به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ٤ ■ شماره ١ ■ بهار و تابستان ١٣٩٥
صفحه‌های ١٩٩-١٨٣
انتشار الکترونیکی: بهار ١٣٩٨

تجزیه ارتباط برای شاخص‌های تحمل به خشکی در گندم نان با استفاده از نشانگرهای ISSR

آنیتا یاقوتی پور[1]، عزت اله فرشادفر[2*]، محسن سعیدی[3]

۱. دانش‌آموخته دکتری اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۲. استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۳. دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۲/۲۶

چکیده

به‌منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با شاخص‌های تحمل به خشکی در گندم نان (*Triticum aestivum*)، از نشانگرهای ISSR استفاده شد. ۱۸ نشانگر مورد استفاده، ۹۲ مکان در ۲۰ ژنوتیپ گندم نان تولید کرد. میزان اطلاعات چند شکل (PIC) از ۰/٤٦ (UBC-857، UPC-864، UBC-867 و is9) تا ۰/۲۱ (is7) متغیر بود. درصد چندشکلی کل ۹۵/۷۵ درصد برآورد گردید و از بین نشانگرهای مورد استفاده نشانگر UBC-867 با ۱۰۰ درصد چندشکلی، تعداد بالای شاخص‌های محتوای چندشکلی، شاخص نشانگر، شاخص نسبت چند شکلی مؤثر و شاخص قدرت تفکیک و با توجه به تکثیر بالای نوارها و تولید بیشترین نوارهای چندشکل به‌عنوان مناسب‌ترین نشانگر برای گندم در مطالعات بعدی معرفی شد. برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با شاخص‌های تحمل به خشکی، تجزیه رگرسیون گام به گام بین داده‌های ملکولی به‌عنوان متغیرهای مستقل و شاخص‌های تحمل به خشکی به‌عنوان متغیرهای وابسته انجام گرفت. ارتفاع، طول پایه سنبله، طول میانگره آخر و سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز توسط نشانگرهای بیشتری تبیین شدند. نشانگرهای UBC-867، is9، is11، is15 و is5 بیشترین ارتباط را با شاخص‌های تحمل به خشکی مورد بررسی نشان دادند. با توجه به این‌که همه نشانگرهای ISSR به‌کار برده‌شده روی صفات مورد مطالعه مؤثر بودند، بنابراین احتمال دارد بتوان از این نشانگرها همراه با اطلاعات مربوط به شاخص‌های تحمل به خشکی جهت شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های در حال تفرق و تولید ارقام هیبرید در اصلاح گندم مقاوم به خشکی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: آنالیز رگرسیونی، تحمل به خشکی، گندم نان، میزان اطلاعات چند شکل، نشانگرهای مرتبط.

* نویسنده مسئول
Email: e_farshadfar@yahoo.com

مقدمه

گندم مهم‌ترین غله است که بیشترین سطح زیرکشت را در بین گیاهان زراعی، به خود اختصاص داده است و اغلب در نواحی خشک و نیمه‌خشک با تغییرات زیاد آب‌وهوای سالانه، رشد می‌کند. ایران به‌علت موقعیت خاص جغرافیایی دارای آب‌وهوای مدیترانه‌ای است و با متوسط نزولات ۲٤۰ میلی‌متر در سال در زمره مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان قرار گرفته است [۲۹]. با توجه به خسارت‌های ناشی از وقوع تنش خشکی، ارزیابی واکنش گیاهان در این شرایط بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۲۳].

امروزه ردیابی صفات مطلوب و سهولت انتخاب به کمک نشانگرها[1] از طریق تعیین پیوستگی (لینکاژ) آن‌ها با صفات مهم زراعی (کمی و کیفی) امکان‌پذیر شده است. این موضوع، امکان گزینش سریع و دقیق ژنوتیپ‌های مطلوب را در مراحل اولیه رشد فراهم کرده و طول دوره به‌نژادی را کوتاه می‌نماید. به جای ارزیابی صفات، گزینش غیرمستقیم به کمک نشانگرهای پیوسته صورت می‌گیرد [۷ و ٤]. پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان‌های ژنی صفات کمی (QTL) محتمل‌ترین توجیه برای وجود رابطه بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی است [۲۸]. مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی دارای کاربردهای متعددی است که برخی از آن‌ها عبارت است از امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی، شناسایی آلل‌های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرم‌پلاسم، تسهیل مکان‌یابی دقیق QTLها و تأیید ژن های کاندیدای مسئول صفات کمی مثل پایداری و تحمل به خشکی [۱۱ و ۱]. در اغلب برنامه‌های اصلاحی، اصلاح ژنتیکی تحمل به خشکی از طریق انتخاب برای عملکرد صورت می‌گیرد ولی به‌علت وراثت‌پذیری پایین عملکرد تحت شرایط دیمو تغییرات زمانی و مکانی در محیط مزرعه، روش‌های سنتی اصلاح نباتات از سرعت کندی برخوردار بوده است. نشانگرهای مولکولی موجب افزایش کارایی در تهیه ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی می‌گردد زیرا بیان آن‌ها مستقل از اثرات محیطی است.

بعد از شناسایی نشانگرهای مولکولی که با تحمل به خشکی در ارتباطند می‌توان از آن‌ها به‌عنوان معیارهای گزینش برای تحمل به خشکی استفاده کرد. انتخاب به کمک نشانگر در تهیه ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی به‌کار رفته است. به‌طور مثال، نشانگرهای RFLP[2] مرتبط با تنظیم اسمزی، دوام سبزینگی و صفات ریشه شناسایی شده است. موتاوا و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از مارکرهای ISSR[3] در ۲۰ واریته گندم ارتباط معنی‌دار بین آن‌ها با ارتفاع و وزن هزاردانه در شرایط عدم تنش و ارتفاع، وزن هزاردانه و تعداد سنبله در متر مربع در شرایط دیم پیدا کردند. پیوستگی نشانگرهای RAPD و ISSR با عملکرد ۲۰ لاین گندم در دو شرایط دیم‌خشکی و عدم تنش خشکی و صفات مورفولوژی توسط خالد و همکاران (۲۰۱۵) با ۱٦ نشانگر ISSR بررسی گردید و دو نشانگر ارتباط معنی‌داری نشان دادند.

در طی دو دهه اخیر نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA به‌طور گسترده‌ای برای اهداف مختلف در گیاهان و جانوران مورد استفاده قرار گرفته‌اند، که یکی از آن‌ها ISSR است که نشانگری نیمه‌تصادفی بوده و به‌عنوان ابزار قدرتمندی جهت تحلیل ژنومی از سال ۱۹۹٤ به‌کار گرفته شده است [۲۹ و ۲۷]. نشانگرهای مورد استفاده در ISSR، به‌گونه‌ای طراحی شده‌اند که دربرگیرنده توالی ریزماهواره و بخش دیگری که به نواحی احاطه‌کننده ریزماهواره‌ها قلاب شده است.

1. MAS or Marker-aided selection

2. Restriction fragment length polymorphism
3. Intet Simple Sequence Repeat

با توجه به مطالب گفته‌شده هدف از اجرای این تحقیق، شناسایی نشانگرهای مرتبط با شاخص‌های تحمل به خشکی مورد نظر در ۲۰ ژنوتیپ گندم نان با استفاده از سیستم نشانگری ISSR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ۲۰ ژنوتیپ گندم نان به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی و ارزیابی ارتباط شاخص‌های تحمل به خشکی با نشانگرهای مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. برای سهولت، ژنوتیپ‌ها از شماره ۲۰-۱ نام‌گذاری شدند. ژنوتیپ‌ها از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند (جدول ۱).

جدول ۱. کد و نام ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

کد ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	کد ژنوتیپ	نام ژنوتیپ
۱	Geravandi-17	۱۱	WC-47359
۲	WC-47536	۱۲	WC-47403
۳	WC-4919	۱۳	WC-47388
٤	WC-4868	١٤	WC-4611
٥	WC-5046	١٥	WC-4515
٦	WC-4995	١٦	پیشتاز
۷	پیشگام۱	۱۷	Moghan-3
۸	WC-4536	۱۸	WC-47472
۹	پیشگام۲	۱۹	WC-4968
۱۰	WC-47582	۲۰	WC-47528

این پژوهش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار، در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ در دو شرایط آبی و دیم در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه‌های گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه اجرا شد. هر کرت شامل چهار خط دو متری به فاصله خطوط ۲۵ سانتی‌متر و تراکم ٤۰۰ بذر در مترمربع بود. اولین بارندگی در آبان‌ماه به‌عنوان تاریخ کاشت در نظر گرفته شد و در شرایط دیم در تمام طول رشد آبیاری انجام نشد. موقعیت جغرافیایی و آب‌وهوایی مزرعه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه مطابق جدول ۲ می‌باشد.

جدول ۲. موقعیت جغرافیایی و آب‌وهوایی محل اجرای آزمایش

طول جغرافیایی	٤۷ درجه و ۹ دقیقه
عرض جغرافیایی	۳٤ درجه و ۲۱ دقیقه
ارتفاع از سطح دریا	۱۳۱۹متر
متوسط بارندگی	٤۸۰-٤٥۰ میلی‌متر
بافت خاک	سیلتی رسی
وضعیت آب‌وهوایی و وضع طبیعی	سرد معتدل، رشته‌کوه‌های زاگرس شمالی
متوسط درجه حرارت چهار سال مورد بررسی	١٤ درجه سانتی‌گراد
میزان بارندگی در سال‌های اجرای آزمایش	۳۳۰/۲٥ میلی‌متر

در این مطالعه برخی از صفات مورفو- فیزیولوژیک در دو شرایط آبی و دیم اندازه‌گیری شدند که شامل ارتفاع، طول پایه سنبله، طول میانگره آخر، طول میانگره ماقبل آخر، تراکم سنبله، سرعت فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، کلروفیل a، b، کل، نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع، پرولین، مالون دی‌آلدئید بودند. به‌منظور غربال صفات بررسی‌شده، همبستگی آن‌ها با عملکرد دانه در دو شرایط آبی و دیم مورد بررسی قرار گرفت. در انتخاب صفات، صفاتی مهم بودند که با عملکرد در شرایط آبی و دیم همبستگی معنی‌داری داشته باشند. همچنین صفاتی نیز که در شرایط دیم با عملکرد همبستگی معنی‌دار داشته ولی در شرایط آبی با عملکرد همبستگی نداشته باشند نیز انتخاب شدند.

صفات دوره پرشدن دانه، طول میانگره ماقبل آخر نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع، ارتفاع، طول طول پایه سنبله، طول میانگره آخر و سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز که با عملکرد در شرایط دیم همبستگی معنی‌دار داشتند، به‌عنوان شاخص‌های تحمل به خشکی انتخاب گردیدند. این ارتباطات نشان‌دهنده اهمیت این صفات درتحمل به خشکی است.

استخراج DNA ژنومی و تجزیه داده‌ها

DNA از گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای حاصل از کشت بذرها با روش CTAB طبق دستورالعملی تغییریافته از دویال و همکاران، ۱۹۸۷ و به‌صورت بالک استخراج شد [۹]. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین و سپس به غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر برای انجام واکنش‌های PCR رقیق‌سازی شد. ۱۸ نشانگر ISSR انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۳). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ترموسایکلر Bio Rad در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR (۱۰X) ۱/۵ میکرولیتر، کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار) ۱/۵ میکرولیتر، مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰ میلی‌مولار) ۰/۳ میکرولیتر، نشانگر ۱/۲ میکرولیتر از هر کدام و آنزیم تک پلیمراز (۵ واحد در میکرولیتر) ۰/۲ میکرولیتر انجام گرفت. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌صورت: ٤ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه و ٤۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه (جهت واسرشت‌سازی)، ۳۰ ثانیه در دماهای اتصال خاص هر نشانگر و ٦۰ ثانیه در ۷۲ درجه (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه به‌مدت ۷ دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE نیم درصد استفاده شد و برای رنگ‌آمیزی میزان ۷ میکرولیتر ماده safe view به‌کار برده شد.

جدول ۳. نشانگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی

شماره نشانگر	کد نشانگر	توالی نشانگر
P_1	is_3	5' GAGAGAGAGAGAGAGAYC 3'
P_2	is_5	5' AG AG AG AG AG AG AG AGC 3'
P_3	is_9	5' CTCTCTCTCTCTCTCTG 3'
P_4	is_{10}	5' GAGAGAGAGAGAGAGARC 3'
P_5	is_{11}	5' ACACACACACACACACC 3'
P_6	is_{13}	5' AGAGAGAGAGAGAGAGYT 3'
P_7	is_{14}	5' GACAGACAGACAGACA 3'
P_8	is_{15}	5' GGATGGATGGATGGAT 3'
P_9	is_{16}	5'DBDACACACACACACACA3'
P_{10}	is_6	5'-CACACACACACACACAG -3'
P_{11}	is_7	5'DBDACACACACACACACA3'
P_{12}	UBC-807	5'AGA GAG AGA GAG AGA GT3'
P_{13}	UBC-844	5'CTC TCT CTC TCT CTC TRC3'
P_{14}	UBC-848	5'CAC ACA CAC ACA CAC ARG3'
P_{15}	UBC- 857	5'ACA CAC ACA CAC ACA CYG3'
P_{16}	UBC-864	5'ATG ATG ATG ATG ATG ATG3'
P_{17}	UBC-867	5'GGC GGC GGC GGC GGC GGC3'
P_{18}	UBC-869	5'GTT GTT GTT GTT GTT GTT3'

داده‌های مولکولی بر اساس وجود و عدم وجود باند به‌ترتیب به‌صورت یک و صفر کدگذاری گردید. به‌منظور بررسی میزان چندشکلی نشانگرها از پارامترهایی مانند محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص نشانگر، درصد چندشکلی و قدرت تفکیک استفاده شد. میزان اطلاعات چندشکل نشانگرها با استفاده از فرمول $PIC = 1- \sum_{i=1}^{n} P_i^2$ محاسبه گردید. به‌طوری‌که Pi فراوانی آلل iام و n تعداد آلل‌ها می‌باشد. برای بررسی ارتباط نشانگر ISSR و آماره‌های پایداری ابتدا ساختار جمعیت بررسی و سپس تجزیه ارتباط انجام شد.

به‌منظور تعیین ساختار جمعیت، از نرم‌افزار STRUCTURE استفاده گردید [۲۱]. رابطه بین نشانگرهای ISSR و شاخص‌های تحمل به خشکی با استفاده از رگرسیون چندگانه گام به گام، با استفاده از نرم‌افزار SPSS بررسی شد. بدین ترتیب، هر صفت کمی به‌عنوان متغیرهای وابسته و نشانگرهای ISSR به‌عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. برای بررسی اختلاف بین گونه‌های مورد بررسی با استفاده از نشانگر

ملکولی ISSR تجزیه واریانس مولکولی توسط نرم‌افزار GenAlEx انجام گرفت. در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آماری Darwin تجزیه کلاستر به‌روش UPGMA و تجزیه به مختصات اصلی انجام شد.

نتایج و بحث

از DNA کل استخراج شده به میزان ۱۰ میکرولیتر در ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز گردید و باندهای ظاهرشده مورد بررسی قرار گرفت. باندهای قوی‌تر و واضح‌تر نشان‌دهنده DNA با کیفیت بالا بود. در این آزمایش تعداد ۱۸ نشانگر ISSR استفاده شد و با آن‌ها در همه ژنوتیپ‌ها تکثیر انجام شد که نتایج آن به‌طور خلاصه در جدول ۳ آورده شده است. تعداد کل نوارها ۹۲ نوار بود، که ۸۸ نوار چند شکل بودند و درصد چندشکلی کل ۹٤/۷۵ برآورد گردید. درصد چندشکلی به‌دست‌آمده مطابق با بررسی کاروالهو و همکاران (۲۰۰۵) بود که بالاترین چندشکلی را در حدود ۹۸/۵ درصد با استفاده از ۱۸ نشانگر ISSR به‌دست آورد. همه نشانگرهای به جز is5، is14، is16 وis7 دارای صد درصد چندشکلی بودند. کمترین میزان چندشکلی (٦٦/٦٦ درصد) نیز به نشانگر is7 تعلق داشت. به‌منظور بررسی میزان چندشکلی نشانگرها از پارامتر محتوای اطلاعات چندشکلی استفاده شد. بیشترین شاخص محتوای چندشکلی مربوط به نشانگرهای UBC-857، UBC-864، UBC-867 و is9 و کمترین آن مربوط به نشانگر is7 بود. به‌منظور بررسی میزان چندشکلی نشانگرها از پارامترهایی مانند محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص نشانگر، درصد چندشکلی و قدرت تفکیک استفاده شد (جدول ۳). بیشترین شاخص محتوای چندشکلی مربوط به نشانگرهای UBC-857، UBC-864، UBC-867 و is9 و کمترین آن مربوط به نشانگر is7 بود. در بین شاخص‌های مولکولی مورد بررسی، بیشترین شاخص نشانگر متعلق به نشانگرهای is9، is11، UBC-867وis7 با کمترین مقدار بود. نجفی (۲۰۱۲) مقادیر شاخص نشانگر را از ۰/٤۱ تا ۳/۳٦ برآورد کرد. بیشترین شاخص نسبت چندشکلی مؤثر (EMR) مربوط به نشانگرهای UBC-867 و is9 (۸) و کمترین متعلق به نشانگر is3 (۲) بود. بیشترین شاخص قدرت تفکیک (RP) مربوط به نشانگر BC-867 (۹/۷) و کمترین مربوط به is7 (۱/۵) بود.

نشانگر UBC-867 با صد درصد چند شکلی و مقدار بالای شاخص‌های محتوای چندشکلی، شاخص نشانگر، درصد چندشکلی و قدرت تفکیک و با توجه به تکثیر بالای باندها و تولید نوارهای چندشکلی، بالا به‌عنوان مناسب‌ترین نشانگر برای بررسی تحمل به خشکی در گندم در مطالعات بعدی معرفی شد. نشانگر UBC-867 بهتر از نشانگرهای دیگر می‌تواند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص و آن‌ها را از هم متمایز کند. همچنین تعداد زیاد مکان‌های تکثیرشده در این آزمایش نشان می‌دهد که تعداد کمی از نشانگرهای ISSR با میزان اطلاعات چندشکل بالا، می‌تواند تعداد زیادی نمونه و جمعیت‌های مختلف نمونه را تفکیک کند. قبلاً نیز تحقیقات مختلفی کارایی بالای نشانگرهای ISSR را در مطالعات مرتبط با تعیین تنوع ژنتیکی و روابط تکاملی در گونه‌های گیاهی مختلف نشان داده است [۱۸، ۱٤ و ۵]. نجفی و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تنوع ژنتیکی ۳۰ لاین و رقم گندم بااستفاده از نشانگر ISSR، بازه تغییرات این شاخص را ۰/۱۳ تا ۰/٤۲ اعلام گردید.

در تجزیه واریانس مولکولی میزان واریانس بین گروهی ۸٦ درصد و واریانس درون گروهی نیز ۱٤ درصد برآورد گردید (جدول ٤). در این تجزیه، اختلاف بین گروه‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دارشد. که نشان‌دهنده این امر بود که تفاوت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گندم نان براساس گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای تا حدودی به‌وسیله تنوع نوارهای نشانگر ISSR قابل توجیه بود.

جدول ۳. آماره‌های چند شکلی حاصل از بررسی ۲۰ ژنوتیپ گندم با استفاده از نشانگر ISSR

نام نشانگر	تعداد کل نوارها	تعداد نوار چند شکل	درصد چند شکلی	محتوای چندشکلی	شاخص نشانگر	نسبت چند شکلی مؤثر	قدرت تفکیک
is6	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۲	۲/۲۷	۷	۸/۸
is5	۹	۸	۸۸/۸۸	۰/۳٤	۲/۳۹	۷/۱۱	۹/٦
UBC-869	٤	٤	۱۰۰	۰/۳۳	۱/۳۱	٤	۲/۸
is3	۲	۲	۱۰۰	۰/۲۹	۰/۵۸	۲	۲/۱
UBC-867	۸	۸	۱۰۰	۰/٤۱	۳/۲۹	۸	۹/۷
UBC-848	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۵	۰/۷٦	۳	٤/۹
UBC-857	۳	۳	۱۰۰	۰/٤٦	۱/۳۸	۳	۳
UBC-864	۳	۳	۱۰۰	۰/٤٦	۱/۳۷	۳	۲/٤
is14	٤	۳	۷۵	۰/۳۱	۰/٦۹	۲/۲۵	۱/۸
is15	٦	٦	۱۰۰	۰/۳۷	۲/۲٤	٦	۷/٦
is10	۵	۵	۱۰۰	۰/۲۷	۱/۳۳	۵	۳/۳۳
is13	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۵	۰/۷٦	۳	٤/۹
is11	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/٤۵	٤/۵۳	۱۰	۸/۸
is7	۳	۲	٦٦/٦٦	۰/۲۱	۰/۲۸	۱/۳۳	۱/۵
is9	۸	۸	۱۰۰	۰/٤٦	۳/۷۱	۸	۸
is16	٤	۳	۷۵	۰/۲٦	۰/۵۹	۲/۲۵	۳/۱
UBC-807	۳	۳	۱۰۰	۰/٤۱	۱/۲٤	۳	۲/۹
UBC-844	۷	۷	۱۰۰	۰/٤۲	۲/۹٦	۷	۸/۵

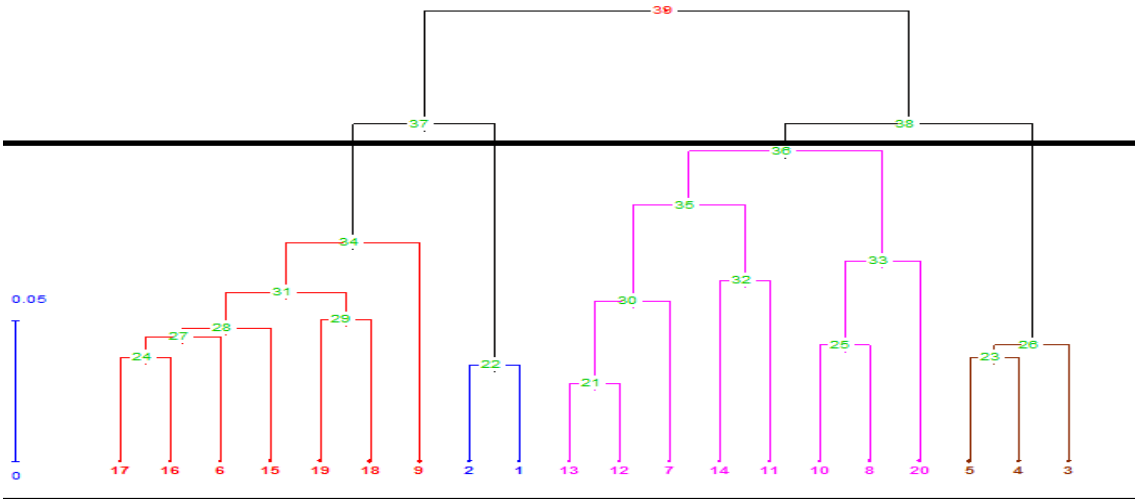
جدول ٤. تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر ISSR

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس کل	phipt
بین گروه‌ها	۳	۸۳/۷	۲۷/۹	٪۱٤	۰/۱۳۵**
داخل گروه‌ها	۱٦	۲٦۰/۵	۱٦/۲	٪۸٦	
کل	۱۹	۳٤٤/۳		٪۱۰۰	

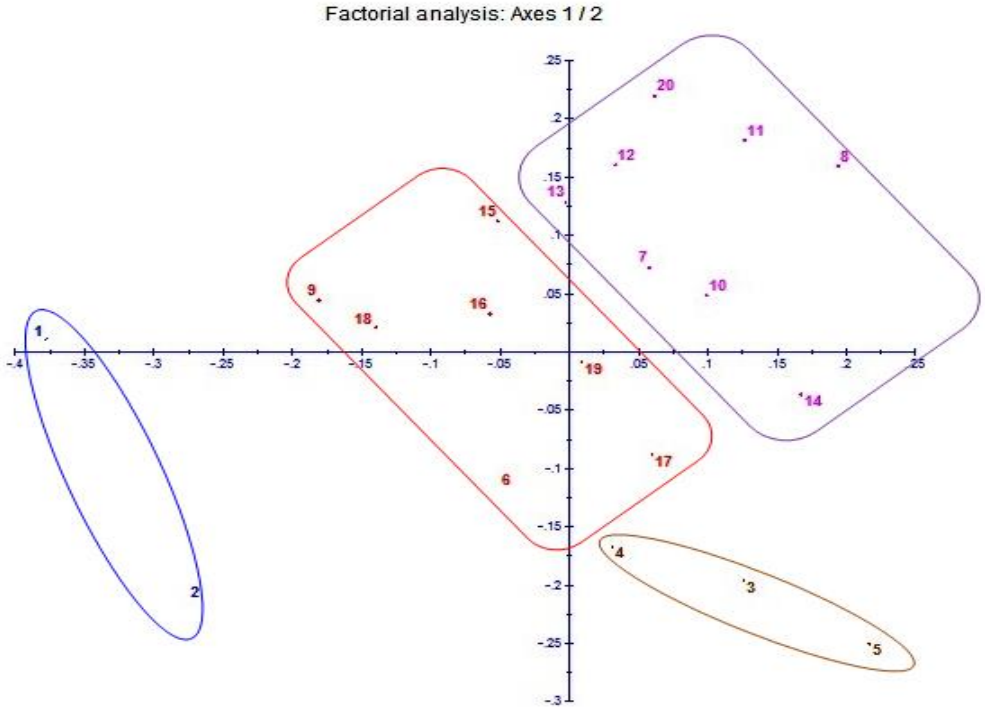
**: معنی دار در سطح احتمال یک درصد.

از مقایسه نتایج حاصل از روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای و ضرایب تشابه مختلف، در نهایت تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA بر مبنای ضریب تشابه دایس به‌دلیل ارائه دندرگرام مناسب (عدم وجود زنجیره‌ای شدن)، همبستگی کوفنیتک بالاتر و به‌خصوص گروه‌بندی مناسب و مطابق با صفات مختلف مورد بررسی، انتخاب شد که منجر به طبقه‌بندی ۲۰ ژنوتیپ گندم در چهار گروه متفاوت گردید، به‌طوری‌که گروه‌های تشکیل‌شده به‌ترتیب شامل ۳، ۲، ۷ و ۸ رقم بودند (شکل ۱). ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس تشابه (ماتریس ورودی) حاصل از ضریب دایس و ماتریس خروجی حاصل از دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ۰/۸۷ بود. مقدار بالای ضریب همبستگی کوفنتیک نشان داد که تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه دایس براساس داده‌های به‌دست‌آمده از نشانگر ISSR در گروه‌بندی

ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی بسیار مناسب بود. نتایج حاصل از گروه‌بندی نشان داد که گروه اول شامل ژنوتیپ‌های ۱ ،٦،٧ ،١٥، ١٩، ١٨، ١٦ و ٩، گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های شماره ۲ و ۱، گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های ۱۳، ۱۲، ۷، ١٤، ١١، ١٠، ٨ و ٢٠ و گروه چهارم شامل ٣، ٤ و ٥ بود. نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر ISSR نیز نتایج حاصل از تجزیه کلاستر را تأیید نمود و ژنوتیپ‌ها در چهار گروه قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۱. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه بر اساس نشانگر مولکولی ISSR



شکل ۲. نمودار پراکنش دو بعدی ۲۰ ژنوتیپ گندم نان بر اساس ضریب تشابه دایس

با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE ساختار جمعیت ۲۰ ژنوتیپ گندم نان بررسی شد (جدول ۵) و داده‌های مولکولی ۵ زیر جمعیت تعریف شد که در بین K=1 تا K=5 زیر جمعیت، K=1 که انحراف معیار کمتر و متوسط لگاریتم درست‌نمایی کمتری داشت انتخاب شد تا اثر ساختار جمعیت جدا شده و موجب مشاهده روابط دروغین بین داده‌های فنوتیپی و مولکولی نشود و ارتباط بین نشانگر و صفات مورد بررسی واقعی نباشد زیرا این ارتباط ناشی از اثر ساختار جمعیت است. بنابراین قبل از تجزیه، پریچارد و همکاران (۲۰۰۰) پیشنهاد کردند که افراد جمعیت به زیرجمعیت‌هایی بر اساس الگوریتم تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر مدل تقسیم و سپس تجزیه‌ها در هر زیر جمعیت انجام شود. علت اصلی اثر ساختار جمعیت، آمیزش‌های غیرتصادفی بین گروه‌ها در یک جمعیت است که منجر به جدایی فیزیکی و تغییر فراوانی‌های آللی در هر گروه می‌شود.

جدول ۵. متوسط لگاریتم احتمال درست نمایی بر اساس نرم‌افزار STRUCTURE

تعداد زیر گروه	متوسط لگاریتم درست‌نمایی	انحراف معیار
۱	۱۰۶۳/۳	۱/۸۲
۲	۱۱۷۹/۹	۲۸
۳	۱۲٤٥	۳۲/۳
٤	۱۲٤۹/٤	۱٤/٥
٥	۱۲٦۲/۰۲	۳۳/٦

تجزیه رگرسیون چندگانه گام به گام

نتایج تجزیه ارتباط ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگر ISSR و شاخص‌های تحمل به خشکی با استفاده از تجزیه رگرسیون چندگانه گام به گام برای شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل تحمل به خشکی در گندم با در نظر گرفتن مکان‌های نشانگری به‌عنوان متغیرهای مستقل و شاخص‌های تحمل به خشکی به‌عنوان متغیرهای وابسته در جدول درج شده است. نتایج نشان داد که بین شاخص‌های تحمل به خشکی با آغازگرهای نشانگر ISSR رابطه وجود دارد. اگرچه نقشه‌یابی بر پایه مکان‌های صفات کمی (QTL) برای ردیابی ژن‌های وابسته به صفات مناسب می‌باشد اما این عمل وقت‌گیر و پر زحمت می‌باشد [۱٤]. برای غلبه بر این محدودیت‌ها، شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت از طریق رگرسیون مناسب به‌نظر می‌رسد. آنالیز رگرسیونی چندگانه ضریب تبیین R^2 را تعیین می‌کند که این ضریب میزان رابطه صفت را با نشانگر مولکولی نشان می‌دهد [۱۲].

ارتفاع گیاه در دو شرایط آبی و دیم

چهار مکان تکثیرشده توسط نشانگرهای ISSR با ارتفاع گیاه در شرایط آبی ارتباط معنی‌دار داشتند (جدول ٦) و بیشترین تأثیر معنی‌دار مربوط به is5 بود (R^2=٪۷۳). در شرایط دیم هفت مکان با ارتفاع گیاه همبستگی نشان داد که ۹۰ درصد از تغییرات ارتفاع را توضیح دادند. مکان تکثیری is11 در هر دو شرایط پایدار و تکرارپذیر بودند.

طول میانگره آخر در دو شرایط آبی و دیم

رابطه معنی‌داری بین طول میانگره آخر و چهار مکان تکثیرشده توسط آغازگرهای نشانگر ISSR در شرایط آبی مشاهده شد (جدول ۷) که این مکان‌ها توانستند ۷۰ درصد تغییرات مربوط به طول میانگره آخر را توجیه نمایند. بیشترین تأثیر مثبت و معنی‌دار مربوط به مکان is5 بود. در شرایط دیم شش مکان تکثیری با این صفت رابطه داشت (R^2=٪۸٥). مکان is3 در هر دو شرایط تکرارپذیر بود.

نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع در دو شرایط آبی و دیم

ارتباط معنی‌داری بین نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع و

پنج مکان تکثیرشده توسط آغازگرهای نشانگر ISSR در شرایط آبی مشاهده شد (جدول ۸) که این مکان‌ها توانستند ۸۷ درصد تغییرات مربوط به نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع را توجیه نمایند. در شرایط دیم سه مکان تکثیری با این صفت رابطه داشت (R^2=٪۵۳). مکان UBC-867 در هر دو شرایط تکرارپذیر بود.

طول میانگره ماقبل آخر در دو شرایط آبی و دیم

در شرایط دیم دو مکان (R^2=٪۴۲) و در شرایط آبی پنج مکان (R^2=٪۹۰) تکثیر شده توسط آغازگرهای نشانگر ISSR با طول میانگره ماقبل آخر رابطه داشتند و مکان پایداری در دو شرایط وجود نداشت (جدول ۹).

طول پایه سنبله در دو شرایط آبی و دیم

ارتباط معنی‌داری بین طول پایه سنبله و پنج مکان تکثیرشده توسط آغازگرهای نشانگر ISSR در شرایط آبی مشاهده شد (جدول ۱۰) که این مکان‌ها توانستند ۸۸ درصد تغییرات مربوط به طول پایه سنبله را توجیه نمایند. در شرایط دیم ٦ مکان‌تکثیری با این صفت‌رابطه داشت (R^2=٪۸۰). مکان‌های is11 و UBC-869 در هر دو شرایط تکرارپذیر بودند.

جدول ٦. نتایج رگرسیون گام به گام بین ارتفاع بوته در شرایط آبی و دیم و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه

شرایط	نام نشانگر	ضریب رگرسیون	سطح معنی‌داری	R^2 changed	R^2 تصحیح شده
آبی	٥is	۰/٤۲	۰/۰۰۰	۰/۳	۰/۳۳
	١٥is	۰/٥٦	۰/۰۰۰	۰/١٧	۰/٤٨
	١١is	۰/۳٨	۰/۰۰۰	۰/١٥	۰/٦٤
	۳is	۰/۳۲	۰/۰۲	۰/۰۹	۰/۷۳
دیم	۹is	−۰/٥	۰/۰۰۰	۰/۲٦	۰/۲۲
	٤٤UBC-8	۰/۸	۰/۰۰۰	۰/١٦	۰/۳٦
	۳is	−۰/٥	۰/۰۰۰	۰/١٦	۰/٥۲
	٦٧UBC-8	−۰/٤	۰/۰۰۰	۰/١٦	۰/٦۹
	١۰is	۰/۳	۰/۰۰۰	۰/۰۸	۰/۷۹
	۹is	−۰/۲	۰/۰۰۰	۰/۰٥	۰/۸٥
	١١is	−۰/۲	۰/۰۰۰	۰/۰٤	۰/۹١

جدول ۷. نتایج رگرسیون گام به گام بین طول میانگره آخر در شرایط آبی و دیم و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه

شرایط	نام نشانگر	ضریب رگرسیون	سطح معنی‌داری	R^2 changed	R^2تصحیح شده
آبی	٥is	۰/٤۲	۰/۰۰۰	۰/۳۷	۰/۳
	١٥is	۰/٥٦	۰/۰۰۰	۰/١٧	۰/٤
	١١is	۰/۳٨	۰/۰۰۰	۰/١٥	۰/٦
	۳is	۰/۳۲	۰/۰۲	۰/۰۹	۰/۷
دیم	۹is	−۰/٥	۰/۰۰۰	۰/۲٦	۰/۲۲
	٤٤UBC-8	۰/۸	۰/۰۰۰	۰/١٦	۰/۳٦
	۳is	−۰/٥	۰/۰۰۰	۰/١٦	۰/٥۲
	٦٧UBC-8	−۰/٤	۰/۰۰۰	۰/١٦	۰/٦۹
	١۰is	۰/۳	۰/۰۰۰	۰/۰۸	۰/۷۹
	۹is	−۰/۲	۰/۰۱۰	۰/۰٥	۰/۸٥

جدول ۸. نتایج رگرسیون گام به گام بین نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع در شرایط آبی و دیم و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه

شرایط	نام نشانگر	ضریب رگرسیون	سطح معنی‌داری	R^2 changed	R^2 تصحیح شده
آبی	۱۱is	−۰/۵	۰/۰۰۰	۰/۳	۰/۲
	۱۵is	−۰/۸	۰/۰۰۰	۰/۲	۰/٤
	۱۱is	−۰/۵	۰/۰۰۰	۰/۱۹	۰/٦
	۷UBC-86	−۰/۵	۰/۰۰۰	۰/۱٤	۰/۸۱
	۵is	۰/۲	۰/۰۰۰	۰/۰۵	۰/۸۷
دیم	۷UBC-86	−۰/۷	۰/۰۰۰	۰/۲٦	۰/۲۲
	۱٦is	۰/۵	۰/۰۰۰	۰/۱۵	۰/۳۵
	٤86 UBC	−۰/٤	۰/۰۱	۰/۱۸	۰/۵۳

جدول ۹. نتایج رگرسیون گام به گام بین طول میانگره ماقبل آخر در شرایط آبی و دیم و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه

شرایط	نام نشانگر	ضریب رگرسیون	سطح معنی‌داری	R^2 changed	R^2 تصحیح شده
آبی	۵is	۰/٦	۰/۰۰۰	۰/۳	۰/۲
	۱٤is	−۰/۷	۰/۰۰۰	۰/۲	۰/۵
	٤۸UBC-8	۰/۳	۰/۰۰۰	۰/۱۷	۰/۷
	۵is	۰/۳	۰/۰۰۰	۰/۰۸	۰/۸
	۱۰is	۰/۲	۰/۰۰۰	۰/۰٤	۰/۹
دیم	۱۱is	−۰/٦۹	۰/۰۰۰	۰/۲۵	۰/۲۱
	۹is	۰/۵۲	۰/۰۱	۰/۲۳	۰/٤۲

دوره پر شدن دانه در دو شرایط آبی و دیم

همبستگی معنی‌دار بین دو مکان تکثیرشده توسط آغازگرهای نشانگر ISSR و دوره پر شدن دانه در شرایط آبی وجود داشت. ۷۰ درصد تغییرات مربوط به دوره پر شدن دانه در شرایط آبی توسط این مکان‌ها توضیح داده شد و بیشترین اثر مثبت مربوط به مکان is6 بود (جدول ۱۱) که باعث افزایش این صفت می‌شود. در شرایط دیم نیز دو مکان مرتبط بود و ٤٦ درصد تغییرات را توجیه کرد. بیشترین تأثیر مثبت و معنی‌دار مربوط به مکان is9 بود.

سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو شرایط آبی و دیم

چهار مکان تکثیرشده توسط نشانگرهای ISSR با آنزیم پراکسیداز در شرایط آبی ارتباط معنی‌دار داشتند (جدول۱۲) (R^2=٪۸۰). در شرایط دیم پنج مکان با آنزیم پراکسیداز همبستگی نشان داد که ۸۱ درصد از تغییرات آنزیم پراکسیداز را توضیح دادند.

عملکرد در دو شرایط آبی و دیم

هشت مکان تکثیری با استفاده از نشانگرهای ISSR با عملکرد در شرایط آبی پیوستگی نشان داد و بیشترین تأثیر مربوط به مکان UBC-869 بود (R^2=٪۹۸). در شرایط دیم سه مکان تکثیری با عملکرد ارتباط داشتند که توانستند ۷۰ درصد از تغییرات مربوط به آن را توجیه کنند (جدول ۱۳).

مکان is11 با صفات طول میانگره آخر، ارتفاع، نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع، طول میانگره ماقبل آخر، سرعت

فعالیت آنزیم پراکسیداز و دوره پر شدن دانه، عملکرد دانه در هر دو شرایط آبی و دیم رابطه داشت. مکان is7 با سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز و عملکرد در شرایط دیم ارتباط نشان داد. مکان UBC-869 با صفت طول پایه سنبله و عملکرد در شرایط آبی رابطه داشت. مکان UBC-867 با صفات نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع، ارتفاع، طول پایه سنبله، طول میانگره آخر، عملکرد در شرایط آبی و سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز ارتباط نشان داد. is16 نیز با نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع، عملکرد در هر دو شرایط آبی و دیم و سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز رابطه داشت. is9 با طول میانگره ما قبل آخر، ارتفاع، طول پایه سنبله، طول میانگره آخر، سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز و دوره پر شدن دانه رابطه نشان داد. is3 با ارتفاع و طول میانگره آخر ارتباط داشت. مکان is15 با ارتفاع، طول پایه سنبله، طول میانگره آخر، عملکرد در شرایط آبی، سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز و نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع رابطه داشت. مکان is5 نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع، طول میانگره آخر، سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز و طول میانگره ماقبل آخر همبستگی نشان داد. مکان is10 با ارتفاع و طول میانگره ماقبل آخر رابطه داشت. مکان UBC-844 با ارتفاع، طول پایه سنبله، طول میانگره آخر و سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز ارتباط داشت. در مجموع مکان‌های is9 و is11 تکثیرشده توسط آغازگرهای نشانگر ISSR با اکثر صفات مورد بررسی ارتباط داشتند.

جدول ۱۰. نتایج رگرسیون گام به گام بین طول پایه سنبله در شرایط آبی و دیم و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه

شرایط	نام نشانگر	ضریب رگرسیون	سطح معنی‌داری	R^2 changed	R^2 تصحیح شده
آبی	٦٩UBC-8	-۰/۳	۰/۰۰۰	۰/٤٥	۰/٤۲
	٦۷UBC-8	-۰/٤	۰/۰۰۰	۰/۱۷	۰/٥۸
	۱۳is	-۰/٥	۰/۰۰۰	۰/۱۰	۰/٦۸
	٤٤UBC-8	۰/٤	۰/۰۰۰	۰/۰۹	۰/۷۸
	۰۷UBC-8	۰/۳	۰/۰۰۰	۰/۰۸	۰/۸۸
دیم	۰۷UBC-8	۰/۷	۰/۰۰۰	۰/۳٥	۰/۳
	۹is	-۰/۷	۰/۰۰۰	۰/۱٦	۰/٤
	٦۹UBC-8	-۰/۳	۰/۰۰۰	۰/۱۷	۰/٦
	٦٤UBC-8	-۰/٤	۰/۰۰۰	۰/۱۱	۰/۷
	۱٥is	-۰/۳	۰/۰۰۰	۰/۰٦	۰/۸
	۱۳is	-۰/۲	۰/۰۱۹	۰/۰٤	۰/۸

جدول ۱۱. نتایج رگرسیون گام به گام بین دوره پر شدن دانه در شرایط آبی و دیم و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه

شرایط	نام نشانگر	ضریب رگرسیون	سطح معنی‌داری	R^2 changed	R^2 تصحیح شده
آبی	٦is	۰/۷	۰/۰۰۰	۰/٥۳	۰/٥۱
	۱۱is	-۰/٤	۰/۰۰۰	۰/۱۹	۰/۷
دیم	۹is	۰/٤٥	۰/۰۱	۰/۳۳	۰/۳
	۱۳is	۰/٤٤	۰/۰۲	۰/۱۷	۰/٤٦

جدول ۱۲. نتایج رگرسیون گام به گام بین سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط آبی و دیم و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه

شرایط	نام نشانگر	ضریب رگرسیون	سطح معنی‌داری	R^2 changed	R^2 تصحیح‌شده
آبی	٥is	-٠/٥	٠/٠٠٠	٠/٥٢	٠/٥
	١٦is	-٠/٤	٠/٠٠٠	٠/١٧	٠/٦
	٧is	-٠/٣	٠/٠٠٠	٠/٠٧	٠/٧
	٩is	٠/٢	٠/٠٢	٠/٠٧	٠/٨
دیم	٤٨UBC-8	-٠/٦	٠/٠٠٠	٠/٢٧	٠/٢٣
	١١is	-٠/٥	٠/٠٠٠	٠/٣٢	٠/٥٥
	١٥is	-٠/٤	٠/٠٠٠	٠/١٠	٠/٦٤
	٤٤UBC-8	-٠/٣	٠/٠٠٠	٠/١٠	٠/٧٥
	٦٧UBC-8	-٠/٢	٠/٠٢	٠/٠٥	٠/٨١

جدول ۱۳. نتایج رگرسیون گام به گام بین عملکرد دانه در شرایط آبی و دیم و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه

شرایط	نام نشانگر	ضریب رگرسیون	سطح معنی‌داری	R^2 changed	R^2 تصحیح‌شده
آبی	UBC-869	٠/٨٢٠	٠/٠٠٠	٠/٤٤٤	٠/٤١٣
	is11	-٠/٣٧١	٠/٠٠٠	٠/١٦٣	٠/٥٦٠
	is15	-٠/٥١٩	٠/٠٠٠	٠/١١٢	٠/٦٦٥
	UBC-867	٠/٤٥١	٠/٠٠٠	٠/١٥٠	٠/٨٣٣
	UBC-848	-٠/٤٢٧	٠/٠٠٠	٠/٠٤٢	٠/٨٧٧
	UBC-869	-٠/٢٥٩	٠/٠٠١	٠/٠٣٢	٠/٩١٤
	is16	٠/٢٠٤	٠/٠١٣	٠/٠١٩	٠/٩٣٨
	UBC-869	٠/١٤٣	٠/٠٢٣	٠/٠١٥	٠/٩٥٩
دیم	is11	-٠/٧١٣	٠/٠٠٠	٠/٤١٤	٠/٣٨١
	is16	٠/٦٤٤	٠/٠٠٠	٠/١٤١	٠/٥٠٢
	is7	-٠/٥٢٤	٠/٠٠٢	٠/٢٠	٠/٧٠٩

اکثر نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق بر روی صفات مورد مطالعه مؤثر بودند، محل قرارگیری این نشانگرها در داخل ژنوم احتمالاً مناطقی از ژنوم می‌باشد که کدکننده ژن‌های مربوط به صفات مورد نظر می‌باشد [۲۸]. بعد از شناسایی نشانگرهای مولکولی که با صفات مرتبط با تحمل به خشکی در ارتباطند می‌توان از آن‌ها به‌عنوان معیارهای گزینش برای تحمل به خشکی استفاده کرد. با هر صفت چندین نشانگر همبستگی نشان دادند که نشانگری که بالاترین R^2 changed و ضریب رگرسیون را داشته به‌عنوان مؤثرترین نشانگر در کد کردن آن صفت محسوب می‌شود [۱۵]. دوره پر شدن دانه در شرایط آبی is6 و در شرایط دیم is9، طول پایه سنبله در شرایط آبی

UBC-869 و در شرایط دیم UBC-807، طول میانگره آخر در شرایط آبی is5 و در شرایط دیم UBC-844، ارتفاع در شرایط آبی is15 و در شرایط دیم UBC-844، طول میانگره ماقبل آخر در شرایط آبی is14 و در شرایط دیم is11، نسبت طول میانگره آخر به ارتفاع در شرایط آبی is15 و در شرایط دیم UBC-867، برای عملکرد در شرایط آبی UBC-869 و عملکرد در شرایط دیم is16 و برای میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط آبی is5 و در شرایط دیم UBC-848 مؤثرترین نشانگر محسوب شدند. توالی‌یابی نشانگرهای دارای R^2 بالا و مقایسه آن‌ها با توالیهای موجود در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر و همسانه‌سازی ژن بر اساس نقشه می‌افزاید. مکان‌های تکثیری توسط نشانگرهای UBC-867، is5، is9، is11 و is15 با بیشترین تعداد صفت مرتبط هستند. نشانگر is11 در هر دو شرایط آبی و دیم برای صفت عملکرد دانه تکرار شد.

موتاوا و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از مارکرهای ISSR در ۲۰ واریته گندم ارتباط معنی‌دار بین آن‌ها با ارتفاع و وزن هزاردانه در شرایط عدم تنش و ارتفاع، وزن هزار دانه و تعداد سنبله در مترمربع در شرایط تنش خشکی پیدا کردند. پیوستگی نشانگرهای RAPD و ISSR با عملکرد ۲۰ لاین گندم در دو شرایط بدون تنش و تنش و صفات مورفولوژی توسط خالد و همکاران (۲۰۱۵) با ۱٦ نشانگر ISSR بررسی گردید و دو نشانگر ارتباط معنی‌داری نشان دادند. نشانگرهای پیوسته توانستند ۱۸/۹ تا ۳٤/۹ درصد از تغییرات کل مربوط به صفات مورد بررسی را توجیه نمایند. اینوستروزا و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از نشانگر SSR نشان دادند که ۲۱ مکان کروموزومی با عملکرد دانه،ارتفاع گیاه و پایداری عملکرد در هشت لاین جایگزینی جو به میزان بالایی ارتباط دارند. وانگ و همکاران (۲۰۱٤) برای ارزیابی پایداری واریته‌های گندم به جای استفاده از مشاهدات مورفولوژی از مارکرهای SSR استفاده نمودند. به‌منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک در جمعیت‌های یونجه زراعی، عبدالهی مندولکانی و عزیزی (۱۳۹۳) از نشانگرهای ISSR استفاده کردند. عبدالهی مندولکانی و همکاران (۱۳۸۹) برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک در بادام زمینی از تجزیه ارتباط با استفاده از نشانگرهای SSR استفاده نمودند و بیان کردند که این روش برای شناسایی مکان‌های مرتبط با صفات مورفولوژیک مفید و مطمئن بوده و نشانگرهای مؤثر حاصل از این مطالعات می‌تواند در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر و تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی استفاده شوند [۵]. به‌منظور بررسی رابطه بین نشانگرهای مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و نشانگرهای مولکولی AFLP در گیاه ماریتیغال، شکرپور و همکاران (۱۳۸۷)، ۳۲ اکوتیپ جمع‌آوری‌شده از نواحی مختلف کشور به‌همراه دو رقم خارجی اکالازی و CN seeds را ارزیابی کردند. بیش از ٤۰ درصد تغییرات مربوط به وزن هزاردانه، ارتفاع بوته و تاریخ گلدهی توسط نشانگرهای شناسایی شده توجیه گردید [۳].

جمع‌بندی نتایج

تجزیه رگرسیونی چندمتغیره یک روش مناسب و سریع برای یافتن رابطه بین صفات و نشانگرها می‌باشد. مزایای بارز این آنالیز این است که این روش می‌تواند مکان‌های صفات کمی (QLT) را ردیابی کند، همچنین نیاز به زمان و هزینه کمتری داشته [۲٦] و به تشکیل جمعیت جهت نقشه‌یابی نیاز ندارد. انتخاب نتاج برتر از نظر صفات مهم، کاری دشوار می‌باشد اما با شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت می‌توان نتایج برتر را در مراحل اولیه رشد آن‌ها شناسایی کرد [۲۸]. برخی از نشانگرها با بیش از یک

صفت ارتباط نشان دادند که ارتباط یک نشانگر با بیش از یک صفت می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی QTLهای مرتبط با هم در صفات مختلف باشد [۲۰ و ۸]. اما برای آگاهی بیشتر از این رابطه، ایجاد یک جمعیت در حال تفرق و نقشه‌یابی لینکاژی آن می‌تواند مفید باشد [۹]. اثر پلیوتروپیک زمانی رخ می‌دهد که یک ژن بتواند به‌طور هم‌زمان در بروز چندین صفت تأثیر داشته باشد همچنین QTLهای مرتبط با همدیگر که صفات مختلف را کنترل می‌کنند نیز می‌توانند منجر به ایجاد یک نشانگر واحد شوند که با بیش از یک صفت همبستگی داشته باشد [۱۸]. بین این صفات نیز همبستگی مثبت وجود دارد و کاهش یا افزایش در هر کدام می‌تواند باعث کاهش یا افزایش دیگری می‌شود [۱۹].

نتایج مطالعه حاضر و تحقیقات ذکرشده نشان می‌دهد که چنانچه از نشانگرهای بیشتری استفاده شود می‌توان به شناسایی نشانگرهایی که دارای همبستگی بالا با صفات باشند، امید داشت و از آن‌ها در پژوهش‌های دیگر استفاده نمود. البته لازم است نشانگرهای شناسایی‌شده در جمعیت‌های بزرگ و همچنین در جمعیت‌های در حال تفرق مورد آزمون قرار گیرد تا از پیوستگی آن‌ها با صفات مربوطه اطمینان به‌عمل آید و به این ترتیب کارایی استفاده از این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی افزایش یابد.

اکثر نشانگرهای تولیدی توسط نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق بر روی شاخص‌های تحمل به خشکی مورد مطالعه مؤثر بودند بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نشانگرهای مرتبط شناسایی‌شده می‌توانند راهنمای خوبی برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در گندم نان باشند و احتمال دارد بتوان از این نشانگرهای ISSR در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر بخصوص وقتی که اطلاعاتی از پایه ژنتیکی آن‌ها مانند نقشه لینکاژی در دسترس نیست استفاده کرد. در برنامه‌های اصلاحی تعیین ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی معمولاً وقت و هزینه زیادی می‌طلبد. همچنین، این نشانگرها می‌توانند در انتخاب والدین مناسب برای تولید جمعیت جهت نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید به‌کار روند.

قطعات DNA چندشکل شناسایی‌شده به‌عنوان نشانگر مرتبط با صفت مورد مطالعه که دارای ضریب تبیین بالایی هستند را نیز، می‌توان از روی ژل جدا کرد و همسان‌سازی نمود و سپس توالی شناسایی‌شده را در پایگاه اطلاعاتی یا توالی‌های موجود، هم‌ردیف نمود و ژن‌های کاندید که شباهت بالایی به نشانگرهای مرتبط مورد نظر داشتند را مشخص نمود. همچنین می‌توان از روی توالی به‌دست‌آمده، آغازگرهای SCAR را طراحی نمود و در انتخاب به‌واسطه نشانگر وابسته به صفت در برنامه‌های اصلاحی بهره برد.

منابع

۱. ابراهیمی ا.، نقوی م.ر.، سبکدست م. و مرادی (۱۳۹۰) تجزیه ارتباط صفات زراعی با نشانگرهای ریزماهواره در جوهای بومی ایران. ژنتیک نوین، ٦(۱):٤۳-۳۵.

۲. آهنگری ع.، رسولی م . و نادری م (۱۳۸۸) بررسی صفات مؤثر در مقاومت به تنش خشکی در گندم. مجموعه مقالات کشاورزی زراعت و اصلاح نباتات، سازمان جهاد کشاورزی استان مرکزی.

۳. شکرپور م.، محمدی س.ا.، مقدم م.، ضیایی س.ع. و جوانشیر ع (۱۳۸۷) تجزیه ارتباط نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و نشانگرهای مولکولی AFLP در گیاه دارویی ماریتیغال. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۷۸-۲۹۲:(۳)۲٤.

٤. عبدالهی مندولکانی ب. و عزیزی ح (۱۳۹۳) شناسایی نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات

مورفولوژیک در جمعیت‌های یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۷(۲): ۲۶۸-۲۶۰.

۵. عبدالهی مندولکانی ب.، اعلمی ع. و اصفهانی م (۱۳۸۹) تجزیه ارتباط برای صفات مورفولوژیک در بادام زمینی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله علوم زراعی ایران، ۱۲(٤):٥١٩-٥١٠.

٦. عزیزی ح.، برنوسی ا.، عبدالهی مندولکانی ب. و درویش‌زاده ر (۱۳۹۰) مطالعه ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین، ٦(٤): ٦١-٦٩.

7. Ashraf M and Harris PJ (2005) Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches. Food Products Press. USA. Binghamton: 725 pp.
8. Culp T, Harrell D and Kerr T (1979) Some genetic implications in the transfer of high fiber strength genes to upland cotton. Crop Science. 19: 481-484.
9. Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19:11-15
10. Ebrahimi A, Naghavi M, Sabokdast M and Moradi S S A (2011) Association analysis of agronomic traits with microsatellite markers in Iranian barley landraces barley. Modern Genetics Journal. 6(1): 35-43.
11. Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B, Oberhagemann P and Schüler K(2004) Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. Molecular Breeding. 13: 93-102.
12. Gomez KA and Gomez AA (1984) Statistical procedures for agricultural research. John Wiley and Sons. Science. 680pp.
13. Inostroza L, del Pozo A, Matus I, Castillo D, Hayes P, Machado S and Corey A (2009) Association mapping of plant height, yield, and yield stability in recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using Hordeum vulgare subsp. spontaneum as a source of donor alleles in a Hordeum vulgare subsp. vulgare background. Molecular Breeding. 23: 365-376.
14. Jabbarzadeh Z, Khosh-Khui M, Salehi H and Saberivand A (2013) Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as reproducible and specific tools for genetic diversity analysis of rose species. African Journal of Biotechnology. 9: 6091-6095.
15. Kar P K, Srivastava PP, Awasthi AK and Urs SR (2008) Genetic variability and association of ISSR markers with some biochemical traits in mulberry (*Morus* spp.) genetic resources available in India. Tree Genetics and Genomes. 4: 75-83.
16. Khaled AGA, Motawea MH and Said AA (2015) Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.
17. Li Q, Liu QC, Zhai H, MA DF, Wang X, Li XQ and Wang YP (2008) Genetic diversity in main parents of sweetpotato in China as revealed by ISSR markers. Acta Agronomica Sinica. 34: 972-977.
18. Miletic R, Zikic M, Mitic N and Nicolic R (2005) Pomological characteristic of superior selections of European filbert (*C. avellana* L.). Genetica. 37: 103-111.
19. Meredith WR and Bridge R(1971) Breakup of linkage blocks in cotton, Gossypium hirsutum L. Crop Science. 11: 695-698.
20. Motawea M, Said A and Khaled A (2015) ISSR Markers-Trait Associations and Stability. Plant Breeding Biotechnology. 3(2): 167-177.
21. Najaphy A, Parchin R A and Farshadfar E (2012) Comparison of phenotypic and molecular characterizations of some important wheat cultivars and advanced breeding lines. Australian Journal of Crop Science. 6: 326.
22. Passioura J (2007) The drought environment: Physical, biological and agricultural perspectives. J. Exp. Bot. 58, 113-117.
23. Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155: 945-959.
24. Rakshit S, Ganapathy K, Gomashe S, Rathore A, Ghorade R, Kumar MN, Ganesmurthy K, Jain S, Kamtar M and Sachan J (2012) GGE biplot analysis to evaluate genotype, environment and their interactions in sorghum multi-location data. Euphytica. 185: 465-479.
25. Ruan CJ, Li H and Mopper S (2009) Characterization and identification of ISSR markers associated with resistance to dried-shrink disease in sea buckthorn. Molecular Breeding. 24(3): 255-268.

26. Vaillancourt A, Nkongolo K, Michael P and Mehes M (2008) Identification, characterisation, and chromosome locations of rye and wheat specific ISSR and SCAR markers useful for breeding purposes. Euphytica. 159(3): 297-306.
27. Virk P, Ford-Lloyd B, Jackson M, Pooni H, Clemeno T and Newburry H (1996) Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. 1995. Third International Rice Genetics Symposium, Manila (Philippines). International Rice Research Institute.
28. Wang LX, Li HB, Gu TC, Liu, LH, Pang BS, Qiu J and Zhao CP (2014) Assessment of wheat variety stability using SSR markers. Euphytica. 195(3): 435-452.
29. Zietkiewicz E, Rafalski A and Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 20(2): 176-183.

Breeding of Agronomic and Horticultural Crop
(Journal of Agriculture, University of Tehran)

Vol. 4 ■ No. 1 ■ Spring & Summer 2016

Association analysis for drought tolerance indices in bread wheat using ISSR markers

Anita Yaghoutipour[1], Ezatolah Farshadfar[2*], Mohsen Saeidi[3]

1. Former Ph. D. Student, Plant Breeding, Department of Agriculture and Plant Breeding, Razi University, Kermanshah, Iran.
2. Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Razi University, Kermanshah, Iran.
3. Associate Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Razi University, Kermanshah, Iran.

Received: August 05, 2016 Accepted: March 17, 2019

Abstract

Intersimple sequence repeat(ISSR) markers were evaluated in order to identify informative markers associated with drought tolerance indices in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes . Eighteen ISSR primers amplified 92 loci among 20 bread wheat genotypes. Polymorphic information content (PIC) ranged from 0.46 (UBC-857, UBC-864, UBC-867, is9) to 0.21 (is7), with an average of 2.05. Stepwise regression analysis between molecular data as independent variables, and drought tolerance indices as dependent variables was performed to identify informative markers associated with the studied traits. Plant Hight, Peduncle Length, Xteragen Length and Peroxidase Activity were explained by more primers. ISSR markers, UBC-867, is9, is11, is15 and is5 showed the most association with drought tolerance indices. Since all the used ISSR loci showed significant association with the studied traits, therefore, it is possible to use these markers along with drought tolerance indices in drought tolerance wheat breeding programs for identification of suitable parents to parents to produce mapping populations and hybrid varieties.

Keywords: Analysis regression, bread wheat, drought tolerance, informative markers, Polymorphism Information Content.

Corresponding author: e_farshadfar@yahoo.com