

ارزیابی ژنوتیپهای گندم نان در شرایط تنش خشکی با استفاده از شاخص‌های تحمل به خشکی و نشانگرهای مولکولی SSR

زهرة دهقان منشادی^۱، حسین دشتی^{۲*}، خلیل ملک زاده^۳، شهاب مداح حسینی^۴
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته اصلاح نباتات دانشگاه ولی عصر (عج)
۲، ۳ و ۴. به ترتیب، استاد، استادیار و دانشیار گروه ژنتیک و تولید گیاهی دانشگاه ولی عصر (عج)
(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۷/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۶)

چکیده

تعداد ۳۶ ژنوتیپ گندم نان، شامل ۶ رقم اصلاح شده و ۳۰ ژنوتیپ دیگر که از مناطق مختلف ایران و سایر کشورها جمع آوری و تهیه شده بودند، در دو محیط رطوبتی (آبیاری نرمال و کم آبیاری) و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در هر محیط، مورد ارزیابی قرار گرفتند. با اندازه گیری میانگین عملکرد دانه در دو محیط برای هر ژنوتیپ، شاخص‌های تحمل و حساسیت به تنش محاسبه شد و رابطه بین تعدادی از نشانگرهای ریز ماهواره مرتبط با تحمل به خشکی و میزان تحمل به خشکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی مطالعه شد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، بر اساس شاخص تحمل به تنش (STI)، میانگین هندسی بهره‌وری (GMP)، شاخص میانگین عملکرد (MP) و عملکرد دانه در متر مربع در شرایط تنش (YS) و شرایط بدون تنش (Yp)، با استفاده از تجزیه خوشه‌ای انجام شد و ژنوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم شدند. ژنوتیپ‌های ۱۱/۱۱۳، ۱۵۵۳، ۱۷۶، ۱۹۸، ۳۷۹۸، ۶۸۹، ۸۹۴، ۹۰۱۶، ۹۱۰، ۹۹، کوه‌دشت، پیشتاز، زاگرس، سیوند و ژنوتیپ‌های ۱۶۳۷، سرداری، ۲۰۴۷، ۲۱۰۳، آذر ۲، ۸۷۱، ۸۹۰ به ترتیب به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل و نیمه متحمل شناسایی شدند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای ریز ماهواره نیز ژنوتیپ‌ها را به سه گروه تقسیم‌بندی نمود. مقایسه دندروگرام‌ها، بیانگر ارتباط معنی‌دار بین تحمل به خشکی و نشانگرهای SSR بود. همچنین تجزیه رگرسیونی عملکرد در هر دو شرایط و شاخص‌های GMP، MP و STI، به عنوان متغیرهای وابسته و باندهای نشانگر، به عنوان متغیر مستقل نشان داد که آغازگرهای (WMC179، WMC307 و WMC322)، به عنوان مؤثرترین نشانگر در MAS، برای بهبود عملکرد در شرایط تنش و بدون تنش می باشند.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، شاخص، گندم، نشانگرهای ریز ماهواره، ژنوتیپ.

Evaluation of Bread Wheat Genotypes under Drought Stress Conditions using Drought Tolerance indices and SSR Molecular Markers.

Zohreh Dehghan Manshadi¹, Hossein Dashti^{2*}, Khalil Malekzadeh³ Shahab Maddahhosseini⁴

1.MSc degree in Plant Breeding at Vali-e-Asr University 2, 3 and 4. Respectively, Professor, Assistant Professor and Associate Professor of Genetics and Plant Production at Vali Asr University

(Received: October 10, 2017- Accepted: January 6, 2018)

ABSTRACT

36 bread wheat genotypes including 6 improved and introduced cultivars and 30 other genotypes that were collected and prepared from different regions of Iran and other countries were evaluated in two irrigation conditions (normal and limited irrigation) in two separate randomized complete block design with three replications in both moisture conditions. Average yield for each genotype in each environment were measured and tolerance and stress susceptibility indices were calculated and the relationship between a number of micro satellite markers (associated with drought tolerance) and drought tolerance of genotypes were studied. The genotypes were divided into three groups (tolerant, semi-tolerant and susceptible) by cluster analysis based on Stress Tolerance Index (STI), Geometric Productivity Mean (GMP), Mean Performance (MP) and Yield Index (YI) as well as grain yield under stress conditions. Genotypes 11.113, 1553, 176, 198, 3798, 689, 894, 9016, 910, 99, Kohdasht, Pishtaz, Zagros, Sivand and Genotypes 1637, Sardari, 2047, 2103, Azar 2, 871, 890 were identified as tolerant and semi-olerant genotypes, respectively. Cluster analysis based on micro satellite markers also divided the genotypes into three groups. Comparison of dendrograms revealed a significant relationship between drought tolerance and SSR markers. As well as, regression analysis between the grain yield in both conditions, GMP, STI, MP as dependent and marker bands as independent variables showed that WMC179, WMC307 and WMC322 are the most effective markers in MAS for improving yield under stressed and non-stressed conditions.

Key words: Index, drought tolerance, , SSR markers, Wheat, Genotype.

مقدمه

گندم، مهم‌ترین گیاه زراعی در جهان است که نقش مهمی در تأمین غذای مردم جهان دارد. در سال ۲۰۰۹، دومین غله پر مصرف، با سطح تولید جهانی ۶۸۵ میلیون تن بود و در سال ۲۰۱۳، تولید گندم به میزان ۷۱۳ میلیون تن بود و به عنوان سومین غله پر مصرف، پس از ذرت و برنج گزارش شده است (FAO, 2015). در میان عوامل محدود کننده عملکرد در حالت طبیعی، کمبود آب مهم‌ترین عاملی است که به ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان از جمله ایران، از راه‌های مختلف، باعث محدودیت کاشت و کاهش گیاهان زراعی می‌شود. خشکی عبارت است از فقدان یا کمبود نزولات و به عبارتی کمبود رطوبت در محیط ریشه که موجب آسیب رسیدن به محصول می‌شود. در بسیاری از محیط‌های نیمه خشک، رطوبت نسبی در ابتدای فصل رشد، در بالاترین حد خود می‌باشد و با افزایش دما و قطع بارندگی‌ها، کاهش می‌یابد. در این مناطق، به طور معمول، دوره پرشدن دانه گندم، مصادف با کم‌آبی است و بنابراین عملکرد کاهش می‌یابد؛ در نتیجه در مناطق خشک، افزایش تحمل به خشکی، با افزایش و پایداری عملکرد، از اهداف مهم به شمار می‌رود (Emam, 2007). خشکی، مهم‌ترین عامل محدود کننده تولیدات گیاهی در اکثر مزارع کشاورزی جهان است و خشکسالی، اغلب باعث مشکلات جدی در نواحی تولید گندم شده است (Kilic & Yagbasanlar, 2010). خشکی بسته به زمان وقوع تنش و مرحله رشد گیاه، با تأثیر بر اجزای عملکرد، موجب کاهش عملکرد می‌شود (Alimohammadi & Mirmohammam Maibody, 2011). برای تمایز ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در شرایط مزرعه، چندین شاخص انتخاب، بر اساس عملکرد دانه در شرایط تنش و بدون تنش خشکی پیشنهاد شده است. Fernandez (1992)، با بررسی عملکرد در محیط تنش و بدون تنش، ژنوتیپ‌ها را از نظر واکنش به محیط، به چهار گروه A (ژنوتیپ‌هایی که در هر دو محیط تنش و بدون تنش عملکرد بالایی دارند)، گروه B (ژنوتیپ‌هایی که فقط در شرایط

محیطی بدون تنش عملکرد بالایی دارند)، گروه C (ژنوتیپ‌هایی که فقط در شرایط تنش عملکرد نسبتاً بالایی دارند) و گروه D (ژنوتیپ‌هایی که در هر دو محیط تنش و بدون تنش عملکرد پایینی دارند) تقسیم‌بندی نمود. طبق نظر فرناندز، مناسب‌ترین شاخص برای تحمل به تنش باید بتواند ژنوتیپ‌های گروه اول را از سایر گروه‌ها تفکیک نماید. Fisher & Maurer (1978)، شاخص حساسیت به تنش (Stress Susceptibility Index, SSI) را معرفی کردند. Fernandez & Hambolin (1981)، شاخص تحمل (Tolerance, TOL) و میانگین بهره‌وری (Mean Productivity, MP) را معرفی کردند. Stress Tolerance Index, STI) و میانگین هندسی عمل (Geometric Mean Productivity, GMP) را معرفی کردند. Gavuzzi et al. (1997)، شاخص عملکرد (Yield Index, YI) توسط برای ارزیابی میزان تحمل به خشکی را معرفی کردند. شاخص انتخاب مناسب، شاخصی است که ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا در هر دو شرایط تنش و بدون تنش را از سایر ژنوتیپ‌ها متمایز کند (Fernandez, 1992). محاسبه این شاخص‌ها بسیار زمان‌بر است؛ بنابراین انتخاب بر اساس نشانگرها (Marker assistance selection, MAS) می‌تواند مفید باشد و امروزه به عنوان یک متمم، برای روش‌های معمول مورد توجه قرار گرفته است. تکنولوژی نشانگرهای مولکولی در طی سال‌های اخیر، تحول بزرگی را در تجزیه ژنتیکی گیاهان زراعی ایجاد کرده است (Michelmore et al., 1991). این نشانگرها، تحت تأثیر محیط قرار نمی‌گیرند و بنابراین در تمامی مراحل رشد گیاه می‌توان از آن‌ها استفاده کرد. گزینش به کمک نشانگر مؤثر، غیر مخرب و خطای انتخابی پایینی دارد. تعداد زیادی از نشانگرهای مولکولی برای بررسی ارقام مقاوم به خشکی در گندم مورد استفاده قرار گرفته‌اند اما به کار بردن نشانگرها در انتخاب برای صفات کمی و QTLها ساده نیست. در دو دهه اخیر، نشانگرهای مولکولی، ابزار مناسبی برای مطالعه صفات پیچیده، در گونه‌های گیاهی فراهم کرده‌اند و اصلاح گیاهان، با تاکید بر روی شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده

صفات کمی و انتخاب به کمک نشانگر، گسترش یافته است (Thudi *et al.*, 2014). عملکرد دانه، یک صفت کمی است که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود و به مقدار زیادی تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد و به علت ارتباطی که با سایر صفات دارد، تشخیص ژن‌های مسئول عملکرد به وسیله روش‌های کلاسیک، اندکی مشکل است. ولی با استفاده از تجزیه QTL می‌توان عملکرد را به اجزای کنترل آن تقسیم کرد و نقش هر یک را مطالعه نمود (Hai *et al.*, 2008). در مطالعات مختلف QTL‌های متعددی برای عملکرد دانه گندم مکان یابی شده است که به طور یکنواخت، در کل ژنوم توزیع شده‌اند. بیشترین تعداد QTL برای عملکرد دانه، به ترتیب روی کروموزوم‌های 3B، 2B و 4A مکان‌یابی شده‌اند (Zhang *et al.*, 2010). به منظور شناسایی QTL‌های مرتبط با ژن‌های کنترل کننده عملکرد دانه در گندم نان، ۱۲۱ لاین اینبرد نوترکیب نسل F₈ حاصل از تلاقی رقم متحمل به خشکی آذر ۲ و رقم پر محصول 87Zhong291 در شرایط تنش و نرمال مورد ارزیابی قرار گرفتند و تعداد ۵۹ QTL شناسایی شدند که با چند صفت در ارتباط بودند که از این تعداد، ۲۰ و ۱۰ QTL به ترتیب، تحت شرایط نرمال و تنش شناسایی شدند (Mohammadi *et al.*, 2016). در پژوهشی با استفاده از ۸۲ لاین دابل‌هاپلوئید، پنج QTL برای عملکرد دانه روی کروموزوم‌های 2A، 2B، 3D، 4A، 4D مکان‌یابی شدند (McCartney *et al.*, 2005). در پژوهشی دیگر و با استفاده از ۱۳۱ لاین اینبرد لاین نوترکیب F₁₄ حاصل از تلاقی ارقام گندم Chuan35050، Shannong483، پنج QTL برای عملکرد دانه روی کروموزوم‌های 1D، 2D، 3B (دو QTL) و 6A شناسایی کردند (Li *et al.*, 2007). در مطالعات مختلف، QTL‌هایی که در چندین زمینه ژنتیکی و چندین محیط شناسایی شده‌اند، نه تنها برای بهبود ارقام حساس به خشکی، بلکه برای انتخاب به کمک نشانگر (MAS)، به منظور توسعه ارقام متحمل به خشکی و با عملکرد بالا نیز کاربرد دارند (Dixit *et al.*, 2014). تعیین اعتبار QTL‌ها و تأیید نشانگرهای پیوسته به آن‌ها، یک گام اساسی و

ضروری قبل از انجام برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر است (Nicholas, 2006). بنابراین علاوه بر لزوم مکان‌یابی QTL‌های کنترل کننده صفات مرتبط با تحمل به تنش خشکی، باید پیوستگی آن‌ها با نشانگرهای مولکولی اثبات شود و اعتبار آن‌ها تعسرن گردد. یکی از روش‌هایی که می‌تواند میزان اعتبار نشانگرهای شناسایی شده را مورد ارزیابی قرار دهد، بررسی انطباق گروه‌بندی افراد، بر اساس نشانگرهای مولکولی و داده‌های فنوتیپی است (Dadras *et al.*, 2016) و روش دیگر، تجزیه همبستگی و رگرسیون عملکرد، بر روی مکان‌های نشانگرهای مولکولی می‌باشد. در مطالعه‌ای بر روی ۹۶ لاین دابل‌هاپلوئید در شرایط آبیاری نرمال، یک QTL روی کروموزوم 1B برای عملکرد دانه پیدا شد؛ همچنین برای شاخص SSI، سه QTL در کروموزوم‌های 4D، 7A، 6B و برای شاخص MP، دو QTL بر روی 5B، 5A و برای شاخص‌های GMP، STI، TOL، فقط یک QTL شناسایی شدند (Dashti *et al.*, 2007). Roy *et al.* (2006)، با استفاده از تجزیه ارتباط بر اساس رگرسیون چند متغیره در ۵۵ لاین گندم، ۵۵ نشانگر SSR و ۵۴ نشانگر AFLP را شناسایی کردند که حداقل با یکی از ۱۴ صفت زراعی مورد مطالعه مانند عملکرد بیولوژیکی و وزن هزار دانه مرتبط بوده و به عنوان نشانگرهای مثبت برای برنامه‌های گزینش به کمک این نشانگرها برای این صفات، معرفی شد. پژوهش حاضر، با هدف شناسایی لاین‌های متحمل و حساس به خشکی به کمک نشانگرهای پیوسته به QTL‌های مرتبط با تنش خشکی در گندم نان، انجام شد.

مواد و روش‌ها

ارزیابی مزرعه‌ای

در این تحقیق، ۳۶ ژنوتیپ گندم نان، شامل شش رقم از ارقام اصلاح شده (کوهدشت، زاگرس، سرداری، آذر ۲، پیش‌تاز و سیوند) و ۳۰ ژنوتیپ از ژنوتیپ‌هایی که از مناطق مختلف ایران (خراسان، سیستان و بلوچستان، ایلام) و خارج از کشور جمع‌آوری و تهیه شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند در سال ۱۳۹۲،

وزن هزار دانه، بر اساس ۶۰۰ دانه در متر مربع محاسبه شد و کاشت بذرها در ۲۸ آبان (خاک آب) انجام شد. خاک مزرعه بر اساس آزمون خاک، دارای بافت لومی رسی- شنی، با هدایت الکتریکی (4 dS m^{-1}) و $\text{pH}=7/5$ در منطقه فعال ریشه بود. کنترل علف‌های هرز نیز در طول دوره رشد به صورت دستی انجام شد. به منظور تأمین عناصر مورد نیاز گیاه، ۱۵۰ کیلوگرم کود فسفات آمونیوم در هکتار، قبل از کاشت با خاک مخلوط شد. کود نیتروژن به صورت دستپاش و به میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار استفاده شد. برداشت در اوایل خرداد ماه صورت گرفت. دو ردیف وسط، برداشت شدند و وزن دانه در متر مربع (عملکرد)، اندازه گیری شد و سپس شاخص‌های زیر محاسبه گردید. در نهایت، تجزیه خوشه‌ای با استفاده از شاخص‌ها و بر اساس روش Ward جهت گروه‌بندی انجام شد.

برای تعیین پایداری ژنوتیپ‌ها در دو محیط تنش و بدون تنش، از شاخص ریک استفاده شد.

$$GMP = \sqrt{(Y_p \times Y_s)}$$

$$STI = \frac{(Y_s) \times (Y_p)}{(Y_p)^2}$$

$$SSI = \frac{1 - \left(\frac{Y_s}{Y_p}\right)}{SI}$$

$$SI = 1 - \left(\frac{Y_s}{Y_p}\right)$$

$$MP = \frac{(Y_s + Y_p)}{2}$$

$$TOL = Y_p - Y_s$$

$$YI = \frac{Y_s}{Y_p}$$

Y_s : میانگین عملکرد ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش Y_p : میانگین عملکرد ژنوتیپ‌ها در شرایط نرمال

\bar{Y}_s : میانگین عملکرد کل ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش \bar{Y}_p : میانگین عملکرد کل ژنوتیپ‌ها در شرایط نرمال

$$W_i = \sum_{j=1}^k (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_{i0} - \bar{x}_{0j} + \bar{x}_{00})^2$$

شاخص ریک

\bar{x}_{ij} : میانگین عملکرد ژنوتیپ i در محیط j

\bar{x}_{i0} : میانگین عملکرد ژنوتیپ i

\bar{x}_{0j} : میانگین عملکرد محیط j

\bar{x}_{00} : میانگین کل

در مزرعه، هر کدام در یک خط کشت شدند و از آن‌ها، یک بوته انتخاب شد و در سال‌های ۹۳ و ۹۴، تکثیر شدند و در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفته‌اند و اکنون با شماره‌های ذکر شده در جدول ۱، در کلکسیون دانشگاه ولی عصر رفسنجان نگهداری می‌شوند. این آزمایش در دو محیط آبیاری نرمال (هفت نوبت آبیاری در طول فصل رشد) و تنش (سه نوبت آبیاری در طول فصل رشد)، در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر^(عج) رفسنجان، طی سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ انجام شد. آزمایش به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار بود. پس از تهیه بستر و سطح کردن زمین کاشت، بذرها در عمق دو سانتی‌متری و با فاصله ردیف‌های ۲۰ سانتی‌متر کشت شدند. هر پلات آزمایشی، شامل چهار ردیف به طول ۱/۵ متر بود و میزان بذر لازم برای هر رقم، براساس

میانگین هندسی بهره‌وری

(Fernandez, 1992)

شاخص تحمل به تنش

(Fernandez, 1992)

شاخص حساسیت به تنش

(Fisher & Maurer, 1978)

شاخص میانگین تولید

(Rossielle & Hamblin, 1981)

شاخص تحمل به تنش

(Rossielle & Hamblin, 1981)

شاخص عملکرد:

جدول ۱ - ژنوتیپها و ارقام گندم مورد مطالعه در ارزیابی مزرعه‌ای

Table 1 - Genotypes and wheat cultivars studied in the field experiment

Row	Collection number	Row	Collection number	Row	Collection number
1	11.113	15	3798	29	9016
2	836	16	422	30	9050
3	150	17	99	31	Kohdasht
4	1553	18	48	32	Pishtaz
5	76	19	689	33	Sardari
6	1637	20	744	34	Sivand
7	168	21	910	35	Zagros
8	176	22	8031	36	Azar2
9	1800.1	23	870		
10	198	24	871		
11	2047	25	882		
12	2095	26	890		
13	2103	27	894		
14	2191	28	90		

مقاومت به خشکی در گندم، رابطه دارند (Alnaggara *et al.*, 2013; Bousba *et al.*, 2013; Korzun *et al.*, 1997). خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در پایگاه اینترنتی Grain Genes (http://wheat.pw.usda.gov)، به آدرس قابل دسترسی است. برای انجام PCR، از مخلوط واکنش PCRT در حجم ۲۰ میکرولیتر که شامل دو میکرولیتر بافر 10x، ۵/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۵ واحد بر میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از MgCl₂ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت 10pmol بر میکرولیتر) و دو میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر و بقیه آب دوبار تقطیر، استفاده شد. تکثیر DNA، توسط دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad-T100) و طی ۴۰ چرخه انجام شد؛ ۱۰ چرخه اول به صورت Touch down برنامه‌ریزی شد به طوری که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو، چهار درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و به ازای هر چرخه، ۰/۴ درجه از دمای اتصال کاهش یافت و سپس در ۳۰ چرخه بعدی، جداسازی محصولات تکثیری از ژل پلی‌آکریلامید، واسرشت ساز شش درصد در الکتروفورز عمودی استفاده شد و رنگ آمیزی ژل‌ها، با استفاده از نیترات نقره انجام گرفت (Switzer *et al.*, 1979). برای بررسی چند شکلی بین ژنوتیپ‌ها، به حضور یک باند خاص، عدد یک و به عدم حضور آن، عدد صفر داده شد. ماتریس تشابه، به روش دایس محاسبه شد و رسم دندروگرام با نرم‌افزار NTSYS نسخه ۲/۰۲e و به روش UPGMA انجام شد. در نهایت، با مقایسه دندروگرام حاصل از شاخص‌ها و

رقم کوهدشت، متحمل به تنش خشکی است و در سال ۱۳۷۹، برای کاشت در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر دیم کشور معرفی شد. سرداری نیز به عنوان گندم دیم، برای مناطق سرد کوهستانی غرب کشور مناسب است. هم‌چنین آذر ۲، حاصل تلاقی سرداری و Kqvz/ym71/3/Mayas//Bb/Inia، در سال ۶۷-۶۸، در بخش غلات دیم مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر می‌باشد و به عنوان رقم متحمل به خشکی شناخته شده است. زاگرس، از ایکاردا وارد شده است و برای مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری و دیم کشور معرفی شده است. این چهار رقم، در پژوهش انجام شده توسط Pakniyat & Tavakol (2007) نیز متحمل به خشکی شناخته شده‌اند. رقم پیشتاز که از تلاقی الوند و یک لاین برزیلی بدست آمده است، زودرس و دارای پتانسیل عملکرد بالا است و برای مناطق متعادل توصیه شده است. سیوند نیز حاصل تلاقی "Kauz's" (با منشأ مکزیکی) و رقم آزادی است که در ایران تولید و معرفی شده است و مناسب مناطق معتدل می‌باشد. این شش رقم به عنوان شاهد در این پژوهش استفاده شدند.

ارزیابی مولکولی

برای انجام مطالعات مولکولی، DNA به روش CTAB استخراج شد (Doyle & Doyle, 1987). کمیت و کیفیت DNA، با استفاده از دستگاه نانو درآپ مدل 2000c و ژل آگارز تعیین شد. در این آزمایش، از نشانگرهای SSR پیوسته به QTL های کنترل کننده صفات مرتبط با تحمل تنش خشکی، از منابع انتخاب شدند (جدول ۲). این آغازگرها، بر اساس مطالعات انجام شده، با صفات

ژنوتیپهای متحمل به تنش، تجزیه رگرسیون خطی ساده تک مارکری بین نشانگرهای ریز ماهواره، به عنوان متغیر مستقل و عملکرد دانه و همچنین هر یک از شاخص‌ها به عنوان متغیر وابسته انجام شد...

دندروگرام حاصل از مارکرهای SSR، میزان مطابقت آن‌ها و نیز میزان توانایی این نشانگرها در شناسایی ارقام و ژنوتیپهای متحمل، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور تعیین تأثیرگذارترین نشانگرها در تشخیص

جدول ۲- آغازگرهای SSR مورد استفاده در ارزیابی مولکولی

Table 2. SSR markers used in molecular evaluation

No	Primer name	Sequence	Annealing temperature for 10 cycle	Annealing temperature for 30 cycle
1	WMC 179 F	CAT GGT GGC CAT GAG TGG AGG T	71	67
	WMC 179 R	CAT GAT CTT GCG TGT GCG TAG G		
2	WMS 108 F	ATT AAT ACC TGA GGG AGG TGC	66	62
	WMS 108 R	GGT CTC AGG AGC AAG AAC AC		
3	WMS 198 F	TTG AAC CGG AAG GAG TAC AG	62	58
	WMS 198 R	TCA GTT TAT TTT GGG CAT GTG		
4	WMC 445 F	AGA ATA GGT TCT TGG GCC AGT C	68	64
	WMC 445 R	GAG ATG ATC TCC TCC ATC AGC A		
5	WMS 118 F	GAT GGT GCC ACT TGA GCA TG	62	58
	WMS 118 R	GAT TG TCA AAT GGA ACA CCC		
6	WMS 149 F	CAT TGT TTT CTG CCT CTA GCC	64	60
	WMS 149 R	CTA GCA TCG AAC CTG AAC AAG		
7	WMC 307 F	GTT TGA AGA CCA AGC TCC TCC T	64	60
	WMC 307 R	ACC ATA ACC TCT CAA GAA CCC A		
8	WMC 322 F	CGC CCC ACT ATG CTT TG	61	57
	WMC 322 R	CCC AGT CCA GCT AGC CTC C		

آنهاست. ژنوتیپهای ۱۵۰ و ۷۶، کمترین مقدار را داشتند که نشان دهنده تحمل پایین آنهاست. در صورتی که از نظر شاخص TOL، این ژنوتیپها متحمل هستند ولی میزان عملکرد آن‌ها پایین است. با توجه به این که در انتخاب ژنوتیپهای مقاوم به تنش خشکی، ژنوتیپهایی مد نظر می‌باشند که در هر دو محیط تنش و عدم تنش، دارای عملکرد بالایی باشند و از طرفی شاخص های STI، GMP و MP نیز همیشه ژنوتیپهای متحمل به خشکی را تشخیص نمی‌دهند زیرا ممکن است عملکرد بالای یک ژنوتیپ در محیط نرمال، باعث افزایش شاخص شود، بنابراین انتخاب براساس یک شاخص نمی‌تواند قابل اعتماد باشد و باید ترکیبی از شاخص‌ها را بکار گرفت (Mosavi *et al*, 2008; Najafian, 2009).

از این رو، به روش‌های چند متغیره نیاز است تا با توجه به روابطی که این شاخص‌ها با هم دارند، بتوان با ترکیب منطقی کلیه شاخص‌ها، جمعیت مورد مطالعه را بر اساس میزان تحمل و حساسیت، گروه‌بندی کرد و متحمل‌ترین ارقام و لاین‌ها را معرفی نمود و نشانگرهایی را معرفی کرد که بتوانند گروه متحمل را با اطمینان بالا شناسایی کنند.

نتایج و بحث

جهت بررسی اثر کلی رژیم آبیاری، ژنوتیپ و اثر متقابل آبیاری در ژنوتیپ، تجزیه واریانس مرکب دو محیط تنش و عدم تنش انجام شد و نتایج نشان داد که اثر آبیاری و ژنوتیپ، در سطح یک درصد معنی دار بود ولی اثر متقابل ژنوتیپ در آبیاری معنی دار نبود. تفاوت میانگین عملکرد دانه در دو محیط (Yp-Ys) که همان شاخص تحمل (TOL) می‌باشد، برای تمام ژنوتیپ‌ها بجز هشت ژنوتیپ معنی دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین عملکرد ژنوتیپ‌ها در دو محیط تنش و بدون تنش که همان شاخص میانگین تولید (MP) می‌باشد نشان داد که ژنوتیپ ۱۹۸، بیشترین عملکرد و ژنوتیپ‌های ۱۵۰ و ۷۶، کمترین میانگین تولید را داشتند (جدول ۳). اگرچه مقدار TOL ژنوتیپ‌های ۱۵۰ و ۷۶ پایین بود و مقدار TOL پایین، بیانگر نزدیک بودن عملکرد محیط تنش به عملکرد محیط بدون تنش است و ژنوتیپ تحمل بیشتری دارد، اما این ژنوتیپ‌ها دارای پتانسیل عملکرد پایینی هستند. از نظر شاخص‌های GMP و STI، ژنوتیپ‌های ۱۹۸، ۸۹۴ و سیوند، به ترتیب دارای بیشترین مقدار بودند که نشان دهنده تحمل به تنش خشکی و پتانسیل عملکرد بالای

جدول ۳. میانگین عملکرد محیط تنش و عدم تنش و شاخص های تحمل و حساسیت و شاخص ریک

Table3. Mean yield in stressed and non-stressed conditions, tolerance and sensitivity indices and rick index.

genotypes	GMP	STI	SSI	Mp ^l	YI	Yp	Ys	TOL(Yp-Ys)	wi
11.113	241.92	0.545	1.16	293.8 ^{ab}	1.03	460.46	127.11	333.35**	8399.9
150	18.11	0.003	1.09	21.14 ^c	0.08	32.04	10.23	21.81	16548.9
1553	208.08	0.403	1.11	244.6 ^{abc}	0.94	373.28	115.99	257.29**	1433.8
1637	169.10	0.266	0.76	177.7 ^{abc}	0.99	232.17	123.16	109.01	4486.7
168	224.79	0.470	0.75	235.9 ^{abc}	1.33	307.23	164.47	142.77*	1858.5
176	246.13	0.564	0.86	264.5 ^{ab}	1.35	361.17	167.74	193.44**	53.0
1800.1	150.74	0.212	1.22	190.6 ^{abc}	0.60	307.28	73.95	233.33**	437.9
198	367.32	1.256	0.66	380.4 ^a	2.27	479.10	281.62	197.48**	19.6
2095	90.30	0.076	1.38	136.0 ^{bc}	0.28	237.80	34.29	203.51**	0.03
2103	161.54	0.243	0.57	165.4 ^{abc}	1.05	201.19	129.71	71.47	8746.8
2191	198.27	0.366	1.02	223.9 ^{abc}	0.97	328.01	119.84	208.17**	9.8
3798	191.29	0.341	1.15	230.5 ^{abc}	0.82	359.22	101.87	257.35**	1437.4
422	158.77	0.235	1.27	209.1 ^{abc}	0.59	345.27	73.01	272.26**	2347.6
48	126.17	0.148	1.21	158.6 ^{abc}	0.50	254.83	62.47	192.36**	64.6
689	259.24	0.626	1.05	296.7 ^{ab}	1.23	440.87	152.44	288.42**	3586
744	192.63	0.345	1.07	222.1 ^{abc}	0.90	332.62	111.56	221.06**	150.1
76	20.65	0.003	1.15	24.86 ^c	0.09	38.70	11.02	27.68	15496.9
2047	220.97	0.455	0.74	231.4 ^{abc}	1.31	299.89	162.81	137.08	2221.1
8031	197.30	0.362	0.91	214.9 ^{abc}	1.05	300.16	129.69	170.47*	553.2
836	190.07	0.336	1.06	218.1 ^{abc}	0.90	325.15	111.11	214.04**	53.1
azar2	275.25	0.705	0.58	282.2 ^{ab}	1.77	344.35	220.02	124.33	3152.8
zagros	150.72	0.212	0.37	152.0 ^{bc}	1.07	171.71	132.29	39.42	13499.7
882	153.84	0.220	1.06	176.7 ^{abc}	0.72	263.59	89.79	173.81*	447.8
890	219.01	0.447	0.72	228.8 ^{abc}	1.31	295.16	162.50	132.66	2526.1
894	324.47	0.980	0.85	347.7 ^{ab}	1.80	472.71	222.72	249.99**	1069.9
90	157.33	0.230	1.05	180.1 ^{abc}	0.75	267.65	92.48	175.18*	407.8
9016	221.44	0.457	1.09	257.6 ^{ab}	1.02	389.37	125.94	263.44**	1782.2
9050	130.79	0.159	1.26	171.0 ^{abc}	0.49	281.21	60.83	220.38**	138.5
910	233.28	0.507	0.94	255.9 ^{ab}	1.22	361.19	150.67	210.51**	23.0
99	205.57	0.393	1.26	267.8 ^{ab}	0.78	439.32	96.19	343.13**	9715.4
870	195.05	0.354	1.05	223.3 ^{abc}	0.92	331.95	114.60	217.34**	92.6
koohdasht	243.24	0.551	0.97	269.9 ^{ab}	1.23	386.85	152.94	233.91**	455.2
pishtaz	279.65	0.728	1.19	344.9 ^{ab}	1.15	546.85	143.01	403.84**	20020.4
sardari	247.04	0.568	1.14	294.9 ^{ab}	1.08	456.06	133.82	322.25**	7022.5
sivand	309.76	0.893	0.77	326.6 ^{ab}	1.80	429.98	223.15	206.82**	4.8
871	164.14	0.251	1.24	211.0 ^{abc}	0.63	343.54	78.43	265.11**	1883.3
LSD	0.05							140.6	
	0.01							185.7	

میانگین های دارای حداقل در یک حرف مشترک، تفاوت معنی داری به روش توکی و در سطح یک درصد ندارند.

*, **, ***: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

Means with at least one common letter have no significant difference at 1% probability level, based on Tukey test. *, **, ***: significant at 1% and 5% probability levels, respectively.

۴). با توجه به ماهیت شاخص‌ها می‌توان گفت که GMP، MP و STI، بهترین شاخص‌ها برای انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل و برتر بودند؛ تجزیه عامل‌ها نیز برتری این شاخص‌ها را نشان داد. این شاخص‌ها، بیشترین بار عاملی را در فاکتور اول داشتند که فاکتور تحمل به خشکی شناخته شد (جدول ۵). در پژوهش انجام شده بر روی گندم نان، عملکرد دانه در شرایط تنش، بیشترین همبستگی را با شاخص‌های GMP و STI نشان داد (Abdolshahi *et al.*, 2009). در پژوهشی دیگر نیز شاخص‌های MP، GMP و STI، برای شناسایی ژنوتیپ‌هایی با عملکرد بالا، در هر دو شرایط تنش و بدون تنش خشکی، به عنوان شاخص مناسب معرفی شدند (Dashti *et al.*, 2007).

بررسی همبستگی عملکرد ژنوتیپ‌ها با شاخص‌های تحمل و حساسیت

برای تعیین برترین شاخص‌های تحمل یا حساسیت که بتوانند برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل مورد استفاده قرار گیرند، از ضریب همبستگی استفاده شد. ضرایب همبستگی ساده، بین شاخص‌ها و میانگین عملکرد نرمال و تنش، نشان داد که همبستگی سه شاخص MP، GMP و STI با عملکرد در شرایط تنش و نرمال، مثبت و معنی‌دار بود و همبستگی TOL با عملکرد، در محیط نرمال، مثبت و همبستگی SSI با عملکرد، در شرایط تنش، منفی و معنی‌دار بود. شاخص GMP، همبستگی بالایی با هر دو میانگین عملکرد دانه در شرایط تنش و نرمال داشت و پس از آن، شاخص MP و STI، بیشترین همبستگی را با عملکرد دانه در شرایط تنش و بدون تنش داشتند (جدول

جدول ۴- ضرایب همبستگی بین شاخص‌های تحمل و حساسیت با عملکرد در شرایط تنش و نرمال

Table 4. Correlation coefficients between susceptibility and tolerance indices and genotype yields under normal and stressed conditions

	TOL	GMP	STI	SSI	MP	YS	YP	YI
TOL	1							
GMP	0.485**	1						
STI	0.378*	0.954**	1					
SSI	0.564**	-0.379**	-0.387**	1				
MP	0.666**	0.975**	0.909**	0.249 ^{ns}	1			
YS	0.133 ^{ns}	0.930**	0.924**	-0.669**	0.829**	1		
YP	0.855**	0.868**	0.782**	0.092 ^{ns}	0.956**	0.623**	1	
YI	0.133	0.930**	0.924**	-0.669**	0.829**	1	0.628**	1

*، **، ***: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

*، **: significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

جدول ۵- نتایج تجزیه به عامل‌ها بر اساس شاخص‌های تحمل و حساسیت به خشکی

Table 5. Results of factor analysis based on drought tolerance and susceptibility indices

Index	Factor1	Factor2
STI	0.969	0.031
GMP	0.997	-0.039
YI	0.943	0.325
MP	0.965	-0.253
TOL	0.450	-0.878
SSI	-0.411	-0.890
Variance	4.12	1.73
Var%	0.688	0.289
Total variance	0.977	

ژنوتیپ‌ها توانستند حداکثر اختلاف را از هم داشته باشند. بردار میانگین شاخص‌های مورد مطالعه برای هر کلاستر نشان داد که ژنوتیپ‌های کلاستریک، از نظر کلیه شاخص‌ها به جزء SSI، دارای مقادیر زیاد بودند و کلاستر دوم از نظر کلیه صفات به جزء SSI، دارای مقادیر پائین بود؛ کلاستر سوم، دارای مقدار بالا برای YI (Ys) و مقدار پائین، برای SSI و مقدار مثبت برای GMP بود؛ بنابراین

تجزیه خوشه‌ای بر اساس شاخص‌های تحمل

به منظور گروه‌بندی ارقام و ژنوتیپ‌ها، از شاخص‌های تحمل MP، GMP، STI، YI و همچنین عملکرد دانه در شرایط بدون تنش (Yp)، جهت تجزیه خوشه‌ای به روش Ward همراه با استاندارد کردن و فاصله اقلیدسی استفاده شد و سه گروه مجزا در فاصله ۱۵/۳ تشخیص داده شد (شکل ۱). برش دندروگرام در نقطه‌ای صورت گرفت که

گندم بهاره در دو محیط تنش و بدون تنش خشکی با استفاده از شاخص‌های تحمل، ژنوتیپ‌های سیستان، اکبری، بیات، دز، بک‌کراس روشن بهاره، مهدوی و طبسی، جزء متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها به تنش خشکی معرفی شدند (Mohseni *et al.*, 2015).

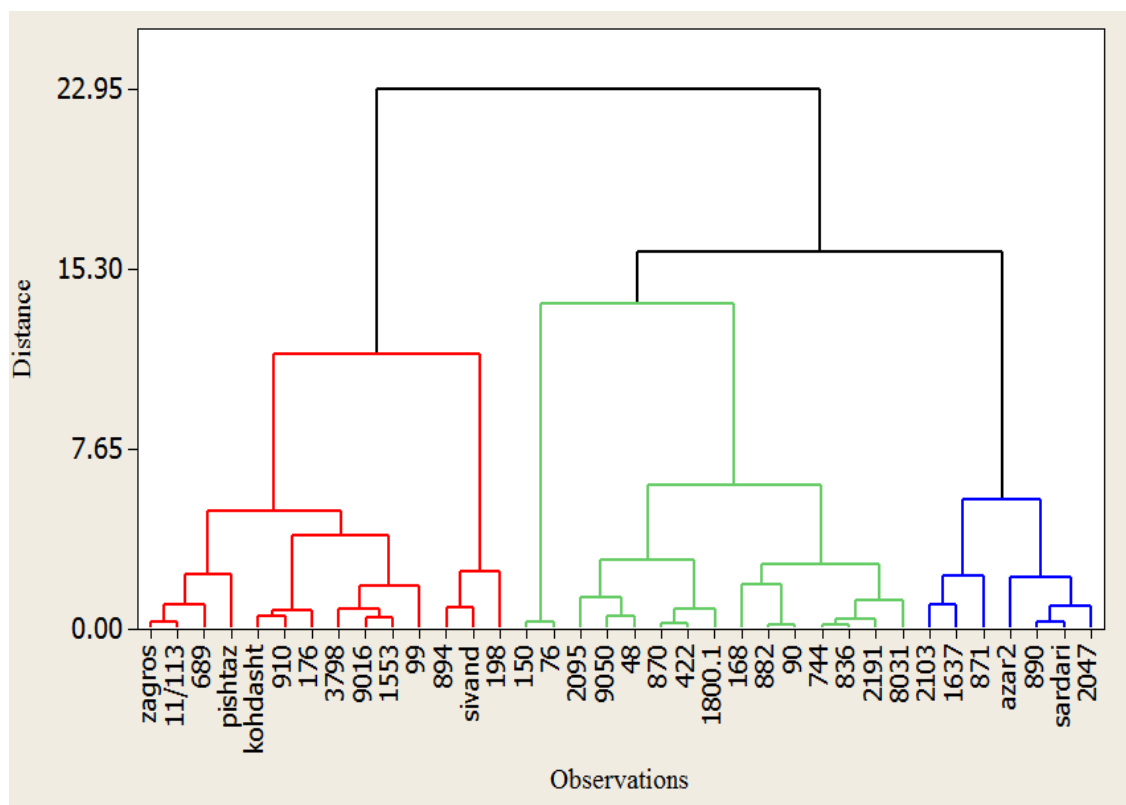
گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گندم با استفاده از نشان‌گرهای مولکولی SSR

نتایج گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه دایس و روش UPGMA با ترسیم خط برش در تشابه ۰/۴۵، ژنوتیپ‌ها را در سه گروه قرار داد (شکل ۲). گروه اول (A): شامل ژنوتیپ‌های ۸۰۳۱، ۲۰۹۵، ۱۶۳۷، ۱۵۵۳، ۱۸۰۰/۱، ۹۰۱۶، ۶۸۹، ۲۰۴۷، ۱۹۸، ۸۷۱، سیوند، پیشتاز، ۱۱/۱۱۳، ۹۱۰، ۳۷۹۸، ۹۹، ۸۹۴، ۱۷۶، ۸۹۰، ۸۷۰، زاگرس، ۲۱۰۳، کوه‌دشت، ۷۴۴، آذر، ۲، سرداری بود. در این گروه، بیشترین شباهت (۰/۹۵) بین ژنوتیپ‌های سیوند و ۹۱۰ وجود داشت. این دو رقم، هر دو از ارقام دیم هستند و سرداری، یکی از والدین آذر ۲ است و هر دو، تیپ زمستانه دارند. گروه دوم (B): شامل ژنوتیپ‌های ۴۸، ۹۰۵۰، ۹۰، ۸۸۲، ۲۱۹۱، ۷۶، ۸۰۳۱ بود؛ در این گروه، بیشترین شباهت (۰/۸۱) بین ژنوتیپ‌های ۸۸۲ و ۹۰ وجود داشت. شاید این دو ژنوتیپ نیز دارای والدین مشابه باشند. گروه سوم (C): شامل ژنوتیپ‌های ۱۶۸، ۴۲۲، ۸۳۶، ۱۵۰ بود. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها نشان داد که می‌توان شباهت‌های قابل توجهی را در دندروگرام مولکولی و دندروگرام حاصل از شاخص‌های تحمل مشاهده نمود. گروه B و C شامل ۱۱ ژنوتیپ بودند که تمام ژنوتیپ‌های آن‌ها، در گروه حساس حاصل از گروه‌بندی بر اساس شاخص‌ها قرار داشتند. گروه A، با داشتن ۲۵ ژنوتیپ، دربرگیرنده ژنوتیپ‌های متحمل و نیمه متحمل به خشکی بود که از این گروه، به ترتیب ۱۱/۱۱۳، ۱۴۷۰، ۱۵۵۳، ۱۷۶، ۱۹۸، ۳۷۹۸، ۶۸۹، ۸۹۴، ۹۰۱۶، ۹۱۰، ۹۹، کوه‌دشت، پیشتاز، زاگرس، سیوند و سرداری ۱۶۳۷، ۲۰۴۷، ۲۱۰۳، ۲۱۹۱، ۷۶۵، آذر، ۲، ۸۷۱، ۸۹۰ در گروه متحمل و نیمه متحمل حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط شاخص‌های متحمل به خشکی قرار داشتند. بنابراین این تطابق نمی‌تواند تصادفی باشد و نشانگرهای SSR توانسته‌اند در تمایز ژنوتیپ‌های حساس و متحمل، نقش مؤثری ایفا نمایند. به بیان دیگر، شاید

کلاستر یک، گروه متحمل، کلاستر دو، حساس و کلاستر سه، نیمه متحمل نامیده شدند. از روش دیگر نیز برای متمایز کردن منطقی گروه‌های مذکور، میانگین شاخص‌های مهم تشخیص داده شده در تجزیه به عامل‌ها، برای هر گروه، تعیین شد و انحراف از میانگین کل برای همان شاخص محاسبه شد (جدول ۶). مطابق روش بکار رفته (Rashidi *et al.*, 2006)، اگر میانگین یک شاخص در یک گروه، از میانگین کل آن شاخص بالاتر باشد، آن گروه از نظر آن شاخص، ارزش بیشتری از میانگین کل ژنوتیپ‌ها خواهد داشت و چنانچه برای همه شاخص‌ها، برتر از میانگین کل باشد، می‌توان آن گروه را متحمل نامید و برعکس، اگر پایین تر باشد، گروه حساس خواهد بود. گروه متحمل، شامل ژنوتیپ‌های ۱۱/۱۱۳، ۱۵۵۳، ۱۷۶، ۱۹۸، ۳۷۹۸، ۶۸۹، ۸۹۴، ۹۰۱۶، ۹۱۰، ۹۹، کوه‌دشت، پیشتاز، زاگرس، سیوند؛ گروه حساس، شامل ژنوتیپ‌های ۱۵۰، ۱۸۰۰/۱، ۲۰۹۵، ۲۱۹۱، ۴۲۲، ۴۸، ۷۴۴، ۷۶، ۸۰۳۱، ۸۳۶، ۸۸۲، ۹۰، ۹۰۵۰، ۸۷۰، ۱۶۸ و گروه نیمه متحمل، شامل ژنوتیپ‌های ۱۶۳۷، سرداری، ۲۰۴۷، ۲۱۰۳، آذر، ۲، ۸۷۱، ۸۹۰ بودند (جدول ۶). دو زیرگروه برای گروه حساس قابل تشخیص است؛ یک گروه دو تایی شامل ۱۵۰ و ۷۶ که دارای پتانسیل عملکرد پایینی بودند و احتمالاً همین مسئله باعث جدا شدن آن‌ها از بقیه افراد گروه شده است (جدول ۳). نتایج بررسی Pakniyat & Tavakol (2007) بر روی گندم نان نشان داد که ارقام سرداری، آذر ۲ و کوه‌دشت، ارقام متحمل به خشکی هستند؛ این ارقام در پژوهش حاضر نیز متحمل به خشکی شناخته شدند. بنابراین ارقام دیگری نیز که با این افراد در یک گروه قرار گرفتند، متحمل و نیمه متحمل بودندشان به خشکی، مورد تصدیق و تأیید قرار می‌گیرد. از آن‌جا که به‌نژادگران، همواره به دنبال یافتن ارقام لاین‌هایی هستند که بتوانند پایداری عملکرد خود را در محیط‌ها و مکان‌های مختلف حفظ نمایند، از این رو برای مطالعه پایداری این ژنوتیپ‌ها، از شاخص ریک (Wi) استفاده شد (جدول ۳). با مرتب کردن ژنوتیپ‌ها بر اساس مقادیر Wi ، ژنوتیپ‌های سیوند، ۱۹۸، ۹۱۰ و ۱۷۶ که به ترتیب دارای Wi پایین تری بودند و در ضمن، در گروه متحمل (جدول ۶) قرار داشتند، به‌عنوان متحمل‌ترین و پایدارترین ژنوتیپ‌های دارای پتانسیل عملکرد بالا در هر دو محیط، انتخاب شدند. در پژوهشی روی ۳۹ ژنوتیپ

اثبات می شود و قابل انتظار هم می باشد چراکه آغازگرهای SSR استفاده شده، آغازگرهایی هستند که بر اساس مطالعات دیگران، با صفات مقاومت به خشکی رابطه نشان داده اند (Alnaggara *et al.*, 2013). نتایج این آزمایش با نتایج آن ها مطابقت دارد و بدین ترتیب، این آزمایش به اعتبار این مارکرها در سلکسیون برای تحمل به خشکی می افزاید.

بتوان گفت که نشانگرهای مورد استفاده، نشانگرهایی نیستند که بطور تصادفی از سطح ژنوم انتخاب شده باشند؛ بلکه از مناطقی از ژنوم هستند که پیوسته به ژن های کنترل کننده تحمل به تنش می باشند. با ترکیب کردن دو گروه B و C به دست آمده از گروه بندی بر اساس نشانگرهای SSR و ترکیب دو گروه متحمل و نیمه متحمل در خوشه بندی بر اساس شاخص ها و تجزیه χ^2 (جدول ۷)، رابطه بین گروه بندی بر اساس شاخص ها و گروه بندی بر اساس مارکرهاي SSR مورد استفاده، بخوبی



شکل ۱- گروه بندی ۳۶ ژنوتیپ گندم نان بر اساس شاخص های تحمل و میانگین عملکرد دانه در شرایط تنش و نرمال، به روش Ward و فاصله اقلیدسی.

Fig1- Grouping of 36 bread wheat genotypes based on tolerance indices and mean of grain yield in stressed and non-stressed conditions using ward method and Euclidian distance.

جدول ۵- بردار میانگین گروه ها در تجزیه کلاستر بر اساس شاخص های تحمل و عملکرد دانه.

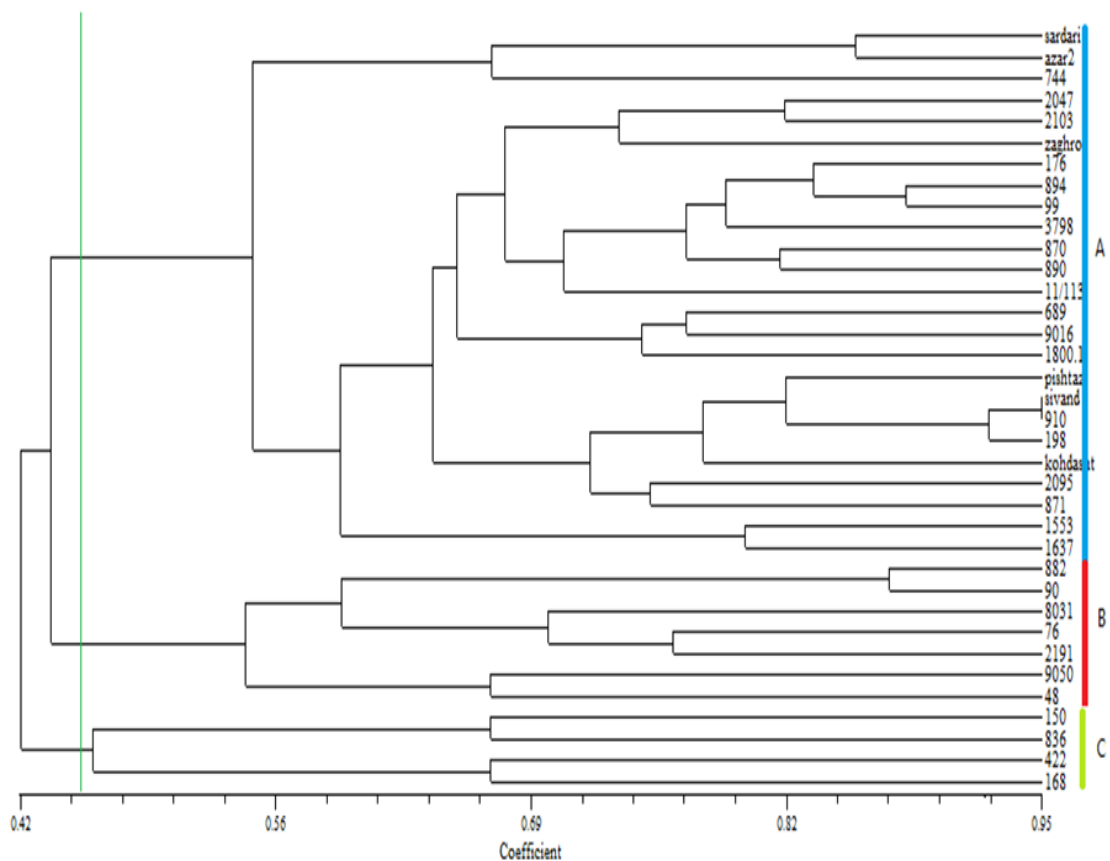
Table 6 -Average vector of clusters based on tolerance indices and grain yield

Variable	Cluster1	Cluster2	Cluster3
YI	0.55	-0.79	0.64
TOL	0.79	-0.18	-1.11
GMP	0.78	-0.76	0.15
STI	0.81	-0.73	0.03
SSI	0.09	0.61	-1.47
MP	0.87	-0.71	-0.11
YP	0.92	-0.57	-0.52

جدول ۶- اعضای گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای همراه با میانگین و میزان انحراف از میانگین کل برای شاخص‌های تحمل

Table7- Memberships of groups derived from cluster analysis with the average and deviation of the total average for tolerance indices

Index	YI	STI	MP	GMP	Genotypes	Group
Group average	1.28	0.639	289.38	253.38	198 176, 1553, 11.113	Tolerant
Deviation From Total mean	0.28	0.217	74.65	57.62	910, 9016-894 689, 3798, Kohdasht, pishtaz, 99, Zagros, Sivand	
Group average	0.639	0.223	170.05	139.47	150, 1800.1,	Sensitive
Deviation From Total mean	-0.361	-0.199	-53.68	-56.29	2095,2191,422, 48,76,744, 8031,836, 822, 90, 9050,870, 168	
Group average	1.308	0.421	214.73	207.73	1637, 2047, 871,890,2103	Semi-Tolerance
Deviation From Total mean	0.308	0.01	-9	11.968	Sardari, Azar2 ,	
Total average	1.00	0.411	223.73	195.762		



شکل ۲- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها به روش UPGMA و ضریب تشابه دایس
fig 2- Denderogram of clustering of 36 genotypes by UPGMA method and Dice coefficient

جدول توافق ۷- تجزیه χ^2 برای ارتباط گروه‌بندی ژنوتیپ‌های تحت مطالعه بر اساس نشانگرهای SSR و شاخص‌های تحمل به خشکی

Table 7- χ^2 Analysis for relationship between two grouping criterions (tolerance indices and SSR markers)

based on indices				
	Semi-tolerant+Tolerant	Susceptible	Total	
based on SSR	Group A	21 (14.58)*	4 (10.42)	25
	Group B+C	0 (6.42)	11 (4.58)	11
Total		21	15	36
$\chi^2 = 22.176$		DF=1		P =0.00

*اعداد داخل پرانتز، تعداد مورد انتظار در هر گروه را نشان می‌دهد.

*Numbers in parentheses are the expected value in each group.

مثبت بود، بجز آلل 5-179 که دارای ضریب رگرسیون منفی بود (جدول ۸). این بدان معناست که انتخاب براساس وجود این آلل، منجر به انتخاب ژنوتیپ‌های با عملکرد و تحمل پایین‌تر می‌شود و انتخاب بر اساس وجود سایرآلل‌ها، منجر به افزایش و بهبود عملکرد و تحمل به خشکی می‌شود. در تهیه نقشه‌های پیوستگی، اطلاعات نشانگری حاصل از تحقیق حاضر، جهت انتخاب آغازگرهای مناسب، مفید می‌باشد. در پژوهش انجام شده روی گندم دوروم برای عملکرد دانه، نشانگرهای WMC179، WMC307، WMC445، WMS108، WMS118، WMS149، WMC198، به ترتیب یک QTL روی کروموزوم‌های 2A، 3B، 5A، 3B، 4B، 5B، 4A شناسایی کردند؛ همچنین نشانگر WMC322، دو QTL روی کروموزوم 3A، 3B بر روی گندم شناسایی کرده‌اند (Bousba et al., 2013; Korzun et al., 1997).

تجزیه رگرسیونی بین عملکرد دانه در متر مربع و شاخص‌های تحمل به تنش با نشانگر SSR

به منظور تعیین مؤثرترین نشانگرهای SSR مرتبط با تنش خشکی، تجزیه رگرسیون بین صفت عملکرد دانه در شرایط تنش و عدم تنش و همچنین سه شاخص تحمل مورد استفاده، به عنوان متغیرهای وابسته و مکان‌های ژنی شناسایی شده توسط هر نشانگر، به عنوان متغیر مستقل و به روش تک نشانگری انجام شد. هدف از شناسایی نشانگر، پیدا کردن آللهایی به عنوان نشانگر آگاهی‌بخش (Informative Markers) است که با عملکرد دانه همبستگی نشان داده‌اند. نتایج نشان داد که برخی نشانگرها، ارتباط معنی‌داری با عملکرد دانه در شرایط تنش، عدم تنش و تعدادی از شاخص‌ها دارند. نشانگرهای WMS-198، WMC-322، WMS-118، WMC-179، WMS-149 و WMC 307 دارای بیشترین ارتباط معنی‌دار با عملکرد دانه در متر مربع و شاخص‌های تحمل به تنش بودند که ضریب رگرسیون تمام باندهای (آلل‌های) آن‌ها

جدول ۸- باندهای آگاهی‌بخش که از طریق رگرسیون ساده تک نشانگری با شاخص‌های تحمل در شرایط تنش و بدون تنش پیوستگی نشان دادند

Table 8- Informative bands that correlated with drought indices and grain yield at stressed and non-stress conditions

Dependent variable	Marker-allele (Independent variable)	Regression coefficient	R ²
Grain yield /m ² in non stress condition	WMC-307-2	117**	30.2
	WMC-307-3	79**	14
	WMS-198-3	102**	22.6
	WMC-322-1	98.6*	16.5
	WMC-322-3	104**	23.4
	WMC-322-4	106**	25
	WMS-118-1	96*	14.4
	WMS-118-3	112**	26
	WMC-179-1	116**	30.6
	WMC-179-2	104**	24
	WMC-179-3	90.4*	17.6

ادامه جدول ۸

Continue of Table 8

Grain yield /m ² in stress condition	Marker-allele	Regression coefficient	R ²
	WMS-108-4	77.6*	12.1
	WMC-307-2	73.5**	40
	WMC-307-3	46**	16
	WMS-198-3	42*	12.8
	WMC-322-3	58.1**	24.5
	WMC-322-4	46.2**	16.1
	WMC-179-1	49.1**	18.3
	WMC-179-2	50.8**	19.6
	WMC-179-3	59.5**	25.7
	WMC-179-5	-45.6**	15.1
	WMS-149-1	41*	12.5

* و **: به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح پنج درصد و یک درصد.

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

ادامه جدول ۸

Continue of Table 8

Dependent variable	Marker-allele (Independent variable)	Regression coefficient	R ²
GMP	WMC-307-2	83.1**	32
	WMC-307-3	56.2**	15.2
	WMS-198-3	66.8**	20.6
	WMC-322-3	70.7**	23.1
	WMC-322-4	61.6**	18.2
	WMC-179-1	76.2**	28.1
	WMC-179-2	74.4*	26.9
	WMC-179-3	71.5**	23.6
	WMC-179-5	-67.2**	20.9
STI	WMC-307-2	0.284**	28.1
	WMC-307-3	0.210**	15.4
	WMS-198-3	0.256**	22.5
	WMC-322-3	0.252**	21.4
	WMC-322-4	0.229**	18.3
	WMC-179-1	0.285**	28.6
	WMC-179-2	0.279**	27.3
	WMC-179-3	0.253**	21.2
	WMC-179-5	-0.250**	21.5
	WMS-118-3	0.222*	17.6
MP	WMC-307-2	84.5**	30.6
	WMC-307-3	58.3*	14.8
	WMS-198-3	66.3**	18.4
	WMC-322-3	70.7**	20.9
	WMC-322-4	65.2**	18.5
	WMC-179-1	78**	26.7
	WMC-179-2	72.4**	23
	WMC-179-3	71**	21.1
	WMC-179-5	-60.8**	18.1

* و **: به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح پنج درصد و یک درصد.

*, **: significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

نتیجه گیری کلی

ارزیابی ۳۶ ژنوتیپ در دو شرایط تنش و نرمال به وسیله شاخص‌های تحمل به خشکی و عملکرد آن‌ها در دو محیط و هم‌چنین ارزیابی و بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای SSR نشان داد که برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر جهت بهبود تحمل به خشکی، شاخص‌های GMP، MP، و STI، شاخص‌های مناسب‌تری بودند زیرا هر سه، همبستگی بالایی با میانگین عملکرد ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش و نرمال داشتند و این شاخص‌ها توانستند در تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های متحمل و نیمه متحمل را به خوبی از حساس‌ها جدا نمایند و از طرفی، تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای SSR مرتبط با صفات مقاومت به خشکی، انطباق بالایی را با تجزیه خوشه‌ای بر اساس شاخص‌ها و عملکرد در محیط تنش و نرمال نشان دادند. از سوی دیگر، رگرسیون بین عملکرد در شرایط تنش و نرمال و شاخص‌های تحمل به خشکی با لوکوس‌های شناسایی شده توسط آغازگرهای SSR مورد استفاده، ارتباط بین این مارکرها و تحمل به خشکی را به خوبی نشان داد، بنابراین در انتخاب ژنوتیپ‌ها برای تحمل به خشکی به وسیله مارکرهای SSR (MAS)، می‌توان از این نشانگرها استفاده نمود.

در پژوهش دیگری، با ارزیابی لاین‌های اینبرد نو ترکیب F₉ حاصل از تلاقی Tamgurat و Cham، درگندم دوروم که با روش بالک تک بذر به دست آمده بودند، توانستند ۱۹ QTL روی کروموزوم‌های 2A, 5B, 6A, 6B, 7B, 1B را برای عملکرد دانه، مکان‌یابی کنند (Diab *et al.*, 2007). شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی، یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای تسریع در انتقال صفات مورد نظر به ژنوتیپ‌های دیگر و ردیابی آن‌هاست. وجود پیوستگی بین نشانگرها و عملکرد، نیاز به تهیه جمعیت‌های در حال تفرق مانند F₂ و جمعیت‌های دیگر مورد استفاده در نقشه مانند (RILs)، DH دارد تا بر اساس این جمعیت‌ها، نقشه‌های پیوستگی تهیه شود و سپس مکان‌های کنترل کننده عملکرد بر روی کروموزوم‌ها مشخص شود (Naghavi *et al.*, 2007).

از آن‌جا که تهیه جمعیت‌های در حال تفرق، وقت‌گیر و پرهزینه است، اگر بتوان قبل از تهیه این جمعیت‌ها، نشانگرهای مرتبط با صفات مورد نظر را از طرق مختلف تجزیه خوشه‌ای و تجزیه رگرسیون شناسایی کرد، می‌توان از آن‌ها، در برنامه اصلاحی، به‌عنوان نشانگرهای آگاهی بخش استفاده کرد (Ranjbar *et al.*, 2009).

REFERENCES

1. Abdolshahi, R., Omidi, M., Talei, A. R. & Yazdi samadi, B. (2009). Evaluation of bread wheat genotypes for drought tolerance. *Electronic Journal of Crop Production*, 3(1), 159-171. (In Farsi).
2. Alimohammadi, M. & Mirmohammady Maibody, S. A. M. (2011). Factor analysis of Agronomic and Physiological Traits of Ten Bread Wheat Cultivars under Two Irrigation Conditions. *Journal of Plant Production*, 18(2), 61-76. (In Farsi).
3. Alnaggara, M. M., Soblehse, S. E. S., Sattam, M. M. & Al-azab, K. F. (2013). Unique sssr markers for drought tolerance in newly- developed bread wheat mutants. *World Research Journal of Agronomy*, 2(1), 15-25.
4. Bousba, R., Baum, M., Jighy, A., Djekoune, A., Lababidi, S., Benbelkacem, A. A., Labhilili, M., Gaboun, F., & Ykhlef, N. (2013). Association analysis of genotypic and phenotypic traits using SSR marker in Durum wheat. *OIJR*, 3, 60-79.
5. Dadras, A. R. Samizadeh, H. & Sabouri, H. (2016). Groping conformity of soybean advanced lines and varieties using microsatellite markers and drought stress tolerance indaices in Rasht and Gonbad- Kavous. *Iranian Journal of Filed Crop Science*, 47 (1), 141-153. (In Farsi).
6. Dashti, H., Yazdi-Samadi, B., Ghannadha, M., Naghavi, M. R. & Quarri, S. (2007). QTL analysis for drought resistance in wheat using doubled haploid lines. *Int. J. Agric. Biol*, 9(1), 98-102.
7. Diab, A. A., Fahmy, A. H., Hassan, O. S., Nachit, M. M. & Momtaz, O. A. (2007). Identification of chromosomal regions and genetic contributions of genes controlling yield and other agronomic traits in durum wheat grown under different Egyptian environmental conditions. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(4), 401-422.
8. Dixit, S., Singh, A. & Kumar, A. (2014). Rice breeding for high grain yield under drought: a strategic solution to a complex problem. *International Journal of Agronomy*, 2014.
9. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19, 11-15.
10. Emam, E. (2007). Cereal Production. Shiraz University Pres, 190PP. (In Farsi)

11. Fernandez, G. C. (1992, August). Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In *Proceedings of the international symposium on adaptation of vegetables and other food crops in temperature and water stress* (pp. 257-270).
12. Fischer, R. A. & Maurer, R. (1978). Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29(5), 897-912.
13. Food and Agriculture Organization. 2015. www. FAO. Org.
14. Gavuzzi, P., Rizza, F., Palumbo, M., Campanile, R. G., Ricciardi, G. L. & Borghi, B. (1997). Evaluation of field and laboratory predictors of drought and heat tolerance in winter cereals. *Canadian Journal of Plant Science*, 77(4), 523-531
15. Hai, L., Guo, H., Wagner, C., Xiao, S. & Friedt, W. (2008). Genomic regions for yield and yield parameters in Chinese winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes tested under varying environments correspond to QTL in widely different wheat materials. *Plant science*, 175(3), 226-232.
16. <http://wheat.pw.usda.gov>. Grain Genes
17. Kilic, H. & Yagbasanlar, T. (2010). The effect of drought stress on grain yield, yield components and some quality traits of durum wheat (*Triticum turgidum ssp. durum*) cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 164.
18. Korzun, V., Börner, A., Worland, A. J., Law, C. N. & Röder, M. S. (1997). Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 95(2), 149-155.
19. Li, S., Jia, J., Wei, X., Zhang, X., Li, L., Chen, H. & Xu, Y. (2007). A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat. *Molecular Breeding*, 20(2), 167-178.
20. McCartney, C. A., Somers, D. J., Humphreys, D. G., Lukow, O., Ames, N., Noll, J., Cloutier, S. & McCallum, B. D. (2005). Mapping quantitative trait loci controlling agronomic traits in the spring wheat cross RL4452×'AC Domain'. *Genome*, 48(5), 870-883.
21. Michelmore, R. W., Paran, I. & Kesseli, R. V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the national academy of sciences*, 88(21), 9828-9832.
22. Mohammadi, Y., Mohammadi, S. A, Moghadam, M. & Rostaei, M. 2016. Identification of molecular markers linked to the genes controlling width and length flag and second leaves and grain yield in bread wheat under rain-fed and supplementary irrigation conditions. *Cereal Research*, 6(3), 271-282. (In Farsi).
23. Mohseni, M., Mortazavian, S. M., Ramshini, A. H. & Foghi, B. (2015). Evaluation of drought tolerance in some wheat genotypes based on selection indices. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 13(3), 524-542. (In Farsi).
24. Moosavi, S. S., Yazdi-Samadi, B., Naghavi, M. R., Zalli, A. A., Dashti, H. & Pourshahbazi, A. (2008). Introduction of new indices to identify relative drought tolerance and resistance in wheat genotypes. *Desert*, 12:165-178
25. Naghavi, M. R., Mardi, M., Pirseyedi, S. M., Kazemi, M., Potki, P. & Ghaffari, M. R. (2007). Comparison of genetic variation among accessions of *Aegilops tauschii* using AFLP and SSR markers. *Genetic resources and crop evolution*, 54(2), 237-240.
26. Najafian, G. (2009). Drought tolerance indices, their relationships and manner of application to wheat breeding programs. *Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 25-34
27. Nicholas, F. W. (2006). Discovery, validation and delivery of DNA markers. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(2), 155-158.
28. Pakniyat, H. & Tavakol, E. (2007). Rapid markers associated with drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(18), 3237- 3239.
29. Ranjbar, M., Naghavi, M. R. Zali, A., Aghai, M. J. & Mardi, M. (2009). Identification of informative markers of SSR in *Aegilops Crassa*. *Journal of Agriculture*, 11(1), 47-56. (In Farsi).
30. Rashidi, V., Majidi, I., Mohamadi, S.A. & MoghadamVahid, M. (2006). Determination of genetic relationship in durum wheat lines by cluster analysis identity of morphological main characters in each group. *Journal of Agricultural Sciences*, 13(2), 440-449. (In Farsi).
31. Rosielle, A. A. & Hamblin, J. (1981). Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environment. *Crop science*, 21(6), 943-946.
32. Roy, J. K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H. S. & Gupta, P. K. (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and. *Current science*, 90, (5).
33. Switzer, R. C., Merrill, C. R. & Shifrin, S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 98(1), 231-237.
34. Thudi, M., Upadhyaya, H. D., Rathore, A., Gaur, P. M., Krishnamurthy, L., Roorkiwal, M., Nayak, S.N., Kumar chaturvedi, S., Sarathi Basu, P., Gangarao, N. & Fikre, A. (2014). Genetic dissection of drought and heat tolerance in chickpea through genome-wide and candidate gene-based association mapping approaches. *Plos one*, 9(5), e96758.

35. Zhang, L. Y., Liu, D. C., Guo, X. L., Yang, W. L., Sun, J. Z., Wang, D. W. & Zhang, A. (2010). Distribution Genomic of quantitative trait loci for yield and yield-related traits in common wheat. *Journal of integrative plant biology*, 52(11)996-1007.