

Research Paper

Association Analysis for Main Seedling Characteristics in Wheat Advanced Varieties and Lines under Non-Stressed and Salt-Stressed Conditions

Ghazal Dogmechi Karimi¹, Iraj Bernousi², Ashkbous Amini³ and Hadi Alipour⁴

1- Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetics, Urmia University, Urmia, Iran

2- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Urmia University, Urmia, Iran,
(Corresponding author: i.bernosi@urmia.ac.ir)

3- Assistant Professor, Seed and Plant Breeding Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization, Karaj, Iran

4- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 17 February, 2025

Revised: 17 May, 2025

Accepted: 29 June, 2025

Extended Abstract

Background: Wheat (*Triticum aestivum* L.) is a strategic cereal crop that plays a vital role in global food security, serving as a primary source of nutrition for over 35% of the world's population. However, the sustainable production of this crucial crop faces numerous challenges, including abiotic stresses. Among these, salinity stress stands out as one of the most significant factors limiting wheat production in many regions worldwide. Salinity stress negatively impacts not only seed germination and seedling establishment but also severely affects various growth stages, final yield, and even grain quality parameters. The mechanisms of salt-induced damage include osmotic stress, ionic toxicity, nutritional imbalance, and oxidative stress. Given the increasing expansion of saline soils and the reduction of quality water resources, identifying and developing salt-tolerant cultivars has become essential in wheat breeding programs. Salt tolerance is a complex quantitative trait controlled by numerous genes and intricate physiological and biochemical networks. Since these mechanisms involve multiple physiological and morphological characteristics, assessing genetic diversity and identifying molecular markers associated with key physiological and morphological traits represents a crucial step for the genetic improvement of this crop. The utilization of molecular markers, particularly Simple Sequence Repeats (SSRs), which are linked to genomic regions controlling salt tolerance, enables more precise and efficient selection of tolerant genotypes through Marker-Assisted Selection (MAS). Therefore, this study was conducted to identify genetic diversity and important molecular markers associated with key seedling traits in wheat genotypes under both non-stress and salt-stress conditions.

Methods: In the phenotypic evaluation phase, 37 wheat genotypes, including commercial varieties and promising lines, were studied in a Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replications under two non-stress and salt stress conditions. The experiment was conducted in 2020 in the Salinity Research Greenhouse of the Cereal Research Department at the Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Karaj, using the Hoagland nutrient solution as the growth medium.

A standard Hoagland nutrient solution was used for the control treatment (non-stress). The salt stress treatment consisted of the Hoagland solution supplemented with NaCl to achieve a salinity level of 12 dS/m.

Important physiological and morphological traits were measured after a six-week growth period, including leaf chlorophyll content (using a SPAD meter), flag leaf length, width and area (measured using ImageJ software), total biomass, and concentrations of sodium (Na⁺) and potassium (K⁺) ions (measured by flame photometry), subsequently calculating the K⁺/Na⁺ ratio. In the molecular phase, genomic DNA was extracted from young, disease-free leaves using the CTAB method. The quality and quantity of the extracted DNA, including concentration and purity, were assessed using spectrophotometry and 1% agarose gel electrophoresis. All genotypes were evaluated using 27 SSR markers previously reported to be associated with Quantitative Trait Loci (QTLs) for salt tolerance in wheat. For morphological data analysis, the analysis of variance (ANOVA) was performed using SPSS software (version 21). In the molecular analyses, population structure was determined using the Bayesian method implemented in the Structure

software (version 2.3.4). Diversity indices and molecular variance (AMOVA) were calculated using GenAlEx software (version 6.501). Principal Coordinate Analysis (PCoA) and cluster analysis based on the UPGMA algorithm were performed using DARwin software (version 6). Association analysis was conducted using the Mixed Linear Model (MLM) in TASSEL software (version 4).

Results: The ANOVA for the measured traits under both conditions revealed statistically significant differences ($p < 0.01$) among the genotypes for all traits: leaf chlorophyll content, flag leaf length, width and area, total biomass, sodium ion concentration, potassium ion concentration, and the K^+/Na^+ ratio. These results indicate the presence of high genetic diversity among the investigated genotypes, providing a basis for selecting superior genotypes. Population structure analysis based on the maximum value of ΔK classified the genotypes into two potential subpopulations ($K=2$). Subpopulation 1 comprised 18 genotypes (four commercial varieties and 14 promising lines), while subpopulation 2 contained 19 genotypes (10 commercial varieties and nine promising lines). Based on various diversity indices (e.g., Shannon's Information Index, Nei's gene diversity), subpopulation 2 exhibited considerably higher genetic diversity than subpopulation 1. AMOVA also confirmed significant genetic differentiation between the two subpopulations. Based on the results of the association analysis using the Mixed Linear Model (MLM), 29 significant ($p < 0.01$) marker-trait associations (MTAs) were identified under non-stress conditions, and 30 significant ($p < 0.01$) MTAs were found under salt stress conditions. Under salt stress, the markers gwm108 and gwm47 showed strong associations with sodium ion concentration and the K^+/Na^+ ratio, indicating their potential utility for identifying salt-tolerant genotypes.

Conclusion: This study provides valuable information regarding the genetic diversity of the investigated wheat genotypes and the genetic basis of the studied traits under salt stress. The identification of molecular markers significantly associated with key physiological and morphological traits under salinity stress enables the application of Marker-Assisted Selection for improving salt tolerance in wheat. These findings can be utilized to advance wheat breeding programs for the selection and development of high-yielding, salt-tolerant genotypes. The identified markers, particularly gwm108 and gwm47, can serve as valuable molecular tools in wheat breeding programs targeting salinity-affected regions.

Keywords: Association analysis, Hydroponic culture, Salinity, Wheat

How to Cite This Article: Dogmechi Karimi, G., Bernousi, I., Amini, A., & Alipour, H. (2025). Association Analysis for Main Seedling Characteristics in Wheat Advanced Varieties and Lines under Non-Stressed and Salt-Stressed Conditions. *J Crop Breed*, 17(3), 45-59. DOI: 10.61882/jcb.2024.1503



مقاله پژوهشی

تجزیه ارتباطی صفات مهم گیاهچه‌ای در ارقام و لاین‌های پیشرفته گندم در شرایط بدون تنش و تنش شوری

غزل دوگمچی کریمی^۱، ایرج برنوسی^۲ ID، اشکبوس امینی^۳ و هادی علی‌پور^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
 ۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، (نویسنده مسئول: i.bernosi@urmia.ac.ir)
 ۳- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
 ۴- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۸

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۷
صفحه: ۴۵ تا ۵۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۹

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: گندم (*Triticum aestivum* L.) به عنوان یک غله استراتژیک، نقش حیاتی در امنیت غذایی جهانی ایفا می‌کند و منبع اصلی تغذیه برای بیش از ۳۵ درصد از جمعیت جهان محسوب می‌شود. با این حال، تولید پایدار این محصول با چالش‌های متعددی از جمله تنش‌های غیر زیستی مواجه است. در میان این تنش‌ها، شوری یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید گندم در بسیاری از مناطق جهان به شمار می‌رود. تنش شوری نه تنها بر جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه تأثیر منفی می‌گذارد، بلکه مراحل مختلف رشد، عملکرد نهایی و حتی ویژگی‌های کیفی دانه را نیز به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد. با توجه به گسترش روزافزون خاک‌های شور و کاهش منابع آب با کیفیت، شناسایی و معرفی ارقام متحمل به شوری در برنامه‌های به‌نژادی گندم ضروری است. تحمل به شوری یک صفت کمی پیچیده است که توسط تعداد زیادی از ژن‌ها و شبکه‌های پیچیده فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی کنترل می‌شود. از آنجا که این مکانیسم‌ها شامل ویژگی‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک متعددی می‌شوند، ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک، گامی ضروری برای بهبود ژنتیکی این گیاه محسوب می‌شود. استفاده از نشانگرهای مولکولی، نظیر ریزماهورها (SSR) که با نواحی ژنی کنترل‌کننده تحمل به شوری ارتباط دارند، امکان گزینش دقیق‌تر و سریع‌تر ژنوتیپ‌های متحمل را در قالب گزینش به کمک نشانگر فراهم می‌کند. بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف شناسایی تنوع ژنتیکی و نشانگرهای مهم مولکولی مرتبط با صفات مهم گیاهچه‌ای تحت شرایط بدون تنش و تنش شوری در ژنوتیپ‌های گندم اجرا شد.

مواد و روش‌ها: در بخش ارزیابی فنوتیپی، تعداد ۳۷ ژنوتیپ گندم در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دو شرایط بدون تنش و تنش شوری در سال ۱۳۹۹ در گلخانه تحقیقات شوری بخش تحقیقات غلات مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در محیط کشت هوگلند مطالعه شدند. در تیمار شاهد (بدون تنش) محلول غذایی هوگلند و در تیمار تنش شوری محلول غذایی هوگلند حاوی NaCl با شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر استفاده شدند. پس از دوره رشد شش هفته‌ای، صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک مهمی شامل میزان کلروفیل برگ، طول، عرض و سطح برگ پرچم، بیوماس کل، میزان یون‌های سدیم و پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم اندازه‌گیری شدند. در بخش مولکولی، استخراج DNA به روش CTAB از برگ‌های جوان و عاری از بیماری انجام گرفت. سپس DNA استخراج‌شده از نظر خصوصیات کیفی و کمی، شامل غلظت و خلوص آن، توسط دستگاه اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی گردید. تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ۲۷ نشانگر SSR که با نواحی گزارش شده QTL‌های تحمل به شوری در گندم مرتبط بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. در بخش ارزیابی موفولوژی، تجزیه وایانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS v.21 و در بخش مولکولی تعیین ساختار جمعیت با استفاده از روش بیزین در نرم‌افزار Structure v.2.3.4، محاسبه شاخص‌های تنوع و تجزیه وایانس مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx v.6.501، تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA در نرم‌افزار DARwin v.6 و تجزیه ارتباطی براساس مدل MLM در نرم‌افزار TASSEL v.4 انجام شدند.

یافته‌ها: نتایج تجزیه وایانس در دو شرایط نشان دادند که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر صفات میزان کلروفیل برگ، طول و عرض برگ پرچم، سطح برگ پرچم، بیوماس کل، میزان سدیم، میزان پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم برگ تفاوت‌های آماری معنی‌داری وجود داشتند ($p < 0.01$)، که بیانگر تنوع ژنتیکی بالا بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. در تجزیه ساختار جمعیت، ژنوتیپ‌های مورد بررسی براساس حداکثر مقدار ΔK در دو زیر گروه احتمالی ($K=2$) طبقه‌بندی شدند، به‌طوری‌که در زیر گروه اول ۱۸ ژنوتیپ و در زیر گروه دوم ۱۹ ژنوتیپ قرار گرفتند. در زیر گروه اول شامل چهار رقم تجاری و ۱۴ لاین امیدبخش و زیر جمعیت دوم ۱۰ رقم تجاری و ۹ لاین امیدبخش گروه‌بندی شدند. بر اساس شاخص‌های تنوع، زیر گروه دوم در مقایسه با زیر گروه اول تنوع بسیار بیشتری نشان داد. بر اساس تجزیه وایانس مولکولی، بین دو زیر گروه تمایز ژنتیکی معنی‌داری مشاهده شد. با توجه به نتایج تجزیه ارتباطی با روش مدل خطی مخلوط (MLM)، در شرایط بدون تنش تعداد ۲۹ و در شرایط تنش شوری تعداد ۳۰ ارتباط معنی‌دار ($p < 0.01$) نشانگر-صفت مشاهده شدند. در شرایط تنش شوری، نشانگرهای gwm108 و gwm47 با صفات میزان سدیم و نسبت میزان پتاسیم به سدیم ارتباط بالایی نشان دادند که می‌تواند در شناسایی نمونه‌های متحمل به تنش شوری مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش اطلاعات ارزشمندی را در ارتباط با تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی و مبنای ژنتیکی صفات مورد مطالعه فراهم می‌نماید. شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم فیزیولوژیک و مورفولوژیک تحت شرایط تنش شوری، امکان گزینش به کمک نشانگر را برای بهبود تحمل به شوری در گندم فراهم می‌کند. این یافته‌ها را می‌توان در پیشرده برنامه‌های به‌نژادی و گزینش و تولید ژنوتیپ‌های مطلوب با تحمل به شوری مورد استفاده قرار داد. نشانگرهای شناسایی‌شده به ویژه gwm108 و gwm47 را می‌توان به عنوان ابزارهای مولکولی ارزشمندی در برنامه‌های به‌نژادی گندم برای مناطق تحت تأثیر شوری به کار گرفت.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ارتباطی، کشت هیدروپونیک، شوری، گندم

مقدمه

توصیه می‌گردد. راه اول، توسعه اراضی قابل کشت و راه دوم افزایش عملکرد در واحد سطح هستند. با توجه به این روند،

با توجه به روند رشد روزافزون جمعیت جهان و افزایش تقاضا برای غذا، دو راه جهت افزایش عملکرد در بخش کشاورزی

مختلف گندم شناسایی کردند. قائدرحمتی و همکاران (Ghaedrahmati *et al.*, 2018) در شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با تحمل به تنش شوری با استفاده از ۲۲۵ نشانگر DARt و ۱۴ نشانگر SSR، در مجموع ۳۱ مکان ژنی مرتبط با تحمل به تنش شوری را روی ۱۳ کروموزوم گندم شناسایی کردند که بیشترین تعداد نشانگرها روی کروموزوم 3B و 5B قرار داشتند. ایلایس و همکاران (Ilyas *et al.*, 2020) در بررسی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مرتبط با تنش شوری در ۸۷ لاین خویش‌آمخته نوترکیب گندم با استفاده از ۲۰۲ نشانگر SSR، در مجموع ۶۰ مکان ژنی مرتبط را شناسایی نمودند که از میان آنها نشانگرهای Xgwm70 و Xbarc361 روی کروموزوم 6B با صفات کلروفیل کل، پتانسیل آب گیاه و محتوی سدیم ارتباط نشان دادند. زارع کهن و همکاران (Zare *et al.*, 2018) در بررسی نقشه‌یابی ارتباطی صفات فنولوژی تحت شرایط تنش شوری در ژنوتیپ‌های جو با استفاده از روش مدل مخلوط خطی^۱ (MLM) در شرایط تنش شوری، نشانگرهای معنی‌دار بیشتری در مقایسه با شرایط بدون تنش مشاهده کردند و بیشترین تعداد نشانگر معنی‌دار در کروموزوم‌های 2H و 6H مشاهده شد. مطالعه حاضر نیز با هدف شناسایی تنوع ژنتیکی و فنوتیپی ژنوتیپ‌های مختلف گندم و مکان‌های ژن‌های مرتبط با صفات مهم گیاهچه‌ای تحت شرایط بدون تنش و تنش شوری با استفاده از نشانگر SSR اجرا شد.

مواد و روش‌ها بخش مورفولوژی

در این مطالعه، به‌منظور ارزیابی فنوتیپی ژنوتیپ‌های گندم آزمایشی به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دو شرایط بدون تنش و تنش شوری در سال ۱۳۹۹ در گلخانه تحقیقات شوری بخش تحقیقات غلات موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام شد. مواد گیاهی شامل ۳۷ ژنوتیپ و رقم گندم بود که اطلاعات مربوطه در جدول ۱ ارائه شده است. برای کشت گیاهان در شرایط هیدروپونیک، ابتدا بذور در داخل ظروف پتری‌جوانه‌دار شدند و پس از پنج روز جوانه‌ها به محیط هیدروپونیک حاوی محلول غذایی هوگلند با pH = 6 منتقل شدند (Sofalian *et al.*, 2013). تیمار شوری در روز هفتم اعمال شد. در تیمار شاهد (بدون تنش) محلول غذایی هوگلند و در تیمار تنش شوری محلول غذایی هوگلند حاوی NaCl با شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر استفاده شد. گیاهان در گلخانه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره‌ی روشنائی ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. برای تیمار شوری از دستگاه EC متر استفاده گردید و NaCl به‌تدریج به محلول غذایی هوگلند اضافه شد تا به غلظت نهایی برسد. تعداد سه بوته از هر نمونه پس از ۶ هفته بعد از کشت بذر برداشت و صفات میزان کلروفیل، طول، عرض و سطح برگ پرچم و بیوماس کل اندازه‌گیری شدند. محتوای کلروفیل قبل از برداشت با استفاده از دستگاه SPAD اندازه‌گیری گردید. پس از نمونه‌گیری و خشک کردن، مقدار ۰/۰۱ گرم از هر نمونه

تقاضای جمعیت جهان برای تولیدات گیاهی از جمله گندم نیز در حال افزایش است (Alipour *et al.*, 2017).

گندم از تیره گرامینه یک غله عمده در سراسر جهان است که ۱۷ درصد از اراضی کشاورزی جهان زیر کشت آن قرار دارد (Rahimi Jarihani & Abdollahi Mandoulakani, 2021). این گیاه به‌تنهایی ۴۰ درصد غذای جهان را به‌خود اختصاص داده است و خاستگاه آن خاورمیانه و احتمالاً ایران است (Akbarpour & Dehghani, 2017). اندازه ژنوم گندم شامل 1.6×10^9 جفت باز است و دارای ۸۰ درصد DNA تکراری با متوسط ۸۱۰ مگا جفت‌باز در هر کروموزوم با طول ۱۰ میکرون است (Alipour *et al.*, 2017).

گندم با آستانه تحمل شوری شش دسی‌زیمنس بر متر به‌عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی در ایران در گروه متوسط از لحاظ تحمل به شوری قرار دارد. حساسیت گندم نسبت به شوری در مرحله گلدهی نسبت به مرحله رویشی و اوایل مرحله زایشی کم‌تر و در مرحله پرشدن دانه حداقل است (El-Hendawy *et al.*, 2005).

به‌نژادی گیاهی هنر بهبود ژنتیکی گیاهان است و هدف کلی آن بهبود خصوصیات از گیاهان است دارای ارزش اقتصادی است. از آنجایی که تنوع ژنتیکی برای پیشبرد اهداف اصلاحی ضروری است، ارزیابی تنوع نخستین گام در جهت به‌نژادی گیاهی است (Maluszynski & Kasha, 2002). یکی از برنامه‌های کاربردی در ارزیابی صفات کمی در دهه اخیر، مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده این صفات است. به‌طور کلی، روش‌های به‌کار رفته در شناسایی و مکان‌یابی جایگاه صفات کمی به دو گروه اصلی نقشه‌یابی پیوستگی و نقشه‌یابی عدم تعادل لینکاژی یا نقشه‌یابی ارتباطی تقسیم می‌شوند (Aghaali *et al.*, 2016). تجزیه ارتباطی یکی از تکنیک‌های مکان‌یابی QTL متکی بر عدم تعادل لینکاژی است تا رابطه بین تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی را در جمعیت تعیین کند. شناسایی معیارهای مؤثر و QTL‌های دخیل در تحمل به تنش شوری به‌نژادگر را قادر به توسعه واریته‌های متحمل به شوری با استفاده از انتخاب به کمک نشانگر می‌سازد که باعث افزایش کارایی به‌نژادی و قدرت انتخاب می‌شود. از جمله این نشانگرها، نشانگرهای مولکولی SSR هستند، توالی‌های تکراری ساده که اولین بار حدود ۳۰ سال پیش در طی مطالعات رفتاری DNA کشف شدند (Chambers & MacAvoy, 2002). تنوع زیاد، حضور فراوان در ژنوم یوکاریوت‌ها، همباز بودن، ساده بودن کاربرد و تفسیر نتایج حاصل، از مزایای استفاده از این نشانگر هستند (Gougerdchi *et al.*, 2013).

در مطالعه گنس و همکاران (Genc *et al.*, 2010) روی ۱۵۲ نمونه دابل هاپلوئید گندم، تعداد ۴۰ مکان ژنی برای صفات مختلف زراعی و فیزیولوژی تحت شرایط تنش شوری شناسایی کردند که یکی از QTL‌های شناسایی شده با ژن حذف Na^+ تحت عنوان HKT1 در کروموزوم 2A پیوستگی داشتند. ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2010) در مطالعه‌ای روی ۱۱۴ لاین خویش‌آمخته نوترکیب تحت شرایط هیدروپونیک، تعداد ۲۷ مکان ژنی مرتبط با کلروفیل برگ را در ۱۱ کروموزوم

^۱. Mixed Linear Model

طول نوارها بر روی ژل پلی آکرل آمید ۶٪ تفکیک و رنگ آمیزی ژل ها توسط نیترات نقره صورت گرفت. همچنین، عکس برداری از ژل ها با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت (Uvitec BTS-20-MS) انجام شد و نمره دهی آل ها با مقایسه با ارقام کنترل و مارکر وزنی به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) انجام و وارد نرم افزار Excel گردید. به منظور تجزیه موثر ساختار جمعیت و دسته بندی ژنوتیپ ها به زیرجمعیت های مناسب و تشخیص ژنوتیپ های مختلف، ارزیابی ساختار جمعیت با استفاده از روش Bayesian در نرم افزار Structure 2.3.4 انجام گرفت. در این روش، هر یک از ژنوتیپ ها با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت های فرضی متناسب می گردند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. در این مطالعه، بین ۱ تا ۱۰ جمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت ها ۱۰ تکرار منظور گردید. برای این منظور، از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش (burn-in) و ۱۰۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov chain Monte Carlo) استفاده گردید تا منحنی حداکثر درست نمایی حاصل شود (Hoshyardel et al., 2014). نرم افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیرجمعیت) ماتریس Q را مشخص می کند. تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه خوشه ای با استفاده از الگوریتم UPGMA در نرم افزار DARwin v.6 انجام شد. تجزیه احتمال جهت آنالیز ارتباط نشانگرها با صفات فنوتیپی با استفاده از نرم افزار TASSEL انجام شد و در این رویکرد از مدل های MLM استفاده گردید.

وزن گردید و جهت اندازه گیری میزان یون های سدیم، پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+) مورد استفاده قرار گرفتند. در بخش ارزیابی موفولوژی، پس از آزمون نرمال بودن توزیع خطاها با استفاده از روش کولموگروف-اسمیرنوف و همگنی واریانس خطاها، تجزیه واریانس داده ها با استفاده از نرم افزارهای SPSS 21 انجام شد.

بخش مولکولی

برای ارزیابی مولکولی، بذر ژنوتیپ های مورد نظر (جدول ۱) در شرایط گلخانه کشت و در مرحله ۳-۲ برگه از هر یک از ژنوتیپ ها و از بین برگ های جوان و عاری از بیماری، نمونه های برگه جدا شدند و استخراج DNA به روش CTAB (Saghai-Marroof et al., 1984) انجام گرفت. DNA استخراج شده از نظر خصوصیات کیفی و کمی شامل غلظت و خلوص آن، توسط دستگاه اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی گردید. در این آزمایش تعداد ۲۷ نشانگر SSR که مرتبط با نواحی گزارش شده QTL های مربوط به تحمل به شوری در گندم بودند (Röder et al., 1998; Song et al., 2002; Gupta et al., 2000; Pestsova et al., 2000; Sourdille et al., 2003; al., 2002, 2005) استفاده شدند که اطلاعات مربوط به این نشانگرها در جدول ۲ آورده شده است. تکثیر نشانگرهای مورد بررسی با استفاده از آغازگرهای تخصصی هر یک از ژن ها از طریق PCR صورت گرفت. در این پژوهش، از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad استفاده شد. محصولات حاصل PCR پس از مخلوط شدن با ماده رنگی (بافر بارگذاری) به صورت جداگانه درون چاهک های ژل بارگذاری شدند و بسته به ماهیت نوارهای تولید شده و تفاوت

جدول ۱- نام یا شجره ۳۷ ژنوتیپ گندم مورد مطالعه

شماره Number	شجره/نام ژنوتیپ Pedigree/name of the genotype	شماره Number	شجره/نام ژنوتیپ Pedigree/name of the genotype
1	Alvd//Aldan/Ias 58/3/Kvr	21	Sakha 8/Darab#2//1-66-22
2	338cb/landrace	22	1-66-22/pishtaz
3	Berkut	23	Desprez80/Rsh//Arg
4	Mahooti (Local variety)	24	1-66-22
5	Soissons/Kvr	25	soison/ pistaz (RWYT-87-140)
6	Sorkhtokhm (Local variety)	26	W3918A/Jup//Gru90-201736/3/Moghan1/Falat
7	1-63-31/3/12300/tob/cno/sx	27	Mrn/Catbird
8	Arg	28	Gv/D630//Ald"s"/3/Azd/4/Rsh/5/Kauz/Stm
9	Stm/3/Kal//V534/Jit/716	29	Maroon
10	Vee"s"/Nac//1-66-22	30	Ofough
11	Roshan (Local variety)	31	1-66-22/SNH.9
12	Moghan3	32	Atrak/3/Chen/Aeg.sq(Taus)//BCN CMBW98
13	Falat	33	Kauz*2/Opata//Kauz/3/Sakha 8/4/Tam 200
14	Gods	34	Alvd//Aldan/Ias 58/3/Karchia
15	Shiraz	35	Barzghar
16	Mina/Molan//Atrak-KJF	36	Sistan
17	Darab#2	37	Arta
18	Gaspard		
19	KRAL-1-4		
20	T.AesxTi(La(FrkaI.xGb))/3/Kauz*2/Opata//Kauz		

جدول ۲- لیست نشانگرهای SSR مورد بررسی

Table 2. The list of investigated SSR markers

شماره Number	کد نشانگر Marker code	نام نشانگر Marker name	توالی (۵'→۳') Sequence (5'→3')	توالی (۳'→۵') Sequence (3'→5')	مکان کروموزومی Chromosomal location	دمای اتصال Connection temperature	منبع Reference
1	S1	cfa2043	CAGCCGAAGAAGGATTCTG	GAGGCAGGAACCTAGGGGAG	2A/2B	61	Sourdille <i>et al.</i> , 2003
2	S2	barc353.1	GAAGTTCCTCAAAATGCCTCTGTC	GCGGATCGAAGACCTAAGAAAAG	2AL	55	Song <i>et al.</i> , 2002, 2005
3	S3	gwm445	TTTGTTGGGGGTTAGGATTAG	CCTTAACACTTGCTGGTAGTGA	2A	61	Röder <i>et al.</i> , 1998
4	S6	gpw2206	GTTTTCATCAACTCTGCCA	AGACTCACTTTGTGGCATCTGA	2A	60	Pestsova <i>et al.</i> , 2000
5	S8	gwm47	TTGCTACCATGCATGACCAT	TTCACCTCGATTGAGGTCCT	2A/2B	61	Röder <i>et al.</i> , 1998
6	S9	gwm294	GGATTGGAGTTAAGAGAGAACCG	GCAGAGTGATCAATGCCAGA	2A	61	Röder <i>et al.</i> , 1998
7	S11	gwm372	AATAGAGCCTGGGACTGGG	GAAGGACGACATTCCACCTG	2A	61	Röder <i>et al.</i> , 1998
8	S12	gwm339	AATTTTCTTCCTCACTTATT	AAACGAACAACCACTCAATC	2A	51	Röder <i>et al.</i> , 1998
9	S15	gwm249	CAAATGGATCGAGAAAGGGA	CTGCCATTTTCTGGATCTACC	2A, 2D	55	Röder <i>et al.</i> , 1998
10	S16	gwm95	GATCAAAACACACCCCTCC	AATGCAAAGTGAAAAACCCG	2A	61	Röder <i>et al.</i> , 1998
11	S18	gwm312	ATCGCATGTCACGTAGAG	ACATGCATGCCTACCTAATGG	2A	51	Röder <i>et al.</i> , 1998
12	S19	wmc170	ACATCCACGTTTATGTTGTGC	TTGGTTGCTCAACGTTTACTTC	2A, 2D	60	Gupta <i>et al.</i> , 2002
13	S22	gwm108	CGACAATGGGGTCTTAGCAT	TGCACACTTAAATTACATCCGC	3B	61	Röder <i>et al.</i> , 1998
14	S23	wmc326	GGAGCATCGCAGGACAGA	GGACGAGGACGCCTGAAT	3B	61	Gupta <i>et al.</i> , 2002
15	S24	wmc291	TACCACGGGAAAGGAAACATCT	CACGTTGAAACACGGTGACTAT	3B	61	Gupta <i>et al.</i> , 2002
16	S25A	cfa2170a	TGGCAAGTAACATGAACGGA	ATGTCATTATGTTGCCCT	3A/3B	61	Sourdille <i>et al.</i> , 2003
17	S25B	cfa2170b	TGGCAAGTAACATGAACGGA	ATGTCATTATGTTGCCCT	3A/3B	61	Sourdille <i>et al.</i> , 2003
18	S26	wmc687	AGGACGCCTGAATCCGAG	GGGAGCGTAGGAGGACTAACA	3B	61	Gupta <i>et al.</i> , 2002
19	S28	barc84	CGCATAACCGTTGGGAAGACATCTG	GGTGCAACTAGAACGTACTTCCAGTC	3B	51	Song <i>et al.</i> , 2002, 2005
20	S30	gwm194	GATCTGCTCTACTCTCTCC	CGACGCAGAACTTAAACAAG	4D	61	Röder <i>et al.</i> , 1998
21	S36	gpw345	TAACGTCTGCCAACCTCGTG	ATGGGCAGTGGTATTGAGGT	4D	60	Pestsova <i>et al.</i> , 2000
22	S38	cfid9	TTGCACGCACCTAAACTCTG	CAAGTGTGAGCGTCGG	3D	60	Guyomarc'h <i>et al.</i> , 2002
23	S39	cfid18	CATCCAACAGCACCAAGAGA	GCTACTACTATTTCATTGCGACCA	5D	60	Guyomarc'h <i>et al.</i> , 2002
24	S40	cfid183	ACTTGCACTTGCTATACCTACGAA	GTGTGTCGGTGTGTGGAAG	5D	60	Guyomarc'h <i>et al.</i> , 2002
25	S42	wmc405	GTGCGGAAAGAGACGAGGTT	TATGTCCACGTTGGCAGAGG	7A/5D/5B/7D/1D	61	Gupta <i>et al.</i> , 2002
26	S43	gwm291	CATCCCTACGCCACTCTGC	AATGGTATCTATTCGACCCG	5A	61	Röder <i>et al.</i> , 1998
27	S44	gwm410	GCTTGAGACCGGCACAGT	CGAGACCTTGAGGGTCTAGA	5A /2B	61	Röder <i>et al.</i> , 1998

نتایج و بحث

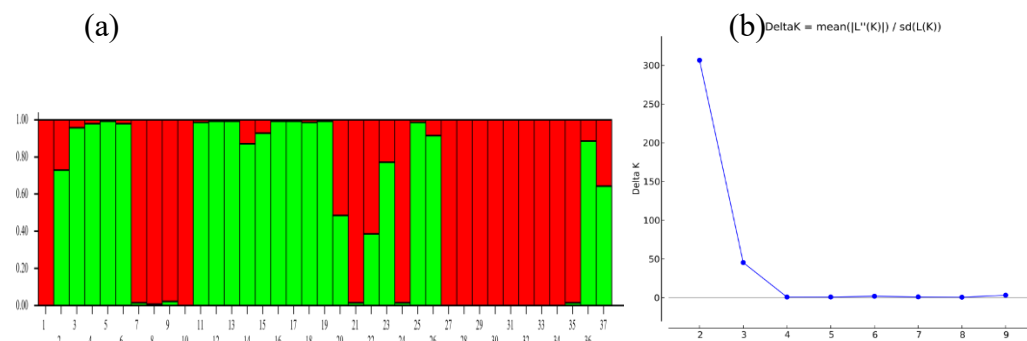
بخش مورفولوژیکی

نتایج تجزیه واریانس در هر دو شرایط محیطی (تنش و بدون تنش) حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ژنوتیپها از لحاظ کلیه صفات مورد بررسی بود، که این امر بیانگر وجود تنوع ژنتیکی زیاد بین مواد گیاهی مورد بررسی است. همچنین، معنی داری اثرات متقابل محیط و ژنوتیپ نشان دهنده واکنش متفاوت ژنوتیپهای مورد مطالعه نسبت به شرایط محیطی مختلف بود. در میان صفات مورد مطالعه، بیشترین درصد کاهش ناشی از تنش شوری در صفت میزان نسبت پتاسیم به سدیم مشاهده شد (جدول مقایسه میانگین به دلیل حجم بالا در پیوست آورده شده است) و ژنوتیپ ۶ بیشترین درصد کاهش ناشی از تنش شوری را در صفت میزان نسبت پتاسیم به سدیم از خود نشان داد (جدول مقایسه میانگین به دلیل حجم بالا در پیوست آورده شده است).

بخش مولکولی

در مطالعات ژنتیکی، ساختار جمعیت که برای توضیح روابط افراد در درون و بین جمعیتها استفاده می شود، چشم اندازی از

روابط تکاملی افراد در یک جمعیت را ارائه می دهد. در صورتی که اثر ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط در نظر گرفته نشوند، نتایج مثبت کاذب به وجود خواهد آمد (Bresseghele & Sorrells, 2006). بنا بر این، آگاهی از ساختار جمعیت به عنوان یک پیش نیاز در نقشه یابی ارتباطی را می توان به منظور اجتناب از شناسایی ارتباطات مثبت دروغین بین نشانگرها و صفات استفاده کرد (Pritchard & Donnelly, 2001). بر اساس حداکثر مقدار عددی مشاهده شده در نمودار ΔK ، تعداد دو زیرجمعیت احتمالی ($K=2$) در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس سهم عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس Q) در نظر گرفته شدند (شکل ۱-۱). بر اساس نتایج ارائه شده در بای پلات (شکل ۱-۱)، از کل ۳۷ ژنوتیپ مورد بررسی (جدول ۱) ۱۸ ژنوتیپ شامل ژنوتیپهای ۱، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۲۰، ۲۲، ۲۱، ۲۴، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴ و ۳۵ منتسب به گروه ۱ (رنگ قرمز) شدند و تعداد ۱۹ ژنوتیپ شامل ژنوتیپهای ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۳، ۲۵، ۲۶، ۳۶ و ۳۷ به گروه ۲ (رنگ سبز) منتسب شدند (شکل ۱-۱).



شکل ۱- (a) بارپلات ساختار جمعیت برای ۳۷ ژنوتیپ گندم بر اساس ۲۷ نشانگر SSR ($K=2$). هر رنگ یک زیرجمعیت یا کلاستر را نشان می دهد. اعداد روی محورهای افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر را نشان می دهند؛ (b) نمودار دلتا K

Figure 1. (a) The Barplot Population structure for 37 wheat genotypes based on 27 SSR markers ($K=2$). Each color shows a subpopulation or cluster. The numbers on the horizontal and vertical axes show the number of people and the belonging coefficient of each person to each cluster, respectively. (b) The Delta K diagram

نشانگر wmc405 متغیر بود. از نظر شاخص تنوع ژنتیکی داخل جمعیتی نیز نشانگر با متوسط 0.14 از 0.09 برای نشانگر gpw2206 تا 0.31 برای نشانگر cfd183 متغیر بود. ضریب تمایز ژنی بین جمعیتها (G_{ST}) به طور متوسط 0.25 شد که نشانگر barc353/1 با 0.48 بیشترین مقدار و نشانگر gpw345 با 0.06 کمترین مقدار را از نظر این شاخص نشان داد. مقدار جریان ژنی (N_m) به طور میانگین برابر با $1/46$ بود (جدول ۵). کمترین (0.53) و بیشترین ($74/71$) مقادیر جریان ژنی به نشانگرهای barc353/1 و gpw345 تعلق داشتند. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) محاسبه شده برای ۲۷ جفت نشانگر مورد استفاده با متوسط 0.26 از 0.10 برای نشانگر barc84 تا 0.48 برای نشانگر gwm291 متغیر بود.

برای بررسی تمایز، تشابه و تنوع ژنتیکی بین جمعیتها، شاخصهای بین جمعیتی برای تک تک نشانگرها به طور جداگانه بررسی شدند. با توجه به نتایج جدول ۴، میانگین تعداد آللهای مشاهده شده برابر $1/16$ بود که بیشترین آن با متوسط ۲ مربوط به نشانگرهای gwm249 و cfd183 و کمترین آن با متوسط ۱ مربوط به نشانگر gwm312 بودند. تعداد آللهای مؤثر نیز با متوسط $1/22$ از دامنه $1/1$ برای نشانگر gwm47 تا $1/50$ برای نشانگر cfd183 متغیر بود. شاخص شانون با متوسط 0.24 از 0.12 برای نشانگر cfd18 تا 0.47 برای نشانگر cfd183 را نشان می دهد. به منظور بررسی روابط بین جمعیتها، اولین شاخص مورد بررسی تنوع ژنتیکی بود که با میانگین 0.2 از 0.1 برای نشانگر gwm47 تا 0.42 برای

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات گیاهچه‌ای در ژنوتیپ‌های پیشرفته گندم

Table 3. Analysis of variance for seedling characteristics in advanced wheat genotypes

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	محتوای کلروفیل Chlorophyll content	طول برگ Leaf length	عرض برگ Leaf width	سطح برگ Leaf area	وزن خشک کل بیوماس Total dry matter	میزان سدیم Na ⁺	میزان پتاسیم K ⁺	نسبت پتاسیم به سدیم K ⁺ /Na ⁺
محیط Environment	1	717.30**	185.24**	2.70**	4413.91**	68.55**	48.37**	13.35**	13117.99**
خطای محیط Environmental error	4	16.79	1.3	0.03	13.88	0.03	0.004	0.10	5.17
ژنوتیپ Genotype	36	15.42**	17.82**	0.02**	18.17**	0.11**	0.31**	0.66**	49.79**
محیط × ژنوتیپ Environment × Genotype	36	6.92*	6.00**	0.016**	14.27**	0.06**	0.23**	0.45**	36.01**
خطا Error	144	4.00	0.64	0.003	1.62	0.01	0.006	0.03	4.31
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation	-	5.01	2.89	5.46	5.96	6.11	13.01	8.38	21.30

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطوح احتمال پنج درصد و یک درصد را نشان می‌دهند.

* and ** show significance at 5% and 1% levels, respectively.

جدول ۴- تعداد آل‌های مشاهده‌شده و موثر، شاخص اطلاعاتی شانون، محتوای اطلاعات چندشکلی، تنوع کل، تنوع داخل جمعیت، ضریب تمایز ژنی و جریان ژنی حاصل از ۲۷ نشانگر در ژنوتیپ‌های گندم

Table 4. The number of observed and effective alleles, Shannon's information index, polymorphic information content, total diversity, intra-population diversity, gene differentiation coefficient, and gene flow from 27 markers in wheat genotypes

نشانگر Primer	تعداد باندها No. of bands	تعداد آل‌های مشاهده شده Na ± SE	تعداد آل‌های موثر Ne ± SE	شاخص اطلاعاتی شانون I ± SE	تنوع کل H _T	تنوع داخل جمعیت H _s	ضریب تمایز ژنی بین جمعیت‌ها G _{st}	جریان ژنی Nm	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC
cfa2043	3	1.66±0.33	1.41±0.17	0.37±0.11	0.25±0.05	0.24±0.05	0.03	15.32	0.27
barc353/1	3	1.33±0.33	1.32±0.14	0.28±0.12	0.37±0.02	0.19±0.00	0.48	0.53	0.32
gwm445	4	1.50±0.32	1.30±0.11	0.30±0.09	0.20±0.04	0.19±0.03	0.07	6.56	0.26
gpw2206	7	1.14±0.27	1.13±0.04	0.16±0.05	0.13±0.02	0.90±0.008	0.27	1.30	0.21
gwm47	8	1.12±0.25	1.10±0.04	0.13±0.04	0.10±0.02	0.07±0.007	0.24	1.51	0.14
gwm294	6	1.33±0.28	1.15±0.05	0.19±0.05	0.14±0.03	0.11±0.01	0.22	1.71	0.19
gwm372	5	0.90±0.31	1.12±0.06	0.15±0.06	0.17±0.03	0.09±0.005	0.47	0.56	0.27
gwm339	5	1.40±0.30	1.18±0.07	0.22±0.06	0.18±0.03	0.13±0.01	0.29	1.21	0.24
gwm249	2	2.00±0.00	1.50±0.17	0.46±0.11	0.41±0.01	0.30±0.003	0.26	1.36	0.45
gwm95	4	1.75±0.25	1.28±0.12	0.28±0.08	0.22±0.04	0.17±0.02	0.24	1.56	0.28
gwm312	5	1.00±0.33	1.17±0.07	0.20±0.07	0.18±0.03	0.12±0.005	0.34	0.93	0.32
wmc170	5	1.40±0.30	1.19±0.06	0.24±0.06	0.18±0.03	0.14±0.01	0.21	1.83	0.24
gwm108	4	1.12±0.35	1.16±0.09	0.17±0.08	0.19±0.04	0.10±0.007	0.44	0.61	0.24
wmc326	5	1.40±0.30	1.22±0.09	0.25±0.07	0.17±0.03	0.15±0.01	0.13	3.25	0.30
wmc291	3	1.66±0.33	1.37±0.13	0.37±0.10	0.28±0.04	0.23±0.02	0.18	2.24	0.35
cfa2170a	2	1.25±0.47	1.35±0.20	0.30±0.17	0.34±0.02	0.20±0.00	0.39	0.75	0.36
cfa2170b	3	1.66±0.33	1.44±0.11	0.43±0.09	0.29±0.01	0.28±0.01	0.04	11.03	0.41
wmc687	6	1.16±0.29	1.15±0.05	0.19±0.05	0.14±0.03	0.11±0.01	0.22	1.76	0.22
barc84	2	1.25±0.47	1.22±0.18	0.21±0.14	0.16±0.02	0.13±0.01	0.16	2.49	0.10
gwm194	3	1.66±0.33	1.32±0.10	0.34±0.09	0.26±0.04	0.21±0.02	0.17	2.34	0.30
gpw345	4	1.25±0.36	1.34±0.13	0.30±0.10	0.20±0.05	0.20±0.05	0.006	74.71	0.33
cfid9	6	1.33±0.28	1.15±0.05	0.19±0.05	0.14±0.03	0.11±0.01	0.23	1.60	0.20
cfid18	7	1.07±0.26	1.08±0.03	0.12±0.04	0.11±0.02	0.06±0.002	0.43	0.65	0.15
cfid183	2	2.00±0.00	1.50±0.15	0.47±0.11	0.37±0.02	0.31±0.01	0.17	2.34	0.39
wmc405	2	1.50±0.50	1.47±0.17	0.42±0.14	0.33±0.04	0.28±0.03	0.15	2.68	0.33
gwm291	2	1.50±0.50	1.46±0.25	0.36±0.17	0.42±0.01	0.24±0.00	0.41	0.70	0.48
gwm410	3	1.16±0.40	1.20±0.12	0.21±0.10	0.22±0.04	0.13±0.005	0.37	0.82	0.25
میانگین Mean	37	1.16±0.40	1.22±0.01	0.24±0.01	0.20±0.03	0.14±0.01	0.25	1.46	0.26

برای بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها، میانگین
تعداد آل‌های موثر (Ne)، تنوع ژنی نی (H)، و شاخص شانون
شاخص‌های درون جمعیتی شامل آل‌های مشاهده شده (Na)،
(I) برای جمعیت‌های مورد بررسی محاسبه گردیدند (جدول ۵).

جدول ۵- شاخص‌های تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی

Table 5. Genetic diversity indices of the studied wheat genotypes

شاخص‌ها Indexes	جمعیت ۱ Population 1	جمعیت ۲ Population 2	میانگین Mean
تعداد آل‌های مشاهده شده $Na \pm SE$	0.81	1.83	1.16
تعداد آل‌های موثر $Ne \pm SE$	1.15	1.30	1.22
تنوع ژنی نی $h \pm SE$	0.09	0.20	0.20
شاخص شانون $I \pm SE$	0.14	0.33	0.24
تعداد باندهای چند شکل Number of polymorphic bands	636	512	987.5
درصد چندشکلی Polymorphic percentage	36.94%	91.89%	64.41

ژنوتیپ موجود، ۱۰ رقم تجاری و نه لاین امیدبخش دارد؛ در واقع، ۵۳ درصد دارای رقم تجاری است (جدول ۶).
بر مبنای مؤلفه‌های اصلی، پنج مؤلفه اصلی بر اساس مقادیر ویژه انتخاب شدند (جدول ۷). نمودار بای پلات بر اساس این مؤلفه‌ها ترسیم شد (شکل ۲) که با توجه به این نمودار تنوع زیادی در پراکنش افراد جمعیت‌ها وجود دارد و ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت‌ها در چهار ناحیه‌ی نمودار پراکنده شده‌اند. اما به‌طور کلی، اکثر ژنوتیپ‌های جمعیت ۲ در ناحیه پایین سمت راست قرار دارند. با توجه به نمودار دو بعدی، آن ژنوتیپ‌هایی که شباهت زیادی به هم داشتند در یک گروه قرار گرفتند.

با توجه به این که بخشی از تنوع بین جمعیتی ناشی از تنوع درون جمعیت‌ها است، با حذف تنوع درون جمعیتی تنوع واقعی بین جمعیت‌ها برابر ۶/۸۰۲ محاسبه شد که حدود ۳۹ درصد از تنوع کل را شامل می‌شود. با توجه به این که در سطح احتمال ۰/۰۰۱ تنوع بین جمعیت‌ها معنی‌دار شده است، پس تمایز بین جمعیت‌ها خیلی زیاد است در واقع این دو زیرجمعیت تمایز ژنتیکی بالایی با هم دارند. زیرجمعیت اول از ۱۸ ژنوتیپ موجود، چهار رقم تجاری و ۱۴ لاین امیدبخش دارد؛ در واقع، ۷۸ درصد شامل لاین امیدبخش است. زیرجمعیت دوم از ۱۹

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای تنوع بین و درون جمعیت‌های ژنوتیپ‌های گندم

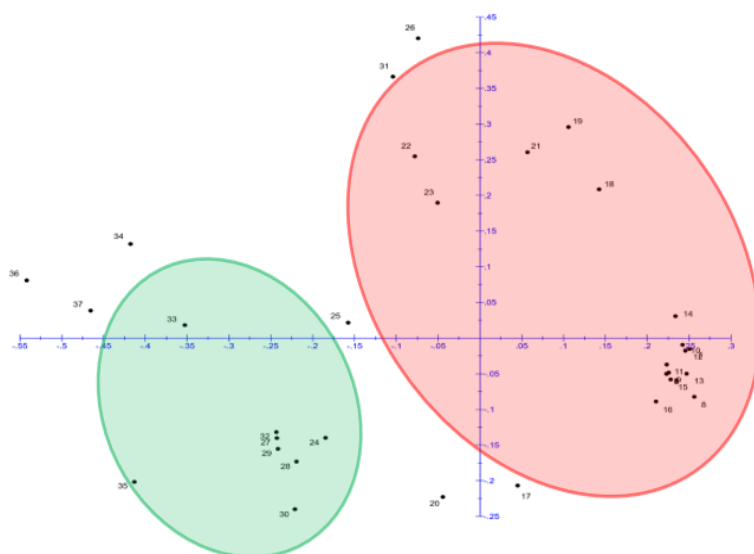
Table 6. The molecular analysis of variance (AMOVA) for diversity between and within populations of wheat genotypes

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات MS	واریانس برآورد شده Est. Var.	%	PhiPT Value	PhiPT Prob
بین جمعیت‌ها Between populations	1	136.316	6.802	39%	0.392	0.001
درون جمعیت‌ها Within populations	35	10.562	10.562	61%		
کل Total	36		17.365	100%		

جدول ۷- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای نشانگرهای مورد بررسی بر اساس داروین

Table 7. Analysis to principal components for the studied markers based on Darwin

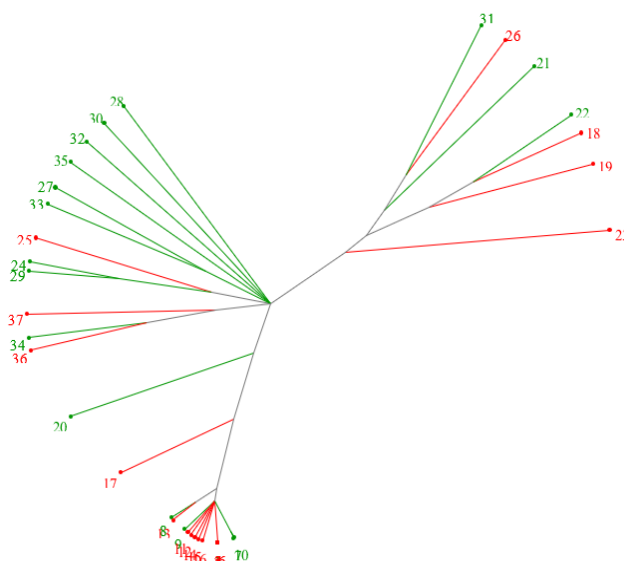
شاخص تشابه Similarity index	مؤلفه ۱ Component 1	مؤلفه ۲ Component 2	مؤلفه ۳ Component 3	مؤلفه ۴ Component 4	مؤلفه ۵ Component 5
مقادیر ویژه Special values	0.06	0.026	0.014	0.013	0.012
سهم تجمعی Cumulative share	31.08	13.62	7.59	7.00	6.26



شکل ۲- نمودار دویعدی تجزیه به مولفه‌های اصلی براساس ۳۷ ژنوتیپ گندم
Figure 2. The biplot diagram of principal component analysis based on 37 wheat genotypes

338cb/Iandrace, Alvd//Aldan/Ias 58/3/Kvr
که (Sorkhtokhm و Soissons/Kvr, Mahooti, Berkut
به جز ژنوتیپ ۱ همگی در جمعیت دوم قرار گرفته‌اند و نزدیکی
زیادی با هم دارند. همچنین، از بین این شش ژنوتیپ، سه
ژنوتیپ جزو لاین امیدبخش هستند.

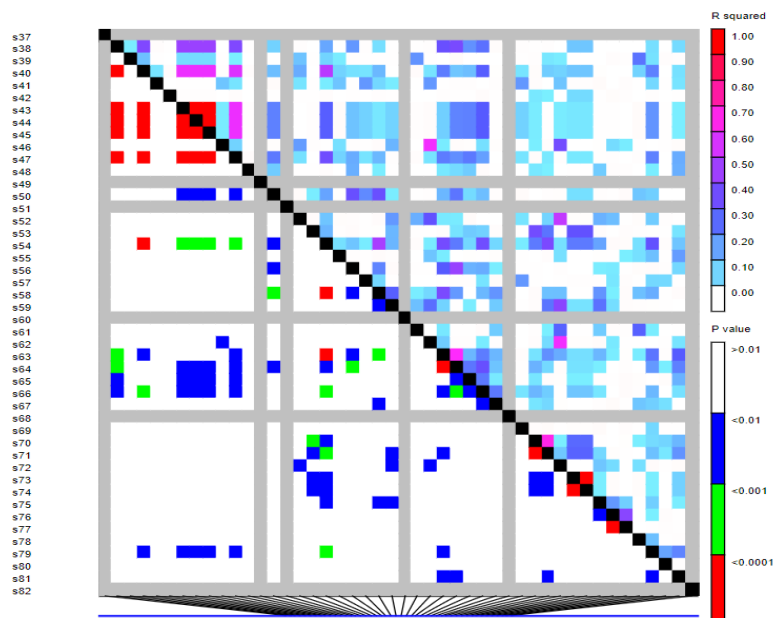
بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای (شکل ۳)، ژنوتیپ‌های ۳۱،
۲۶، ۲۱، ۲۲، ۱۸، ۱۹ و ۲۳ که در سمت راست نمودار در یک
جا تجمع یافته‌اند همگی مربوط به لاین‌های امیدبخش هستند.
همچنین، ژنوتیپ‌های سمت پایین شکل ۳ که نزدیکی زیادی
به هم دارند همگی جز لاین‌های امیدبخش محسوب می‌شوند.
ژنوتیپ‌های ۱ تا ۶ نزدیکی زیادی با هم دارند (که به ترتیب



شکل ۳- نمودار تجزیه خوشه‌ای ۳۷ ژنوتیپ گندم بر اساس الگوریتم UPGMA
Figure 3. The cluster analysis diagram of 37 wheat genotypes based on the UPGMA algorithm

که مقیاس‌بندی سمت راست شکل نشان می‌دهد، رنگ قرمز به معنی عدم تعادل پیوستگی مطلق و رنگ سفید به معنی تعادل پیوستگی است. رنگ قرمز در پایین معنی‌داری عدم تعادل پیوستگی در سطح کمتر از ۰/۰۰۰۱ و رنگ سفید معنی‌داری را در سطح ۰/۰۱ نشان می‌دهند.

در نقشه‌یابی ارتباطی که مکان‌یابی QTLها بر اساس عدم تعادل پیوستگی صورت می‌گیرد، علاوه بر ترکیب ساختار جمعیت، عدم تعادل پیوستگی (LD) در ژنوم نیز از اهمیت بسیاری برخوردار است (Al-Maskri *et al.*, 2012). ماتریس قطری عدم تعادل بین جایگاه‌های ژنی ترسیم شده است، که دو طرف آن را نشانگرها تشکیل می‌دهند (شکل ۴).



شکل ۴- پلات عدم تعادل پیوستگی. بالای قطر میزان عدم تعادل لینکازی و پایین قطر P-value را برای جفت نشانگرها نشان می‌دهند.
Figure 4. Linkage imbalance plot. The upper diameter indicates the degree of linkage imbalance and the lower diameter indicates the P-value for the pair of markers.

با نشانگرهای مرتبط با دفع سدیم در مطالعه لیندسی و همکاران (Lindsay *et al.*, 2004) منطبق هستند. در مطالعه ساردوئی نسب و همکاران (Sardouie-Nasab *et al.*, 2013) نیز نشانگر gwm312 به‌همراه نشانگر barc353.1 به‌عنوان نشانگرهای مناسب برای تحمل به تنش شوری شناسایی شدند. در مطالعه گنس و همکاران (Genc *et al.*, 2010)، نشانگرهای مرتبط با تولید بیوماس و دفع سدیم تحت شرایط تنش شوری روی کروموزوم‌های 2A، 6A و 7A شناسایی شدند. در مطالعه حاضر نیز چهار نشانگر مرتبط با میزان سدیم در کروموزوم 2A شناسایی شدند. البته یائو و همکاران (Yao *et al.*, 2009) در بررسی مکان‌های کنترل‌کننده صفات زراعی در گندم، ۱۴ ارتباط نشانگر-صفت با صفات زراعی مهم را در کروموزوم 2A شناسایی کردند.

در حالت کلی، می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به جدول MLM در شرایط بدون تنش (جدول ۸)، صفت وزن خشک کل بیوماس دارای بیشترین تعداد نشانگر بود که نشانگر cfa2170a بیشتر از بقیه تکرار شده است و در شرایط تنش شوری (جدول ۹) صفات میزان سدیم و نسبت میزان پتاسیم به سدیم دارای تعداد بیشتر نشانگر هستند که نشانگرهای gwm108 و gwm47 در هر دو مشترک‌اند.

تجزیه ارتباط و مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات فنوتیپی نیز دارای کاربردهای متعددی از جمله امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی، تسهیل مکان‌یابی دقیق QTLها و تأیید ژن‌های کاندیدای مسئول صفات کمی است. تعداد زیرگروه‌ها و ماتریس Q توسط نرم‌افزار Structure و با استفاده از داده‌های مولکولی محاسبه شدند. داده‌های حاصل وارد نرم‌افزار Tassel شدند و ارتباط بین صفات و داده‌های مولکولی با استفاده از MLM بررسی شد. برای به‌دست آوردن سطح معنی‌داری از ۱۰۰ جایگشت استفاده شد.

شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش همزمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند (Tuberosa *et al.*, 2002). همچنین بر اساس نتایج ارائه شده، می‌توان اظهار داشت که ارتباط چند نشانگر با یک صفت خاص حاکی از ماهیت توارث کمی و چندژنی صفات مورد ارزیابی است. با توجه به نتایج جدول MLM در شرایط بدون تنش (جدول ۸)، ۲۹ مکان ارتباط معنی‌داری با صفات مورد مطالعه و در شرایط تنش شوری (جدول ۹) ۳۰ مکان ارتباط معنی‌داری با صفات داشتند. در تحقیق حاضر، در مجموع شش نشانگر در ارتباط با صفت میزان سدیم در شرایط تنش شوری شناسایی شدند که نشانگرهای gwm249 و gwm312

جدول ۸- نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های گندم تحت شرایط بدون تنش بر اساس MLM
 Table 8. Continuous markers with the studied traits in wheat genotypes under normal conditions based on MLM

ضریب تبیین R^2 Adjusted R-squared	مقدار P P-value	MAF	مکان کروموزومی Chromosomal location	نشانگر Marker	صفات Traits
0.235	0.006	0.02	2A	gwm445-4	سطح کلروفیل Chlorophyll level
0.191	0.013	0.32	3A/3B	cfa2170b-3	
0.114	0.05	0.05	2A	gpw2206-7	
0.114	0.05	0.05	2A,2D	wmc170-3	
0.114	0.05	0.24	2A/2B	cfa2043-1	
0.171	0.018	0.10	2A	gwm445-3	طول برگ Leaf length
0.146	0.028	0.21	2A	gpw2206-6	عرض برگ Leaf width
0.249	0.005	0.02	2AL	barc353.1-2	
0.175	0.017	0.02	2A	gwm294-5	
0.119	0.046	0.24	3A/3B	cfa2170a-1	
0.119	0.046	0.24	3A/3B	cfa2170a-2	
0.146	0.028	0.10	2A	gwm445-3	سطح برگ Leaf area
0.132	0.036	0.02	2AL	barc353.1-2	
0.123	0.042	0.21	2A	gwm445-2	
0.173	0.017	0.08	2A/2B	gwm47-5	وزن خشک کل بیوماس TDM
0.140	0.031	0.02	5A/2B	gwm410-2	
0.135	0.034	0.02	2AL	barc353.1-2	
0.133	0.035	0.24	3A/3B	cfa2170a-1	
0.118	0.035	0.24	3A/3B	cfa2170a-2	
0.116	0.047	0.10	2A	gwm445-3	
0.083	0.048	0.02	2A	gwm294-5	
0.121	0.044	0.24	2A/2B	cfa2043-1	میزان سدیم Na
0.207	0.010	0.27	2A/2B	cfa2043-2	میزان پتاسیم K
0.202	0.011	0.24	2A/2B	cfa2043-1	
0.190	0.013	0.37	4D	gpw345-2	
0.186	0.014	0.40	4D	gpw345-3	
0.168	0.019	0.24	2A/2B	cfa2043-1	نسبت میزان پتاسیم به سدیم K^+/Na^+
0.160	0.022	0.45	2A	gpw2206-1	
0.124	0.041	0.27	2A/2B	cfa2043-2	

جدول ۹- نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های گندم تحت تنش بر اساس MLM

Table 9. Continuous markers with the studied traits in stressed wheat genotypes based on MLM

صفات Traits	نشانگر Marker	مکان کروموزومی Chromosomal location	MAF	مقدار P-value	ضریب تبیین Adjusted R-squared
سطح کلروفیل Chlorophyll level	gwm291-2	5A	0.4	0.037	0.128
طول برگ Leaf length	gpw2206-3	2A	0.10	0.010	0.201
	gwm95-2	2A	0.08	0.018	0.166
	gwm95-3	2A	0.45	0.019	0.164
	gwm410-1	5A/2B	0.08	0.047	0.114
	cfa2043-3	2A/2B	0.02	0.048	0.113
عرض برگ Leaf width	cfid18-6	5D	0.35	0.015	0.18
سطح برگ Leaf area	gwm339-2	2A	0.10	0.029	0.139
	gpw2206-3	2A	0.10	0.032	0.135
	gwm410-1	5A/2B	0.08	0.047	0.115
	cfid183-1	5D	0.27	0.049	0.112
	cfid183-2	5D	0.27	0.049	0.112
وزن خشک کل بیوماس TDM	gwm194-2	4D	0.29	0.034	0.131
میزان سدیم Na	gpw345-2	4D	0.37	0.040	0.123
	gpw2206-3	2A	0.10	0.016	0.175
	gwm108-3	3B	0.32	0.028	0.146
	gwm108-4	3B	0.24	0.030	0.142
	gwm47-5	2A/2B	0.08	0.033	0.136
	gwm294-6	2A	0.05	0.041	0.124
	gwm312-1	2A	0.18	0.041	0.124
	gwm47-3	2A/2B	0.02	0.012	0.196
میزان پتاسیم K	cfid18-7	5D	0.02	0.012	0.196
	gpw2206-4	2A	0.05	0.028	0.146
	cfid9-3	3D	0.08	0.042	0.123
نسبت میزان پتاسیم به سدیم K ⁺ /Na ⁺	gwm108-3	3B	0.32	0.015	0.179
	gwm47-3	2A/2B	0.02	0.022	0.159
	cfid18-7	5D	0.02	0.022	0.157
	gwm108-4	3B	0.24	0.024	0.152
	gwm339-2	2A	0.10	0.031	0.137
	gpw2206-3	2A	0.10	0.05	0.112

نتیجه گیری کلی

می‌تواند چندشکلی بالایی را آشکار سازند و از این رو روش مفیدی برای انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌ها، دسته‌بندی آنها و گزینش نشانگری است و از این نشانگر می‌توان در مطالعات تنوع ژنتیکی گندم استفاده کرد. نشانگر gwm291 با داشتن بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی در این مطالعه به‌عنوان بهترین نشانگر برای آنالیز ژنتیکی شناسایی شد، ولی نشانگر barc84 دارای کمترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی بود. نشانگر gpw345 با صفت بیوماس کل در شرایط تنش و با افزایش میزان پتاسیم در شرایط بدون تنش و نشانگرهای gwm108 و gwm47 با صفات میزان سدیم و نسبت میزان پتاسیم به سدیم ارتباط بالایی را نشان دادند که می‌توان از آنها در شناسایی نمونه‌های متحمل به تنش شوری استفاده کرد.

تجزیه ساختار ژنتیکی نشان داد که تعداد خوشه‌هایی که پارامتر ΔK را به حداکثر خود می‌رساند برابر با ۲ است. دو زیرجمعیت احتمالی ($K=2$) در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس در نظر گرفته شدند. بر اساس نتایج ارائه شده، ۱۸ ژنوتیپ در زیرجمعیت اول و ۱۹ ژنوتیپ در زیرجمعیت دوم قرار گرفتند. نتایج بخش مولکولی بیانگر این بود که انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی یک راه سریع در برنامه‌های اصلاحی است و اطلاعات ژنتیکی بدست آمده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی نقش بسزایی دارد. بنا بر این، برای انتخاب ژنوتیپ برتر با ارزش بالا، نشانگرهای ریزماهواره

References:

- Aghaali, Z., Darvishzadeh, R., & Goodarzi, F. (2016). Association analysis of morphological traits in castor (*Ricinus communis* L.) by using ISSR markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 24(1), 79-91.
- Akbarpour, O., & Dehghani, H. (2017). Genetic dissection of grain yield and some morphological traits in Iranian bread wheat under field normal and salt stress conditions using JinksHayman approach. *Cereal Research*, 7(2), 155-169. [In Persian]
- Alipour, H., Bihamta, M.R., Mohammadi, V., Peyghambari, S.A., Bai, G., & Zhang, G. (2017). Genotyping-by-sequencing (GBS) revealed molecular genetic diversity of Iranian wheat landraces and cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1293.
- Al-Maskri, A.Y., Sajjad, M., & S.H. Khan, S.H. (2012). Association Mapping: A Step Forward to Discovering New Alleles for Crop Improvement. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14(1).

- Bresegheello, F., & M.E. Sorrells, M.E. (2006). Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*, 172(2), 1165-1177
- Chambers, G.K., & MacAvoy, E.S. (2002). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 126, 455-476.
- El-Hendawy, S.E., Hu, Y., Yakout, G.M., Awad, A.M., Hafiz, S.E., & Schmidhalter, U. (2005). Evaluating salt tolerance of wheat genotypes using multiple parameters. *European Journal of Agronomy*, 22(3), 243-253.
- Genc, Y., Oldach, K., Verbyla, A.P., & Lott, G. (2010). Sodium exclusion QTL associated with improved seedling growth in bread wheat under salinity stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 877-894.
- Ghaedrahmati, M., Mardi, M., Naghavi, M.R., Majidi Haravan, E., Nakhoda, B., Azadi, A., & Kazemi, M. (2018). Mapping QTLs associated with salt tolerance related traits in seedling stage of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16, 1413-1428.
- Gougerdchi, V., Dezhsetan, S., Izadi Dogonchi, M., Ebrahimi, M.A., Asghari, A., & Sadeghzadeh, B. (2017). Assessment of genetic diversity and association analysis for phenological traits related to drought escape in barley lines using microsatellite markers. *Journal of Crop Breeding*, 8(20), 69-60. [In Persian]
- Gupta, P., Balyan, H. S., Edwards, K. J., Isaac, P., Korzun, V., Röder, M. S., ... & Leroy, P. (2002). Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 413-422.
- Guyomar'h, H., Sourdille, P., Charmet, G., Edwards, K. J. K. J., & Bernard, M. (2002). Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 1164-1172.
- Hoshyardel, F., Darvishzadeh, R., Basirnia, A., & Hatami-Maleki, H. (2014). Association Mapping of Agronomic Traits in Oriental Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Genotypes. *Journal of Plant Breeding*, 8, 134-143.
- Ilyas, N., Amjid, M.W., Saleem, M.A., Khan, W., Wattoo, F.M., Rana, R.M., Maqsood, R.H., Zahid, A., Shah, G.A., Anwar, A., & Ahmad, M.Q. (2020). Quantitative trait loci (QTL) mapping for physiological and biochemical attributes in a Pasban90/Frontana recombinant inbred lines (RILs) population of wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress condition. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1), 341-351.
- Lindsay, M.P., Lagudah, E.S., Hare, R.A., & Munns, R. (2004). A locus for sodium exclusion (*Nax1*), a trait for salt tolerance, mapped in durum wheat. *Functional Plant Biology*, 31(11), 1105-1114.
- Maluszynski, M., & Kasha, K.J. (2002). Mutations in vitro and molecular techniques for environmentally sustainable crop improvement. Kluwer Academic Publishers.
- Pestsova, E., Korzun, V., Goncharov, N. P., Hammer, K., Ganal, M. W., & Röder, M. S. (2000). Microsatellite analysis of *Aegilops tauschii* germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 100-106.
- Rahimi Jarihani, L., & Abdollahi Mandoulakani, B. (2021). Expression pattern of catalase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase encoding genes under soil Zn deficiency in bread wheat. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(1), 40-51. [In Persian]
- Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., & Ganal, M. W. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149(4), 2007-2023.
- Saghai-Maroo, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., & Allard, R.W.L. (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.
- Sardouie-Nasab S., Mohammadi-Nejad, Gh., & Nakhoda, B. (2013). Assessing genetic diversity of promising wheat (*Triticum aestivum* L.) lines using microsatellite markers linked with salinity tolerance. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 1(2), 28-39.
- Sofalian, O., Salmani-Samadi, R., Asghari, A., Shokrpour, M., Sedghi, M., Firoozi, B., & Ahmadpoor, F. (2013). Evaluation of salinity tolerance in wheat varieties and its relation with Molecular markers. *Applied Crop Breeding*, 1(2), 161-174. [In Persian]
- Song, Q. J., Fickus, E. W., & Cregan, P. B. (2002). Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 286-293.
- Song, Q. J., Shi, J. R., Singh, S., Fickus, E. W., Costa, J. M., Lewis, J., Gill, B. S., Ward, R. & Cregan, P. (2005). Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and applied genetics*, 110, 550-560.
- Sourdille, P., Cadalen, T., Guyomar'h, H., Snape, J. W. J. W., Perretant, M. R. M. R., Charmet, G., ... & Bernard, M. (2003). An update of the Courtot× Chinese Spring intervarietal molecular marker linkage map for the QTL detection of agronomic traits in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 530-538.
- Tuberosa, R., Gill, B.S., & Quarrie, S.A. (2002). Cereal genomics: Ushering in a brave new world. *Plant Molecular Biology*, 48(5), 445-449.
- Pritchard, J.K., & Donnelly, P. (2001). Case-control studies of association in structured or admixed populations. *Theoretical Population Biology*, 60(3), 227-23.

- Yao, J., Wang, L., Liu, L., Zhao, C., & Zheng, Y. (2009). Association mapping of agronomic traits on chromosome 2A of wheat. *Genetica*, 137(1), 67-75.
- Zare Kohan, M., Babaeian Jelodar, N., Aghnoum, R., Tabatabaee, S.A., & Kazemi Tabar, S.K. (2018). Association mapping of some phenological traits in barley under salt stress. *Journal of Crop Breeding*, 10(26), 12-21. [In Persian]
- Zhang, Z.B., Xu, P., Jia, J.Z., & Zhou. R.H. (2010). Quantitative Trait Loci for Leaf Chlorophyll Fluorescence Traits in Wheat. *Australian Journal of Crop Science*, 4, 571-579.