



مطالعه تنوع هاپلوتایپی و ارتباط آلل‌های ریزماهواره واقع بر کروموزوم 4B گندم نان با برخی صفات زراعی

عادلہ ابری^۱، خلیل زینلی نژاد^۲، مهران علمی^۳ و سعید باقری کیا^۴

- ۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
 - ۲- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران، (نویسنده مسوول: khalil1381@yahoo.com)
 - ۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
 - ۴- استادیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران
- تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱/۱۶
صفحه: ۱ تا ۱۴

چکیده

هدف از این پژوهش تعیین گروه‌های هاپلوتایپی و بررسی رابطه آن‌ها با صفات فنوتیپی به منظور دستیابی به آلل‌های مرتبط با صفات مطلوب زراعی در گندم نان بود. به همین منظور ۳۴ ژنوتیپ گندم بومی منطقه خاورمیانه به همراه رقم بهاره چینی (ژنوتیپ مرجع) در قالب طرح اگمنت کشت و از نظر ۱۲ صفت فنوتیپی کمی ارزیابی شدند. نتایج آمار توصیفی نشان داد که صفات طول ریشک و روز تا گلدهی به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین ضریب تغییرات فنوتیپی را داشتند. به منظور بررسی تنوع هاپلوتایپی QTL‌های مرتبط با صفات فنوتیپی واقع بر کروموزوم‌های 4B گندم از ۱۰ نشانگر ریزماهواره استفاده شد. میانگین آلل‌های چند شکل، میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص قدرت (RP) به ترتیب ۰/۲۹، ۴/۵ و ۱/۵۸ بود. ژنوتیپ‌های مورد بررسی با توجه به مطابقت آللی با ژنوتیپ مرجع در کروموزوم 4B در ۲۱ گروه هاپلوتایپی قرار گرفتند. به منظور بررسی وجود ارتباط بین صفات و نشانگرها، تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی با تکرار نامساوی برای تک تک نشانگرها انجام شد. در مجموع از ۱۲ صفت مورد بررسی، برای چهار صفت ارتباط معنی‌دار آماری مشاهده شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از نشانگرهای ریزماهواره واقع بر کروموزوم 4B، صفات عرض دانه، تعداد دانه در سنبله و عرض برگ پرچم با نشانگر *Xgwm888-4B*، صفت تعداد سنبله در سنبله با نشانگر *Xgwm891-4B* و صفات عرض دانه و تعداد دانه در سنبله با نشانگر *Xgwm898-4B* پیوستگی نشان دادند. برای سه صفت فنوتیپی به‌طور همزمان یک آلل اختصاصی در نشانگر *gwm888-4B* معرفی گردید. چنانچه به‌نژادگر علاقمند به گزینش ژنوتیپ‌هایی باشد که به‌طور همزمان سه حالت مطلوب یعنی عرض دانه و تعداد دانه در سنبله بیشتر و همچنین افزایش شاخص سطح برگ از طریق عرض برگ پرچم را داشته باشند، می‌تواند از آلل اختصاصی شناسایی شده (۱۹۹ جفت باز) نشانگر *Xgwm888-4B* استفاده کند.

واژه‌های کلیدی: صفات فنوتیپی، انتخاب به کمک نشانگر، آلل اختصاصی، گندم بومی

مقدمه

گندم از نظر ژن‌های مقاومت به بیماری استفاده شده است (۲۶،۴۴).

در گندم نان، نقشه‌یابی QTL برای صفات زراعی مهم شامل عملکرد و اجزای آن، کیفیت، مقاومت به بیماری‌ها و زمان گلدهی انجام شده است (۱،۳۸،۴۵). روی کروموزوم 4B گندم، QTL‌های خوبی در ارتباط با اندازه دانه شناسایی شده است (۳۱). QTL‌های مربوط به طول دانه روی بازوی بلند (۳،۴۲) و QTL‌های مربوط به عرض دانه روی بازوی کوتاه کروموزوم 4B گندم بوده‌اند (۳۵). همچنین در کروموزوم 4B، QTL‌های مرتبط با خواب بذر شناسایی شده‌اند (۲۱).

یکی از برنامه‌های تحقیقاتی بعد از شناسایی این QTL‌ها، بررسی تنوع آللی نشانگرهای مولکولی در منطقه مورد نظر روی ژنوتیپ‌های مختلف به منظور یافتن آلل‌های اختصاصی می‌باشد (۴۳). از این اطلاعات می‌توان برای ساخت تمامی ترکیبات آللی ممکن در آن منطقه یا هاپلوتایپینگ استفاده نمود. به عبارت دیگر هاپلوتایپینگ رابطه بین ترکیبات مختلف آللی ایجاد شده توسط چندین نشانگر را با QTL‌های مرتبط با صفت مورد نظر را بررسی می‌کند (۲۶).

مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی دارای کاربردهای متعددی است که از جمله آنها می‌توان به

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی (QTL) یکی از روش‌هایی است که در دو دهه اخیر برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش تفرق همزمان صفت کمی و نشانگرهای مولکولی بررسی می‌شود و مکان QTL‌ها روی ژنوم شناسایی می‌گردد و در نهایت تعداد ژن‌ها، نوع عمل آن‌ها و میزان اثر هر یک برآورد می‌شود (۴۱). نشانگرهای ریزماهواره یا توالی‌های ساده تکراری به دلیل پلی‌مورفیسم بالا، هم‌باز بودن، مکان کروموزومی مشخص، قرار گرفتن در نواحی رمز نشونده ژنوم، سادگی و هزینه نسبتاً پایین، کاربرد بسیار زیادی را در تهیه نقشه‌های لینکازی پیدا کرده‌اند (۱۸،۲۷). همچنین نشانگرهای ریزماهواره و تنوع هاپلوتایپی آن‌ها برای تشخیص واریته‌های گندم مفید بوده‌اند (۳۷). به طوری که با استفاده از مجموعه‌ای از ۱۰ جفت نشانگر ریزماهواره تنوع هاپلوتایپی ۱۰۵ رقم گندم به‌طور واضح و مشخص تعیین شده است (۲۵). در مطالعه دیگری تنوع هاپلوتایپی ارقام رایج گندم نان در سه کشور اروپایی (مجارستان، اتریش و آلمان) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره به خوبی تشخیص داده شده است (۲۴). همچنین از این روش برای شناسایی تنوع ژرم پلاسما

ژنوتیپ‌ها گزینش شدند. از ارقام گندم نان تجاری رایج منطقه گرگان شامل گنبد، دریا، کوه‌دشت و مروارید به عنوان ارقام شاهد طرح آگمنت استفاده شد. ارقام مذکور در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با نه تکرار به منظور برآورد خطای آزمایشی کشت شدند. هر ژنوتیپ روی یک خط به طول یک و نیم متر و با فاصله پنج سانتی‌متری بوته‌ها از یکدیگر روی ردیف کشت گردید. عملیات تهیه زمین شامل یک شخم عمیق و دیسک بود. مراقبت‌های زراعی لازم طبق روش مرسوم منطقه انجام شد. برای از بین بردن علف‌های هرز پهن برگ و باریک برگ به ترتیب از علفکش‌های گرانستار و پوماسوپر در مرحله پنجه‌زنی و قبل از ساقه رفتن استفاده شد. عملیات وجین نیز دو بار به صورت دستی انجام شد.

اندازه‌گیری صفات فنوتیپی

در این مطالعه ۱۲ صفت کمی اندازه‌گیری و سه صفت کیفی ثبت شد. صفات کمی شامل روز تا گرده افشانی، ارتفاع گیاه، طول ریشک، تعداد دانه در سنبله، تعداد سنبله در سنبله، طول پدانکل، طول برگ پرچم، عرض برگ پرچم، طول سنبله، وزن ۱۰۰ دانه، طول دانه و عرض دانه بود. صفت روز تا گلدهی بر اساس تعداد روز از زمان کاشت تا زمان گرده افشانی ثبت شد. زمان گرده افشانی با مشاهده بیرون آمدن بساک‌ها از گلچه‌ها در زمان به گل رفتن در ۵۰ درصد سنبله ثبت شد. یادداشت‌برداری‌ها به صورت روزانه از خطوطی که به گل رفته بودند انجام شد. اندازه‌گیری ارتفاع بوته‌ها در زمان سفت شدن دانه‌ها انجام گرفت و طول ساقه اصلی از سطح زمین تا انتهای سنبله بدون در نظر گرفتن ریشک اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری عرض دانه و طول دانه به وسیله کولیس انجام شد.

استخراج DNA و نشانگرها

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های سبز و جوان گیاه در مرحله چهار یا پنج برگی با استفاده از روش CTAB با اندکی تغییر انجام شد (۱۰).

امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی، ردیابی آلل‌های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرم پلاسسم، تسهیل مکان‌یابی خیلی دقیق QTL‌ها و تأیید ژن‌های کاندیدای مسئول صفات کمی اشاره کرد (۱۵). بر همین اساس نیز مطالعات مختلفی در جهت ارزیابی تنوع آللی و تعیین گروه‌های هاپلوتایپی در گندم صورت پذیرفته است (۵،۷،۱۶،۲۶،۳۷،۴۸).

هدف از این پژوهش تعیین گروه‌های هاپلوتایپی و شناسایی ارتباط آلل‌های واقع بر کروموزوم 4B گندم نان با صفات مطلوب زراعی در یک جمعیت از ژنوتیپ‌های بومی گندم نان منطقه خاورمیانه بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طرح آزمایشی

این آزمایش با ۳۵ ژنوتیپ گندم نان بومی منطقه خاورمیانه شامل کشورهای ایران، عراق، ترکیه، آذربایجان، افغانستان، پاکستان و ترکیه انجام شد (جدول ۱). برخی از این ژنوتیپ‌های بومی حدود نیم قرن پیش توسط محققین آلمانی از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری و در بانک ژن موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی^۱ (IPK) در کشور آلمان نگهداری می‌شدند. سایر ژنوتیپ‌ها از مرکز بین‌المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک^۲ (ICARDA) دریافت شد. در این پژوهش از رقم بهاره چینی نیز که دارای آلل‌های مشخص برای نشانگرهای ریزوماهواره مورد نظر در این تحقیق بود، به عنوان ژنوتیپ مرجع و به منظور تأیید آلل‌های مورد مطالعه استفاده شد (جدول ۱).

ژنوتیپ‌های مورد نظر در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در بهمن ماه سال ۱۳۹۴ در کنار ۷۵۰ ژنوتیپ دیگر بر اساس طرح آگمنت کشت شده بودند. در واقع ژنوتیپ‌های استفاده شده در این پژوهش بر اساس وجود بیشترین تنوع مکانی و مورفولوژیکی از بین سایر

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های بومی گندم نان مطابق بانک ژن - موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی آلمان و ایکاردا
Table 1. Characteristics of local bread wheat genotypes, according to IPK-Gatersleben and ICARDA gene banks

کشور	نام ژنوتیپ در بانک ژن	شماره ژنوتیپ در کلکسیون اختصاصی	شماره ژنوتیپ
Turkey	ATRI 2200	۴۸	۱
Turkey	ATRI 2202	۴۹	۲
Turkey	ATRI 2203	۵۰	۳
Turkey	ATRI 2205	۵۱	۴
Turkey	ATRI 22076	۵۶	۵
Turkey	ATRI 3315	۱۵۹	۶
Iran	ATRI 5938	۲۲۹	۷
Iran	ATRI 5980	۲۳۷	۸
Iran	ATRI 6005	۲۴۰	۹
Iran	ATRI 6047	۲۴۳	۱۰
Iran	ATRI 6084	۲۴۶	۱۱
Iran	ATRI 6119	۲۴۹	۱۲
Iran	ATRI 6190	۲۵۲	۱۳
Iran	ATRI 6274	۲۵۵	۱۴
Iraq	ATRI 10440	۳۳۹	۱۵
Iraq	ATRI 11530	۳۴۵	۱۶
Iraq	ATRI 15295	۳۵۱	۱۷
Iraq	ATRI 16081	۳۶۱	۱۸
Iraq	ATRI 16084	۳۶۲	۱۹
Pakistan	ATRI 19262	۳۹۱	۲۰
Pakistan	ATRI 28703	۴۰۰	۲۱
Pakistan	ATRI 28749	۴۰۵	۲۲
Chinese Spring*	ATRI 12922	۵۳۷	۲۳
Afghanistan	ICBW 138285	۵۷۳	۲۴
Afghanistan	ICBW 127724	۵۷۴	۲۵
Afghanistan	ICBW 90192	۵۷۶	۲۶
Afghanistan	ICBW 90186	۵۷۷	۲۷
Pakistan	ICBW 43247	۶۱۳	۲۸
Syria	ICBW 141055	۶۲۳	۲۹
Syria	ICBW 140872	۶۲۴	۳۰
Syria	ICBW 138789	۶۲۵	۳۱
Azerbaijan	ICBW 140887	۶۳۳	۳۲
Azerbaijan	ICBW 140436	۶۳۵	۳۳
Azerbaijan	ICBW 138673	۶۳۷	۳۴
Azerbaijan	ICBW 138620	۶۳۸	۳۵

* گندم بهاره چینی (Chinese Spring) به ژنوتیپ مرجع مورد استفاده قرار گرفت.

کلرید منیزیم سه میلی مولار، مخلوط نوکلئوتیدی ۰/۴ میلی مولار و ۰/۲ واحد بر میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمرز بود. واکنش‌های PCR تحت شرایط دمایی ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت‌سازی ابتدایی به مدت هفت دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دامنه دمایی ۵۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس (بسته به آغازگر، جدول ۲) به مدت ۶۰ ثانیه، بسط آغازگرها در ۷۲ درجه سلسیوس در مدت ۹۰ ثانیه انجام شد و در نهایت بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. فرآورده‌های PCR در بستر ژل پلی اکریل امید شش درصد به (سیستم عمودی) تفکیک شدند و پس از رنگ آمیزی به روش نیترا ت نقره باندها ظاهر شدند (۶).

تجزیه و تحلیل آماری

محتوای اطلاعات چندشکلی PIC^3 از طریق فرمول $PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum p_j^2$ محاسبه شد. در این رابطه p مجموع باندهای هر مکان ژنی برای کلیه ژنوتیپ‌هاست (۲). شاخص نشانگری MI^4 از رابطه $MI = PIC \times N \times B$ به دست آمد که N تعداد کل باندها و B نسبت چندشکلی

در این پژوهش به منظور بررسی تنوع هاپلوتایی QTL مرتبط با صفات فنوتیپی واقع بر کروموزوم 4B گندم نان از ۱۰ جفت نشانگر ریزماهواره استفاده شد (جدول ۲). مطالعات قبلی حاکی از وجود QTL در منطقه مورد اشاره فوق است (۴۹). برای افزودن نشانگرهای دیگر به مناطق فوق از نقشه ژنتیکی تهیه شده توسط رودر و همکاران (۳۶) و سومر و همکاران (۴۰) استفاده شد. نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این پژوهش توسط شرکت Eurofins Genomics ساخته شدند. این نشانگرها از نوع GWM از موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی (IPK) در کشور آلمان بودند (۳۶).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر دارای شیب دمایی (peqSTAR Biotechnologie) PEQLAB در حجم ۱۵ میکرولیتر، شامل ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس، یک میکرولیتر از هر آغازگر (با غلظت ۱۰ پیکومول) به همراه ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی تهیه شد. مسترمیکس استفاده شده با نام تجاری *Taq DNA Polymerase Master Mix* از شرکت RedAmpliqon و *RedAmpliqon* از شرکت پیشگام^۲ تهیه شده بود و حاوی

انجام شد. برای این کار برای هر نشانگر آلل‌ها به عنوان تیمار و تعداد ژنوتیپ‌های دارای آن آلل به عنوان تکرار در نظر گرفته شدند. البته آلل‌هایی که تنها در یک ژنوتیپ (تکرار) مشاهده شده بودند، کنار گذاشته شدند و تجزیه واریانس برای سایر آلل‌ها انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1.3 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با روش LSD در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

برای هر آغازگر بود (۳۳). شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR) با رابطه $EMR = NPB \times \beta$ محاسبه شد که β درصد چندشکلی و NPB تعداد باندهای چندشکل است (۲۲). شاخص قدرت تفکیک (RP) نیز با استفاده از رابطه $RP = \sum I$ محاسبه شد که در این رابطه $I = 1 - [2 \times (0.5 - \text{رابطه } \pi_i \text{ و } \pi_j)]$ به منظور بررسی وجود ارتباط بین صفات و نشانگر، تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی با تکرار نامساوی برای تک تک نشانگرها

جدول ۲- ویژگی‌های نشانگرهای ریزوماهواره واقع بر کروموزوم 4B

Table 2. Characteristics of microsatellite markers located on chromosomes 4B

نام آغازگر	توالی (5' → 3')	دمای اتصال (°C)	موتیف
GWM163	F:CGCTGTTTTAAGGTAATTTTCCATTTTCT R:GCGCATCCTGTTCTCCATTCATA	۵۵	CT
GWM710	هنوز منتشر شده*	۵۰	GA
GWM888	هنوز منتشر نشده	۶۰	GTimp
GWM891	هنوز منتشر نشده	۵۵	CAimp
GWM898	هنوز منتشر نشده	۵۵	GT
GWM910	هنوز منتشر نشده	۵۵	AT, GT imp
GWM930	هنوز منتشر نشده	۵۰	GAimp
GWM925	هنوز منتشر نشده	۶۰	GT
GWM998	هنوز منتشر نشده	۵۵	GT
GWM1084	هنوز منتشر شده	۶۰	CT

*توالی پرایمر نزد طراح آن محفوظ است و با مکاتبه شخصی با شرط عدم انتشار آن دریافت شده است.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس ارقام شاهد طرح آگمنت

نتایج تجزیه واریانس ارقام شاهد کشت شده طبق طرح آگمنت بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی نشان داد که صفات عرض دانه، طول دانه، وزن صد دانه، تعداد سنبلچه در سنبله، تعداد دانه در هر سنبله، طول سنبله، طول ریشک،

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه برای ارقام شاهد

Table 3. Analysis of variance for the studied control cultivars

میانگین مربعات											
منبع تغییرات	درجه آزادی	مربع	مربع	مربع	مربع	مربع	مربع	مربع	مربع	مربع	مربع
تکرار	۸	۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۳۷	۰/۶۴	۶۳/۸۷	۰/۰۸	۶/۹۲	۰/۰۲	۴۴/۷۲	۰/۴۵
ژنوتیپ	۳	۰/۱۶**	۰/۸**	۲/۶**	۴۴/۲۳**	۶۴۴/۳۲**	۰/۸۳**	۳۳/۳۴**	۰/۳۰**	۱۱۵/۵۹ ^{ns}	۳۵/۸۸**
خطا	۲۴	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۲۴	۱/۴۵	۶۱/۱۳	۰/۱۲	۳/۶۹	۰/۰۳	۸۰/۹۰	۱۰/۰۲
ضریب تغییرات (%)		۴/۶۳	۳/۰۹	۱۱/۶۴	۵/۶۲	۱۱/۹۳	۴/۴۷	۷/۵۷	۱۰/۲۶	۱۱/۱۷	۷/۴۳

** و ^{ns}: به ترتیب معنی‌دار در سطح یک درصد و غیر معنی‌دار

دارای ریشک هستند این دامنه تغییرات بالا دور از انتظار نبود. همچنین با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه اکثراً از توده‌های بهاره و یا بینابینی بودند در نتیجه تفاوت دامنه تغییرات ژنوتیپ‌ها از نظر صفت روز تا گلدهی پایین بود (جدول ۴). در مطالعه ناروتی راد و همکاران (۳۰) نیز به دلیل استفاده از گندم‌های بهاره، کمترین ضریب تغییرات در صفت روز تا گلدهی مشاهده شد.

تنوع ژنتیکی صفات فنوتیپی

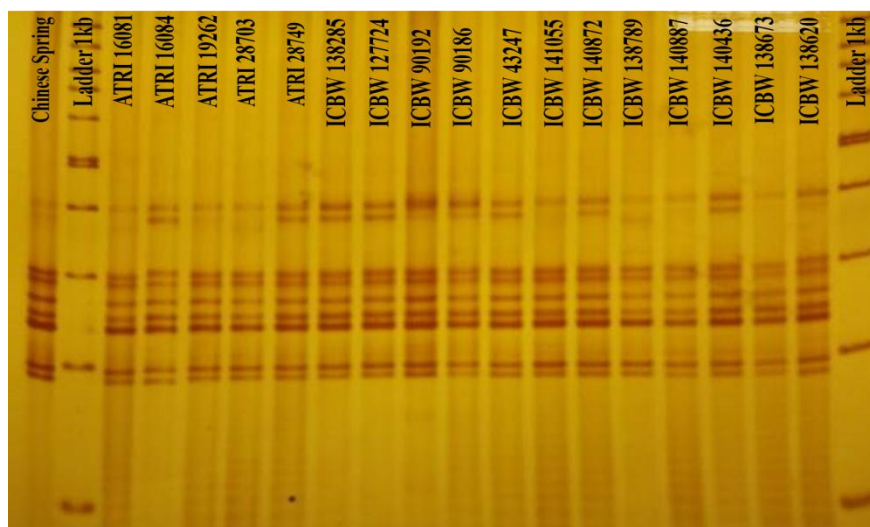
نتایج آمار توصیفی مربوط به ۱۲ صفت کمی مورد بررسی شامل کمترین و بیشترین مقدار، دامنه تغییرات، میانگین صفات، انحراف معیار و ضریب تغییرات در جدول ۴ نشان داده شده است. صفات طول ریشک و روز تا گلدهی به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین ضریب تغییرات را داشتند (به ترتیب ۴۴/۹۷ و ۶/۰۴ درصد). از آنجایی که برخی ژنوتیپ‌ها به طور ژنتیکی دارای ریشک‌های تحلیل یافته هستند و برخی دیگر

نوع هاپلوتایپی نشانگرهای ریزوماهواره پیوسته به QTL‌های مرتبط با صفات فنوتیپی روی کروموزوم شماره 4B

کروموزوم 4B گندم نان به عنوان یکی از مهم‌ترین کروموزوم‌های در برگیرنده ژن‌های کنترل‌کننده صفات فنوتیپی گندم نان شناسایی شده است (۴۹). در این پژوهش به منظور بررسی تنوع هاپلوتایپی از ۱۰ نشانگر ریزوماهواره استفاده شد که شش نشانگر چند شکلی خوبی بین ژنوتیپ‌ها نشان دادند. پس از تفکیک باندها روی ژل‌های اکریل امید شش درصد (شکل ۱)، الگوی باندها مشاهده شده نشانگرهای چند شکل برای مناطق مورد نظر در کروموزوم 4B مورد آنالیز دقیق قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۶ آمده است.

میانگین آلل‌های چند شکل ۴/۵ بود و میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بین ۰/۱۹ و ۰/۳۸ متغیر بود که بالاترین مقدار مربوط به نشانگر *Xgwm930-4B* و کمترین مقدار مربوط به نشانگر *Xgwm898-4B* بود (جدول ۷). میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه ژنوتیپ‌ها از لحاظ قدرت تمایز آن‌هاست (۲). میانگین شاخص قدرت (RP) برابر ۱/۵۸ بود که نشانگرهای *Xgwm891-4B* و *Xgwm925-4B* به ترتیب بیشترین و کمترین میزان این شاخص را داشتند (جدول ۷). بهترین شاخص برای انتخاب نشانگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) است، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم تعداد آلل تأثیرپذیری دارد (۳۴). همچنین میانگین شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه موثر (EMR) به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۹۹ بود. به طوری که بیشترین میزان شاخص نشانگری (MI) مربوط به نشانگر *Xgwm930-4B* بود. شاخص نشانگری (MI) در واقع معیاری برای کارایی نشانگر در تخمین چند شکلی است و به عنوان یک معیار کلی برای تعیین کارایی نشانگرها استفاده می‌شود (۳۳). از نظر نسبت چندگانه موثر (EMR) نشانگرهای *Xgwm888-4B*، *Xgwm891-4B*، *Xgwm925-4B* و *Xgwm930-4B* بیشترین مقادیر را داشتند (جدول ۷).

ژنوتیپ‌های مورد استفاده از لحاظ مطابقت آللی با جایگاه‌های مختلف ژنوتیپ مرجع (رقم بهاره چینی) در کروموزوم 4B در ۲۱ گروه هاپلوتایپی قرار گرفتند که نشان‌دهنده تنوع آللی ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود (جدول ۸). در کروموزوم 4B، برای نشانگر *Xgwm888-4B* سه آلل، برای نشانگر *Xgwm891-4B* چهار آلل، برای نشانگر *Xgwm898-4B* هشت آلل، برای نشانگر *Xgwm925-4B* چهار آلل و برای نشانگر *Xgwm930-4B* هفت آلل مشاهده شد (جدول ۶). از ۲۱ گروه هاپلوتایپی، ۱۴ گروه دارای یک ژنوتیپ بود و هیچ یک از ۳۴ ژنوتیپ، مطابقت آللی از لحاظ همه جایگاه‌های نشانگری با رقم بهاره چینی نداشتند (جدول ۸). به طور کلی ژنوتیپ‌هایی که رفتار کراسینگ‌آوری یکسانی داشتند در یک گروه هاپلوتایپی قرار می‌گیرند (۴۷) اگر ژنوتیپ‌ها الگوی آللی یکسان با مکان نشانگری پیوسته به QTL مورد نظر داشته باشند به احتمال زیاد در بردارنده همان QTL می‌باشند (۲۶). در مطالعه محمدی نژاد و همکاران (۲۸) جهت بررسی تحمل به شوری در ژنوتیپ‌های برنج، ۳۶ ژنوتیپ بر اساس QTL ناحیه سالتول در ۱۸ گروه هاپلوتایپی قرار گرفتند که هیچ کدام از ۳۰ ژنوتیپ ترکیبی مشابه پوکالی (ژنوتیپ مرجع) تولید نکردند. همچنین در مطالعه مک‌کارتنی و همکاران (۲۶) جهت بررسی تنوع هاپلوتایپی مقاومت به فوزاریوم ۷۹ لاین گندم بر اساس ۴۱ نشانگر ریزوماهواره در ۷۶ گروه هاپلوتایپی قرار گرفتند. در مطالعه دیگری با بررسی تنوع هاپلوتایپی QTL‌های مرتبط با صفات فنوتیپی واقع بر کروموزوم‌های 4B و 7D در ۵۰ ژنوتیپ بومی و تجاری گندم نان ایران به ترتیب در ۱۳ و شش گروه هاپلوتایپی شناسایی شده است (۸). در مطالعه ساردوئی نسب و همکاران (۳۷) ۳۰ لاین گندم نان با بیشترین تحمل و کمترین تحمل نسبت به شوری را، از ۱۰۰ لاین اولیه انتخاب کردند و بوسیله نشانگرهای SSR موجود در QTL‌های کروموزوم‌های 4A، 4B و 3B تنوع هاپلوتایپی آنها را بررسی کردند. آنها گزارش نمودند که در کروموزوم 2A، سه نشانگر و در کروموزوم 4D، دو نشانگر با صفات اندازه‌گیری شده ارتباط معنی داری داشتند.



شکل ۱- الگوی باندی نشانگر *Xgwm888-4B* روی ژل پلی اکریل آمید شش درصد برای برخی ژنوتیپ‌های گندم نان
Figure 1. Banding pattern of *Xgwm888-4B* marker on 6% polyacrylamide gel for some of the bread wheat genotypes

جدول ۶- باندهای مشاهده شده هر نشانگر برای مناطق مورد نظر در کروموزوم 4B
Table 6. The observed bands of each marker for the target regions on chromosome 4B

شماره ژنوتیپ	<i>Xgwm 888-4B</i>	<i>Xgwm 891-4B</i>	<i>vm 898-4B</i>	<i>Xgwm 925-4B</i>	<i>Xgwm 930-4B</i>	<i>Xgwm 998-4B</i>
Ch.S*	۱۹۷	۱۰۰	۱۰۴	۱۸۶	۱۸۶	۱۹۹
۱	۱۹۷	۱۰۰	۱۱۰	۱۸۲	۱۸۴	۱۹۹
۲	۱۹۷	۱۰۰	۱۱۰	۱۸۴	۱۸۴	۱۹۹
۳	۱۹۷	۱۰۰	۱۱۵	۱۸۲	۱۸۴	۱۹۹
۴	۱۹۷	۱۰۰	۱۱۵	۱۸۲	۱۸۶	۲۰۱
۵	۱۹۷	۱۰۵	۱۱۵	۱۸۶	۱۸۴	۱۹۹
۶	۱۹۹	۱۱۰	۱۰۴	۱۸۴	۱۸۶	۲۱۰
۷	۱۹۷	۱۰۰	۱۰۶	۱۸۴	۱۸۶	۱۹۵
۸	۱۹۷	۱۱۰	۱۰۴	۱۸۲	۱۸۶	۲۰۱
۹	۱۹۷	۱۰۰	۱۱۵	۱۸۴	۱۸۶	۱۹۵
۱۰	۱۹۷	۱۰۰	۱۲۵	۱۸۲	۱۸۶	۲۰۱
۱۱	۱۹۷	۱۰۰	۱۰۶	۱۸۴	۱۸۶	۱۹۹
۱۲	۱۹۷	۱۰۵	۱۰۶	۱۸۰	۱۸۶	۱۹۹
۱۳	۱۹۷	۱۰۰	۱۱۷	۱۸۰	۱۸۶	۱۹۹
۱۴	۱۹۷	۱۰۰	۱۱۵	۱۸۲	۱۸۴	۱۹۹
۱۵	۱۹۹	۱۰۰	۱۲۰	۱۸۲	۱۸۶	۱۹۹
۱۶	۱۹۷	۱۰۰	۱۰۴	۱۸۰	۱۸۶	۱۹۹
۱۷	۱۹۷	۱۰۰	۱۱۵	۱۸۲	۱۸۶	۱۹۹
۱۸	۱۹۷	۹۰	۱۰۴	۱۸۲	۱۸۶	۱۹۹
۱۹	۱۹۷	۱۰۵	۱۰۸	۱۸۲	۱۸۴	۱۹۹
۲۰	۱۹۵	۱۰۰	۱۰۸	۱۸۲	۱۸۴	۲۰۱
۲۱	۱۹۵	۱۰۰	۱۰۴	۱۸۲	۱۸۴	۲۰۱
۲۲	۱۹۵	۱۰۰	۱۱۰	۱۸۴	۱۸۴	Null
۲۳	۱۹۵	۱۰۰	۱۰۸	۱۸۴	۱۸۶	۱۹۹
۲۴	۱۹۵	۱۰۰	۱۰۸	۱۸۴	۱۸۴	۱۹۹
۲۵	۱۹۵	۱۱۰	۱۰۸	۱۸۴	۱۸۶	۱۹۹
۲۶	۱۹۵	۱۰۰	۱۰۸	۱۸۴	۱۸۶	۱۹۹
۲۷	۱۹۵	۱۰۰	۱۰۴	۱۸۴	۱۸۶	۱۹۹
۲۸	۱۹۵	۱۰۰	۱۱۰	۱۸۰	۱۸۶	۲۲۰
۲۹	۱۹۵	۱۰۰	۱۰۸	۱۸۶	۱۸۶	۲۰۱
۳۰	۱۹۵	۱۱۰	۱۰۸	۱۸۲	۱۸۶	۱۹۹
۳۱	۱۹۵	۹۰	۱۰۴	۱۸۴	۱۸۶	۱۹۹
۳۲	۱۹۵	۱۰۰	۱۱۰	۱۸۲	۱۸۶	۱۹۹
۳۳	۱۹۵	۱۰۰	۱۱۵	۱۸۴	۱۸۶	۲۲۰
۳۴	۱۹۵	۱۰۰	۱۰۴	۱۸۴	۱۸۶	۲۳۰

* ژنوتیپ مرجع (بهاره چینی)

جدول ۷- محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص نشانگری، نسبت چندگانه مؤثر و شاخص قدرت تفکیک در آغازگرهای مورد بررسی
Table 7. Polymorphic information content, marker index, effective multiplex ratio and resolving power in the primers examined

نام آغازگر	تعداد آلل چند شکل	PIC	EMR	MI	RP
<i>Xgwm 888-4B</i>	۳	۰/۳۵	۱/۰۰	۰/۰۰۴	۱/۹۴
<i>Xgwm 891-4B</i>	۴	۰/۳۰	۱/۰۰	۰/۰۰۳	۱/۰۳
<i>Xgwm 898-4B</i>	۸	۰/۱۹	۰/۹۷	۰/۰۰۱	۱/۹۴
<i>Xgwm 925-4B</i>	۴	۰/۳۰	۱/۰۰	۰/۰۰۳	۲/۰۰
<i>Xgwm 930-4B</i>	۲	۰/۳۸	۱/۰۰	۰/۰۰۷	۱/۱۴
<i>Xgwm 998-4B</i>	۶	۰/۲۳	۰/۹۷	۰/۰۰۱	۱/۴۳
میانگین	۴/۵۰	۰/۲۹	۰/۹۹	۰/۰۰۳	۱/۵۸

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR) و شاخص قدرت تفکیک (RP)

جدول ۸- گروه‌های هاپلوتایپی تولید شده به وسیله نشانگرهای ریزماهواره واقع بر کروموزوم 4B
Table 8. Haplotype groups generated by the microsatellite markers located on chromosome 4B

گروه هاپلوتایپی	مکان ژنی / باند (جفت باز)						تعداد ژنوتیپ در هر گروه
	<i>Xgwm 888-4B</i>	<i>Xgwm 891-4B</i>	<i>Xgwm 898-4B</i>	<i>Xgwm 925-4B</i>	<i>Xgwm 930-4B</i>	<i>Xgwm 998-4B</i>	
	۱۹۷	۱۰۰	۱۰۴	۱۸۶	۱۸۶	۱۹۹	
۱*	۱#	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۱	۰	۰	۰	۱	۴
۳	۱	۱	۰	۰	۱	۰	۴
۴	۱	۰	۰	۱	۰	۱	۱
۵	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۱
۶	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۱
۷	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۳
۸			۰	۰	۱	۱	۱
۹		۱	۰	۰	۱	۱	۴
۱۰	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱
۱۱	۱	۰	۱	۰	۱	۱	۱
۱۲	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۱
۱۳	۰	۱		۰	۰	۰	۲
۱۴	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۱
۱۵	۰	۱	۰	۰	۰	۱	۱
۱۶	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۲
۱۷	۰	۱	۱	۰	۱	۱	۱
۱۸	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۲
۱۹	۰	۱	۰	۱	۱	۰	۱
۲۰	۰	۰	۱	۰	۱	۱	۱
۲۱	۰	۱	۱	۰	۱	۰	۱

* ژنوتیپ مرجع (بهاره چینی) در این گروه هاپلوتایپی قرار دارد.
وجود باند (۱) و عدم وجود باند (۰)

ارتباط نشانگرهای ریزماهواره با صفات فنوتیپی

به منظور بررسی وجود ارتباط بین صفات و نشانگر، تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی با تکرار نامساوی برای تک نشانگرها انجام شد. بر همین اساس نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین برخی صفات فنوتیپی با نشانگرهای *Xgwm888-4B*، *Xgwm898-4B* و *Xgwm891-4B* ارتباط معنی‌دار آماری وجود داشت (جدول ۹). اختلاف معنی‌دار آماری بین ارقام متعلق به گروه‌های آللی سایر نشانگرها از نظر صفات مورد بررسی مشاهده نشد (نتایج نمایش داده نشده‌اند). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ارقام متعلق به گروه‌های آللی نشانگر *Xgwm898-*

4B از نظر صفات عرض دانه و تعداد دانه در سنبله اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت (جدول ۹). در صفات عرض دانه، تعداد دانه در سنبله و عرض برگ پرچم بین ژنوتیپ‌های متعلق به گروه‌های آللی نشانگر *Xgwm888-4B* اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت (جدول ۹). همچنین بین ژنوتیپ‌های متعلق به گروه‌های آللی نشانگر *Xgwm891-4B* با صفت تعداد سنبله در سنبله ارتباط معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۹). این نتایج بیانگر پیوستگی نشانگرهای مورد نظر روی کروموزوم 4B با بخشی از ژن‌های کنترل‌کننده صفات مذکور می‌باشد (۱).

جدول ۹- تجزیه واریانس صفات به منظور ارتباط نشانگرهای ریزماهواره با صفات مورد مطالعه روی کروموزوم 4B
Table 9. Analysis of variance for the traits in order to associate the microsatellite markers with the studied traits on chromosome 4B

نشانگر	صفت	درجه آزادی	میانگین مربعات تیمار	میانگین مربعات خطا	F	سطح معنی داری	ضریب تغییرات
	عرض دانه	۲	۰/۲۲	۰/۰۶۳	۳/۵۲*	۰/۰۴	۸/۹۲
<i>Xgwm888-4B</i>	تعداد دانه در هر سنبله	۲	۱۱۶۹/۸	۱۴۳/۸۰	۸/۱۳**	۰/۰۰۱۴	۲۵/۷۵
	عرض برگ پرچم	۲	۰/۲۵۹	۰/۰۷۷	۳/۳۴*	۰/۰۴	۱۵/۸۳
<i>Xgwm891-4B</i>	تعداد سنبله در سنبله	۳	۱۶/۰۸	۴/۲۱	۲/۸۲*	۰/۰۱۹	۱۰/۱۶
	عرض دانه	۴	۰/۱۸۳	۰/۰۵۳	۳/۴۰*	۰/۰۲	۸/۳۰
<i>Xgwm898-4B</i>	تعداد دانه در هر سنبله	۴	۷۴۶/۱۲۰	۱۳۰/۱۷	۵/۷۳*	۰/۰۰۱	۲۴/۳۰

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

نشانگر *Xgwm888-4B* نشان داد که تیمار سه (آل ۱۹۹ جفت باز) با میانگین ۲/۲۵ سانتی متر در یک گروه مجزا قرار گرفت و دارای بیشترین میانگین بود که به عنوان آل اختصاصی برای عرض برگ پرچم انتخاب گردید (جدول ۱۰). افزایش سطح برگ تعیین کننده ظرفیت فتوسنتزی گیاه است و با افزایش عرض برگ پرچم سطح برگ پرچم نیز افزایش می یابد و گیاه کارخانه بزرگتری برای فتوسنتز دارد (۱۱). افزایش سطح برگ از طریق افزایش عرض برگ بهتر از حالتی است که طول برگ پرچم زیاد می شود زیرا با افزایش طول برگ، برگ حالت افتاده به خود گرفته و میزان انرژی خورشیدی جذب شده کاهش خواهد یافت (۴۱). با توجه به ارتباط نشانگر *Xgwm888-4B* با صفات فنوتیپی می توان گفت چنانچه به نژادگر علاقمند به گزینش ژنوتیپ هایی باشد که به طور همزمان سه حالت مطلوب یعنی عرض دانه بیشتر، تعداد دانه در سنبله بیشتر و همچنین افزایش شاخص سطح برگ از طریق عرض برگ پرچم را داشته باشد، می تواند از آل اختصاصی شناسایی شده (۱۹۹ جفت باز) این نشانگر استفاده کند. در مطالعه دستورانی (۶) نیز یک آل اختصاصی (۱۵۳ جفت باز) در نشانگر *Xgwm149-4B* برای انتخاب همزمان سه صفت روز تا گلدهی کمتر، نیمه پاکوتاهی و تعداد بیشتر دانه در سنبله گزارش کرد.

نشانگر *Xgwm898-4B* هشت آل روی ژنوتیپ های مورد مطالعه مشاهده شد. آل های ۱۱۷، ۱۲۰ و ۱۲۵ جفت بازی چون تنها در یک ژنوتیپ دیده شدند از ادامه آنالیز به عنوان یکی از تیمارها حذف شدند. مقایسه میانگین برای صفات عرض دانه و تعداد دانه در سنبله در نشانگر *Xgwm898-4B* نشان داد که میانگین تیمارهای سه و یک (۱۰۸ و ۱۰۴ جفت باز) به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۱۰). هدف نهایی اصلاح گیاهان زراعی تولید عملکرد بیشتر است و عرض دانه و تعداد دانه در سنبله از اجزای مهم تشکیل دهنده عملکرد نهایی دانه هستند (۳۲). با توجه به ارتباط این نشانگر با صفات عرض دانه و تعداد دانه در سنبله از دو آل اختصاصی شناسایی شده (۱۰۴ و ۱۰۸ جفت باز) این نشانگر می توان در برنامه اصلاحی و یا غربالگری به منظور گزینش همزمان دو صفت مذکور استفاده کرد.

در نشانگر *Xgwm888-4B*، مقایسه میانگین ها برای صفات عرض دانه و تعداد دانه در سنبله نشان داد که تیمارهای شماره یک و سه (آل های ۱۹۵ و ۱۹۹ جفت باز) با هم اختلاف معنی دار آماری نداشتند و میانگین دو تیمار مذکور بطور معنی داری بیشتر از تیمار دو (آل ۱۹۷ جفت باز) بود (جدول ۱۰). مقایسه میانگین ها برای عرض برگ پرچم در

جدول ۱۰- مقایسه میانگین صفات معنی‌دار برای نشانگرهای مختلف

Table 10. Mean comparison of significant traits for different markers

نشانگر <i>Xgwm898-4B</i>				
تعداد دانه در سنبله	عرض دانه (میلی متر)	تعداد ژنوتیپ	آلل (bp)	تیمار
۵۹/۸۳ ^a	۲/۹۳ ^d	۹	۱۰۴	۱
۳۹/۵۵ ^b	۲/۶ ^b	۳	۱۰۶	۲
۵۲/۶۳ ^a	۲/۹۵ ^a	۸	۱۰۸	۳
۳۶/۸۰ ^b	۲/۶۸ ^b	۵	۱۱۰	۴
۳۷/۴۵ ^b	۲/۶۴ ^d	۷	۱۱۵	۵
نشانگر <i>Xgwm888-4B</i>				
عرض برگ پرچم (cm)	تعداد دانه در سنبله	عرض دانه (cm)	تعداد ژنوتیپ	آلل (bp)
۱/۷۱ ^b	۵۴/۸۹ ^d	۲/۹۱ ^d	۱۵	۱۹۵
۱/۷۴ ^b	۳۸/۱۹ ^b	۲/۶۹ ^b	۱۷	۱۹۷
۲/۲۵ ^a	۵۱ ^a	۲/۹۸ ^a	۲	۱۹۹
نشانگر <i>Xgwm891-4B</i>				
تعداد سنبله در سنبله	تعداد ژنوتیپ	آلل (bp)	تیمار	
۲۳/۸ ^d	۲	۹۰	۱	
۱۹/۷۵ ^b	۲۶	۱۰۰	۲	
۲۲/۴۶ ^{ab}	۳	۱۰۵	۳	
۱۹/۵۳ ^b	۴	۱۱۰	۴	

برای هر نشانگر، میانگین‌هایی که در هر ستون حرف مشترک دارند با هم تفاوت معنی‌دار آماری ندارند (LSD= 0.05).

عرض برگ پرچم با نشانگر *Xgwm888-4B* صفت تعداد سنبله در سنبله با نشانگر *Xgwm891-4B* و صفات عرض دانه و تعداد دانه در سنبله با نشانگر *Xgwm898-4B* پیوستگی نشان دادند. ارتباط مارکرها با صفات زراعی مورد علاقه به منظور شناسایی QTL‌های دخیل در کنترل صفت در بسیاری از گیاهان بررسی شده است (۱۴، ۱۷، ۲۱). زمانی که چنین ارتباطی بین مارکر و صفت به وجود آمد، گزینش غیرمستقیم می‌تواند از طریق بررسی حضور یا عدم حضور مارکرهای مورد نظر صورت گیرد که می‌تواند به طور جدی هزینه‌های برنامه‌های اصلاحی را کاهش داده و علاوه بر این زمان مورد نیاز برای اصلاح یک رقم جدید را کوتاه‌تر و یا حداقل تسهیل نماید (۴۶). بدیهی است در برنامه‌های اصلاحی گزینش تنها بر اساس یک صفت صورت انجام نمی‌گیرد و با توجه به هدف و در نظر گرفتن شرایط محیطی عمل گزینش جهت نیل به اهداف برنامه اصلاحی انجام می‌شود. به هر حال نتایج این آزمایش می‌تواند به عنوان ابزاری در دسترس به‌نژادگران قرار گیرد تا با توجه به هدف برنامه‌های اصلاحی گندم از آن استفاده بهینه را نمایند.

با مقایسه میانگین‌ها برای صفت تعداد سنبله در سنبله در نشانگر *Xgwm891-4B* مشخص شد که تیمار یک (آلل ۹۰ جفت باز) دارای بیشترین تعداد سنبله در سنبله بود که اختلاف معنی‌داری با آلل ۱۰۵ نداشت (جدول ۱۰). در این مطالعه با توجه به ارتباط نشانگر *Xgwm891-4B* با صفت تعداد سنبله در سنبله و عدم ارتباط با وزن ۱۰۰ دانه می‌توان از آلل ۹۰ جفت بازی برای گزینش گیاهان با عملکرد بالاتر بخصوص در مناطقی که گیاهان پیش از گرده افشانی و در زمان باروری با تنش‌های خشکی و گرما، روبرو می‌شوند، استفاده نمود. در مطالعه جاگادیش و همکاران (۱۹) گزارش شد که زمانی که گیاه پیش از گرده افشانی و در زمان باروری با تنش خشکی و گرما مواجه شود، کاهش عملکرد بیشتر با تاثیر منفی بر تعداد سنبله‌ها اتفاق می‌افتد و تغییر در وزن دانه نقش کمتری دارد. بنابراین گزینش ژنوتیپ‌هایی با تعداد سنبله بیشتر در سنبله می‌تواند مانع کاهش شدید عملکرد گندم در شرایط تنش خشکی و گرما در زمان باروری شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده از نشانگرهای ریزوماهواره واقع بر کروموزوم 4B، صفات عرض دانه، تعداد دانه در سنبله و

منابع

1. Börner, A., E. Schumann, A. Fürste, H. Cöster, B. Leithold, M. Röder and W. Weber. 2002. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics, 105(6-7): 921-936.
2. Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32: 314-331.
3. Breseghello, F. and M.E. Sorrells. 2007. QTL analysis of kernel size and shape in two hexaploid wheat mapping populations. Field crops research, 101(2): 172-179.
4. Caviglia, O.P., V.O. Sadras and F.H. Andrade. 2011. Yield and quality of wheat and soybean in sole-and double-cropping. Agronomy Journal, 103(4): 1081-1089.
5. Cook, J.P., N.K. Blake, H.Y. Heo, J.M. Martin, D.K. Weaver and L.E. Talbert. 2017. Phenotypic and haplotype diversity among tetraploid and hexaploid wheat accessions with potentially novel insect resistance genes for wheat stem sawfly. The Plant Genome, 10(1).
6. Creste, S., A.T. Neto and A. Figueira. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Molecular Biology Reporter, 19(4): 299-306.
7. Dakouri, A., B.D. McCallum and S. Cloutier. 2013. Haplotype diversity and evolutionary history of the Lr34 locus of wheat. Molecular breeding, 33(3): 639-655.
8. Dasturani E. 2014. Study of haplotyping diversity for morphologic traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran, 119 pp (In Persian).
9. Denčić, S., R. Kastori, B. Kobiljski and B. Duggan. 2000. Evaluation of grain yield and its components in wheat cultivars and landraces under near optimal and drought conditions. Euphytica, 113(1): 43-52.
10. Doyle, J. and J. Doyle. 1987. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. Phytochem Bulletin, 19(11): 11-15.
11. Evans, J. R. 1983. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Physiology, 72(2): 297-302.
12. Fang, Q., L. Ma, Q. Yu, L. Ahuja, R. Malone and G. Hoogenboom. 2010. Irrigation strategies to improve the water use efficiency of wheat-maize double cropping systems in North China Plain. Agricultural Water Management, 97(8): 1165-1174.
13. Farooq, M., M. Hussain and K.H. Siddique. 2014. Drought stress in wheat during flowering and grain-filling periods. Critical Reviews in Plant Sciences, 33(4): 331-349.
14. Ganeva, G., V. Korzun, S. Landjeva, N. Tsenov and M. Atanasova. 2005. Identification, distribution and effects on agronomic traits of the semi-dwarfing Rht alleles in Bulgarian common wheat cultivars. Euphytica, 145(3): 305-315.
15. Gebhardt, C., A. Ballvora, B. Walkemeier, P. Oberhagemann and K. Schöler. 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. Molecular Breeding, 13(1): 93-102.
16. Guo, Y., J. Sun, G. Zhang, Y. Wang, F. Kong, Y. Zhao and S. Li. 2013. Haplotype, molecular marker and phenotype effects associated with mineral nutrient and grain size traits of TaGS1a in wheat. Field Crops Research, 154: 119-125.
17. Gupta, P., P. Langridge and R. Mir. 2010. Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. Molecular Breeding, 26(2): 145-161.
18. Gupta, P.K. and R. Varshney. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica, 113(3): 163-185.
19. Jagadish, K.S., P.B. K Kishor, R.N. Bahuguna, N. von Wirén and N. Sreenivasulu. 2015. Staying alive or going to die during terminal senescence—an enigma surrounding yield stability. Frontiers in Plant Science, 6.
20. Kato, K., H. Miura and S. Sawada. 2000. Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat. Theoretical and Applied Genetics, 101(7): 1114-1121.
21. Kulwal, P.L., R.R. Mir, S. Kumar and P.K. Gupta. 2010. QTL analysis and molecular breeding for seed dormancy and pre-harvest sprouting tolerance in bread wheat. Journal of Plant Biology, 37: 59-74.

22. Kumar, M., G.P. Mishra, R. Singh, J. Kumar, P.K. Naik and S.B. Singh. 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of Trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3): 225-236.
23. Kumar, N., P. Kulwal, H. Balyan and P. Gupta. 2007. QTL mapping for yield and yield contributing traits in two mapping populations of bread wheat. *Molecular Breeding*, 19(2): 163-177.
24. Lelley, T. and M. Stachel. 1998. Microsatellites can differentiate wheat varieties from different agroecological areas and of different quality. In *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium*, University of Saskatchewan, Canada, pp: 123-125.
25. Manifesto, M.M., A.R. Schlatter, H.E. Hopp, E.Y. Suárez and J. Dubcovsky. 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Science*, 41(3): 682-690.
26. McCartney, C., D. Somers, G. Fedak and W. Cao. 2004. Haplotype diversity at fusarium head blight resistance QTLs in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(2): 261-271.
27. Miah, G., M.Y. Rafii, M.R. Ismail, A.B. Puteh, H.A. Rahim, K.N. Islam and M.A. Latif. 2013. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11): 22499-22528.
28. Mohammadi-Nejad, G., A. Arzani, A. Rezai, R. Singh and G. Gregorio. 2008. Assessment of rice genotypes for salt tolerance using microsatellite markers associated with the saltol QTL. *African Journal of Biotechnology*, 7(6): 730-736.
29. Moomaw, R., G. Lesoing and C. Francis. 1991. G91-1025 Two Crops in One Year: Doublecropping. *Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension*, 730. <https://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/730>
30. Naroui Rad, M.R., M. Farzanju, H.R. Fanay, A.R. Arjmandy Nejad, A. Ghasemy and M.R. Polshekane Pahlevan. 2006. The study genetic variation and factor analysis for morphological characters of wheat native accessions of Sistan and Baluchistan. *Pajouhesh and Sazandegi*, 73: 50-57 (In Persian).
31. Nave, M., R. Avni, B. Ben-Zvi, I. Hale and A. Distelfeld. 2016. QTLs for uniform grain dimensions and germination selected during wheat domestication are co-located on chromosome 4B. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(7): 1303-1315.
32. Poehlman, J.M. 2013. *Breeding field crops*: Springer Science and Business Media, USA, 723 pp.
33. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
34. Prevost, A. and M.J. Wilkinson 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretic and Applied Genetics*, 98: 107-112.
35. Ramya, P., A. Chaubal, K. Kulkarni, L. Gupta, N. Kadoo, H.S. Dhaliwal, P. Chhuneja, M. Lagu and V. Gupta. 2010. QTL mapping of 1000-kernel weight, kernel length, and kernel width in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Genetics*, 51(4): 421-429.
36. Röder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy and M.W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149(4): 2007-2023.
37. Sardouie-Nasab, S., G. Mohammadi-Nejad and A. Zebarjadi. 2013. Haplotype analysis of QTLs attributed to salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Biology Reports*, 40(7): 4661-4671.
38. Sari, E., S. Berraies, R.E. Knox, A.K. Singh, Y. Ruan, R.D. Cuthbert and A.J. Burt. 2018. High density genetic mapping of Fusarium head blight resistance QTL in tetraploid wheat. *Plos One*, 13(10): e0204362.
39. Sharma, J.R. 2006. *Statistical and biometrical techniques in plant breeding*, New Age International. Limited Publishers, New Delhi, India 432 pp.
40. Somers, D.J., P. Isaac and K. Edwards. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 109(6): 1105-1114.
41. Van Slageren, M. 1994. *Wild Wheats: A Monograph of Aegilops L. and Amblypyrum* (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae), Agricultural University Wageningen, Netherland, 512 pp.

42. Wu, Q.H., Y. X. Chen, S.H. Zhou, L. Fu, J.J. Chen, Y. Xiao, D. Zhang, S.H. Ouyang, X.J. Zhao, Y. Cui and D.Y. Zhang. 2015. High-density genetic linkage map construction and QTL mapping of grain shape and size in the wheat population Yanda1817× Beinong6. *PloS One*, 10(2).
43. Würschum, T. 2012. Mapping QTL for agronomic traits in breeding populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 125(2): 201-210.
44. Yang, Z., J. Gilbert and J.D. Procunier. 2006. Genetic diversity of resistance genes controlling fusarium head blight with simple sequence repeat markers in thirty-six wheat accessions from east asian origin. *Euphytica*, 148(3): 345-352.
45. Yao, J., L. Wang, L. Liu, C. Zhao and Y. Zheng. 2009. Association mapping of agronomic traits on chromosome 2A of wheat. *Genetica*, 137(1): 67-75.
46. Yin, X., P. Stam, M.J. Kropff and A.H. Schapendonk. 2003. Crop modeling, QTL mapping, and their complementary role in plant breeding. *Agronomy Journal*, 95(1): 90-98.
47. Yu, J.B., G.H. Bai, S.B. Cai and T. Ban. 2006. Marker-assisted characterization of Asian wheat lines for resistance to Fusarium head blight. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(2): 308-320.
48. Yu, L.X., S. Liu, J.A. Anderson, R.P. Singh, Y. Jin, J. Dubcovsky and Z. He. 2010. Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. *Molecular Breeding*, 26(4): 667-680.
49. Zaynali Nezhad, K., W. Weber, M. Röder, S. Sharma, U. Lohwasser, R. Meyer and A. Börner. 2012. QTL analysis for thousand-grain weight under terminal drought stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 186(1): 127-138.

Study of Haplotype Variation and Association of Microsatellite Alleles on Chromosome 4B of Bread Wheat with Some Agronomic Traits

Adeleh Abri¹, Khalil Zaynali Nezhad², Mehran Alami³ and Saeed Bagherikia⁴

1- M.Sc. Graduated, Plant Breeding and Biotechnology Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

2- Assistant Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, (Corresponding author: khalil1381@yahoo.com)

3- Associate Professor, Food Science and Technology Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

4- Assistant Professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran

Received: May 21, 2019

Accepted: April 3, 2020

Abstract

The aim of this study was to determine the haplotype groups and their relationship with phenotypic traits in order to obtain the alleles associated with desirable agronomic characteristics in bread wheat. For this purpose, 34 local bread wheat genotypes belong to the Middle East region along with Chinese Spring variety (reference genotype) were cultivated in the form of augmented design and evaluated based on their 12 phenotypic traits. The results of descriptive statistics showed that awn length and day to flowering had the highest and lowest phenotypic coefficient of variation respectively. Ten microsatellite markers were used to investigate the haplotype variation of QTLs associated with phenotypic traits located on wheat chromosomes 4B. The mean of polymorphic alleles, polymorphic information content (PIC) and resolving power (RP) were 4.5, 0.29 and 1.58, respectively. The genotypes were classified into 21 haplotype groups according to the allelic comparison with the reference genotype on chromosome 4B. In order to investigate the relationship between traits and markers, analysis of variance was performed on the basis of completely randomized design with unequal numbers of replications for each marker. In general, of the 12 traits studied, there was a statistically significant relationship for four traits. According to the results of microsatellite markers on chromosome 4B, there was a linkage between grain width, number of grains per spike and flag leaf width with *Xgwm888-4B* marker, number of spikelets per spike with *Xgwm891-4B* marker, grain width and number of grains per spike with *Xgwm898-4B* marker. For the three phenotypic traits, a specific allele was simultaneously introduced to *Xgwm888-4B* marker. If the breeders is interested in genotype selection that simultaneously have three desirable characteristics such as more grain width and more number of grain per spike, as well as increase of leaf area index through flag leaf width, they can use an allele-specific (199 bp) of *Xgwm888-4B* marker.

Keywords: Phenotypic Traits, Marker-assisted Selection, Specific allele, Local wheat