



## Association Analysis for Photosynthetic Pigments in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Late spring Cold stress

Mohammad Ali Abdollahi<sup>1</sup>, Reza Qoli Mirfakhrai<sup>2</sup> & Reza Darvishzadeh<sup>3</sup>✉

<sup>1</sup> MSc. Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran.

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran.

<sup>3</sup> Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia.

✉ Corresponding author. E-mail: [r.darvishzadeh@urmia.ac.ir](mailto:r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)

### ABSTRACT

**Introduction:** Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is the most widely cultivated cereal and a globally significant crop. Understanding physiological trait responses to late spring cold stress in susceptible and tolerant cultivars provides insights into cold tolerance mechanisms. One critical physiological trait affected by cold stress is leaf chlorophyll content. This study aimed to investigate the changes of photosynthetic pigments and their association with SSR markers in bread wheat subjected to late spring cold stress.

**Materials and methods:** Changes in the concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoids were evaluated in 70 bread wheat varieties under two temperature treatments: +8°C (control) and -2°C (cold stress). The cultivars were grown in a greenhouse under a completely randomized design with three replications. During the reproductive stage (Zadoks growth stages 48–60), temperature treatments were applied by gradually reducing the temperature from 24°C to the target temperature at a rate of -2°C per hour. Plants were maintained at the target temperature for two hours before being returned to 24°C. Sampling for trait measurements and molecular experiments was conducted 24 hours after the stress treatment.

**Results:** Mean comparisons revealed significant variations among cultivars across temperature treatments. For chlorophyll a, Moghan2 exhibited the highest change (20.70), while Karaj3 showed the lowest (4.30). For chlorophyll b, Chamran2 showed the highest change (7.78 mg.g<sup>-1</sup>), whereas Baharan showed the lowest (0.16). Total chlorophyll changes were highest in Moghan2 (20.70) and lowest in Karaj3 (4.30). For carotenoids, Ehsan exhibited the highest change (1.75), while Neyshabour displayed the lowest (0.009). Cultivars with minimal pigment changes were identified as potentially tolerant to late spring cold stress. Marker-trait association analysis identified specific SSR markers linked to pigment traits under control and stress conditions. Four SSR markers were identified under control conditions (+8°C) and four under cold stress (-2°C) for chlorophyll a. For chlorophyll b, three SSR markers were linked under control conditions and five under cold stress conditions. Total chlorophyll was associated with five SSR markers under both environments. Four SSR markers were identified under control conditions for carotenoids, while only one was detected under cold stress.

**Conclusion:** Structure analysis revealed that most genotypes were not clustered based on origin or growth type. Due to significant genotype × environment interactions, marker-trait associations were analyzed separately for control and stress conditions. More quantitative trait loci (QTL) were identified at 8°C than at -2°C. Several markers showed consistent associations across environments, demonstrating high stability and utility for marker-assisted selection. These results highlight the efficacy of SSR markers in evaluating genetic diversity and population structure among wheat genotypes, providing valuable tools for breeding programs aimed at improving cold tolerance.

**Keywords:** Chlorophyll, Informative markers, Low-temperature stress, Microsatellite markers, Wheat.

**Article Type:** Research Article

**Article history:** Received: 16 Sep 2024, Revised: 07 Oct 2024, Accepted: 02 Dec 2024, Published online: 27 Dec 2024

**Cite this article:** Abdollahi, M., Mirfakhrai, R. & Darvishzadeh, R. (2024). Association Analysis for Photosynthetic Pigments in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Late spring Cold stress. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 3(4), 517-544. DOI: [10.22126/cbb.2025.11517.1096](https://doi.org/10.22126/cbb.2025.11517.1096)



© The Author(s).  
doi: [10.22126/cbb.2025.11517.1096](https://doi.org/10.22126/cbb.2025.11517.1096)

Publisher: Razi University



## تجزیه ارتباطی برای رنگیزه‌های فتوسنتزی در گندم نان (*Triticum aestivum* L.) تحت تنش سرمای دیررس بهاره

محمدعلی عبدالهی<sup>۱</sup>، سیدرضاقلی میرفخرایی<sup>۲</sup> و رضا درویش‌زاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

<sup>۲</sup> استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

<sup>۳</sup> استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

✉ نویسنده مسئول. رایانامه: [r.darvishzadeh@urmia.ac.ir](mailto:r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)

### چکیده

**مقدمه:** گندم نان (*Triticum aestivum* L.) اولین غله و مهمترین گیاه زراعی دنیا است. نحوه تغییرات صفات فیزیولوژیک مختلف در اثر سرمای دیررس بهاره در ارقام حساس و متحمل می‌تواند در شناسایی راهکارهای تحمل به سرما مفید واقع شود. یکی از این تغییرات فیزیولوژیک تغییر در میزان کلروفیل برگ است. در همین راستا این تحقیق با هدف بررسی تغییرات رنگیزه‌های فتوسنتزی در گندم نان تحت تنش سرمای دیررس بهاره و تجزیه ارتباطی برای این صفات انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه حاضر تغییرات غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئیدها، در ۷۰ رقم گندم نان در دو دمای +۸ درجه سانتی‌گراد (شاهد) و -۲ درجه سانتی‌گراد (به عنوان تنش سرما) بررسی و ارتباطات نشانگر-صفت شناسایی شد. بدین منظور کشت ارقام در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه انجام شد. ارقام در مرحله زایشی (کد زادوکس ۴۸ تا ۶۰) با دماهای +۸ و -۲ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. بدین منظور دما از ۲۴ درجه سانتی‌گراد تا سطح دمای مورد نظر، هر یک ساعت دو درجه سانتی‌گراد کاهش یافت، سپس گیاهان به مدت دو ساعت در آن سطح دمایی متوقف شده و بعد از اعمال تنش، دما به صورت تدریجی به ۲۴ درجه سانتی‌گراد برگردانده شد و پس از ۲۴ ساعت نمونه‌برداری از گیاهان انجام گرفت.

**یافته‌ها:** با توجه به نتایج مقایسات میانگین ارقام گندم در سطوح دماهای مورد مطالعه، رقم مغان ۲ بیشترین میزان تغییر غلظت؛ (۲۰/۷۰ mg.g<sup>-1</sup>) و رقم کرج ۳ کمترین میزان تغییر غلظت؛ (۴/۳۰ mg.g<sup>-1</sup>) برای کلروفیل a، رقم چمران ۲ بیشترین میزان تغییر غلظت؛ (۷/۷۸ mg.g<sup>-1</sup>) و رقم بهاران کمترین میزان تغییر غلظت؛ (۰/۱۶ mg.g<sup>-1</sup>) برای کلروفیل b، رقم مغان ۲ بیشترین میزان تغییر غلظت؛ (۲۰/۷۰ mg.g<sup>-1</sup>) و رقم کرج ۳ کمترین میزان تغییر غلظت؛ (۴/۱۲۰ mg.g<sup>-1</sup>) برای کلروفیل کل، رقم احسان بیشترین میزان تغییر غلظت؛ (۱/۷۵ mg.g<sup>-1</sup>) و رقم نیشابور کمترین میزان تغییر غلظت؛ (۰/۰۹ mg.g<sup>-1</sup>) برای کارتنوئید نشان دادند. ارقام با کمترین تغییر غلظت را می‌توان ارقام متحمل به سرمای دیررس بهاره در نظر گرفت. در تجزیه ارتباطی؛ چهار نشانگر SSR در شرایط دمایی +۸ درجه سانتی‌گراد و چهار نشانگر SSR در شرایط دمایی -۲ درجه سانتی‌گراد برای صفت کلروفیل a، سه نشانگر SSR در شرایط دمایی +۸ درجه سانتی‌گراد و پنج نشانگر SSR در شرایط دمایی -۲ درجه سانتی‌گراد برای کلروفیل کل و تعداد چهار نشانگر SSR در شرایط دمایی +۸ درجه سانتی‌گراد و یک نشانگر SSR در شرایط دمایی -۲ درجه سانتی‌گراد برای صفت کارتنوئید شناسایی شد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج حاصل از تجزیه ساختار، اغلب ژنوتیپ‌ها بر اساس منشأ و تیپ رشدی تفکیک نشدند. شناسایی ارتباطات نشانگر-صفت به دلیل معنی‌دار بودن اثر متقابل دما و رقم بصورت جداگانه با داده‌های هر محیط (+۸ و -۲ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت. تعداد ارتباط معنی‌دار بیشتری در شرایط +۸ درجه سانتی‌گراد نسبت به -۲ درجه سانتی‌گراد شناسایی شد. تعدادی از ارتباطات معنی‌دار در دو محیط برای یک یا چند صفت خاص به‌طور مشترک شناسایی شدند، که حاکی از پایداری بالای این نشانگرها می‌باشد. اطلاعات حاصل از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای SSR ابزار توانمندی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ژنوتیپ-های گندم هستند.

**واژه‌های کلیدی:** تنش دمای پایین، کلروفیل، گندم، نشانگرهای آگاهی‌بخش، نشانگرهای میکروساتلیت.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۶ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۷/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۲ انتشار آنلاین: ۱۴۰۳/۱۰/۰۷

استناد: عبدالهی، م.، میرفخرایی، س. و درویش‌زاده، ر. (۱۴۰۳). تجزیه ارتباطی برای رنگیزه‌های فتوسنتزی در گندم نان (*Triticum aestivum* L.) تحت تنش سرمای

دیررس بهاره. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۳(۴)، ۵۱۷-۵۴۴. DOI: [10.22126/cbb.2025.11517.1096](https://doi.org/10.22126/cbb.2025.11517.1096)



## مقدمه

تمایز سنبله‌های جوان اگر سرمای دیررس بهاره اتفاق بیافتد، تمایز سنبله‌های جوان متوقف شده و یک پرچم و مادگی ناقص تشکیل می‌شود و این امر باعث کاهش قابل توجه عملکرد گندم می‌شود. سرمزدگی معمولاً در محدوده دمایی  $15^{\circ}\text{C}$  -  $0^{\circ}\text{C}$  و انجماد در دماهای کمتر از  $0^{\circ}\text{C}$  اتفاق می‌افتد (Tarkowski *et al.*, 2015).

مطالعه ژنتیک صفات کمی یکی از اهداف اصلی به‌نژادی گیاهی است که امروزه با استفاده از مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی انجام می‌شود. از زمانی که تجزیه ارتباطی برای شناسایی نواحی ژنومی درگیر در کنترل صفات کمی مطرح شد این روش به دلیل پیشرفت‌های چشمگیر در تکنولوژی توالی‌یابی DNA، علاقمندی برای شناسایی ژن‌های جدید و بهبود روش‌های آماری، نظر محققین زیادی را جلب کرده است (Stich *et al.*, 2010; Altaf *et al.*, 2024; Mohammadalizadeh *et al.*, 2024). اطلاع از تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت جهت استفاده از منابع ژنتیکی در برنامه‌های به‌نژادی از جمله تجزیه ارتباطی از اهمیت بالایی برخوردار است (Pour-Aboughadareh *et al.*, 2022). در تجزیه ارتباطی، شناسایی ارتباط نشانگر با صفات کمی با بهره‌مندی از تنوع طبیعی و بر اساس عدم تعادل پیوستگی انجام می‌گیرد (Karim *et al.*, 2023). در این تجزیه چون از جوامع طبیعی استفاده می‌شود تنوع ژنتیکی وسیع‌تری نسبت به جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والدی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. تجزیه ارتباطی در مقایسه با روش معمول؛ تجزیه پیوستگی، دارای دقت

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) اولین غله و مهمترین گیاه زراعی دنیا است. تقریباً ۶۰ درصد از گندم تولید شده در سطح جهان به‌عنوان غذا مصرف می‌شود و انتظار می‌رود تقاضا برای گندم در سطح جهان با افزایش جمعیت انسانی در چند دهه آینده (۲۰۲۰-۲۰۵۰) تا حدود ۷۰ درصد افزایش یابد (Abedi *et al.*, 2020). منشأ ژنتیکی گندم مثال بارزی از ترکیب گونه‌های خویشاوند در طبیعت برای تشکیل یک سری پلی‌پلوئید است. گیاهان در طول چرخه زندگی خود در معرض تنش‌های غیر زیستی مختلفی مانند شوری، خشکسالی، دماهای بالا/پایین، سمیت فلزات سنگین، سیل، اشعه UV-B و اوزون قرار می‌گیرند که اثرات نامطلوبی بر رشد، بهره‌وری و کیفیت آنها دارد (Gull *et al.*, 2019; Gholinezhad *et al.*, 2022, 2024). توانایی گیاهان برای سازش با تنش‌های محیطی بستگی به نوع، شدت و مدت تنش و همچنین گونه گیاهی و مرحله‌ای از رشد گیاه که تنش رخ می‌دهد، دارد (Knight & Knight, 2001). وقتی گیاه با تنش روبرو شود، تغییرات فیزیولوژیک، مورفولوژیک و بیوشیمیایی زیادی جهت سازگار شدن با تنش در آن اتفاق می‌افتد (Karimzadeh *et al.*, 2005). دمای پایین یکی از مهمترین عوامل غیر زیستی محدود کننده رشد، تولید و نیز توزیع جغرافیایی گیاهان است (Shewry, 2009; Allahabadi *et al.*, 2024). پدیده سرمزدگی به آسیب ناشی از کم شدن ناگهانی دما یا تغییر شدید دما بعد از مراحل کشت اشاره دارد. در مرحله

تجزیه ارتباطی برای رنگیزه‌های فتوسنتزی در گندم نان...

بالتری است چرا که در این نوع تجزیه تمام رویدادهای میوزی که در طول تاریخچه تکاملی گیاه انباشته شده است، در نظر گرفته می‌شود (Rezaeizad *et al.*, 2011). تجزیه ارتباطی به‌عنوان یک روش جایگزین و یا مکمل جهت شناسایی ارتباطات نشانگر و صفت دارای مزایای زیادی نسبت به تجزیه پیوستگی از جمله افزایش وضوح موقعیت QTL و استفاده از ژرمپلاسم طبیعی و افزایش پوشش آلی می‌باشد (Yu *et al.*, 2011). در تحقیقی با استفاده از تحلیل ارتباط در گستره ژنوم (Genome wide association analysis; GWAS) بر روی رقم گندم نان، دو ارتباط نشانگر-صفت برای غلظت روی (Zn) در دانه روی کروموزوم‌های 1A و 7B شناسایی شد (Rathan *et al.*, 2022). در این مطالعه تغییرات غلظت کلروفیل و کارتنوئید در ۷۰ رقم گندم نان در دو دمای +۸ درجه سانتی‌گراد و -۲ درجه سانتی‌گراد (تنش سرما) بررسی و ارتباطات نشانگر-صفت با نشانگرهای SSR شناسایی شد. نشانگرهای SSR شناسایی شده به‌طور بالقوه می‌توانند در انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های به‌نژادی برای تحمل سرما مورد استفاده قرار گیرند.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

در این مطالعه، تعداد ۷۰ رقم تجاری گندم از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد و از لحاظ تنوع ژنتیکی و فنوتیپی ارزیابی شدند. بذور ارقام به

۵۲۰

مدت ۵ دقیقه با  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  ۵ درصد ضدعفونی شدند. سپس دو تا سه بار بذور در آب استریل شست و شو داده شدند و آنگاه بذور روی کاغذهای صافی اتوکلاو شده، درون پتری‌دیش‌های اتوکلاو شده منتقل شدند. بعد از این مرحله، بذور به مدت چهار روز در اتاقکی با دمای  $25^\circ\text{C}$  و رطوبت ۷۰٪ در تاریکی به‌منظور جوانه‌زنی قرار گرفتند. بعد از این که طول نورسته‌ها به اندازه ۲ سانتی‌متر رسیدند، پتری‌دیش‌ها به مدت شش هفته در دمای ۱ تا ۳ درجه سلسیوس جهت بهاره‌سازی در یخچال قرار گرفتند. سپس تعداد ۱۰ گیاهچه از هر رقم در گلدان‌های اتیکت-گذاری شده با ابعاد قطر بالا ۲۵cm، قطر پایین ۲۰cm و عمق ۲۶cm که با نسبت ۱:۱:۱ به ترتیب کود برگی، کود دامی و خاک مزرعه پُر شده بودند، در عمق ۳cm از سطح بستر کشت شدند. پس از استقرار گیاهچه‌ها در گلدان‌ها، عمل تنک کردن انجام شد و پنج بوته در هر گلدان باقی ماند. گلدان‌ها در اتاق رشد با دمای  $24^\circ\text{C}$  روز و  $18^\circ\text{C}$  شب، طول روز ۱۶ ساعت و طول شب ۸ ساعت و شدت نور  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران با مختصات طول شرقی ۵۱ درجه و ۱۵ دقیقه و عرض شمالی ۳۵ درجه و ۴۵ دقیقه و با ۱۳۵۳ متر ارتفاع از سطح دریا نگهداری شدند. گلدان‌ها به‌طور یکنواخت با کودهای شیمیایی تغذیه شدند. برای کنترل آفات و بیماری‌ها از جمله شته گندم از سم دیازینون به نسبت یک در ۱۰۰۰ استفاده شد. برای کنترل علف‌های هرز وجین دستی انجام گرفت. پس از دو ماه که بوته‌های گندم به مرحله زایشی (خوشه

برگ به کمک ازت مایع پودر شد و در درون فالکون ۱۵ ml قرار داده شد. سپس ۱۰ ml متانول ۹۹/۸٪ تهیه شده از شرکت مرک آلمان به آن اضافه گردید. سپس فالکون به مدت چند ثانیه ورتکس شد. سپس درون سانتریفیوژ Eppendorf با دور ۱۲۰۰۰rpm با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. سپس مایع شفاف و سبز رنگ رویی برداشته شده و درون کووت اسپکتروفوتومتر ریخته شد. جذب نور با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل GENOVA در طول موج‌های ۴۷۰ nm، ۶۵۲ nm و ۶۶۵ nm قرائت شد. غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئیدها بر حسب  $\text{mg g}^{-1}$  از طریق روابط زیر برآورد شد (Lichtenthaler, 1987).

$$C_a = 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4} \quad \text{رابطه ۱}$$

$$C_b = 34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2} \quad \text{رابطه ۲}$$

$$C_{a+b} = 1.44A_{665.2} - 24.93A_{652.4} \quad \text{رابطه ۳}$$

$$C_c = \frac{1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96C_b}{221} \quad \text{رابطه ۴}$$

#### استخراج DNA و ارزیابی ژنوتیپی

از گیاهچه‌های ۲۰ روزه نمونه‌های برگ‌گی انتخاب و استخراج DNA به روش سقایی معروف و همکاران (Saghai-Marooif *et al.*, 1984) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتوفوتومتر ارزیابی شد. در این تحقیق به منظور بررسی سلامت

رفتن) رسیدند (معادل مقیاس زادوکس ۴۸-۶۰، (Zadoks, 1974))، بوته‌ها برای اعمال تنش سرما به مدت یک هفته به اتاقک سرما با طول روز ۱۴ ساعت و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و طول شب ۱۰ ساعت و دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از آن دما هر یک ساعت ۲ درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد تا جداگانه به هر یک از سطوح دماهای +۸ و -۲ درجه سانتی‌گراد برسد. گلدان‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای نهایی مورد نظر قرار گرفتند و بعد از پایان آن، دمای اتاقک هر ساعت ۲ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد تا به شرایط پیش از اعمال سطوح دمایی (۲۴ درجه سانتی‌گراد) باز گردد (Shroyer *et al.*, 1995). پس از ۲۴ ساعت نمونه‌برداری از گیاهان انجام گرفت و محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل و کارتنوئید بر حسب میلی-گرم در گرم بافت تر برگ از طریق روابط ۱، ۲، ۳ و ۴ محاسبه شدند.

#### تعیین غلظت رنگدانه‌های گیاهی

جهت بررسی تغییرات غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئیدها، نمونه‌برداری از برگ پرچم گیاهان تحت شرایط دمایی ۸ درجه سانتی‌گراد و -۲ درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت بعد از اعمال دما انجام گرفت. نمونه‌ها، درون فویل آلومینیومی قرار داده شدند. سپس در محیط ازت مایع به فریزر با دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. جهت اندازه‌گیری رنگدانه‌ها، ۵۰ میلی‌گرم

به مدت ۳۰s و دمای ۹۴°C، اتصال آغازگر به رشته-های الگو به مدت ۳۰s و بسته به نوع آغازگر دمای X°C (دمای X همیشه ۱۰ درجه بالاتر از دمای واقعی اتصال آغازگر در نظر گرفته می‌شود و به ازاء هر چرخه یک درجه کم می‌گردد تا به دمای واقعی اتصال آغازگر برسد (جدول ۲)، بسط آغازگر به مدت ۳۰s و دمای ۷۲°C، مرحله سوم: ۲۵ چرخه شامل: واسرشته‌سازی به مدت ۳۰s و دمای ۹۴°C، اتصال آغازگر به رشته‌های الگو به مدت ۳۰s و دمای اتصال آغازگر (جدول ۲) و بسط آغازگر به مدت ۳۰s و دمای ۷۲°C، مرحله چهارم: چرخه‌ی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C. بعد از تمام شدن زمان تکثیر، محصول واکنش در دمای ۴°C نگهداری شد. الکتروفورز محصولات PCR با ژل آگارز ۳٪ در بافر ۱X TAE که با Safe stain رنگ‌آمیزی شده بود انجام گرفت. امتیازدهی باندها به صورت بارز انجام شد.

#### تجزیه داده‌ها

تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک در قالب مدل آماری طرح پایه مورد استفاده (طرح کاملاً تصادفی) در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام گرفت. همبستگی ساده بین صفات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ محاسبه شد. محتوای اطلاعات چندشکلی (Polymorphic Information Content; PIC) برای هر نشانگر SSR، بوسیله نرم‌افزار

DNA و وجود یا عدم وجود RNA همراه آن، ۲ μL از DNA استخراج شده به همراه ۱ μL از بافر بارگذاری<sup>۲</sup> مخلوط شده و روی ژل آگارز ۱٪ در بافر ۱X TAE که با Safe stain رنگ‌آمیزی شده بود، بارگذاری شد و به مدت ۴۰ دقیقه و با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. مشاهده عکس ژل به کمک دستگاه Gel documentation زیر نور UV انجام شد. برای انجام PCR تعداد ۳۰ جفت آغازگر ریزماهواره از شرکت پیشگام (تهران، ایران) تهیه شد. این آغازگرها از آغازگرهای ریزماهواره گندم، سری Xgwm که توسط Roder جداسازی شده‌اند، می‌باشد (Roder *et al.*, 1998). پس از انتخاب آغازگرهای SSR، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۱۰μL (جدول ۱) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Eppendorf انجام شد. مسترمیکس PCR از شرکت پیشگام (تهران، ایران) تهیه شد. PCR به روش Touchdown انجام گرفت. این یکی از روش‌هایی است که از تکثیر غیر اختصاصی جلوگیری می‌کند (Done *et al.*, 1991). در این روش برنامه PCR به گونه‌ای طراحی می‌گردد که در چرخه‌های متوالی، به تدریج دمای اتصال کاهش می‌یابد تا به دمای اتصال مورد نظر آغازگر برسد. نیم رخ حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به شرح زیر بود: مرحله اول: یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۴ min و دمای ۹۴°C، مرحله دوم: ۱۰ چرخه شامل: واسرشته‌سازی

<sup>۲</sup>Loading dye

احتمال باشد.  $\text{LnP}(D)$  لگاریتم طبیعی درست‌نمایی توزیع ژنوتیپ‌ها در  $K$  زیر جمعیت است. میانگین حسابی این مقادیر روی تکرارها (جمع این مقادیر در تکرارهای مختلف و تقسیم آن بر تعداد تکرارها) به همراه انحراف معیار مربوطه با  $L(K)$  نشان داده می‌شود که عبارت است از:

$$L(K) = \text{Mean LnP}(D) + SD$$

با ترسیم مقادیر  $L(K)$  روی تعداد زیر جمعیت ( $K$ ) نموداری بدست می‌آید که بهترین زیر جمعیت روی این نمودار نقطه‌ای است که نمودار مسطح می‌شود. در روش دیگری که توسط (Evano *et al.*, 2005) ارائه شده است، بیشینه مقدار  $K$  بهترین تعداد زیر جمعیت را نشان می‌دهد. در بای‌پلات حاصل وقتی درصد عضویت یک ژنوتیپ به یک کلاستر بیشتر یا مساوی ۰/۷ باشد ژنوتیپ به آن کلاستر تعلق می‌گیرد؛ ولی در صورتی که درصد عضویت آن کمتر از این مقدار باشد به عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط شده) در نظر گرفته می‌شود (Spataro *et al.*, 2011). تجزیه ارتباطی به‌وسیله نرم‌افزار TASSEL2.1 انجام شد. چالش اصلی در تجزیه ارتباطی متمایز ساختن روابط حقیقی بین نشانگرها و صفات از روابط کاذب ناشی از ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی است که البته در این بین تأثیر روابط خویشاوندی در ارایه نتایج مثبت کاذب بیشتر از ساختار جمعیت می‌باشد. لذا برای تعیین ارتباطات معنی‌دار نشانگر و صفت از مدل خطی مخلوط (Mixed linear model; MLM) به همراه ماتریس  $K$  و  $Q$  به عنوان کواریانت استفاده شد.  $Q$

PowerMarker با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Powel *et al.*, 1996).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

در این رابطه  $P_i$  فراوانی آلل نام و  $n$  تعداد آلل‌های نشانگر است. مقدار عددی این شاخص بین صفر (برای آلل‌های یک شکل در جمعیت) تا ۰/۵ (برای آلل‌هایی که فراوانی آنها در جمعیت برابر باشد) تغییر می‌کند. برای گروه‌بندی ارقام مورد مطالعه و تجزیه خوشه‌ای بر مبنای داده‌های ژنوتیپی از نرم‌افزار TASSEL2.1 استفاده شد. در ادامه، تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت با استفاده از داده‌های SSR و گروه‌بندی بیز در نرم‌افزار Structure نسخه ۲,۳,۴ (Pritchard *et al.*, 2000) انجام شد. این روش امکان تفکیک کل جمعیت به زیر جمعیت‌هایی با ساختارهای همگن را فراهم می‌سازد. مقادیر زیر جمعیت فرضی اولیه ( $K$ ) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت، ۳ تکرار برای هر  $K$  در نظر گرفته شد. از مدل Admixture با ۱۰۰۰۰ بار Burn-in (دوره گرم کردن) و ۱۰۰۰۰ بار تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) جهت حصول منحنی حداکثر درست‌نمایی استفاده شد. در نهایت تعداد زیر جمعیت‌های احتمالی ( $K$  بهینه) به دو روش تعیین شد: آماره  $\text{LnP}(D)$  که احتمال پسین داده‌ها را با در نظر گرفتن  $K$  فرضی محاسبه می‌کند و آماره  $\Delta K$  (Evano *et al.*, 2005) که شیب تابع احتمالی  $\text{Ln P}(D)$  را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد  $K$  فرضی در آن نقطه دارای حداکثر

گرفتن ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت، ارتباطات و پیوستگی‌های دروغین بین نشانگر و صفت به حداقل می‌رسد.

یک عامل ثابت است و ضریب تعلق هر فرد به زیرجمعیت‌ها را نشان می‌دهد که با نرم‌افزار Structure محاسبه می‌شود. K ماتریس روابط خویشاوندی افراد است و یک عامل تصادفی در نظر گرفته می‌شود و با نرم‌افزار TASSEL2.1 محاسبه می‌شود. در MLM با در نظر

### جدول ۱- اجزای PCR در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم با نشانگرهای میکروساتلایت

**Table 1. PCR components in investigating the genetic diversity of wheat genotypes with microsatellite markers**

مقدار مواد در ۱۰ میکرولیتر Amount in 10 $\mu$ l	غلظت Concentration	اجزای واکنش PCR component
3	-	آب مقطر (Distiled water)
5	1x	مستر میکس (Master mix)
0.5	100 pMol	آغازگر پیش‌رو (Forward primer)
0.5	100 pMol	آغازگر پس‌رو (Reverse primer)
1	50-100 pMol	DNA ژنومی (Genomic DNA)
10	-	حجم نهایی (Total volum)

### نتایج و بحث

#### تجزیه واریانس صفات فنوتیپی

آماره‌های توصیفی در جدول ۳ خلاصه شده است. تحت تنش سرما کمترین ضریب تغییرات در صفت کلروفیل کل و بیشترین آن در صفت کلروفیل a مشاهده شد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر دما، رقم و اثر متقابل دما و رقم بر کلیه صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود (جدول ۴). معنی‌دار بودن اثر متقابل دما و رقم در جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که رتبه‌بندی ژنوتیپ‌ها از لحاظ

صفات مورد بررسی از سطحی به سطح دیگر دما متفاوت است. رتبه‌بندی متفاوت حاکی از وجود تنوع ژنتیکی از نظر صفات اندازه‌گیری شده و احتمالاً مکانیسم‌های متفاوت در واکنش به تنش سرمای دیررس است که می‌تواند در انتخاب والدین مناسب و تولید جمعیت‌های در حال تفرق مورد استفاده قرار گیرند. بالاترین ضریب تغییرات در صفت کلروفیل b با مقدار (۱۶/۶۸) و پایین‌ترین مقدار در صفت کارتنوئید با مقدار (۹/۲۴) مشاهده شد (جدول ۴).



## جدول ۲- مشخصات آغازهای SSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم

Table 2. Characteristics of SSR primers used in investigating the genetic diversity of wheat genotypes

نشانهگر Marker	توالی (۵'→۳') Sequence (5'→3')	جایگاه کروموزومی Chromosomal locus	دمای اتصال Annealing temperature (°C)
Xgwm 10	F: CGC ACC ATC TGT ATC ATT CTG R: TGG TCG TAC CAA AGT ATA CGG	2A	50
Xgwm 2	F: CTG CAA GCC TGT GAT CAA CT R: CAT TCT CAA ATG ATC GAA CA	3D	50
Xgwm 55	F: TGC CCA CAA CGG AAC TTG R: GCA ACC ACC AAG CAC AAA GT	2B	55
Xgwm 68	F: AGG CCA GAA TCT GGG AAT G R: CTC CCT AGA TGG GAG AAG GG	5B	60
Xgwm 88	F: CAC TAC AAC TAT GCG CTC GC R: TCC ATT GGC TTC TCT CTC AA	6B	60
Xgwm 129	F: TCA GTG GGC AAG CTA CAC AG R: AAA ACT TAG TAG CCG CGT	5A	50
Xgwm 162	F: AGT GGA TCG ACA AGG CTC TG R: AGA AGA AGC AAA GCC TTC CC	3A	60
Xgwm 164	F: ACA TTT CTC CCC CAT CGT C R: TTG TAA ACA AAT CGC ATG CG	1A	55
Xgwm 165	F: TGC AGT GGT CAG ATG TTT CC R: CTT TTC TTT CAG ATT GCG CC	4D	60
Xgwm 191	F: AGA CTG TTG TTT GCG GGC R: TAG CAC GAC AGT TGT ATG CAT G	2B	60
Xgwm 192	F: GGT TTT CTT TCA GAT TGC GC R: CGT TGT CTA ATC TTG CCT TGC	5D	60
Xgwm 642	F: ACG GCG AGA AGG TGC TC R: CAT GAA AGG CAA GTT CGT CA	1D	60
Xgwm 259	F: AGG GAA AAG ACA TCT TTT TTT TC R: CGA CCG ACT TCG GGT TC	1B	55
Xgwm 260	F: GCC CCC TTG CAC AA TC R: CGC AGC TAC AGG AGG CC	7A	55
Xgwm264	F: GAG AAA CAT GCC GAA CAA CA R: GCA TGC ATG AGA ATA GGA	1B	60
Xgwm 284	F: AAT GAA AAA ACA CTT GCG TGG R: GCA CAT TTT TCA CTT TGC GG	3B	60
Xgwm 319	F: GGT TGC TGT ACA AGT GTT CAC G R: CGG GTG CTG TGT GTA ATG AC	2B	55
Xgwm 428	F: CGA GGC AGC GAG GAT TT R: TTC TCC ACT AGC CCC GC	7D	60
Xgwm 456	F: TCT GAA CAT TAC ACA ACC CTG A R: TGC TCT CTC TGA ACC TGA AGC	3D	55
Xgwm 458	F: AAT GGC AAT TGG AAG ACA TAG C R: TTC GCA ATG TTG ATT TGG C	1D	60
Xgwm 469	F: CAA CTC AGT GCT CAC ACA ACG R: CGA TAA CCA CTC ATC CAC ACC	6D	60
Xgwm 471	F: CGG CCC TAT CAT GGC TG R: GCT TGC AAG TTC CAT TTT GC	7A	60
Xgwm498	F: GGT GGT ATG GAC TAT GGA CACT R: TTT GCA TGG AGG CAC ATA CT	1B	55
Xgwm 518	F: AAT CAC AAC AAG GCG TGA CA R: CAG GGT GGT GCA TGC AT	6B	55
Xgwm 540	F: TCT CGC TGT GAA ATC CTA TTT C R: AGG CAT GGA TAG AGG GGC	5B	55
Xgwm 583	F: TTC ACA CCC AAC CAA TAG CA R: TCT AGG CAG ACA CAT GCC TG	5D	60
Xgwm 608	F: ACA TTG TGT GTG CGG CC R: GAT CCC TCT CCG CTA GAA GC	2D	60
Xgwm 610	F: CTG CCT TCT CCA TGG TTT GT R: AAT GGC CAA AGG TTA TGA AGG	4A	60

Xgwm 611	F: CAT GGA AAC ACC TAC CGA AA R: CGT GCA AAT CAT GTG GTA GG	7B	55
Xgwm 613	F: CCG ACC CGA CCT ACT TCT CT R: TTG CCG TCG TAG ACT GG	6B	60

جدول ۳- آماره های توصیفی برای صفات کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در ۷۰ رقم گندم نان تحت تنش سرمای دیررس بهاره

**Table 3. Descriptive statistics for chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoid traits in 70 bread wheat cultivars under late spring cold stress**

-۲ درجه سانتی‌گراد				+۸ درجه سانتی‌گراد				مورد
-2°C				+8°C				Item
کارتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	کارتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	
Carotenoid	Total chlorophyll	Chlorophyll b	Chlorophyll a	Carotenoid	Total chlorophyll	Chlorophyll b	Chlorophyll a	
0.79	13.83	7.06	6.77	1.36	22.56	8.96	13.78	میانگین (Average)
0.31	9.36	3.85	3.34	0.6	16.68	5.27	7.87	حداقل (Minimum)
1.3	30.03	11.13	19.55	2.28	35.38	14.93	24.18	حداکثر (Maximum)
0.99	20.67	7.28	16.2	1.68	18.7	9.66	16.3	دامنه (Rang)
0.21	2.89	1.5	2.29	0.38	3.7	2.12	3.15	انحراف معیار (SD)
0.27	0.20	0.21	0.33	0.28	0.16	0.23	0.22	ضریب تغییرات (CV)

SD: Standard deviation; CV: Coefficient of variation

جدول ۴- تجزیه واریانس برای صفات کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در ۷۰ رقم گندم نان تحت تنش سرمای دیررس بهاره

**Table 4. Variance analysis for chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoid traits in 70 bread wheat cultivars under late spring cold stress**

میانگین مربعات (Mean squares)				درجه آزادی	منابع تغییرات
کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	df	Sources of variations	
Carotenoid	Total chlorophyll	Chlorophyll b	a		
0.27**	26.6**	11.86**	13.59**	69	ژنوتیپ (Genotype)
33.84**	2584.64**	384.03**	976.09**	1	دما (Temperature)
0.32**	29.68**	8.47**	21.15**	69	ژنوتیپ × دما (Genotype × Temperature)
0.009	4.86	1.76	3.44	280	خطا (Error)
9.24	11.27	16.68	16.003		ضریب تغییرات (%) (Coefficient of variation)

\*\* معنی دار در سطح احتمال ۱٪

df: Degree of freedom; \*\*: Significance at the 1% probability level

#### تاثیر سرمای دیررس بهاره بر رنگدانه‌ها

۴/۳۰ به نظر می‌رسد به ترتیب رقمی حساس و متحمل به سرمای دیررس بهاره باشند. در رابطه با صفت کلروفیل b در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در رقم چمران ۲ با غلظت  $14/94 \text{ mg.g}^{-1}$  و در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در رقم شهریار با غلظت  $11/14 \text{ mg.g}^{-1}$  بیشترین مقدار کلروفیل b مشاهده شد. در مقابل در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در رقم سپاهان با غلظت  $5/27 \text{ mg.g}^{-1}$  و در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در رقم گنبد با غلظت  $3/85 \text{ mg.g}^{-1}$  کمترین مقدار کلروفیل b مشاهده شد. بنابراین بر اساس صفت کلروفیل b چمران ۲ با بیشترین میزان تغییر؛  $0/16$  و رقم بهاران با کمترین میزان تغییر با مقدار  $0/16$  به نظر می‌رسد به ترتیب رقمی حساس و متحمل به

با توجه به نتایج مقایسات میانگین ارقام گندم در هر یک از سطوح دمای مورد مطالعه (جدول ۵)، در رابطه با صفت مقدار کلروفیل a در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در رقم مغان ۲ با غلظت  $24/19 \text{ mg.g}^{-1}$  و در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در رقم کرج ۳ با غلظت  $19/55 \text{ mg.g}^{-1}$  بیشترین مقدار کلروفیل a مشاهده شد. در مقابل، در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در رقم افلاک با غلظت  $9/88$  و در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در رقم سپاهان با غلظت  $3/34 \text{ mg.g}^{-1}$  کمترین مقدار کلروفیل a مشاهده شد. بنابراین بر اساس این صفت رقم مغان ۲ با بیشترین میزان تغییر؛  $20/70$  و کرج ۳ با کمترین میزان تغییر؛

دیررس بهاره باشند. با توجه به نتایج مقایسات میانگین ارقام مورد بررسی در رابطه با صفت کارتنوئید در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در رقم احسان با مقدار ۲/۲۹ بیشترین و در رقم ترابی با مقدار ۰/۶۰ کمترین مقدار کارتنوئید مشاهده شد. در مقابل در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در رقم کرج ۳ با مقدار ۱/۳۱ بیشترین مقدار و در رقم گاسپارد با مقدار ۰/۳۱ کمترین مقدار کارتنوئید مشاهده شد. بنابراین رقم احسان با بیشترین میزان تغییر؛ ۱/۷۵ و رقم نیشابور با کمترین میزان تغییر؛ ۰/۰۰۹ به نظر می‌رسد به ترتیب رقمی حساس و متحمل به سرمای دیررس بهاره باشند.

سرمای دیررس بهاره باشند. با توجه به نتایج مقایسات میانگین در رابطه با صفت مقدار کلروفیل کل در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در رقم مغان ۲ با غلظت  $26/19 \text{ mg.g}^{-1}$  و در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در رقم کرج ۳ با غلظت  $19/55 \text{ mg.g}^{-1}$  بیشترین مقدار کلروفیل کل مشاهده شد. در مقابل در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در رقم افلاک با غلظت  $9/88 \text{ mg.g}^{-1}$  و در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در رقم سپاهان با غلظت  $3/34 \text{ mg.g}^{-1}$  کمترین مقدار کلروفیل کل مشاهده شد. بنابراین بر اساس صفت کلروفیل کل مغان ۲ با بیشترین میزان تغییر؛ ۲۰/۷۰ و کرج ۳ با کمترین میزان تغییر؛ ۴/۳۰ به نظر می‌رسد به ترتیب رقمی حساس و متحمل به سرمای

#### جدول ۵- مقایسه میانگین ارقام گندم برای صفات رنگدانه در هر یک از سطوح دمایی ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

**Table 5. Mean Comparison of wheat cultivars for pigment traits in each of temperature levels ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )**

شمار ° No.	نام رقم Cultivar name	+۸ درجه سانتی‌گراد +8°C				-۲ درجه سانتی‌گراد -2°C			
		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل Total chlorophyll l	کارتنوئید Caroteno i d	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل Total chlorophyll l	کارتنوئید Caroteno i d
1	زارع Zare	11.956	5.848	17.805	1.6589	9.522	4.075	4.075	0.99
2	زرین Zarin	13.071	8.306	21.377	1.6892	6.506	4.875	4.875	0.587
3	پیشتاز Pishtaz	14.434	8.327	22.76	0.9157	7.253	6.164	6.164	1.141
4	سیستان Sistan	12.555	7.066	19.621	1.2017	6.8	8.204	8.204	1.032
5	شاهپسند Shahpesan d	12.724	7.072	19.797	1.3316	6.579	5.85	5.85	0.969
6	مروارید Morvarid	10.203	7.719	18.589	1.5572	9.53	5.44	5.44	0.926
7	ارگ Arg	13.616	5.883	19.5	1.383	7.77	8.912	8.912	0.937

8	هیرمند	Hirmand	10.448	6.834	17.283	0.8203	6.896	8.447	8.447	0.678
9	اترک	Atrak	16.864	9.633	18.497	0.9789	10.066	5.133	5.133	0.554
10	کرج ۲	Karaj2	19.653	8.664	25.883	1.6193	7.704	8.571	8.571	0.794
11	دریا	Darya	13.584	7.384	20.968	1.0722	8.825	6.896	6.896	0.834
12	ازادی	Azadi	12.900	9.893	22.46	1.5331	6.878	5.135	5.135	1.16
13	کرج ۳	Karaj3	21.849	13.535	35.384	1.450	19.551	10.484	10.484	1.306
14	فلات	Falat	14.075	8.250	22.326	1.434	7.508	6.796	6.796	1.055
15	سیوند	Sivand	12.703	7.403	20.107	0.95	5.059	8.395	8.395	0.815
16	گاسپارد	Gaspard	9.717	8.013	17.397	0.797	6.855	8.62	8.62	0.312
17	دز	Dez	13.680	9.731	23.414	1.948	6.34	8.719	8.719	0.997
18	سیلان	Sabalan	13.514	6.987	20.501	1.486	5.411	7.815	7.815	0.971
19	آذر ۲	Azar2	19.484	9.122	28.607	1.466	7.094	9.14	9.14	0.747
20	بزوستایا	Bezostaya	14.426	10.381	24.807	1.06	6.623	9.628	9.628	0.694
21	اوحدی	Ohadi	12.876	5.976	18.853	0.996	5.191	4.918	4.918	1.027
22	سایسون	Saison	13.025	8.579	21.526	0.976	6.809	5.872	5.872	0.31
23	اروم	Erom	15.59	10.439	27.03	1.491	10.294	9.0084	9.0084	0.911
24	بیات	Bayat	16.752	11.32	23.987	1.953	7.7	5.0317	5.0317	0.513
25	BC روشن	Roshan BC	13.639	6.736	21.376	1.235	4.257	6.0294	6.0294	0.878
26	رصد	Rasad	13.673	13.38	27.688	1.971	10.307	7.744	7.744	0.445
27	امید	Omid	14.585	9.04	23.625	1.436	8.847	7.564	7.564	0.935
28	رسول	Rasol	13.414	8.454	21.304	0.798	6.523	6.959	6.959	0.565
29	گلستان	Golestan	8.186	12.387	20.574	0.969	5.575	7.0893	7.0893	0.837
30	مغان ۲	Moghan2	24.185	10.088	34.273	1.835	5.482	6.362	6.362	1.042
31	سپاهان	Sepahan	12.456	5.270	17.726	1.466	3.343	6.021	6.021	0.753
32	بهار	Bahar	13.473	6.588	20.062	1.472	5.273	7.81	7.81	0.364
33	الوند	Alvand	14.228	6.476	20.705	1.421	5.424	7.099	7.099	0.89
34	الموت	Alamot	14.456	5.793	20.249	1.04	7.7	6.247	6.247	0.843
35	مهدوی	Mahdavi	14.553	6.81	21.363	1.111	5.26	4.994	4.994	0.751
36	نیشابور	Nayshabor	9.228	7.453	16.681	0.947	6.71	5.339	5.339	0.9384
37	کویر	Kavir	12.932	9.735	22.668	0.781	6.327	6.618	6.618	0.92

38	چمران	Chamran	22.274	8.4	30.675	1.863	5.26	4.994	4.994	0.688
39	شیرودی	Shirodi	12.836	11.551	24.387	1.017	6.551	7.831	7.831	0.841
40	مرودشت	Marvdasht	13.898	7.4217	21.566	1.278	8.93	5.542	5.542	0.917
41	شهریار	Shahryar	9.580	10.781	20.361	1.23	5.4	11.138	11.138	0.872
42	بم	Bam	12.875	10.905	23.78	0.958	6.383	9.849	9.849	0.589
43	افلاک	Aflak	7.877	13.524	21.456	0.952	3.897	8.264	8.264	0.927
44	پارسی	Parsi	12.125	8.012	20.138	1.045	7.793	8.646	8.646	0.9944
45	نیک نژاد	Niknegad	11.635	9.73	21.365	1.687	7.277	7.793	7.793	0.587
46	میهن	Maehan	13.630	6.957	21.345	1.556	7.485	8.896	8.896	0.587
47	سیروان	Sirvan	14.122	8.026	22.148	1.404	5.879	8.376	8.376	0.842
48	افق	Ofogh	21.698	7.957	29.656	1.799	7.551	7.34	7.34	0.9
49	گنبد	Gonbad	13.844	10.354	24.199	1.828	7.729	3.854	3.854	0.701
50	چمران ۲	Chamran2	16.752	14.939	31.411	1.093	7.325	7.159	7.159	0.666
51	بهاران	Baharan	13.173	9.801	22.975	0.941	6.663	6.007	6.007	1.13
52	مهرگان	Mehrgan	13.525	10.124	23.65	1.84	6.475	6.309	6.309	0.824
53	شوش	Shosh	13.776	7.688	21.465	1.708	6.346	5.334	5.334	0.77
54	نارین	Narin	12.453	12.127	24.581	0.765	5.49	5.706	5.706	1.034
55	حیدری	Haydari	9.071	12.165	21.55	1.387	5.259	8.076	8.076	0.933
56	برات	Barat	13.877	6.13	20.008	1.512	4.407	6.682	6.682	0.994
57	شاوور	Shavoor	14.347	9.612	23.959	1.934	3.759	7.502	7.502	0.723
58	رخشان	Rakhshan	7.897	10.19	18.087	2.043	3.759	8.780	8.780	0.482
59	خلیل	Khalil	19.410	6.291	25.106	1.799	4.641	6.428	6.428	0.52
60	احسان	Ehsan	15.301	9.788	25.09	2.285	7.575	7.065	7.065	0.538
61	زرینه	Zarine	14.850	10.52	25.37	1.048	9.468	6.026	6.026	0.463
62	طلایی	Talayi	13.337	11.711	25.048	1.643	4.477	7.156	7.156	0.614
63	تیرگان	Tirgan	13.883	7.809	21.692	1.753	4.116	6.378	6.378	0.585
64	سارنگ	Sarang	12.953	9.726	22.673	1.946	8.931	6.624	6.624	0.81
65	ترابی	Torabi	14.082	8.913	22.328	0.604	6.434	7.824	7.824	0.793
66	ستاره	Setare	12.683	10.119	22.802	1.819	4.842	7.044	7.044	1.044
67	معراج	Meraj	11.948	6.927	18.876	0.961	9.054	7.675	7.675	0.416
68	کلاته	Kalate	9.311	10.776	20.087	0.958	4.27	7.759	7.759	0.96

69	برزگر	Barzegar	13.301	7.162	20.464	1.298	7.383	5.833	5.833	0.53
70	ارتا	Arta	13.947	10.642	24.589	1.037	3.415	6.32	6.32	0.735

پیدا می‌کند (Groppa & Benavides, 2008). کاروتنوئیدها که گروه بزرگی از مولکول‌های ایزوپرنوئید را تشکیل می‌دهند، یکی از رنگریزه‌های کلیدی و مهم سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان بوده که به تخریب اکسیداتیو بسیار حساس می‌باشند ( Simkin *et al.*, 2008). محققین دریافتند که دمای پایین، مانع از تشکیل زآگزانتین (از گروه کارتنوئیدها) می‌شود. زآگزانتین، انرژی برانگیخته شده در فتوسیستم II را به صورت حرارت آزاد می‌کند (Bilger & Bjorkman, 1991).

#### ضرایب همبستگی

بر اساس نتایج، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین مقدار کلروفیل a با کلروفیل b (۰/۶۵۲۱)، کلروفیل کل (۰/۹۵۱۰) و کارتنوئید (۰/۳۵۳۲) مشاهده شد (جدول ۶). کلروفیل b با کلروفیل کل (۰/۸۵۲۴) و کارتنوئید (۰/۲۸۲۶۶) و کلروفیل کل با کارتنوئید (۰/۳۱۵۴) همبستگی مثبت و معنی‌دار نشان دادند (جدول ۶). بر اساس نتایج همبستگی‌های مثبت، با افزایش رنگدانه‌های کلروفیلی، رنگدانه‌های کاروتنوئیدی نیز افزایش می‌یابد.

بر اساس نتایج تحقیقات مختلف، افزایش مقادیر کلروفیل احتمالاً به دلیل کاهش مقدار آب نسبی سلول‌های برگ بروز می‌نماید. به عبارت دیگر با افزایش زمان یا شدت دوره سرما و کاهش بیشتر مقدار آب نسبی سلول‌های برگ، مقدار کلروفیل در سلول‌های برگ به تدریج افزایش می‌یابد. در حقیقت با از دست رفتن آب گیاه، غلظت محتویات آن افزایش می‌یابد (Groppa & Benavides, 2008). بنابراین به نظر می‌رسد متفاوت بودن میزان رنگدانه‌ها از جمله کلروفیل بین ارقام گندم مورد مطالعه در ۲- دمای سانتی‌گراد ناشی از متفاوت بودن میزان تحمل ارقام نسبت به دمای پایین باشد. کاهش میزان کلروفیل در اثر تنش سرما به علت تولید رادیکال‌های آزاد نیز بیان شده است؛ که باعث پراکسیداسیون این رنگی‌ها و در نتیجه تجزیه آنها می‌شود. در مطالعه‌ای بیان شد که به طور کلی میزان کلروفیل در گیاهان سرما دیده، کاهش یافته و گیاهان بی‌رنگ می‌شوند (Fowler *et al.*, 2001). گزارش شده است میزان سنتز کارتنوئیدها در برگ، در ابتدای بروز تنش‌های محیطی، به علت نقش آنها در حفاظت در مقابل رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد اما با گذشت زمان و در تطابق گیاه با تنش، میزان آن کاهش

جدول ۶- ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مورد ارزیابی در ژنوتیپ‌های گندم نان تحت تنش سرمای دیررس

Table 6. Phenotypic correlation coefficients between evaluated traits in bread wheat genotypes under late cold stress

کارتنوئید Carotenoid	کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	صفات Characters
			1	کلروفیل a Chlorophyll a
		1	0.6521*	کلروفیل b Chlorophyll b
	1	0.8524*	0.9510*	کلروفیل کل Total chlorophyll
1	0.3154*	0.28266*	0.3532*	کارتنوئید Carotenoid

ns, \*, \*\* و \*\*\* به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, \* and \*\* are non-significant and significant at the 0.05 and 0.1 probability levels, respectively.

نان، با ۸ جفت آغازگر ریزماهوره مورد استفاده در مجموع ۲۲ آلل شناسایی شد و میانگین تعداد آلل مشاهده شده، ۲/۷۵ آلل در هر مکان ژنی بود (Asghari *et al.*, 2011). در تحقیقی دیگر در لاین‌های دابل هاپلوئید گندم میانگین تعداد آلل به ازای هر مکان میکروساتلیت ۵/۶ گزارش شد. آغازگر Xgwm ۱۹۰ با ۸ آلل بیشترین تعداد آلل را نشان داد (Zargani *et al.*, 2015). با توجه به اینکه میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریزماهوره مناسب بودن آن برای تخمین تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد محققین در تحقیق ذکر شده نتیجه گرفتند که آغازگرهای Xgwm 165 و Xgwm 518 به دلیل تولید تعداد آلل بیشتر می‌توانند برای تخمین تنوع ژنتیکی بین ارقام مناسب‌تر باشند. شاخص چندشکلی به عنوان تخمینی از قدرت تمایز هر ریزماهوره با در نظر گرفتن تعداد و فراوانی نسبی آلل‌ها می‌باشد. بنابراین اگرچه برخی از ریزماهوره‌ها دارای تعداد آلل یکسان می‌باشند، ولی به واسطه این که فراوانی این آلل‌ها متفاوت است،

### تجزیه تنوع مولکولی

جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم نان، از ۳۰ جفت آغازگر SSR استفاده گردید؛ که ۲۳ جفت از آنها تکثیر واضح و مشخصی داشتند. پس از انجام واکنش PCR جهت تعیین چند شکلی، محصول PCR روی ژل آگارز بارگذاری شد. این آغازگرها در مجموع توانستند ۵۳ آلل با میانگین ۲/۳ آلل در هر جایگاه را شناسایی کنند. تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر مکان ژنی بین یک تا پنج متغیر بود؛ آغازگرهای Xgwm 165 و Xgwm 518 با تعداد ۵ و ۴ آلل بیشترین تعداد آلل را در میان آغازگرهای مورد بررسی داشتند. محتوای اطلاعات چندشکلی، با استفاده از فراوانی آلل‌های چندشکل، برای هر نشانگر برآورد گردید. محتوای اطلاعات چندشکلی، با میانگین ۰/۶۳۶ از ۰/۲۸۸ در نشانگر Xgwm610 تا ۰/۹۲۵ در نشانگر Xgwm 165 متفاوت بود (جدول ۷). در پژوهشی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم



شاخص چند شکلی متفاوتی را نشان می‌دهند. با توجه به مطالعات انجام شده تفاوت در تعداد آلل شناسایی شده در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل منشأ و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نیز ماهیت نشانگرهای ریزماهواره از نظر تعداد نوکلئوتید واحدهای تکراری

(اختلاف در تعداد آنها) و آلل‌های نادر باشد. منظور از آلل نادر، آللی است که در نتیجه جهش در ناحیه بسط آغازگر یا اندازه کوچک آلل و با کیفیت پایین DNA ایجاد می‌شود و بنابراین در حین PCR تکثیر نمی‌شود.

#### جدول ۷- اطلاعات مربوط به چند شکلی آللی مکان‌های ریزماهواره در ژنوتیپ‌های گندم نان

**Table 7. Information related to allelic polymorphism of microsatellite loci in bread wheat genotypes**

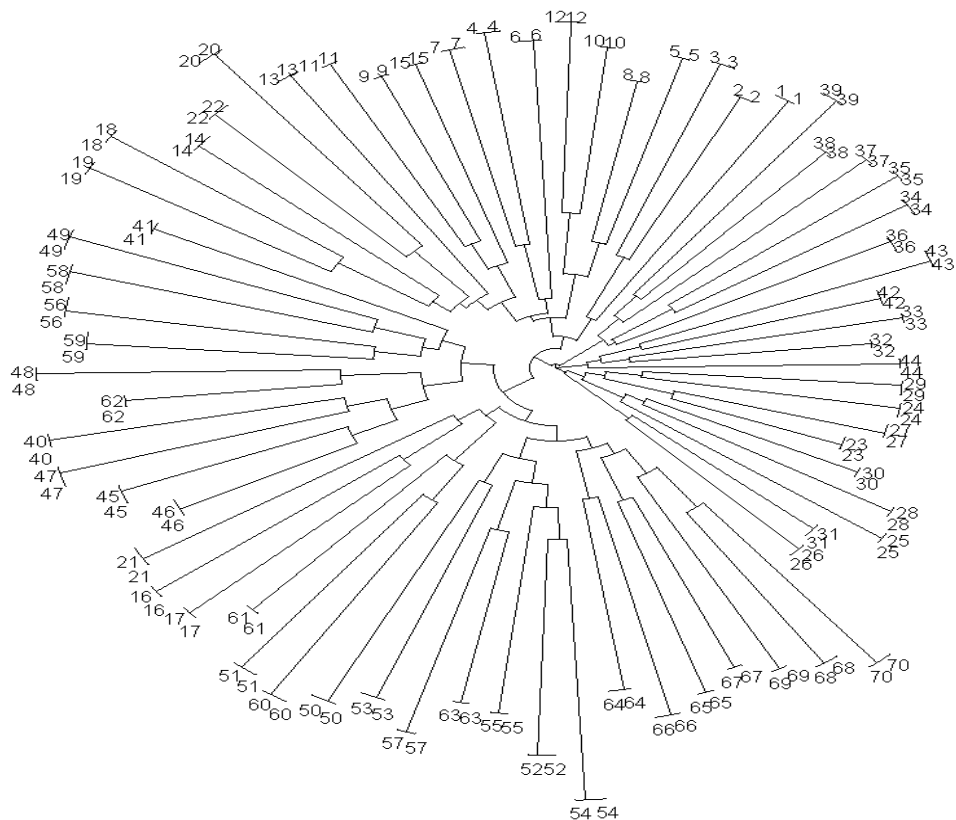
نشانگر	مکان نشانگر	Na	CA	PIC	Di
Marker	Marker locus				
Xgwm 518	6B	4	0.284	0.903	0.918
Xgwm 165	4D	5	0.237	0.925	0.936
Xgwm 610	4A	1	0.542	0.288	0.256
Xgwm 284	3B	3	0.436	0.728	0.678
Xgwm 259	1B	3	0.412	0.688	0.701
Xgwm 428	7D	3	0.318	0.724	0.724
Xgwm 642	1D	3	0.454	0.641	0.627
Xgwm 608	2D	3	0.462	0.662	0.745
Xgwm 260	7A	2	0.497	0.386	0.377
Xgwm 456	3D	3	0.400	0.657	0.733
Xgwm 583	5D	2	0.411	0.401	0.428
Xgwm 68	5B	2	0.485	0.381	0.476
Xgwm 88	6B	1	0.518	0.296	0.263
Xgwm 129	5A	2	0.480	0.359	0.523
Xgwm 162	3A	2	0.470	0.368	0.488
Xgwm 319	2B	1	0.532	0.280	0.274
Xgwm498	1B	2	0.488	0.377	0.387
Xgwm 2	3D	2	0.495	0.410	0.421
Xgwm 613	6B	3	0.459	0.664	0.68
Xgwm 540	5B	1	0.509	0.255	0.289
Xgwm 458	1D	1	0.533	0.261	0.311
Xgwm 191	2B	2	0.472	0.426	0.39
Xgwm 471	7A	2	0.463	0.412	0.41
میانگین	-	2.3	0.450	0.490	0.52

PIC: Polymorphic information content; Na: Number of observed alleles; Di: Genetic diversity; CA: Common allele frequency

شیرودی، الموت، مهدوی، نیشابور، بم، افلاک، بهار، الوند، گلستان، پارسی، اروم، بیات، امید، رسول، مغان ۲، BC روشن، رصد، سپاهان، گروه سوم شامل سارنگ، ترابی، ستاره، معراج، کلاته، برزگر، آرتا، مهرگان، نارین، حیدری، تیرگان، شاوور، چمران ۲، شوش، بهاران، احسان، زرینه، گاسپارد، دز، اوحدی و گروه چهارم شامل نیک نژاد، میهن، سیروان، مرودشت، طلائی، افق، خلیل، برات، رخشان، شهریار، گنبد بودند.

### تجزیه خوشه‌ای بر اساس اطلاعات نشانگرها

هدف از تجزیه خوشه‌ای، انتساب ژنوتیپ‌ها به گروه‌هاست به طوری که ژنوتیپ‌های دارای شباهت و خویشاوندی بیشتر در یک گروه قرار می‌گیرند. در تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های SSR ژنوتیپ‌ها در ۴ گروه طبقه‌بندی شدند (شکل ۱). گروه اول شامل آذر ۲، سبلان، فلات، سایسون، بزوستایا، کرج ۳، دریا، اترک، سیوند، ارگ، سیستان، مروارید، آزادی، کرج ۲، هیرمند، شاهپسند، پیشتاز، زرین، زارع، گروه دوم شامل کویر، چمران،



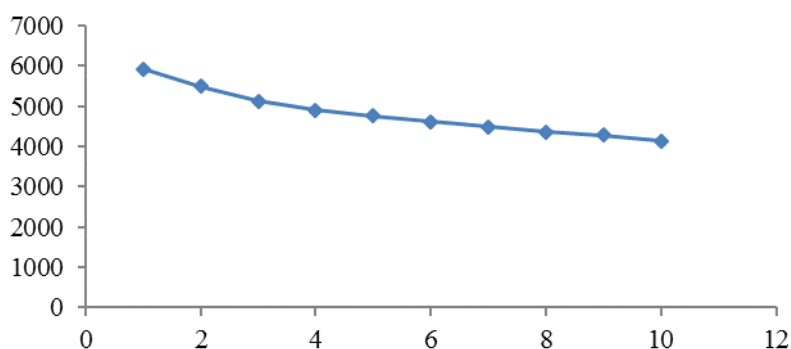
شکل ۱- دندروگرام ۷۰ ژنوتیپ گندم نان حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش Neighbor-Joining بر اساس نشانگرهای SSR با نرم‌افزار TASSEL

Figure 1. Dendrogram of 70 bread wheat genotypes obtained from cluster analysis with Neighbor-Joining method based on SSR markers with TASSEL software

## تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت

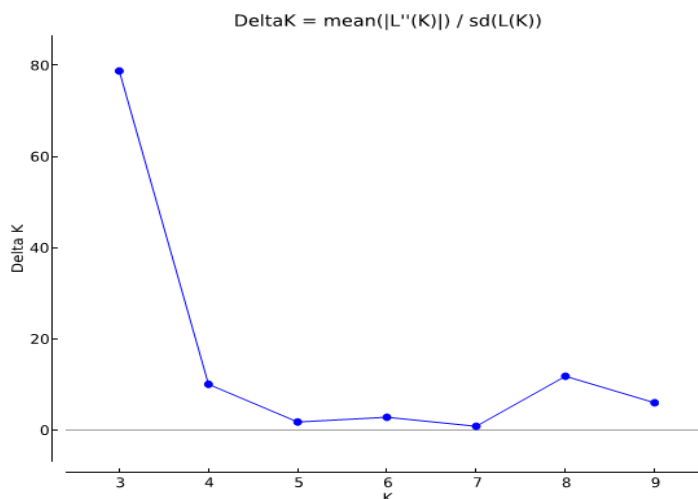
در این تحقیق، تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت ژرم پلاسما گندم مورد مطالعه و دسته‌بندی افراد به روش بیز انجام گرفت. طبق نتایج حاصل، آماره‌های  $K$  و  $\Delta K$  استخراج و نمودارهای دو بعدی با توجه به این معیارها ترسیم شد. با توجه به اینکه تنها تغییر بسیار جزئی در منحنی  $\ln P(D)$  وجود داشت، بنابراین تعیین تعداد زیرجمعیت‌های احتمالی در ژرم پلاسما امکان‌پذیر نبود (شکل ۲). در مقابل نمودار  $\Delta K$  به صورت کاملاً واضح یک مقدار بیشینه را در  $K=3$  نشان داد که در آن شکستگی کاملاً روشن است (شکل ۳). بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده سه زیر جمعیت احتمالی  $K=3$  در ژرم پلاسما مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۴)، که محور افقی مربوط به ژنوتیپ-ها و محور عمودی سهم تعلق هر فرد به هر گروه را نشان

می‌دهد. در این نمودار وقتی درصد عضویت یک ژنوتیپ به یک کلاستر بیشتر یا مساوی ۰/۷ باشد ژنوتیپ به آن کلاستر تعلق می‌گیرد؛ ولی در صورتی که درصد عضویت آن کمتر از این مقدار باشد به عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط شده) در نظر گرفته می‌شود. با در نظر گرفتن مقدار حد آستانه احتمال عضویت ۰/۷، از کل ۷۰ ژنوتیپ گندم نان، ۱۵ ژنوتیپ (۲۱ درصد) به ساختار اول، ۲۷ ژنوتیپ (۳۸/۵ درصد) به ساختار دوم و ۲۲ ژنوتیپ (۳۱ درصد) به ساختار سوم تعلق داشتند و ۶ ژنوتیپ باقیمانده (۹/۵ درصد) هم مخلوط در نظر گرفته شدند و به هیچ گروهی منتسب نشدند. با توجه به گروه‌بندی بدست آمده از نرم‌افزار Structure، ژنوتیپ‌ها با توجه به منشأ جغرافیایی خود از هم تفکیک نشدند.



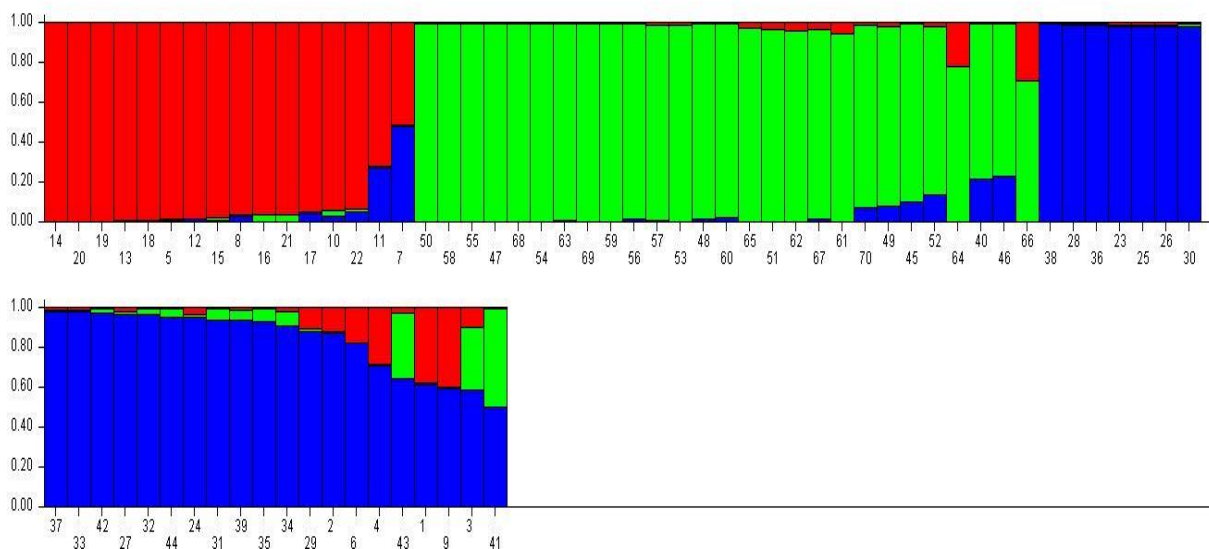
شکل ۲- نمودار دوطرفه برای تعیین تعداد مناسب زیرجمعیت در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه بر اساس  $\ln P(D)$

**Figure 2. Diagram to determine the appropriate number of subpopulations in the studied wheat genotypes based on  $\ln P(D)$**



شکل ۳- تعیین زیرگروه‌ها با استفاده از Structure Harvester و روش Evanno و همکاران (۲۰۰۵). محور عمودی مقدار آماره  $\Delta K$  و محور افقی تعداد زیر جمعیت‌ها را نشان می‌دهد.

Figure 3. Determining subgroups using Structure Harvester and the method of Evanno *et al.* (2005). The vertical axis shows the value of  $\Delta K$  statistic and the horizontal axis shows the number of subpopulations.



شکل ۴- تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل بیس برای ۷۰ ژنوتیپ گندم مورد مطالعه بر اساس  $K = 3$ . هر رنگ یک زیر جمعیت یا کلاستر را نشان می‌دهد. محور عمودی ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر را نشان می‌دهد.

Figure 4. Cluster analysis based on Bayes model for 70 studied wheat genotypes based on  $K = 3$ . Each color represents a subpopulation or cluster. The vertical axis shows the coefficient of each person belonging to each cluster.

**ضرایب خویشاوندی نسبی (Kinship)**

شود (Yin et al., 2003). شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی یکی از مهمترین روش‌ها برای تسریع انتقال صفات مورد نظر به ژنوتیپ‌های دیگر و ردیابی آنهاست. مدل‌های مختلفی برای کاهش نتایج مثبت کاذب و تعیین ارتباط واقعی در تجزیه ارتباطی مورد استفاده قرار می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به ماتریس Q در داخل مدل Q و ماتریس K در داخل مدل K اشاره نمود. مدل دیگر  $Q + K$  می‌باشد که ترکیبی از دو مدل قبلی است و تأثیر آن در کاهش نتایج مثبت کاذب بیشتر از دو مدل K و Q می‌باشد. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که در ذرت، استفاده از مدل  $(Q + K)$  ترکیب شده، بهبود معنی‌داری در کاهش نتایج مثبت کاذب در بررسی صفاتی مانند روز تا گلدهی و وزن و طول بلال در مقایسه با مدل‌های منفرد ایجاد نموده است (Zhu et al., 2008). برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های گندم، تجزیه ارتباطی براساس مدل خطی مخلوط MLM وابسته به ماتریس  $Q+K$  (Q): ماتریس ضرایب احتمال عضویت هر فرد به هر یک از زیرجمعیت‌ها که از خروجی‌های نرم‌افزار Structure است و K: ماتریس روابط خویشاوندی که قابل برآورد در نرم‌افزار Tassel بوده و در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 محاسبه گردید) انجام گرفت.

گزارش کامل ارتباطات معنی‌دار نشانگرهای SSR با صفات مورد مطالعه برای هر دو محیط آزمایشی در جداول ۸ ارائه شده است. برای صفت کلروفیل a در شرایط ۸ درجه سانتی‌گراد، چهار نشانگر SSR مرتبط

به‌منظور ارزیابی خویشاوندی ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها، ضرایب خویشاوندی نسبی بین جفت ژنوتیپ‌ها تخمین زده شد. ماتریس خویشاوندی نشان دهنده‌ی میزان همانندی دو مکان همسان (همولوگ) بین افراد یک جمعیت است، هنگامیکه دو فرد در یک مکان همسان آлл همانند دارند. این آلل وضعیت همانندی آنها را بیان می‌کند (Hardy & Vekemans, 2002). نتایج محاسبه ماتریس روابط خویشاوندی یا Kinship نشان داد که ۱۸/۵۷ درصد از ضرایب خویشاوندی بین جفت ژنوتیپ‌ها کمتر از ۰/۱ بود. حدود ۵۲/۸۴۱ درصد از خویشاوندی بین جفت ژنوتیپ‌ها بین ۰/۱ تا ۰/۵ (بجز ۰/۱) بود. حدود ۲۸/۸۹ درصد از ضرایب بیش از ۰/۵ بودند. بنابراین نتایج این تجزیه بیانگر این است که خویشاوندی تقریباً بالایی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود دارد.

**نتایج تجزیه ارتباطی بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM)**

ارتباط نشانگرها با صفات زراعی مورد علاقه به منظور شناسایی ژن‌ها یا نشانگرهای دخیل در کنترل صفات در بسیاری از گیاهان بررسی شده است. زمانیکه چنین ارتباطی بین نشانگر و صفت شناسایی شود، گزینش غیرمستقیم می‌تواند از طریق بررسی حضور یا عدم حضور نشانگرهای مورد نظر انجام گیرد؛ که باعث می‌شود به طور جدی هزینه‌های برنامه‌های اصلاحی کاهش یابد و علاوه بر این زمان مورد نیاز برای اصلاح یک رقم جدید کوتاه‌تر

معنی‌دار شامل Xgwm 165، Xgwm 518، Xgwm 284 و Xgwm 608، به ترتیب روی کروموزوم‌های 3B، 2D، 6B، 7A و 3D شناسایی شدند. برای صفت کارتنوئید در شرایط تنش (۲-)، درجه سانتی‌گراد) فقط یک SSR شامل Xgwm 456 روی کروموزوم 3D شناسایی شد. با توجه به وجود همبستگی معنی‌دار بین صفات رنگدانه‌های گیاهی می‌توان دریافت که برخی از این صفات پیوستگی بسیار نزدیکی با یکدیگر دارند و یا احتمالاً با ژن‌های چند اثره (چند نمودی یا پلیوتروپی) کنترل می‌شوند. برای درک این موضوع تهیه نسل‌های در حال تفرق و نقشه‌های پیوستگی ضروری می‌باشد. در مطالعه‌ای ارتباط ۱۳ صفت و ۱۴۰ نشانگر مولکولی SSR در ۷۰ نمونه *Aegilops crassa* بومی ایران با استفاده از تجزیه ارتباطی مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که تعداد ۸۷ نشانگر حداقل با یکی از ۱۳ صفت، ارتباط معنی‌دار دارند و بعضی از نشانگرها به صورت مشترک برای چندین صفت شناسایی شد. در تجزیه همبستگی صفات ارتباط معنی‌داری بین این صفات مشاهده شد (Ranjbar *et al.*, 2009). در مطالعه دیگر ارتباط بین ۱۰ صفت زراعی و ۷۰ نشانگر مولکولی در ۱۱۵ ژنوتیپ جو بومی ایران بررسی شد؛ برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط نشان دادند و بر این اساس محققین نتیجه‌گیری کردند که صفات مورد نظر یا دارای پیوستگی بسیار نزدیک باهم هستند و یا احتمالاً تحت تاثیر ژن‌های چند اثره قرار دارند (Ebrahimi *et al.*, 2011). در تحقیقی دیگر ارتباط بین ۱۱ صفت زراعی با ۵۱۹ نشانگر SSR و ۲۵۵ نشانگر AFLP بررسی شد.

معنی‌دار شامل Xgwm 165، Xgwm 518، Xgwm 284 و Xgwm 608، به ترتیب روی کروموزوم‌های 6B، 3B، 4D و 1B شناسایی شد. برای کلروفیل a در شرایط تنش (۲- درجه سانتی‌گراد)، چهار SSR مرتبط معنی‌دار شامل Xgwm 165، Xgwm 428، Xgwm 642 و Xgwm 518 به ترتیب روی کروموزوم‌های 4D، 7D، 1D و 6B شناسایی شدند. برای صفت کلروفیل b در شرایط ۸ درجه سانتی‌گراد، سه نشانگر SSR مرتبط معنی‌دار شامل Xgwm 518، Xgwm 165، Xgwm 583 به ترتیب روی کروموزوم‌های 6B، 4D و 5D شناسایی شد. برای کلروفیل b در شرایط تنش (۲- درجه سانتی‌گراد)، پنج SSR مرتبط معنی‌دار شامل Xgwm 284، Xgwm 608، Xgwm 518، Xgwm 165 و Xgwm 583 به ترتیب روی کروموزوم‌های 3B، 2D، 6B، 4D و 5D شناسایی شدند. برای صفت کلروفیل کل در شرایط ۸ درجه سانتی‌گراد، پنج نشانگر SSR مرتبط معنی‌دار شامل Xgwm 260، Xgwm 518، Xgwm 608، Xgwm 456 و Xgwm 610 به ترتیب روی کروموزوم‌های 2D، 6B، 7A، 3D و 4A شناسایی شد. برای کلروفیل کل در شرایط تنش (۲- درجه سانتی‌گراد)، پنج SSR مرتبط معنی‌دار شامل Xgwm 284، Xgwm 456، Xgwm 518، Xgwm 260 و Xgwm 608 به ترتیب روی کروموزوم‌های 3B، 2D، 6B، 7A و 3D شناسایی شدند. برای صفت کارتنوئید در شرایط ۸ درجه سانتی‌گراد تعداد چهار SSR مرتبط و معنی‌دار شامل Xgwm 608، Xgwm 518، Xgwm 260 و Xgwm 608

جدول ۸- ارتباطات معنی دار نشانگر-صفت برای صفات رنگدانه در گندم بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM) در شرایط: +۸ و -۲ درجه سانتیگراد (تنش سرما)

**Table 8. Significant marker-trait associations for pigment traits in wheat based on mixed linear model under +8 degrees Celsius and -2 degrees Celsius (cold stress)**

صفت Character	نشانگر Marker	گروه پیوستگی Linkage group	محیط Environment	P-value	r <sup>2</sup>	موتیف Motif	Opata (bp)	Synth. (bp)
کلروفیل a	Xgwm 518	6B	+8°C	0.00055	0.12	(CA)34	166	154
Chlorophyll a	Xgwm 165	4D	+8°C	0.000054	0.28	(GA)20	197	-
	Xgwm 284	3B	+8°C	0.00026	0.10	(GA)17	121	117
	Xgwm 259	1B	+8°C	0.00071	0.13	(GA)17	105	-
	Xgwm 165	4D	-2°C	0.00051	0.18	(GA)20	197	-
	Xgwm 428	7D	-2°C	0.00029	0.15	(GA)22	137	133
	Xgwm 642	1D	-2°C	0.000057	0.24	(GT)14	187	179
	Xgwm 518	6B	-2°C	0.00069	0.12	(CA)34	166	154
کلروفیل b	Xgwm 518	6B	+8°C	0.00055	0.12	(CA)34	166	154
Chlorophyll b	Xgwm 165	4D	+8°C	0.000054	0.28	(GA)20	197	-
	Xgwm 583	5D	+8°C	0.000049	0.20	(GA)25	-	-
	Xgwm 284	3B	-2°C	0.0003	0.10	(GA)17	121	117
	Xgwm 608	2D	-2°C	0.00054	0.11	(GA)16	166	181
	Xgwm 518	6B	-2°C	0.0007	0.12	(CA)34	166	154
	Xgwm 165	4D	-2°C	0.000068	0.31	(GA)20	169	165
	Xgwm 583	5D	-2°C	0.00025	0.10	(GA)21	138	165
کلروفیل کل	Xgwm 608	2D	+8°C	0.00054	0.11	(GA)16	166	181
Total chlorophyll	Xgwm 518	6B	+8°C	0.0007	0.12	(CA)34	166	154
	Xgwm 260	7A	+8°C	0.000068	0.31	(GA)20	169	165
	Xgwm 456	3D	+8°C	0.00025	0.10	(GA)21	138	165
	Xgwm 610	4A	+8°C	0.00035	0.18	(GA)18	157	138
	Xgwm284	3B	-2°C	0.0003	0.10	(GA)17	121	117
	Xgwm 608	2D	-2°C	0.00048	0.10	(GA)16	166	181
	Xgwm 518	6B	-2°C	0.0006	0.14	(CA)34	166	154
	Xgwm 260	7A	-2°C	0.000056	0.28	(GA)20	169	165
	Xgwm 456	3D	-2°C	0.00028	0.15	(GA)21	138	165
کارتنوئید	Xgwm 608	2D	+8°C	0.00054	0.11	(GA)16	166	181
Carotenoid	Xgwm 518	6B	+8°C	0.0007	0.12	(CA)34	166	154

Xgwm 260	7A	+8°C	0.000068	0.31	(GA)20	169	165
Xgwm 456	3D	+8°C	0.00025	0.10	(GA)21	138	165
Xgwm 456	3D	-2°C	0.00032	0.13	(GA)21	138	165

Synth. = Synthetic wheat.

## نتیجه‌گیری

نشانگرهای دارای ضریب تبیین بالا می‌توان به شناسایی ژن‌های رمزکننده صفات زراعی دست یافت. از چنین نشانگرهای با ارتباط قوی با نواحی ژنومی کنترل کننده می‌توان جهت اشباع نقشه‌های پیوستگی استفاده نمود. اطلاعات حاصل از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای SSR ابزار توانمندی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ژنوتیپ‌های گندم هستند که می‌توانند بعد از تایید در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر (Marker assisted selection; MAS) مورد استفاده قرار گیرند.

## سپاسگزاری

تحقیق حاضر، با پشتیبانی گروه ژنتیک و به‌نژادی دانشگاه تربیت مدرس و مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام شده است. بدین‌وسیله از تمامی اساتید و کارشناسان تشکر و قدردانی می‌گردد.

با توجه به گروه‌بندی حاصل از تجزیه ساختار، اغلب ژنوتیپ‌ها بر اساس منشأ و تیپ رشدی تفکیک نشدند. شناسایی ارتباطات معنی‌دار نشانگر-صفت به دلیل معنی-دار بودن اثر متقابل دما و رقم بصورت جداگانه روی داده‌های هر محیط انجام گرفت. تعداد ارتباطات معنی‌دار بیشتری در شرایط +8 درجه سانتی‌گراد نسبت به -2 درجه سانتی‌گراد شناسایی شد. تعدادی از نشانگرهای با ارتباطات معنی‌دار در دو محیط برای یک یا چند صفت خاص به طور مشترک شناسایی شدند، که حاکی از پایداری بالای این نشانگرها می‌باشد. مکان‌های مشترک برای صفات مذکور احتمالاً ناشی از اثر پلیوتروپی و یا پیوستگی بین مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات مورد نظر می‌باشد. با توالی‌یابی نواحی ژنومی پیوسته با

## References

- Abedi, T. & Mojiri, A. 2020. Cadmium uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.): An overview. *Plants*, 9(4), 500-514.
- Altaf, MT., Tatar, M., Ali, A., Liaqat, W., Mortazvi, P., Kayihan, C., Ölmez, F., Nadeem, M.A., Javed, J., Gou, J-Y., Wang, M-L., Umar, U.U.D., Daşgan, H.Y., Kurt, C., Yildiz, M., Mansoor, S., Dababat, AA., Çeliktaş, N., & Baloch, F.S. 2024. Advancements in QTL mapping and GWAS application in plant improvement. *Turkish Journal of Botany*, 48(7). <https://doi.org/10.55730/1300-008X.2824>.
- Aranzana, M. J., Kim, S., Zhao, K., Bakker, E., Horton, M., Jakob, K., ... & Nordborg, M. 2005. Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genet*, 1(5), e60. doi: 10.1371/journal.pgen.0010060.



- Agrama, H. A., Eizenga, G. C. & Yan, W. 2007. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Molecular Breeding*, 19(4), 341-356. <https://doi.org/10.1007/s11032-006-9066-6>
- Allahabadi, M., Mirfakhrai, R. Q., & Darvishzadeh, R. 2024. Changes in proline and fructan concentration in leaves of bread wheat cultivars under the occurrence of cold stress at the beginning of the reproductive growth stage. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 3(1), 1-14. doi: 10.22126/cbb.2024.10783.1073
- Asghari, S. and R.G. Mirfakhraii. 2011. Study on genetic variation in some wheat cultivars using microsatellite markers and physiological traits under late spring stress. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 120 pp (In Persian).
- Bilger, W. & Björkman, O. 1991. Temperature dependence of violaxanthin de-epoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L., *Planta*, 184(2), 226–234. doi: 10.1007/BF00197951.
- Castrillo, M., Trujillo, I. 1994. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and chlorophyll and protein contents in two cultivars of French bean plants under water stress and rewatering. *Photosynthetica*, 30, 175-181,
- Done, T. J., Dayton, P. K., Dayton, A. E. & Steger, R. 1991. Regional and local variability in recovery of shallow coral communities: Moorea, French Polynesia and central Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, 9(4), 183-192. <https://doi.org/10.1007/BF00290420>
- Evano, G., Tadiparthi, K. & Couty, F. 2005. Copper-mediated cross-coupling of 1, 1-dibromo-1-alkenes with dialkyl phosphites: a convenient synthesis of 1-alkenylphosphonates. *Chemical Communications*, 47(1), 179-181. DOI <https://doi.org/10.1039/C0CC01617A>
- Fowler, D. B., Breton, G., Limin, A. E., Mahfoofi, S. & Sarhan, F. 2001. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiology*, 127(4), 1676–1681. [10.1104/pp.010483](https://doi.org/10.1104/pp.010483)
- Gholinezhad, E., Darvishzadeh, R., & Abhari, A. 2022. Drought Stress and Strategies to cope with it in Crops. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 17(67), 152-184. DOI: [10.30495/iper.2022.1966339.1818](https://doi.org/10.30495/iper.2022.1966339.1818).
- Gholinezhad, E., Darvishzadeh, R., & Abhari, A. 2024. Strategies to deal with salinity and oxidative stress in crops. *Sustainability, Development & Environment*, 5(1), 21-42.
- Gull, A., Ahmad Lone, A. and Ul Islam Wani N. 2019. Biotic and Abiotic Stresses in Plants [Internet]. *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. IntechOpen. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85832>.
- Groppa, M. D. & Benavides, M. P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*, 34(1), 35-45. doi: 10.1007/s00726-007-0501-8
- Hardy, O.J. & Vekemans, X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2, 618-620. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00305.x>
- Karim, M. R., Sabouri, H., Ebrahimi, M. A. & Sanchouli, S. 2023. Association analysis of agronomic traits using microsatellite markers (SSR) in different rice genotypes in terms of flooding and drought. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 16(1), 263-275. doi: 10.22077/escs.2022.4561.2040
- Karimzadeh, G., Darvishzadeh R., Jalali-Javaran, M. & Dehghani, H. 2005. Cold-induced accumulation of protein in the leaves of spring and winter barley cultivars. *Acta Biologica Hungarica*, 56 (1-2), 83-96.

- Knight, H. & Knight, M.R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: Specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, 6, 262-267. <https://doi.org/10.1016/s1360-1385%2801%2901946-x>
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382. DOI:[10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Mohammadalizadeh, O., Darvishzadeh, R., Mohammadi, V., Soufimaleky, S., & Kahrizi, D. 2024. Principles and Applications of Next-Generation Sequencing (NGS) Technology in Life Sciences (with a Focus on Cereal Breeding). *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 3(1), 110-231. doi: 10.22126/cbb.2024.11011.1080
- Nachit, M. M., Elouafi, I., Pagnotta, A., El Saleh, A., Iacono, E., Labhilili, M. & Khairallah, M. 2001. Molecular linkage map for an intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2,3), 177-186. <https://doi.org/10.1007/s001220051633>
- Powel, W. C. 1996. Complex roles of matrix metalloproteinase in tumor progression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 213, 1-21. doi: 10.1007/978-3-642-61107-0\_1
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A. & Donnelly, P. 2000. Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, 67(1), 170-181. <https://doi.org/10.1086/302959>
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-59. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Prasad, M., N. Kumar, P.L. Kulwal, M.S. Roder, H.S. Balyan, H.S. Dhaliwal and P.K. Gupta. 2003. QTL analysis for grain protein content using SSR markers and validation studies using NILs in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 659-667.
- Pasam, R.K., Sharma, R., Malosetti, M., Eeuwijk, F.A.V., Haseneyer, G., Kilian, B. & Graner, A. 2012. Genome-wide association studies for agronomical traits in a worldwide spring barley collection. *BMC Plant Biol*, 12 (1), 16. doi: 10.1186/1471-2229-12-16
- Pour-Aboughadareh, A., Poczai, P., Etminan, A., Jadidi, O., Kianersi, F. and Shoostari, L. 2022. An analysis of genetic variability and population structure in wheat germplasm using microsatellite and gene-based markers. *Plants* 11 (9), 1205.
- Rathan, N.D., Krishna, H., Ellur, R.K., Sehgal, D., Govindan, V., Ahlawat, A.K., Krishnappa, G., Jaiswal, J.P., Singh, J.B., Sv, S., Ambati, D., Singh, S.K., Bajpai, S.K. and Singh, A.M. 2022. Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for grain micronutrients and quality traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Scientific Reports*, 12, 7037.
- Roy, J. K., Prasad, M., Varshney, R. K., Balyan, H. S., Blake, T. K., Dhaliwal, H. S., Edwards, K. J. & Gupta, P. K. 1999. Identification of a microsatellite on chromosomes 6B and a STS on 7D of bread wheat showing an association with preharvest sprouting tolerance. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1-2), 336-340. <https://doi.org/10.1007/s001220051241>
- Reich, D.E. & Lander, E.S. 2001. On the allelic spectrum of human disease. *Trends in Genetics*, 17, 502-10. doi: 10.1016/s0168-9525(01)02410-6
- Reich, D.E., Cargill, M., Bolik, S., Ireland, J., Sabeti, P.C., Richter, D.J., Lavery, T., Kouyoumjian, R., Farhadian, S., Ward, R. & Lander, E.S. 2001. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*, 411(6834), 199-204. <https://doi.org/10.1038/35075590>

- Rezaeizad, A., Wittkop, B., Snowdon, R., Hasan, M., Mohammadi, V., Zali, A., & Friedt, W. 2011. Identification of QTLs for phenolic compounds in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by association mapping using SSR markers. *Euphytica*, 177, 335-342. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0231-y>
- 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. doi: [10.1093/genetics/149.4.2007](https://doi.org/10.1093/genetics/149.4.2007)
- Roy J.K., Bandopadhyay R., Rustgi1 S., Balyan1 H.S. and Gupta1 P.K. 2006. Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Journal of Current Science*, 90:5-10
- Simkin, A. J., Moreau, H., Kuntz, M., Pagny, G., Lin, C., Tanksley, S. & McCarthy, J. 2008. An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *Journal of Plant Physiology*, 165(10), 1087–1106. doi: [10.1016/j.jplph.2007.06.016](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.016).
- Seppänen, M. M., Cardi, T., Hyökki, M. B. & Pehu, E. 2000. Characterization and expression of cold-induced glutathione S-transferase in freezing tolerant *Solanum commersonii*, sensitive *S. tuberosum* and their interspecific somatic hybrids. *Plant Science*, 153(2), 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00252-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00252-6)
- Shewry, P.R. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60, 1537-1553
- Shroyer, J. M., Mikesell, M. E. & Paulsen, G. M. 1995. Spring freeze injury to Kansas wheat, Kansas State University. <http://www.ksre.ksu.edu/bookstore/pubs/c646.pdf>.
- Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti Zeuli, P. & Negri, V. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 122, 1281-1291. doi: [10.1007/s00122-011-1530-y](https://doi.org/10.1007/s00122-011-1530-y)
- Thornsberry, J.M., Goodman, M.M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D. & Buckler, E.S. 2001. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*, 28(3), 286-289. <https://doi.org/10.1038/90135>
- Yin, X., Stam, P., Kropff, M.J. & Schapendonk, A.H.C.M. 2003. Crop Modeling, QTL Mapping, and Their Complementary Role in Plant Breeding. *Agron. J.*, 95, 90-98. <https://doi.org/10.2134/agronj2003.9000a>.
- Yu, L.X., Lorenz, A., Rutkoski, J., Singh, R.P., Bhavani, S., Huerta-Espino, J. & Sorrells, M.E. 2011. Association mapping and gene-gene interaction for stem rust resistance in CIMMYT spring wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 123, 1257-1268. doi: [10.1007/s00122-011-1664-y](https://doi.org/10.1007/s00122-011-1664-y).
- Zadoks, J. C., Chang, T. T. & Konzak, C. F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6), 415-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
- Zargani, M., G.A. Ranjbar and Sh. Ebrahim Nejad. 2015. Molecular assessment of genetic diversity among bread wheat (*Triticum aestivum* L.) doubled haploid lines using SSR markers. *Journal of Crop Breeding*, 7(15), 88-95 (In Persian)
- Zhang, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11(1), 1-16. doi: [10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x](https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x)
- Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E. & Ira, G. 2008. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell*, 134(6), 981-994. doi: [10.1016/j.cell.2008.08.037](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.037)

Zhu, C., Gore, M., Buckler, E.S. & Yu, J. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome*, 1 (1), 5-20.  
<https://doi.org/10.3835/plantgenome2008.02.0089>