

مطالعه تنوع ژنتیکی گندم نان (*Triticum aestivum* L.) به کمک نشانگرهای ریزماهوره و تجزیه ارتباطی برای صفات فیزیولوژیک تحت تنش سرمای بهاره

Genetic diversity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) as revealed by microsatellite markers and association analysis of physiological traits related to spring cold stress

مجید محمدی^۱، سیدرضاقلی میرفخرایی^{۱*}، علیرضا عباسی^۲

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استادیار دانشگاه تربیت مدرس

۲- استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج دانشگاه تهران

Mohamadi M¹, Mirfakhraee SRG^{*1}, Abbasi AR²

1. Graduated MSc and Assistant Professor, Tarbiat Modares University, Tehran
2. Assistant Professor, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: abdhoorz@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۳)

چکیده

وجود تنوع ژنتیکی برای تداوم و پیشرفت برنامه‌های به‌نژادی گیاهان زراعی و افزایش کارایی انتخاب ضروری است. در این راستا نشانگرهای مولکولی بطور موفقیت‌آمیز در ارزیابی تنوع ژنتیکی انواع گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. بدین منظور ۲۰ رقم گندم نان در قالب طرح کاملاً تصادفی کشت شدند و ۵ صفت فیزیولوژیک کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئید و پایداری غشا سیتوپلاسمی در آنها اندازه‌گیری شد و همچنین در سطح مولکولی نیز از ۱۲ جفت آغازگر ریزماهوره استفاده شد. جهت تعیین روابط ژنتیکی بین ارقام، تجزیه خوشه‌ای به روش Ward انجام و ارقام مورد بررسی به چهار گروه تقسیم شدند. سطح اطلاعات چند شکلی از ۰/۳۲ (مکان ژنی Xgwm10) تا ۰/۷۲۵ (مکان ژنی Xgwm33) برای نشانگرهای SSR متفاوت بود. با استفاده از روش رگرسیون گام به گام ارتباط بین هر کدام از ۵ صفت فیزیولوژیک و ۴۰ نشانگر چند شکل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از رگرسیون گام به گام ارتباط معنی‌دار دو نشانگر را با ۵ صفت فیزیولوژیک در دمای شاهد (۸°C) و ارتباط معنی‌دار ۶ نشانگر را با ۵ صفت تحت تنش شدید (۲°C-) نشان داد که می‌توان از آنها در انتخاب مقدماتی در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد. همچنین نتایج نشان داد که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط دارند که بیانگر پیوستگی صفات با یکدیگر و یا تاثیر ژن‌های چند اثره می‌تواند باشد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه ارتباط
تنش سرمای بهاره
تنوع ژنتیکی
گندم
نشانگر ریزماهوره

مقدمه

دما یکی از عوامل مهم محیطی است که در گسترش و پراکنش موجودات زنده نقش مهمی ایفا می‌کند. خطرات دمایی مربوط به نوسانات آن است که بیشترین خسارت را بر گیاهان زراعی وارد می‌سازد (Samach and Wigge 2005). تنش‌های محیطی، از جمله سرما، سبب کاهش معنی‌دار در عملکرد محصولات کشاورزی می‌شوند. با توجه به اینکه اقلیم‌های سرد و فراسرد، بیش از ۶۲ درصد از سطح کشور را تحت پوشش خود دارند (Khalili et al. 1991). می‌توان انتظار داشت، تنش سرما در فرم‌های سرمازدگی^۱، انجماد^۲ و افت ناگهانی دما^۳، زراعت‌های گندم را در اراضی واقع در اقلیم‌های مذکور با آسیب‌های جدی مواجه سازد (Mirfakhraei et al. 2010). آگاهی از نقش صفات فیزیولوژیک موثر بر فاکتورهای محدودکننده عملکرد و نحوه توارث آنها به منظور طراحی برنامه‌های به‌نژادی دقیق‌تر، برای بهبود ژنتیکی پتانسیل عملکرد، ضروری است (Hall 2001).

امروزه از نشانگرهای مولکولی DNA به عنوان ابزار مفید برای ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم‌ها و تعیین مکان ژن‌های مقاومت به بیماری و تنش‌های محیطی و همچنین رابطه بین اجداد اولیه و رقم‌های اصلاح شده در گیاهان استفاده می‌شود. در این میان، نشانگرهای ریزماهواره به دلیل چندشکلی بالا (Condon et al. 2008)، توارث پذیری، همباز بودن و فراوانی در گیاهان، نشانگرهای ایده‌آلی برای دامنه‌ی وسیعی از کاربردها از جمله تهیه نقشه ژنتیکی، گزینش به کمک نشانگر، مطالعات ژنتیک جمعیت و تکاملی، انگشت نگاری ژنتیکی، تجزیه و تحلیل شجره‌نامه و مشخص کردن میزان تغییرات تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم‌ها هستند (Roder et al. 1998; Kolliker 2001). مطالعه روابط بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی دارای کاربردهای متعددی است که برخی از آنها عبارت است از امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص، شناسایی ال‌های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرم‌پلاسمی، تسهیل مکان‌یابی دقیق ال‌های صفات کمی و تأیید ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات کمی (Gebhardt

et al 2004). در گندم تعداد زیادی ژن برای صفات متفاوت (از جمله صفات کیفی، مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی) شناسایی شده‌اند. شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی یکی از مهمترین روش‌ها برای تسریع انتقال صفات مطلوب به ژنوتیپ‌های دیگر و ردیابی آن‌هاست. اصولی‌ترین روش شناسایی این نشانگرها تهیه جمعیت‌های در حال تفرق و پس از آن ردیابی صفات کیفی و یا کمی در این جمعیت‌ها می‌باشد، تا بر اساس آن نشانگرهای پیوسته شناسایی شوند. در حالتی که صفت کمی باشد تهیه نقشه پیوستگی یک امر مهم در مکان‌یابی آل‌های آن است. ولی برای صفات کیفی تهیه نقشه لینکازی تنها در اطراف ژن مورد نظر کافی است و از طریق روش تجزیه تفرق توده نیز قابل تحقیق است (Naghavi et al. 2007). چون تهیه جمعیت‌های در حال تفرق وقت گیر و پرهزینه است، اگر بتوان قبل از تهیه این جمعیت‌ها، نشانگرهای دارای ارتباط مناسب با صفات مورد نظر را از طریق تجزیه رگرسیونی شناسایی کرد می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی به عنوان نشانگرهای آگاهی بخش^۴ استفاده کرد (Ranjbar et al. 2009). بررسی ارتباط بین نشانگرها و صفات زراعی نه تنها نقشه‌یابی ژن‌ها را تسهیل کرد بلکه شناسایی ژن‌هایی را نیز که در نقشه‌یابی‌های مبتنی بر لینکاژ قابل ردیابی نیستند، مقدور می‌سازد (Roy et al. 2006). در مطالعه‌ای، ۳۰ رقم گندم را با ۲۴ آغازگر ریزماهواره ارزیابی و در مجموع ۱۱۵ آلل در دامنه‌ای از ۲ تا ۹ آلل و میانگین ۴/۶ آلل برای هر جایگاه گزارش کردند (Liu et al. 2007). در مطالعه‌ای در ایران ۳۶ توده وحشی گندم‌های دیپلوئید غرب ایران را با ۱۴ آغازگر RAPD، ۱۷ آغازگر AFLP و ۱۷ آغازگر SSR ارزیابی و میزان اطلاعات چند شکلی به ترتیب ۰/۴۵، ۰/۵۶ و ۰/۸۱ به دست آمد که نشانگر SSR بیشترین میزان اطلاعات چند شکلی را داشت (Naghavi et al. 2009). در مطالعه با استفاده از تجزیه ارتباط و نشانگرهای SSR، یازده QTL را با صفت محتوای پروتئین در ۹۶ نمونه سویا شناسایی کردند که برخی از این QTLها قبلاً شناسایی نشده بودند (Shalini et al. 2007). در گزارشی ارتباط بین ۱۱ صفت زراعی و ۵۰ نشانگر مولکولی با استفاده از رگرسیون گام به گام بررسی شد که در مجموع ۱۷

¹ Frost² Freezing³ Chilling⁴ Informative markers

Bertin et al. (1987) و تعیین پایداری غشا سیتوپلاسمی از روش (1996) استفاده شد.

ارزیابی مولکولی

در این تحقیق، از ۱۲ جفت نشانگر ریزماهواره استفاده شد (Roder et al. 1998). استخراج دی.ان.ا. از برگ به روش دلاپورتا انجام گرفت (Dellaporta et al. 1983). واکنش زنجیره-ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر دی.ان.ا. ژنومی (غلظت ۵۰-۴۰ نانوگرم)، ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر dNTPs (دو میلی مولار)، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیش رو و پس رو (۱۰ pmol/μl)، نیم واحد آنزیم Taq پلیمرز (۰/۱ میکرولیتر)، ۰/۷۲ میکرولیتر از کلرید منیزیم ۲۵ میلی مولار و ۷/۱۸ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت چهار دقیقه، ۳۵ چرخه حرارتی (۱۰ چرخه اول سیکل حرارتی به صورت Touch Down) برنامه ریزی شده بود و دمای اتصال آغازگرها به رشته الگو ۱۰°C بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و در هر چرخه بخش اول با کاهش یک درجه سانتی گراد، به دمای اتصال واقعی رسید. در ۲۵ چرخه بعدی به بعد دمای اتصال ثابت (بر حسب دمای اتصال آغازگر) و در زمان ۳۰ ثانیه انجام شد. در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشته سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۴°C در نظر گرفته شد. همچنین زمان و دمای بسط رشته به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۷۲°C بود. محصولات تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل پلی اکریل امید واسرشته ساز تفکیک و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره انجام گرفت (An et al. 2009).

تجزیه های آماری

همبستگی بین صفات با استفاده از میانگین داده های فیزیولوژیک، محاسبه شد. برای داده های مولکولی بر اساس وجود باند یک و عدم وجود آن صفر برای هر جفت آغازگر اختصاصی کد گذاری شد. میزان اطلاعات چند شکلی آغازگرها با استفاده از فرمول $PI = 1 - \sum P_i^2$ محاسبه شد (Powell et al. 1996). و برای گروه-بندی ارقام از تجزیه خوشه ای با روش دورترین همسایگی و معیار تشابه جاکارد از نرم افزار NTSYS-pc 2.02 استفاده شد. سپس تجزیه رگرسیونی ۵ صفت فیزیولوژیک در ۲۰ رقم گندم

نشانگر ریزماهواره رابطه معنی داری با حداقل یکی از ۱۱ صفت مورفولوژیک نشان دادند (Mohammadi et al. 2010) در مطالعه-ای دیگر تجزیه ارتباط ۱۰ صفت زراعی با ۷۰ نشانگر ریزماهواره بر روی ۱۱۵ ژنوتیپ بومی جو ایرانی مشخص شد که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت در ارتباط هستند (Ebrahimi et al. 2011).

مواد و روش ها

ارزیابی صفات فیزیولوژیکی تحت تنش سرمای بهار این تحقیق در گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس و پردیس کشاورزی کرج، دانشگاه تهران در یک آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل ۲۰ رقم گندم نان به اسامی: گاسپارد، طوس، الموت، آذر، سرداری، زرین، سبلان، بزوستایا (زمستانه)، پیشتاز، چمران، روشن، بک کراس روشن، نیک نژاد، زاگرس، تجن، بهار، فلات (بهاره)، قدس، کراس اروند، مهدوی (بینابین) که از مؤسسه اصلاح بذر و نهال تهیه شدند و ۴ تیمار سرمای (+۸(شاهد)، +۲، صفر و -۲ درجه سانتی گراد) بودند. با رسیدن بوته های گندم به اوایل مرحله زایشی (سنبله دهی و گلدهی، کد زیداک برای ۵۰ الی ۶۸) (Zadoks et al. 1974)، گلدانها برای القا تنش سرما، به اتاقک رشد منتقل و به مدت یک هفته در دمای ۱۶°C روز به مدت ۱۶ ساعت و ۸°C شب به مدت ۸ ساعت قرار گرفتند و بعد از طی این مدت برای شروع تنش، نمونه ها در دمای ۸°C و در تاریکی مطلق قرار داده شدند. پس از آن هر یک ساعت، ۲°C دما کاهش داده شد، و با رسیدن به هر یک از سطوح دماهای +۲، صفر و -۲ درجه سانتی گراد، گلدانها به مدت دو ساعت تحت تنش سرما قرار گرفتند و بعد از پایان تنش، دمای محیط هر ساعت ۲°C افزایش داده شد تا دمای محیط به شرایط دمای شاهد رسید و گلدانهای شاهد نیز به منظور مقایسه تاثیر سرما بر گیاه گندم در شرایط عادی و بدون تنش روز/شب ۸/۱۶ و دمای ۸°C/۱۶°C قرار داده شدند، و پس از ۲۴ ساعت نمونه گیری به عمل می آمد. برای اندازه گیری کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید از روش (Lichtenthaler

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس صفات محتوای کلروفیل کل، a، b، کارتوتیید و نشت یونی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			رقم
		کلروفیل کل	کارتوتیید	نشت یونی	
رقم	۱۹	۷/۳۲۳**	۶/۱۷۴**	۱۰۰/۴۵**	۸۲/۷۲۲**
تنش سرما	۳	۵/۴۹۹**	۱۰/۸۵۸**	۱۲۱۴/۸۷۳**	۶/۵۴۰**
رقم×تنش سرما	۵۷	۰/۵۱۸*	۰/۶۰۲**	۴۵/۷۶۲**	۰/۷۶۴*
اشتباه	۱۶۰	۰/۳۲۱	۰/۳۲۷	۱۴/۶۳۷	۰/۵۳۳
CV%		۱۸/۸۹	۱۹/۰۶	۲۵/۹	۱۱/۵۶

* و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

در میان آللهای تولیدی توسط هر آغازگر داشتند. محتوای اطلاعات چندشکلی به ازای هر نشانگر برابر با میانگین ۰/۵۱۱ بود که بیشترین محتوای اطلاعات چند شکلی با مقدار ۰/۷۲۵ مربوط به نشانگر Xgwm33 با ۶ آلل چند شکل و کمترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی با مقدار ۰/۳۲ مربوط به نشانگر Xgwm10 با دو آلل چند شکل بود. فراوانی آلل رایج (آلی که بیشترین فراوانی را در بین آللهای یک جایگاه دارد) در این مطالعه از ۰/۴ (Xgwm33) تا ۰/۸ (Xgwm2 و Xgwm10) متغیر بود (جدول ۳). مقایسه تعداد آللهای چند شکل و فراوانی آلل رایج در جایگاههای ریزماهوره نشان داد که نشانگرهایی با تعداد آلل چند شکل کمتر، حداکثر آلل رایج را داشتند. با بررسی دو پارامتر محتوای اطلاعات چندشکلی و فراوانی آلل رایج مشخص شد که نشانگرهایی با محتوای اطلاعات چند شکلی بالا، فراوانی آلل رایج کمتری داشتند. مقایسه نشانگرهایی با توالی تکراری متفاوت نشان داد که نشانگرهایی با توالی تکراری دو نوکلئوتیدی دارای بیشترین تعداد آلل، محتوای اطلاعات چندشکلی و کمترین میزان فراوانی آلل رایج بودند.

در مطالعه‌ای، ۳۰ رقم گندم را با ۲۴ آغازگر ریزماهوره ارزیابی و در مجموع ۱۱۵ آلل در دامنه‌ای از دو تا ۹ آلل و میانگین ۴/۶ آلل برای هر جایگاه گزارش کردند (Liu et al. 2007). در مطالعه‌ای دیگری، ۱۰ رقم از گندمهای پاکستان را با ۱۴ آغازگر ریزماهوره ارزیابی و میانگین ۵/۲ آلل در هر جایگاه ژنی گزارش کردند (Zeb et al. 2009). در مطالعه‌ای در ایران ۳۶ توده وحشی گندم

نان با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 با روش رگرسیون گام به گام انجام شد به طوری که در هر بار تجزیه یکی از صفات فیزیولوژیکی به عنوان متغیر وابسته (Y) و کلیه نشانگرها به عنوان متغیرهای مستقل (X) در تجزیه وارد شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که سطوح تنش سرما، ارقام و اثرات متقابل ارقام و تنش سرما در کلیه صفات اندازه‌گیری شده اختلاف معنی داری داشتند (جدول ۱).

بر اساس میانگین تکرارهای هر رقم ضرایب همبستگی ساده تمامی صفات مورد بررسی تحت دو شرایط شاهد (۸°C) و تنش شدید (۲°C-) محاسبه شد. در شرایط شاهد همبستگی بین صفات رنگدانه‌های گیاهی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتوتیید در سطح یک درصد معنی دار بود. اما بین صفت نشت یونی با صفات رنگدانه‌های گیاهی همبستگی معنی داری مشاهده نشد (جدول ۲). همچنین در شرایط تنش شدید همبستگی بین صفات رنگدانه‌های گیاهی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتوتیید در سطح یک درصد معنی دار بود. لیکن بین صفت نشت یونی با صفات رنگدانه‌های گیاهی همبستگی معنی داری مشاهده نشد (جدول ۲).

نشانگرهای ریزماهوره مورد بررسی در مجموع توانستند ۴۰ آلل چند شکل با میانگین ۳/۳۳ در هر جایگاه را شناسایی کنند. تعداد آللهای مشاهده شده در هر مکان ژنی بین دو تا ۶ آلل بود که آغازگرهای Xgwm33 و Xgwm165 با ۶ آلل بیشترین تعداد را

جدول ۲- ضرایب همبستگی ساده بین صفات فیزیولوژیک مورد مطالعه در ارقام گندم بهاره در شرایط دمایی شاهد (بالای قطر) و شرایط تنش شدید (2°C) (پایین قطر).

صفات	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	نشست یونی
کلروفیل a	۱	۰/۹۸۱**	۰/۹۹۹**	۰/۹۵۱**	۰/۰۷۵ ^{ns}
کلروفیل b	۰/۹۶۸**	۱	۰/۹۸۹**	۰/۹۰۴**	۰/۰۰۳ ^{ns}
کلروفیل کل	۰/۹۹۸**	۰/۹۸۳**	۱	۰/۹۴۲**	۰/۰۵۶ ^{ns}
کارتنوئید	۰/۹۵۱**	۰/۸۶۸**	۰/۹۳۵**	۱	۰/۰۱۵ ^{ns}
نشست یونی	-۰/۲۱۵ ^{ns}	-۰/۱۸۲ ^{ns}	-۰/۲۰۷ ^{ns}	-۰/۲۲۸ ^{ns}	۱

ns و ** به ترتیب عدم معنی داری و معنی دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه و تعداد آلل چند شکل، فراوانی آلل رایج و محتوای اطلاعات چند شکلی نشانگرهای ریزماهواره

PIC	فراوانی آلل رایج	تعداد آلل	دمال اتصال ($^{\circ}\text{C}$)	نوع توالی تکراری	آغازگر پیشرو ($5'-3'$)	آغازگر معکوس ($5'-3'$)	مکان نشانگر	نشانگر
۰/۶۱۵	۰/۵۰	۴	۶۰	(GA)19	CAC TGC ACA CCT AAC TAC CTG C	GGA GTC ACA CTT GTT TGT GCA	۳B	Xgwm284
۰/۳۹۵	۰/۷۵	۳	۵۰	(AT)5 (GT)15	TGG TCG TAC CAA AGT ATA CGG	CGC ACC ATC TGT ATC ATT CTG	۵B	Xgwm68
۰/۵۵۵	۰/۶۰	۳	۵۰	(CA)18	CAT TCT CAA ATG ATC GAA CA	CTG CAA GCC TGT GAT CAA CT	۴A	Xgwm113
۰/۳۷۵	۰/۷۵	۲	۶۰	(GA)20	CTT TTC TTT CAG ATT GCG CC	TGC AGT GGT CAG ATG TTT CC	۵D	Xgwm583
۰/۷۲۵	۰/۴۰	۶	۶۰	(CA)34	GCT TGC AAG TTC CAT TTT GC	CGG CCC TAT CAT GGC TG	۱A	Xgwm33
۰/۳۲۰	۰/۸۰	۲	۶۰	(CT)19	TAG CAC GAC AGT TGT ATG CAT G	AGA CTG TTG TTT GCG GGC	۲A	Xgwm10
۰/۶۷۵	۰/۴۵	۴	۶۰	(GA)17	GCA CAT TTT TCA CTT TCG GG	AAT GAA AAA ACA CTT GCG TGG	۲B	Xgwm191
۰/۴۵۵	۰/۶۵	۲	۵۵	(GT)12	GAG GGT CGG CCT ATA AGA CC	ATT CGA GGT TAG GAG GAA GAG G	۷B	Xgwm146
۰/۳۷۵	۰/۷۵	۲	۶۰	(GA)3(G)3(GA)25	CTC CCT AGA TGG GAG AAG GG	AGG CCA GAA TCT GGG AAT G	۴D	Xgwm608
۰/۵۷۵	۰/۶۰	۴	۶۰	(GA)5GG(GA)20	CTC TGG CAT TGC TCC TTG G	CCA AAA AAA CTG CCT GCA TG	۷A	Xgwm471
۰/۶۹۲	۰/۴۵	۶	۶۰	(GA)16	GAT CCC TCT CCG CTA GAA GC	ACA TTG TGT GTG CGG CC	۴B	Xgwm165
۰/۳۷۵	۰/۸۰	۲	۶۰	(CA)27	TCT AGG CAG ACA CAT GCC TG	TTC ACA CCC AAC CAA TAG CA	۳A	Xgwm2
۰/۵۱	۰/۶۲	۳/۳۳	--	-----	-----	-----	--	میانگین

2009). در مطالعه‌ای دیگر در ایران ۲۱ رقم و لاین گندم ایرانی را با استفاده از ۵۰ جفت آغازگر ریزماهواره مورد مقایسه قرار دادند. تعداد آلل‌ها از دو تا ۱۰ آلل متغیر و میانگین تعداد آلل در جایگاه‌ها برابر با ۵/۳ بود. همچنین محتوی اطلاعات چند شکلی

های دیپلوئید غرب ایران را با ۱۴ آغازگر RAPD، ۱۷ آغازگر AFLP و ۱۷ آغازگر SSR ارزیابی و میزان اطلاعات چند شکلی به ترتیب ۰/۴۵، ۰/۵۶ و ۰/۸۱ به دست آمد که نشانگر SSR بیشترین میزان اطلاعات چند شکلی را داشت (Naghavi et al.)

در ارقام گندم، برای هر صفت بطور جداگانه رگرسیون گام به گام انجام گرفت و مشخص شد که بیشترین تعداد نشانگر در شرایط شاهد و تنش شدید مربوط به صفت کارتنوئید به ترتیب دو و سه نشانگر بود. بیشترین ضریب تبیین در شرایط شاهد مربوط به صفت کارتنوئید (۳۶/۲ درصد) و در شرایط تنش برای صفت نشن یونی (۳۵/۸ درصد) بود. همچنین بیشترین ضریب تبیین در مجموع نشانگرهای آگاهی بخش در شرایط شاهد (۵۶/۵ درصد) و تنش (۷۳/۵ درصد) مربوط به صفت کارتنوئید بود (جدول ۴).

نشانگر Xgwm583 در شرایط شاهد با کلیه صفات همبستگی نشان داد و توانست ۲۵/۲ درصد تا ۳۶/۲ درصد تغییرات صفات مورد بررسی را توجیه کند. همچنین در شرایط تنش شدید، نشانگر Xgwm146 به غیر از صفت نشن یونی با کلیه صفات همبستگی نشان داد و توانست ۲۳/۲ درصد تا ۳۰ درصد تغییرات صفات مورد بررسی را، بر اثر تنش سرمای بهاره، توجیه کند. بیشترین ضریب تبیین نشانگرها در شرایط شاهد مربوط به نشانگر Xgwm583 (۳۶/۲ درصد) و در شرایط تنش مربوط به نشانگر Xgwm284 (۳۵/۸ درصد) بود (جدول ۴).

نشانگرهای Xgwm583 و Xgwm146 با بیش از یک صفت ارتباط نشان داشتند. با توجه به وجود همبستگی معنی دار (جدول ۲) بین صفات رنگدانه‌های گیاهی می‌توان دریافت که برخی از این صفات پیوستگی بسیار نزدیکی با یکدیگر دارند و یا احتمالاً به صورت ژن‌های چند اثره در مکان‌های کروموزومی مستقر می‌باشند. برای درک این موضوع تهیه نسل‌های در حال تفرق و نقشه‌های پیوستگی ضروری می‌باشد (Ebrahimi et al. 2010).

البته برای اطمینان از وجود ارتباط پیوستگی بین نشانگرها و صفات مختلف زراعی نیاز به تهیه جمعیت‌های تفرق مانند F₂، RIL¹ و DH² می‌باشد تا بر اساس این جمعیت‌ها نقشه‌های پیوستگی تهیه و سپس محل مکان‌های کنترل کننده این صفات بر روی کروموزوم‌ها مشخص شوند (Bassam et al. 1991).

در تحقیقی تجزیه ارتباط بین ۱۱ صفت زراعی و ۵۱۹ نشانگر که شامل ۲۲۱ نشانگر SSR، ۴۳ نشانگر SAMPL و ۲۵۵ نشانگر AFLP را در گندم نان انجام دادند، در نشانگرهای SSR بیشترین

را از ۰/۱۸۸ تا ۰/۷۵۵ و با میانگین ۰/۵۶ گزارش کردند (Fazelinasab et al. 2006).

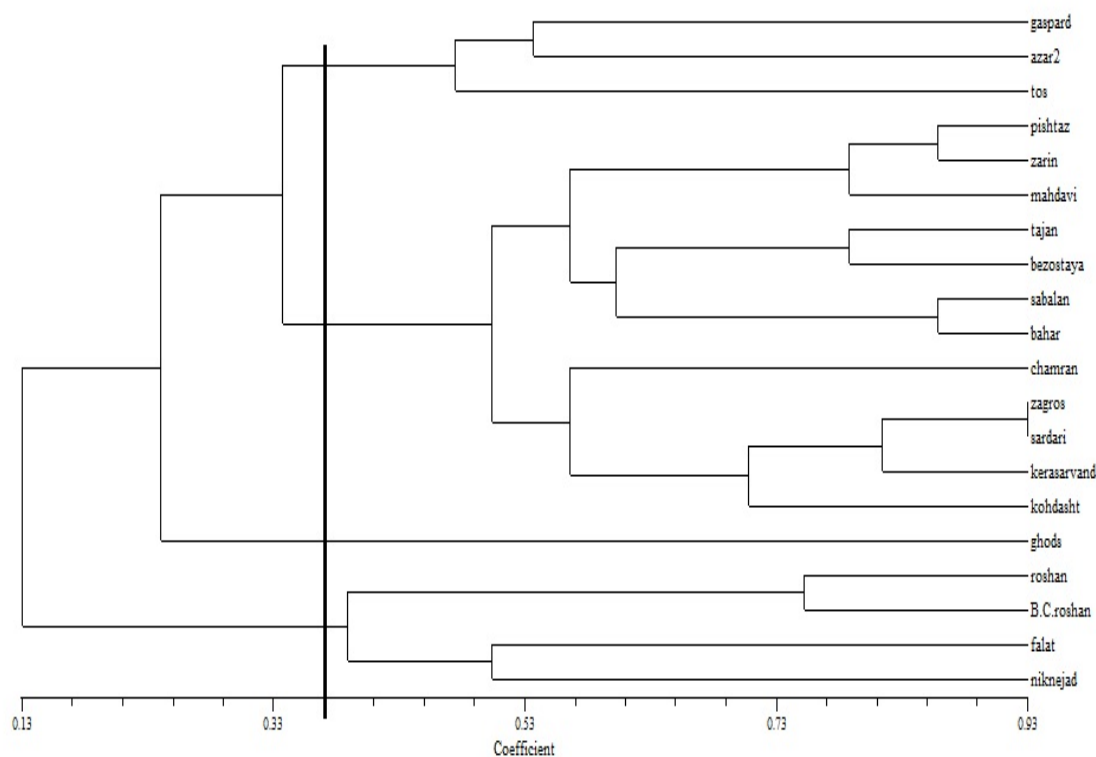
از نتایج این تحقیق و سایر تحقیقات مشابه نشان می‌دهد که محتوای اطلاعات چند شکلی نمی‌تواند عدد ثابتی باشد و به عوامل متعددی نظیر تعداد آلل در هر جایگاه و به محتوای نوکلئوتیدهای G و T در نواحی تکرار شونده وابسته است (roder et al. 1998). تکرارهای دو نوکلئوتیدی نسبت به سه و چهار و حتی تکرارهای بیشتر، چند شکلی بیشتری می‌توانند داشته باشند (Maccaferri et al. 2003). تفاوت در تعداد آلل شناسایی شده در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل منشا و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نیز ماهیت نشانگرهای ریزماهواره از نظر تعداد نوکلئوتید واحدهای تکراری باشد (Jamali rad et al. 1387). همچنین تعداد ژنوتیپ و تعداد آغازگر ریزماهواره نیز همبستگی مثبتی با محتوای چند شکلی دارند (Prasad et al. 2000).

با توجه به ماتریس تشابه بدست آمده، دو رقم زاگرس و سرداری، بیشترین شباهت ژنتیکی معادل ۰/۹۲۸ که هر دو از رقم‌های دیم محسوب می‌شوند و دو رقم گاسپارد و فلات، کمترین شباهت ژنتیکی معادل ۰/۱۲۵ را داشتند. با توجه به اینکه رقم فلات دارای تیپ رشد بهاره که رقم وارداتی از مرکز سیمیت می‌باشد و برای مناطق نیمه گرمسیری تا گرمسیری توصیه شده است و رقم گاسپارد که دارای تیپ رشد زمستانه بوده و از ارقام وارداتی فرانسوی می‌باشد، احتمالاً این فاصله ناشی از اختلاف در فواصل جغرافیایی و ژنتیکی بین این دو رقم می‌باشد. بررسی دندروگرام‌های حاصل از روش‌های مختلف نشان داد که الگوریتم دورترین همسایگی بر اساس ضریب تشابه جاکارد بهترین گروه‌بندی را ارائه کرد. با توجه به اینکه همبستگی کوفنتیک این دندروگرام ۰/۷۱ بود و معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک درصد و نیز جداسازی قابل توجه ژنوتیپ‌ها، این الگوریتم انتخاب شد. در گروه‌بندی حاصل ارقام در چهار گروه قرار گرفتند و با توجه به تیپ رشدی خود تا حدود زیادی از هم تفکیک شدند (شکل ۱).

تجزیه ارتباط ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای ریزماهواره و صفات فیزیولوژیک مورد بررسی در تحمل به تنش سرمای بهاره

¹ Recombinant inbred line

² Double haploid



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ارقام گندم نان با استفاده از الگوریتم دورترین همسایگی و ضریب تشابه جاکارد

جدول ۴- تعداد نشانگرهای آگاهی بخش پیوسته با صفات فیزیولوژیکی و درصد تغییرات توجیه شده این صفات به کمک نشانگرها.

نشانگرهای مرتبط	R^2_T (%)	R^2_{max} (%)	تعداد نشانگر (T)	صفت
Xgwm583	۳۴/۵	۳۴/۵	۱	شاهد
Xgwm146 و Xgwm583	۴۵/۶	۲۳/۶	۲	تش
Xgwm583	۳۴/۹	۳۴/۹	۱	شاهد
Xgwm146 و Xgwm583	۴۴/۴	۲۳/۲	۲	تش
Xgwm583	۳۵/۱	۳۵/۱	۱	شاهد
Xgwm146 و Xgwm583	۴۵/۶	۲۳/۶	۲	تش
Xgwm165 و Xgwm583	۵۶/۵	۳۶/۲	۲	شاهد
Xgwm68 و Xgwm146, Xgwm10	۷۳/۵	۳۰	۳	تش
Xgwm583	۲۵/۲	۲۵/۲	۱	شاهد
Xgwm10 و Xgwm284	۵۹/۳	۳۵/۸	۲	تش

(T) تعداد نشانگرهای آگاهی بخش برای صفت کمی؛ R^2_{max} بیشترین ضریب تبیین مربوط به یک نشانگر برای صفت کمی (درصد)؛ R^2_T مجموع کل ضریب تبیین نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات کمی (درصد).

جدول ۵- نتایج حاصل از رگرسیون گام به گام نشانگرهای ریزماهواره و صفات فیزیولوژیک

SSR complete%	df	SSR max%	df	منبع واریانس	صفت
۶/۵۶**	۱	۶/۵۶**	۱	X	شاهد
۰/۶۹۱	۱۸	۰/۶۹۱	۱۸	Y	
۴/۳۳**	۲	۴/۴۷*	۱	X	تنش
۰/۶۰۸	۱۷	۰/۸۰۷	۱۸	Y	
۶/۶۳**	۱	۶/۶۳**	۱	X	شاهد
۰/۶۸۷	۱۸	۰/۶۸۷	۱۸	Y	
۴/۲۱**	۲	۴/۴۰*	۱	X	تنش
۰/۶۲۲	۱۷	۰/۸۱۱	۱۸	Y	
۶/۶۶**	۱	۶/۶۶**	۱	X	شاهد
۰/۶۸۵	۱۸	۰/۶۸۵	۱۸	Y	
۴/۳۳**	۲	۴/۴۹*	۱	X	تنش
۰/۶۰۸	۱۷	۰/۸۰۶	۱۸	Y	
۵/۳۶**	۲	۶/۸۸**	۱	X	شاهد
۰/۴۸۶	۱۷	۰/۶۷۳	۱۸	Y	
۴/۶۵***	۳	۵/۷۱*	۱	X	تنش
۰/۳۱۵	۱۶	۰/۷۳۸	۱۸	Y	
۴/۷۹*	۱	۴/۷۹*	۱	X	شاهد
۰/۷۸۹	۱۸	۰/۷۸۹	۱۸	Y	
۵/۶۴***	۲	۶/۸۱**	۱	X	تنش
۰/۴۵۴	۱۷	۰/۶۷۷	۱۸	Y	

***، ** و * به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج، یک و یک دهم درصد

(X رگرسیون؛ Y انحراف از رگرسیون؛ SSR max) درصدی از تغییرات که توسط متغیر مستقل اول توجیه می‌شود؛ (SSR complete) درصدی از تغییرات که توسط کل متغیرهای مستقل منظور شده در رگرسیون توجیه می‌شود.

میزان ضریب تبیین برای صفت شاخص برداشت با ۲۸ درصد و در نشانگرهای SAMPL بیشترین میزان ضریب تبیین برای صفت شاخص برداشت با ۲۰ درصد و در نشانگرهای AFLP بیشترین میزان ضریب تبیین برای صفت تعداد گلچه در خوشه با ۲۹ درصد مشخص شد. بررسی‌ها نشان داد در مورد نشانگرهایی که توزیع یکنواختی در اطراف صفات زراعی مورد بررسی داشتند، با توالی‌یابی نشانگرهای دارای ضریب تبیین بالا می‌توان به شناسایی ژن‌های رمزکننده صفات زراعی و همچنین نشانگرهایی که دارای ارتباط فراوان با آن صفت هستند جهت اشیاع نقشه‌های پیوستگی امیدوار بود (Roy et al. 2006). در مطالعه‌ای ارتباط بین ۱۳ صفت کمی و ۱۴۰ نشانگر مولکولی SSR در ۷۰ نمونه

Aegilops crassa بومی ایران با استفاده از رگرسیون گام به گام مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که تعداد ۸۷ نشانگر حداقل با یکی از ۱۳ صفت کمی، ارتباط معنی‌دار دارند و بعضی از نشانگرها در چندین صفت مشترک بود که این صفات همبستگی معنی‌داری باهم داشتند (Ranjbar et al. 2009). در مطالعه‌ی دیگری ارتباط بین ۱۰ صفت زراعی و ۷۰ نشانگر حاصل از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره روی ۱۱۵ ژنوتیپ جو بومی ایران مشخص شد که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط دارند که بر این اساس صفات مورد نظر یا دارای پیوستگی بسیار نزدیکی باهم هستند و یا احتمالا تحت‌تاثیر ژن‌های چند اثره قرار می‌گیرند (Ebrahimi et al. 2011).

صورتی که ژرم پلاسم موجود از یک گونه از لحاظ صفات کمی مهم در شرایط خاص (مانند تحمل تنش) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ارزیابی شود، داده‌های حاصل از نشانگرها، ابزار ارزشمندی برای ارزیابی ژرم پلاسم‌های دیگر و در نهایت شناسایی مواد ژنتیکی مطلوب حتی در شرایط آزمایشگاهی خواهد بود (Virk et al. 1996). بنابراین این مطالعه ارزش ژرم پلاسم‌های گیاهی را به عنوان ذخایر توارثی مفید و یا به عنوان منابع اطلاعات در خصوص صفات فیزیولوژیک تحت تاثیر تنش سرمای بهار را مشخص می‌کند.

منابع

An ZW, Xie LL, Cheng H, Zhou Y, Zhang Q, He XG, Huang HS (2009) A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Analytical Biochemistry* 391: 77-79.

Bassam B, Caetano-Anolles JG, Gressho PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annual Biochemistry* 19: 680-683.

Bertin P, Bouharmont J, Kinet JM (1996) Somaclonal variation and improvement in chilling tolerance in rice. *Plant Breeding* 115: 268-273.

Condon F, Charles Gustus D, Rasmusson C, Kevin PS (2008) Effect of advanced cycle breeding on genetic diversity in barley breeding germplasm. *Crop Science* 48: 1027-1036.

Dellaporta S, Wood L, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep. *plant molecular biology Reporter* 1: 19-21.

Ebrahimi A, Naghavi MR, Sabokdast M, Moradi AS (2011) Association analysis of agronomic traits with microsatellite markers in Iranian barley landraces barley. *Modern Genetics Journal* 6: 35-43. (In Farsi).

Fazelinasab B, Naghavi MR, Mardi M, Yazdisamadi B, Kazemi M (2006) Genetic diversity and relationships of Iranian cultivars using microsatellite markers. *Iranian Journal of Crop Science* 37: 93-99. (In Farsi).

Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B, oberhagemann P, Schuler K (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: 93-102.

Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology* 57: 461-485.

Hall AE (2001) *Crop responses to environmental stresses*. CRC Press, LLC, Boca Raton, FL 232 p.

در تهیه نقشه‌های پیوستگی، اطلاعات نشانگری حاصل از تحقیق حاضر در جهت انتخاب آغازگرهای مناسب می‌تواند مفید باشد ولی زمان‌بر بودن تهیه جمعیت‌های در حال تفرق برای نقشه‌یابی و در مواردی فقدان لینکاژ مناسب بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی از مهمترین محدودیت‌ها در زمینه نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی می‌باشد (Gupta et al. 2005) که با آنالیز ارتباطی می‌توان بر این محدودیت‌ها فائق آمد. به عبارت دیگر با توجه به وجود این روابط، کاربرد نشانگرهای مولکولی به همراه تجزیه رگرسیون چندگانه، کمک قابل توجهی در استفاده از تنوع زیستی گیاهان فراهم می‌آورد. علاوه بر این، در

Khalili A, Hajam S, Irannejad P (1991) The comprehensive water country project (climate knowing of Iran- climatic divisions). Ministry of Energy Publication, Pp. 274. (In Farsi).

Kölliker R, Jones ES, Drayton MC, Dupal MP, Forster JW (2001) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) marker for white clover (*Trifolium repens* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 102: 416-424.

Lichtenthaler H (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.

Liu J, Liu L, Hou N, Zhang A (2007) Chunguang Liu Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. *Euphytica* 155: 249-258.

Jamali Rad S, Mohammadi A, Khodarahimi M, Torchi M (2008) Genetic diversity evaluation in wheat cultivars using microsatellite marker, *Modern Genetics Journal* 1: 79-89.

Maccaferri M, Sanguineti MC, Donini P, Tuberosa R (2003) Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 783-797.

Mirfakhraii R, Mardi M, Talei A, Mahfoozi S, Zali A (2010) Identification of Quantitative Trait Loci Associated with Low-Temperature Tolerance in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Iranian Journal of Crop Science* 41: 105-112. (In Farsi).

Mohammadi R, Naghavi MR, Maali-Amiri R, Rezaei M (2010) Identification of informative markers of Microsatellite in the Part of the hay crop in Iran. *Modern Genetics Journal* 5: 57-66. (In Farsi).

Naghavi MR, Malaki M, Alizadeh H, Pirseiedi M, Mardi M (2009) An Assessment of Genetic Diversity in Wild Diploid Wheat *Triticum boeoticum* from West of Iran Using RAPD, AFLP and SSR Markers. *Journal Agronomy Science Technology* 11: 585-598.

Naghavi MR, Mardi M, Pirseyedi SM, Kazemi M, Potki P, Ghaffari MR (2007) Comparison of genetic variation among accessions of *Aegilops tauschii* using AFLP and SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 237-240.

Powell W, Andre M, Hanafey CM, Vogel J, Tingey S, Rafalsky A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for Germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-23.

Prasad M, Varsheny RK, Roy JK, Balyan HS, Gupta PK (2000) The use of microsatellite for detection DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 584-592.

Ranjbar M, Naghavi MR, Zali A, Aghaei MJ, Mardi M (2009) Identification of informative markers of SSR in *Aegilops crassa* accessions of Iran. *Journal of Agriculture* 11: 47-56. (In Farsi).

Roder MS, Korzum V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.

Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan HS, Gupta PK (2006) Association analysis of agronomically important

traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science* 90: 5-10.

Samach A, Wigge PA (2005) Ambient temperature perception in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 483-6.

Shalini KV, Manjunatha S, Lebrun P, Berger A, Baudouin L, Pirany N, Ranganatha RM, Theertha Prasad D (2007) Identification of molecular markers associated with mite resistance in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genome* 50: 35-42.

Virk PS, Ford-Lloyd BV, Jackson MT, Pooni HS, Clemeno TP, Newbury HJ (1996) Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. In: IRRI, Rice genetics III, Proceedings of The Third International Rice Genetics Symposium, Manilla, Philippines 307-316.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14: 415-421.

Zeb B, Ahmad khan L, Ali S, Bacha S, Mumtaz S, Swati ZA (2009) Study on genetic diversity in pakistani wheat varieties using simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology* 8: 4016-4019.