation
(Locus) مکان‌ژنی									نشانگر ۱۹
X8	X7	X6	X5	X4	X3	X2	X1	Primer number 19	
0.594	.	0.907	0.291	0.619	0.715	.	.	تابع ۱	
									Function 1
تحمل به تنش	میانگین هندسی	میانگین حسابی		تحمل	حساسیت به تنش	شاخص‌های خشکی			
STI	GMP	MP		TOL	SSI	Drought indices			
-0.794	-0.671	-0.650		-0.204	0.094	تابع ۱			
									Function 1

شاخص‌های کمی خشکی و ارتباط آن‌ها با نشانگرهای
 SSR، رقم SLMO46 به‌عنوان مقاوم‌ترین رقم در برابر
 خشکی معرفی و پیشنهاد می‌شود.

امروزه با توجه به شرایط اقلیمی کشور و نیاز مبرم به روغن
 خوراکی، شناسایی ارقام متحمل به خشکی از اهمیت
 خاصی برخوردار است. در این پژوهش با استفاده از

References

- Ahmadi, G., Zeinaly Khane Ghah, H., Rostamy, M.A. and Chogan, R. (2000). The study of drought tolerance indices and biplot method in eight corn hybrids. *Iranian Journal of Agricultural Science*, **3(31)**: 323-513 (In Persian).
- Ahmadizadeh, M., Valizadeh, M., Shahbazi, H. and Nori, A. (2012). Behavior of durum wheat genotypes under normal irrigation and drought stress conditions in the greenhouse. *African Journal of Biotechnology*, **11(8)**: 1912-1923.
- Allen, R.R., Pereira, L.S., Raes, D. and Smith, M. (1998). *Crop Evapotranspiration*. FAO, Utah State University, Logan, USA
- Amiri, P., Ismaili, A. and Hadian, J. (2017). Evaluation of genetic diversity of styrian pumpkin (*Cucurbita pepo* var. styriaca) populations, using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **4(2)**: 17-28 (In Persian).
- Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, **218(4571)**: 443-448.
- Esmailpour, A., Van Labeke, M.C., Samson, R., Ghaffaripour, S. and Van Dmme, P. (2015). Comparison of biomass production-base drought tolerance indices of pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings in drought stress conditions. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, **7(2)**: 36-44.
- Fernandez, G.C. (1992). Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. *Adaptation of Food Crops to Temperature and Water Stress: Proceedings of an International Symposium*. Taiwan, 13-18 August 1992: 257-270
- Fischer, R.A. and Maurer, R. (1978). Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research*, **29(5)**: 897-912.
- Havlíčková, L., Jozová E., Rychlá, A., Klíma, M., Kučera, V. and Čurn V. (2014). Genetic diversity assessment in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) collection using AFLP, ISSR and SSR markers. *Czech Journal of Genetic and Plant Breeding*, **50**: 216-225.
- Huangfu, C.H., Song, X.L. and Qiang, S.H. (2009). ISSR variation within and among wild *Brassica juncea* populations: implication for herbicide resistance evolution. *Genetic Resources of Crop Evolution*, **56**: 913-924.
- Johnson, R.A. and Wichern, D. (2002). *Multivariate Analysis*. Wiley Online Library. New Jersey, USA.
- Kumar, P., Gupta, V., Misra, A., Modi, D. and Pandey, B. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, **2(4)**: 141.
- Lorencetti, C., de Carvalho, F.I.F., de Oliveira, AC., Valério, I.P., Hartwig, I., Benin, G. and Schmidt, D.A.M. (2006). Applicability of phenotypic and canonic correlations and path coefficients in the selection of oat genotypes. *Scientia Agricola*, **63(1)**: 11-19.
- Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science*, **80(6)**: 758-763.
- Moaveni, P. and Changizi, M. (2007). *Foundation of Plant's Physiology in Dry and Salty Conditions*. Azad University of Arak Publication, Arak, IR (In Persian).
- Molasadeghi, V. and Shahryari, R. (2011). Grouping bread wheat genotypes under terminal drought in the presence of humic fertilizer by use of multivariate statistical analysis. *Advances in Environmental Biology*, **7**: 510-516.
- Naderi, R., Emam, Y. (2014). Evaluation of rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars performance under drought stress. *Australian Journal of Crop Science*, **8(9)**: 1319-1323.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, **106(949)**: 283-292.
- Nicolas, F.M., Bollero, G. and Bullock, D.G. (2005). Associations between field characteristics and soybean plant performance using canonical correlation analysis. *Plant and Soil*, **273**: 39-55.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2(3)**: 225-238.
- Ramezani, M. and Rahimi, M. (2017). Study of phylogenetic relationships and genetic diversity of *Plantago ovata* ecotypes using morpho-phenological traits and ISSR markers. *Plant Genetic Researches*, **4(1)**: 63-74 (In Persian).
- Roder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P. and Ganal, M.W. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, **149**: 2007-2023.

- Rosille, A.A. and Hambilin J.** (1981). Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments. *Crop Science*, **21**: 43-46.
- Safari, S., Mehrabi, A. and Safari, Z.** (2013). Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessment of genetic diversity in *Brassica napus* genotypes. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, **5(3)**: 273-279.
- Saghai-Marooif, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.** (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **81(24)**: 8014-8018.
- Shannon, C.** (1948). A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, **27**: 379-423.
- Shirani Rad, A.H.** (2012). Winter rapeseed response to zeolite and nitrogen rates under different irrigation regimes. *International Journal of Science and Advanced Technology*, **2(1)**: 108-114.
- Soleimani, A., Bihamta, M.R., Peyghambari, S.A. and Maali-Amiri, R.** (2017). Evaluation of late season drought in barley genotypes using some drought tolerance indices. *Journal of Crop Breeding*, **9(23)**: 166-176 (In Persian).
- Srivastava, S.** (1987). Peroxidase and poly-phenol oxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Macrophomina phaseolina* (Tassai) goid. and their implication in disease resistance. *Journal of Phytopathology*, **120(3)**: 249-254.
- Tamura, K., Nishioka, M., Hayashi, M., Zhang, Z., Lian, C., Hougetsu, T. and Harada, K.** (2005). Development of microsatellite markers by ISSR-suppression-PCR method in *Brassica rapa*. *Breeding Science*, **55**: 247-252.
- Tatikonda, L., Wani, S.P., Kannan, S., Beerelli, N., Sreedevi, T.K., Hoisington, D.A. and Varshney, R.K.** (2009). AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. *Plant Science*, **176(4)**: 505-513.
- Thiyam-Holländer, U., Eskin, N.A.M. and Matthäus, B.** (2012). *Canola and Rapeseed: Production, Processing, Food Quality, and Nutrition*. CRC Press, Florida, USA.
- Thudi, M., Manthena, R., Wani, S.P., Tatikonda, L., Hoisington, D.A. and Varshney, R.K.** (2010). Analysis of genetic diversity in pongamia [*Pongamia pinnata* (L) Pierre] using AFLP markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **19(2)**: 209-216.
- Yadava, J.S. and Singh, N.B.** (2004). Strategies to enhance yield potential of rapeseed mustard in India. *Proceedings of 10th International Rapeseed Congress*, Canberra, AU.
- Yarnia, M., Arabifard, N., Rahimzadeh Khoei, F. and Zandi, P.** (2011). Evaluation of drought tolerance indices among some winter rapeseed cultivars. *African Journal of Biotechnology*, **10**: 10914-10922.
- Yusefi Azar, M. and Rezai, A.** (2008). Assessment of drought tolerance in different breeding lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Water and Soil Science*, **11(42)**: 113-121 (In Persian).
- Zebarjadi, A., Kakaei, M. and Mostafaie, A.** (2011). Genetic variability of some traits in Rapeseed (*Brassica napus* L.) under drought stress and non-stress conditions. *Biharean Biologist*, **5(2)**: 127-131.

Study of Drought Tolerance Indices and Their Relationship with ISSR Markers in some Canola (*Brassica napus* L.) Cultivars

Sara Motallebinia¹, Omid Sofalian^{2,*}, Ali Asghari², Ali Rasoulzadeh³ and Bahram Fathi⁴

1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Breeding, Faculty of Agricultural and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agricultural and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3- Associate Professor, Department of Water Engineering, Faculty of Agricultural and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

4- Associate Professor, Department of Food Industries, Faculty of Agricultural and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: December 24, 2018 – Accepted: July 13, 2019)

Abstract

In the present study, in order to evaluate the drought tolerance indices and their relationship with ISSR markers, 12 rapeseed genotypes were studied using a factorial experiment based on completely randomized block design under the three irrigation treatments (control and irrigation after drainage of 60 and 85% moisture content) in the greenhouse of Mohaghegh Ardabili University, Iran. Drought tolerance genotypes were evaluated by quantitative indices including MP, GMP, SSI, STI and TOL. Cultivars in all five of indices at two levels of stress exhibited significant differences. Regarding the results of the mean comparison at both levels of stress, SLMO46 was identified as the most resistant cultivar with the highest amount of MP and STI, and Karun was the most sensitive one with the highest amount of SSI index. According to the results of factor analysis, in the first level of stress, Sarigol32 and Karun were sensitive, and in the second level of stress, Talaye and Sarigol32 were sensitive as well. SLMO46 was known to be resistant to stress in both levels of stress. Phenotypic correlation of grain yield under stress and non-stress conditions was investigated in two levels of stress with 5 drought indices. In first level of stress condition, grain yield had a positive and significant correlation with mean productivity, geometric mean of productivity and stress tolerance index. In the second level of stress condition, the same correlation was observed with the difference that there was no significant correlation between drought tolerance and tolerance indices. Canonical correlation analysis was performed between drought indices and molecular markers. Five ISSR primers (5, 9, 11, 14 and 19) with the highest polymorphic percentages were used for calculation using the first factor coefficients. ISSR-PCR was used to identify some of the molecular markers associated with drought tolerance indices. A total of 106 clear and score-able loci were amplified by 18 ISSR primers, of which 60 bands (56.6%) were polymorphic. Finally, according to the results, these markers can be used in rapeseed breeding programs for drought tolerance.

Keywords: Drought stress, Drought tolerance index, *Brassica napus* L., ISSR markers

* Corresponding Author, E-mail: sofalian@uma.ac.ir