

## تحقیقات غلات

دوره نهم / شماره چهارم / زمستان ۱۳۹۸ (۳۷۱-۳۵۹)

# صفات مرتبط با تحمل به تنش خشکی و ارتباط آن با نشانگر AFLP در ژنوتیپ‌های گندم نان

فرزاد آهک‌پزا<sup>۱</sup>، اسلام مجیدی هروان<sup>۲\*</sup>، مظفر روستایی<sup>۳</sup>، محمدرضا بی‌همتا<sup>۴</sup> و سلیمان محمدی<sup>۵</sup>

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۱۰

### چکیده

به‌منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات وابسته به تحمل به خشکی تحت دو شرایط متفاوت رطوبتی، دیم (تنش خشکی) و آبیاری تکمیلی، آزمایشی در دو سال متوالی (۹۴-۱۳۹۲) اجرا شد. از بین آغازگرهای AFLP مورد استفاده، هشت ترکیب آغازگری *EcoRI/MseI* در مجموع ۱۱۹ نوار چندشکل با میانگین ۱۴/۸۸ نوار به‌ازای هر نشانگر تولید کردند. متوسط محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای کلیه نشانگرها ۰/۲۹۸ محاسبه شد. بر اساس آماره‌های تنوع ژنتیکی ارزیابی شده شامل PIC، شاخص شانون (I)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و تعداد آلل‌های موثر (EA)، ترکیب E-ACT/M-CTT به‌عنوان بهترین ترکیب آغازگر در تفکیک ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شناسایی شد. ارتباط بین صفات آگرو-فیزیولوژیک به‌عنوان متغیرهای وابسته و داده‌های مولکولی به‌عنوان متغیرهای مستقل از طریق تحلیل رگرسیون چندگانه به روش گام به گام مورد بررسی قرار گرفت و ۷۶ و ۹۸ نشانگر پیوسته با صفات مورد مطالعه به‌ترتیب در شرایط دیم و آبیاری تکمیلی شناسایی شد. در شرایط آبیاری تکمیلی، بالاترین ضریب تبیین به نشانگر E-ACT/M-CTC-11 با توجیه بیش از ۶۰ درصد تغییرات وزن پدانکل، طول پدانکل، وزن خشک سنبله و وزن دانه در سنبله و نشانگر E-ACT/M-CTT-8 با توجیه ۶۲ درصد از تغییرات وزن هزار دانه اختصاص یافت. در شرایط دیم نیز نشانگر E-ACT/M-CTT-8 با ۷۰ درصد، نشانگر E-ACG/M-CTG-2 با ۵۷ درصد و نشانگر E-ACG/M-CAA-2 با ۵۱ درصد، به‌ترتیب بالاترین میزان تغییرات وزن هزار دانه، نسبت آب از دست رفته و محتوای آب نسبی برگ را تبیین کردند. نشانگرهای E-ACT/M-CTC-11 و E-ACG/M-CAA-20 نیز ۳۲ و ۴۱ درصد از تغییرات عملکرد دانه را به‌ترتیب تحت شرایط آبیاری تکمیلی و دیم توجیه کردند. در این پژوهش، نشانگر E-ACT/M-CTT-8 به‌طور مشترک بیش از ۶۰ درصد از تغییرات وزن هزار دانه را تحت هر دو شرایط آزمایشی توجیه کرد. نتایج این تحقیق می‌تواند در تأمین اطلاعات اولیه برای انتخاب غیرمستقیم صفات گندم از طریق نشانگرهای مرتبط با تحت شرایط دیم مفید باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تجزیه رگرسیون، صفات آگرو-فیزیولوژیک، محتوای آب نسبی برگ، نسبت آب از دست رفته، نشانگرهای مولکولی

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- دانشیار پژوهش، بخش غلات، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران

۴- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۵- استادیار پژوهش، بخش غلات، ایستگاه تحقیقات کشاورزی میان‌دواب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، میان‌دواب، ایران

\* نویسنده مسئول: [majidi\\_e@yahoo.com](mailto:majidi_e@yahoo.com)

شده است ( Petrovic *et al.*, 2012; Talebi *et al.*, 2012; Balta *et al.*, 2014; Ejaz *et al.*, 2015; Saremi Rad *et al.*, 2016; Mathew *et al.*, 2019; Roncallo *et al.*, 2019; Sadeqi *et al.*, 2019). بررسی روابط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مختلف کاربردهای متعددی دارد که می‌توان به شناسایی آلل‌های صفات مطلوب در مجموعه‌های ذخایر توارثی، امکان ارزیابی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص، امکان‌سنجی مکان‌یابی دقیق آلل‌های صفات کمی و تأیید ژن‌های کاندیدی مرتبط با صفات کمی اشاره کرد ( Sonmezoglu and Terzi, 2018). اصولی‌ترین روش شناسایی این نشانگرها، تهیه جمعیت‌های در حال تفرق و ردیابی صفات در این جمعیت‌ها است تا بر اساس آن نشانگرهای پیوسته شناسایی شوند. به دلیل زمان‌بر و پرهزینه بودن تهیه جمعیت‌های در حال تفرق، اگر بتوان قبل از تهیه جمعیت‌ها، نشانگرهای دارای ارتباط مناسب با صفات مورد نظر را از طریق تجزیه رگرسیونی شناسایی کرد، می‌توان از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی به‌عنوان نشانگرهای مثبت استفاده کرد (Ranjbar *et al.*, 2009). محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2015) در مطالعه‌ای روی ۲۰ رقم گندم با استفاده از تجزیه رگرسیون گام به گام، ارتباط معنی‌دار دو نشانگر را با پنج صفت فیزیولوژیک در دمای شاهد و شش نشانگر را با ۵ صفت تحت تنش شدید سرما گزارش کردند. ارتباط صفات با نشانگرها در شرایط تنش خشکی در گندم نان توسط محققین مختلفی گزارش شده است ( Mwadzingeni *et al.*, 2017; Qaseem *et al.*, 2018; Beyer *et al.*, 2019; Bhatta *et al.*, 2019; Mathew *et al.*, 2019).

پژوهش حاضر با هدف بررسی کارایی نشانگرهای AFLP در شناسایی و تعیین ویژگی‌های مرتبط با تحمل به خشکی در گندم نان اجرا شد.

### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل هفت رقم (سرداری، آذر۲، رصد، اوحدی، صائین، واران و هما) و ۱۳ لاین امیدبخش گندم دیم بود که از بخش غلات موسسه تحقیقات دیم کشور تهیه شدند. نام، شجره، نوع و منشأ ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه در جدول ۱ ارایه شده است.

آزمایش مزرعه‌ای تحت تیمارهای آبیاری تکمیلی و کشت دیم کامل (تنش خشکی) در ایستگاه تحقیقات

کشور ایران با متوسط ۲۴۰ میلی‌متر بارندگی در زمهره مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان قرار دارد که در این شرایط، تنش خشکی عامل اصلی کاهش تولید گندم نان (*Triticum aestivum* L.) در آن می‌باشد ( Razegi, Yadak and Tavakkol Afshari, 2010). از این‌رو، معرفی ارقام متحمل به خشکی در مراحل مختلف رشدی، از چالش‌های اصلی اصلاح گندم نان در ایران می‌باشد (Khalili and Mohammadi, 2016). تحمل به خشکی صفت پیچیده و کمی است که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود و از این‌رو شناخت مکانیسم‌های فیزیولوژیک و مولکولی تحمل به خشکی دشوار است (Senapati *et al.*, 2019). جهت غلبه بر مشکل وراثت‌پذیری پایین تحمل به خشکی همانند اغلب صفات کمی، محققان از نشانگرهای مولکولی DNA استفاده کرده‌اند و نتایج مطلوبی در بهبود تحمل به خشکی در غلات به‌دست آورده‌اند (Sukumaran *et al.*, 2018). بدین منظور از روش‌های مختلفی همچون مکان‌یابی QTL (Quantitative Trait Locus)، تجزیه ارتباط، تجزیه کل ژنوم و تجزیه بیان ژن با هدف شناسایی صفات مرتبط با ژن یا QTL‌های دخیل در تحمل به خشکی استفاده می‌شود (Hu and Xiong, 2014).

روش AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) بر اساس تکثیر دستجات خاصی از قطعات برش‌یافته ژنومی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز است که توسط ووس و همکاران ( Vos *et al.*, 1995) ارایه شد. از مزایای این روش تولید بیش‌ترین تعداد نشانگرها به‌ازای هر ژل، ظرفیت بررسی کل ژنوم برای نمایان کردن چندشکلی، امکان بررسی هم‌زمان چندین مکان ژنی و عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر است (Zhu *et al.*, 2013). اخیراً در بررسی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گندم افغانی گزارش شد که نشانگر AFLP نتایج بهتری نسبت به نشانگر SSR تولید می‌کند (Sadeqi *et al.*, 2019). نشانگر AFLP با موفقیت در چندین برنامه کاربردی همچون انتخاب به‌کمک نشانگر (Marker Assisted Selection)، ایجاد نقشه پیوستگی با چگالی بالا و تکثیر مکانی ژن‌های مورد نظر استفاده شده است (Karakas *et al.*, 2013).

مطالعات متعددی توسط محققین جهت تعیین تنوع ژنتیکی گندم نان با استفاده از نشانگرهای AFLP گزارش

$$RWC = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100 \quad (1)$$

$$RWL = \frac{FW - ADW}{t - DW} \times 100 \quad (2)$$

که در آن ها، FW، DW، TW و ADW به ترتیب وزن برگ تازه، وزن برگ خشک شده در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت، وزن برگ اشباع و وزن برگ پژمرده و t مدت زمان پژمردگی است.

به منظور ارزیابی ارتباط نشانگرهای AFLP با صفات مورد مطالعه، ابتدا بذر هر ژنوتیپ در گلدان های مجزا کشت و پس از چهار هفته، برگ های جوان نمونه برداری و مقدار یک گرم از بافت تازه جهت استخراج DNA ژنومی با روش CTAB (Saghai Maroof *et al.*, 1994) استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۷ درصد و اسپکتروفتومتری تعیین شد. روش AFLP طبق روش ووس و همکاران (Vos *et al.*, 1995) با کمی تغییرات با استفاده از هشت ترکیب آغازگری *EcoRI/MseI* که از بین ۲۰ ترکیب آغازگر با بیشترین تعداد باند چندشکل انتخاب شدند، انجام گرفت (جدول ۲).

کشاورزی میانوآب با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۵۸ دقیقه شمالی، طول جغرافیایی ۴۶ درجه و ۶ دقیقه شرقی و ارتفاع ۱۳۱۴ متر از سطح دریا در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار طی دو سال زراعی متوالی (۹۴-۱۳۹۲) اجرا شد. کلیه عملیات کاشت، داشت و برداشت طبق الگوی کشت آزمایش های گندم دیم کشور به عمل آمد (Ministry of Agriculture, 2003) و نیاز غذایی بر اساس آزمایش خاک تامین شد. هر کرت آزمایشی شامل شش ردیف به طول چهار متر و فاصله ۲۰ سانتی متر با تراکم ۴۰۰ دانه در متر مربع بود. در تیمار آبیاری تکمیلی، دو نوبت در زمان کاشت (جهت جوانه زنی بذر ها) و پر شدن دانه، هر مرحله به میزان ۳۰ میلی متر آبیاری انجام شد. طی دوره رشد و پس از برداشت، صفات تاریخ سنبله دهی، ارتفاع بوته، طول سنبله، وزن خشک سنبله، تعداد دانه در سنبله، وزن دانه در سنبله، وزن هزار دانه، طول پدانکل، وزن پدانکل و عملکرد دانه اندازه گیری شد. محتوای نسبی آب برگ (RWC) (Ritchie *et al.*, 1990) و نسبت آب از دست رفته (RWL) (Yang *et al.*, 1991) با استفاده از روابط زیر محاسبه شد:

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ های گندم دیم مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Characteristics of the rainfed wheat genotypes used in this study

No.	Name/Pedigree	Type	Origin <sup>†</sup>
1	Sardari	Cultivar	IRAN
2	Azar2	Cultivar	IRAN
3	Rasad	Cultivar	IRAN
4	Ohadi	Cultivar	IRAN
5	Saein	Cultivar	IRAN
6	Azar2/87Zhong291-149	Promising line	IRAN
7	Varan	Cultivar	IRAN
8	Homa	Cultivar	IRAN
9	F10S-1//ATAY/GALVEZ87	Promising line	IWWIP
10	Seafalah/3/Sbn//Trm/K253	Promising line	IRAN
11	Sardari-101	Promising line	IRAN
12	Unknown11	Promising line	IRAN
13	Sabalan/4/Vrz3/Or F1.148/Tdl//Blo	Promising line	IRAN
14	F134.71/Nac//Zombor	Promising line	IWWIP
15	HN7/OROFEN//BJN8/3/SERI/4/	Promising line	IWWIP
16	F130-L-1-12/LAGOS	Promising line	IWWIP
17	Sara-PBWYT-85-86-22-5	Promising line	IWWIP
18	PYN/BAU//BONITO	Promising line	IWWIP
19	Sabalan/84.40023//Seafallah	Promising line	IRAN
20	SUBEN-7	Promising line	IWWIP

<sup>†</sup>: IWWIP, International Winter Wheat Improvement Program.

جدول ۲- آداپتورها و ترکیبات آغازگری مورد استفاده برای تجزیه AFLP ژنوتیپ‌های گندم

Table 2. Adapters and primer combinations used for AFLP analysis of wheat genotypes

Restriction enzyme	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
Adapters	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'	5'-GACGATGAGTCTCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
Preamplification primers	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'	5'-GATGAGTCTCTGAGTAAC-3'
Selective amplification primers	E-AGG E-AGC E-ACT E-AGG E-ACG E-AGG E-ACT E-ACG	M-CTT M-CTT M-CTC M-CTC M-CTG M-CTG M-CTT M-CAA

۱۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس تکثیر شدند و در انتها نیز یک مرحله به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس قرار گرفتند.

برای جداسازی و مشاهده قطعات تکثیرشده، محصولات PCR مرحله انتخابی به سیستم کیاکسل (QIAGEN, Hilden, Germany) منتقل شده و با استفاده از کیت QIAxcel DNA High Resolution، با روش 0M700 تجزیه شدند. شکل ۱ نمونه پروفایل ژل شبیه‌سازی شده توسط دستگاه کیاکسل را نشان می‌دهد. در نهایت امتیازدهی نوارها به‌صورت (+) و (۱) به‌ترتیب برای عدم حضور و حضور نوارها با استفاده از نرم‌افزار BioCalculator نسخه 3.2 (QIAGEN, Hilden, Germany) انجام و فقط از باندهایی که چندشکلی مشخصی داشتند، برای ساخت ماتریس داده‌ها استفاده شد. برای تجزیه داده‌ها در هر دو شرایط آزمایشی، تجزیه واریانس مرکب بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی و محاسبه آماره‌های توصیفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. وراثت‌پذیری عمومی صفات مورد مطالعه نیز با استفاده از رابطه (۳) محاسبه شد (Nyquist, 1991):

$$H_{bs}^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_p^2} \times 100 \quad (3)$$

که در آن،  $\sigma_g^2$  و  $\sigma_p^2$  به‌ترتیب واریانس‌های ژنوتیپی و فنوتیپی صفت مورد نظر هستند.

جهت شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورد مطالعه در دو شرایط آزمایشی (آبیاری تکمیلی و کشت دیم)، تجزیه رگرسیون چند متغیره به‌روش گام به گام با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد، به‌طوری که در

این تغییرات عبارت از تفاوت در حجم و زمان واکنش هضم آنزیمی، تغییر حجم نهایی و دمای واکنش اتصال آداپتورها و تفاوت در حجم و تعداد چرخه‌ها در واکنش‌های پیش‌تکثیر و تکثیر انتخابی بود. ابتدا DNA ژنومی توسط آنزیم *EcoRI* (5U) در حجم ۲۰ میکرولیتر به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس هضم شد، سپس تحت تاثیر آنزیم *MseI* (5U) قرار گرفت و در نهایت مخلوط واکنش به مدت دو ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت تا هضم آنزیمی به‌طور کامل صورت گیرد. قطعات DNA برش‌یافته، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه سلسیوس با استفاده از آنزیم *T4 DNA Ligase* (1U) به آداپتورهای *EcoRI* (5 pmol/μL) و *MseI* (50 pmol/μL) متصل شدند. محصولات مرحله اتصال توسط آب به نسبت ۱:۵ رقیق و در مرحله پیش‌تکثیر انتخابی با جفت آغازگرهای *EcoRI/MseI* حاوی یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' تکثیر شد (*EcoRI-A* و *MseI-C*) (جدول ۲). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. تکثیر انتخابی با استفاده از DNA رقیق شده از مرحله پیش‌تکثیر انتخابی و هشت ترکیب آغازگری دارای دو نوکلئوتید انتخابی دیگر در انتهای ۳' (جدول ۲) در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه دمایی در این مرحله شامل سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و متعاقب آن ۱۳ چرخه به‌صورت Touch Down با کاهش ۰/۷ درجه‌ای دمای اتصال در هر چرخه از ۶۵ درجه به ۵۶ درجه سلسیوس بود. سپس نمونه‌ها، ۲۷ چرخه دیگر شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۶ درجه و

جهت بررسی میزان چندشکلی بین ژنوتیپ‌های گندم، از هشت جفت ترکیب آغازگری EcoRI/MseI استفاده شد. نتایج نشان داد که در مجموع ۱۲۷ نوار قابل امتیازدهی با میانگین ۱۵/۸۸ نوار برای هر آغازگر تولید شد که تعداد ۱۱۹ نوار چن شکل بودند (جدول ۴). دامنه تغییرات نوارهای چندشکل از ۸۴/۶۲ درصد E-AGG/M-CTT تا ۱۰۰ درصد (E-AGC/M-CTT) و E-AGG/M-CTG با میانگین ۹۳/۱۴ درصد متغیر بود. جهت شناسایی ترکیبات آغازگری آگاهی‌بخش، شاخص PIC برای هر ترکیب آغازگر محاسبه شد که بین ۰/۲۶۷ تا ۰/۳۵۱ E-AGC/M-CTT در آغازگر E-ACT/M-CTT متغیر بود. معیار دیگر برای ارزیابی کارایی نشانگرها جهت تعیین چندشکلی، شاخص اطلاعات شانون (I) بود که بیش‌ترین و کم‌ترین مقادیر آن به ترتیب به ترکیبات آغازگری E-ACT/M-CTT (۰/۵۴۳) و E-AGC/M-CTT (۰/۳۶۵) اختصاص یافت. همچنین شاخص نشانگری (MI) بر پایه تعداد نوارهای چند شکل برای هر ترکیب آغازگری محاسبه شد که دامنه تغییرات آن از ۲/۰۸ تا ۶/۵۹ به‌دست آمد. بیش‌ترین میزان MI مربوط به ترکیب E-AGG/M-CTT بود که نشان‌دهنده توان جدا سازی بالای آن در مقایسه با سایر ترکیب‌های آغازگری بود. قدرت تفکیک نشانگر (Rp) از ۳/۳۳۴ تا ۹/۶۵۸ با میانگین ۶/۱ متغیر بود. بالاترین میزان Rp برای آغازگر E-AGG/M-CTT و سپس E-ACG/M-CAA و کم‌ترین آن به E-AGG/M-CTC اختصاص داشت.

بر اساس تجزیه رگرسیون چند متغیره به روش گام به گام داده‌های مربوط به میانگین ۱۲ صفت مورد مطالعه و ۱۱۹ مکان تکثیری چندشکل AFLP، در مجموع ۹۹ نشانگر در شرایط آبیاری تکمیلی و ۸۷ نشانگر در شرایط دیم (تنش خشکی)، ارتباط معنی‌داری با تغییرات صفات نشان دادند (جدول ۵). در شرایط آبیاری تکمیلی، بیش‌ترین تعداد نشانگر برای طول سنبله، تعداد دانه در سنبله، طول پدانکل، وزن پدانکل، عملکرد دانه و وزن خشک سنبله (با ۱۱ نشانگر مرتبط) و کم‌ترین تعداد نشانگر برای RWL (با یک نشانگر مرتبط) به‌دست آمد. در شرایط تنش خشکی نیز بیش‌ترین تعداد نشانگر متعلق به وزن دانه در سنبله، وزن خشک سنبله و وزن هزار دانه (با ۱۱ نشانگر مرتبط) و کم‌ترین تعداد نشانگر متعلق به وزن پدانکل (با یک نشانگر مرتبط) بود.

تحمل به خشکی و ارتباط آن با نشانگر AFLP در گندم نان

هر بار تجزیه، یکی از صفات به‌عنوان متغیر وابسته (Y) و مکان‌های نشانگری به‌عنوان متغیرهای مستقل (X) در نظر گرفته شدند. همچنین، برای هر یک از ترکیبات آغازگری، تعداد کل نوارهای تولید شده، تعداد نوارهای چندشکل و درصد چندشکلی محاسبه و جهت برآورد کارایی نشانگرها، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) (Roldan-Ruiz et al., 2000)، شاخص نشانگری (MI) (Varshney et al., 2007)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) (Lynch and Milligan, 1994)، شاخص شانون (I) (Lewontin, 1972) و قدرت تفکیک نشانگر (Rp) (Altintas et al., 2008) با استفاده از نرم‌افزار GenAEx نسخه 6.503 (Peakall and Smouse, 2012) به‌دست آمد.

### نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مرکب عملکرد دانه و ۱۱ صفت دیگر نشان داد که در هر دو شرایط آزمایشی دیم (تنش خشکی) و آبیاری تکمیلی، به استثنای تاریخ سنبله‌دهی، تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین ژنوتیپ‌ها وجود داشت. علاوه بر این، در هر دو شرایط آزمایشی، اغلب صفات (به جز وزن دانه در سنبله و وزن پدانکل) تحت تاثیر برهمکنش ژنوتیپ×سال قرار گرفتند که نشان‌دهنده تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در سال‌های مختلف بوده است (نتایج آورده نشده است). شاخص‌های آماری توصیفی صفات مورد مطالعه در جدول ۳ ارائه شده است. دامنه تغییرات عملکرد دانه از ۱۴۷۹/۳ تا ۲۳۸۳/۵ کیلوگرم در هکتار به ترتیب در شرایط تنش خشکی و آبیاری تکمیلی متغیر بود. نتایج نشان داد که اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین حداقل و حداکثر سایر صفات مورد مطالعه نیز وجود دارد. بیش‌ترین ضریب تغییرات فنوتیپی در شرایط آبیاری تکمیلی برای عملکرد دانه و وزن پدانکل (به ترتیب ۲۹/۳۲ و ۲۵/۸۸) و در شرایط تنش برای تعداد دانه در سنبله و وزن پدانکل (به ترتیب ۳۰/۸۱ و ۳۰/۵۶) به‌دست آمد. الگوی پیوسته توزیع فراوانی نمونه‌ها نشان داد که اغلب صفات توسط یک سیستم چند ژنی کنترل می‌شوند. بیش‌ترین و کم‌ترین درصد وراثت‌پذیری عمومی به ترتیب به صفات تعداد دانه در سنبله (۸۹/۲۱ درصد در شرایط آبیاری تکمیلی و ۹۰/۵۵ درصد در شرایط تنش) و طول سنبله (۱۳/۰۱ درصد در شرایط آبیاری تکمیلی و ۲۸/۱ درصد در شرایط تنش) به‌دست آمد.

Table 3. Descriptive statistics and broad-sense heritability of different traits of wheat genotypes in average years

Trait <sup>†</sup>	Condition	Mean	Min	Max	GCV (%)	PCV (%)	H <sup>2</sup> <sub>bs</sub> (%)
DH	Supplementary irrigation	201.15	196	207	1.01	1.06	91.44
	Rainfed	197.13	193	202	0.61	0.75	64.71
PH (cm)	Supplementary irrigation	122.45	86.10	163.06	6.56	9.64	46.31
	Rainfed	110.49	73.44	174.43	13.02	16.21	64.47
SL (cm)	Supplementary irrigation	10.66	8.48	12.82	8.10	9.98	65.81
	Rainfed	9.09	6.01	11.28	6.44	10.75	35.93
SDW (g)	Supplementary irrigation	1.42	0.88	2.17	16.52	20.54	64.71
	Rainfed	0.84	0.39	1.27	18.21	21.76	70
NSPS	Supplementary irrigation	37.10	19.31	53.70	21.93	23.22	89.21
	Rainfed	28.67	10.7	52.9	29.31	30.81	90.55
WSPS (g)	Supplementary irrigation	0.99	0.63	1.46	17.42	20.12	75
	Rainfed	0.5	0.21	0.72	19.88	28.12	50
PL (cm)	Supplementary irrigation	42.5	30.22	54.93	11.21	13.08	73.53
	Rainfed	37.04	23.95	52.04	12.98	16.41	62.6
PW (g)	Supplementary irrigation	0.61	0.36	1.04	23.71	25.88	83.89
	Rainfed	0.44	0.23	0.83	20.61	30.56	45.45
RWC (%)	Supplementary irrigation	84.03	74.53	95.26	8.63	10.13	72.53
	Rainfed	75.11	62.90	84.39	6.44	10.75	35.93
RWL (g/g.hr)	Supplementary irrigation	0.238	0.109	0.395	7.93	10.68	66.17
	Rainfed	0.401	0.189	0.711	6.88	9.08	52.55
TKW (g)	Supplementary irrigation	46.62	32.73	56.39	10.05	11.16	82.54
	Rainfed	34.5	21.95	48.4	12.67	15.34	68.24
YLD (kg/ha)	Supplementary irrigation	3561.7	2557.5	4941	25.28	29.32	76.45
	Rainfed	2399	1853.08	3332.4	10.31	24.18	37.5

<sup>†</sup>: DH, days to heading; PH, plant height; SL, spike length; SDW, spike dry weight; NSPS, number of grain per spike; WSPS, grain weight per spike; PL, peduncle length; PW, peduncle weight; RWC, relative water content; RWL, relative water lose; TKW, 1000-kernel weight; YLD, grain yield; GCV, genotypic coefficient of variation; PCV, phenotypic coefficient of variation; h<sup>2</sup><sub>bs</sub>, broad sense heritability.

جدول ۴- آماره‌های تنوع ژنتیکی برای هشت ترکیب آغازگری مورد استفاده در این تحقیق

Table 4. Genetic diversity statistics for eight AFLP primer combinations used in this study

Primer combination	TB	PB	PPB	EA	He	Rp	MI	I	PIC
E-AGG/M-CTT	28	26	92.86	1.415	0.252	9.658	6.59	0.396	0.273
E-AGC/M-CTT	13	11	84.62	1.365	0.227	4.162	2.48	0.365	0.266
E-ACT/M-CTC	13	11	84.62	1.502	0.294	4.166	2.504	0.45	0.269
E-AGG/M-CTC	6	6	100	1.605	0.342	3.334	2.083	0.508	0.347
E-ACG/M-CTG	17	16	94.12	1.404	0.254	6.998	4.523	0.404	0.3
E-AGG/M-CTG	20	20	100	1.352	0.229	7.5	5.542	0.372	0.277
E-ACT/M-CTT	9	8	88.89	1.642	0.368	4.334	2.493	0.543	0.351
E-ACG/M-CAA	21	21	100	1.451	0.268	8.666	6.306	0.416	0.3
Total	127	119		11.736					
Mean	15.88	14.88	93.14	1.467	0.279	6.102	4.065	0.432	0.298

TB, total bands; PB, polymorphic bands; PPB, percentage of polymorphic bands; EA, effective alleles; He, expected heterozygosity; Rp, resolving power; MI: marker index; I, Shannon's index; PIC: polymorphic information content.

Table 5. AFLP markers associated with evaluated traits in supplemental irrigation and drought stress conditions

Trait <sup>†</sup>	Condition	Associated marker*	P value**	Adjusted R <sup>2</sup>
DH	Irrigated	a16, e12	4.36E-4, 0.019	0.546
	Rainfed	h21, a3, a16, f10, h5, c12, h9	2.7E-7, 2.8E-7, 1.2E-6, 1.3E-5, 5.4E-5, 0.002, 0.029	0.325
PH	Irrigated	c2, g8, a3, g9, f3, a8, d2, e6, c11	4.8E-6, 1.1E-5, 1.1E-5, 2.2E-5, 5.9E-5, 4E-4, 4.7E-4, 0.004, 0.01	0.376
	Rainfed	g8, c2, a3, c12	1.5E-5, 5.2E-5, 3.2E-4, 0.011	0.362
SL	Irrigated	g7, e17, a14, d4, d2, h13, h19, a5, h3, g9, a15	2.6E-5, 4E-5, 1.2E-4, 1.8E-4, 2.2E-4, 3.9E-4, 8.4E-4, 0.002, 0.005, 0.023, 0.038	0.339
	Rainfed	d3, h14, h13, d1, e9, b2, h21, c3	1.4E-6, 4.8E-6, 5.6E-6, 2.4E-4, 7.7E-4, 5.7E-4, 0.001, 0.02	0.373
SDW	Irrigated	c11, b7, b3, a14, h13, a5, g8, a26, c5, g6, a10	9.8E-5, 1.9E-4, 2.7E-4, 3.8E-4, 2.8E-4, 0.003, 0.002, 0.008, 0.012, 0.039, 0.046	0.657
	Rainfed	a25, e2, h13, g1, h5, b7, a9, g6, e16, f15, a3	1.3E-4, 1.2E-4, 1.3E-4, 5E-4, 2.6E-4, 5.2E-4, 0.001, 0.0013, 0.01, 0.017, 0.025	0.41
NSPS	Irrigated	c11, a24, f17, h3, g4, b6, c3, e2, d4, g8, c9	4.3E-5, 5.8E-5, 2E-4, 1.8E-4, 2.5E-4, 4.8E-4, 0.001, 0.0014, 0.006, 0.029, 0.041	0.537
	Rainfed	a24, h6, h15, d2, e1, h2, a5	2.6E-6, 1.1E-5, 3.3E-5, 2.1E-4, 4.8E-4, 0.001, 0.028	0.451
WSPS	Irrigated	c11, b7, h21, f13, h20, f8, b3, d2, e1	2.3E-6, 2.7E-6, 5.9E-6, 6.3E-6, 3E-5, 2.9E-5, 3.9E-4, 0.004, 0.025	0.619
	Rainfed	a25, b7, g9, g4, c3, c2, g8, a6, h9, f14, c1	8.1E-4, 4E-4, 3.5E-4, 7E-4, 8.6E-4, 0.002, 0.003, 0.004, 0.013, 0.029, 0.045	0.488
PL	Irrigated	c11, a24, f8, c4, h5, h13, g8, f18, b9, h19, g4	2.3E-6, 1.1E-5, 5.6E-6, 7.4E-6, 1.4E-5, 3.1E-5, 7.2E-5, 2.2E-4, 7E-4, 0.005, 0.014	0.682
	Rain-fed	c11, a24, e14, h9, h7, e2, g9, h21	1E-8, 3.5E-9, 7.6E-8, 1.8E-7, 5.6E-7, 4.4E-6, 7.7E-5, 9.8E-4	0.5
PW	Irrigated	c11, h9, h5, c3, c5, e1, a16, a3, b2, h4, f20	3E-6, 5.4E-6, 8.6E-6, 1.7E-5, 1.8E-5, 1.8E-5, 3.7E-5, 7.6E-5, 3.4E-4, 9.8E-4, 0.006	0.777
	Rain-fed	c11	0.011	0.44
RWC	Irrigated	g4, a24, c11, g7, f10, f1, e16, a15, f8	5.5E-6, 3.8E-6, 2.6E-5, 5.2E-5, 5.5E-5, 1.6E-4, 9.2E-4, 0.004, 0.046	0.381
	Rain-fed	h2, g8	0.004, 0.026	0.514
RWL	Irrigated	f19	0.011	0.491
	Rain-fed	E2, b7, g9, b2, f20, h21, f18, a9, a24, g8, a16	1.3E-8, 5.3E-8, 4E-8, 5.8E-8, 6.3E-8, 1.1E-7, 3.1E-7, 6E-7, 1.1E-6, 3.9E-6, 9.5E-6	0.578
TKW	Irrigated	g8, h21, h20	1.6E-5, 5.4E-4, 0.004	0.623
	Rain-fed	g8, h20, f14, h21, f8, e4, b1, e6, a25, h13, a11	2.1E-8, 5.6E-8, 3.8E-8, 5.8E-8, 1.2E-7, 3.4E-7, 2.2E-7, 5E-7, 1.4E-6, 7.3E-6, 1E-5	0.708
YLD	Irrigated	c11, f17, b6, c4, f14, a2, h5, e17, g6, b7, h13	5.1E-5, 6.7E-5, 6.6E-5, 1.8E-4, 1.7E-4, 2.5E-4, 5.5E-4, 0.002, 0.006, 0.022, 0.039	0.323
	Rain-fed	h20, a6, f16, g7, a11, e1	5.2E-6, 4.8E-6, 4.9E-5, 0.03, 0.002, 0.01	0.409

<sup>†</sup>: DH, date to heading; PH, plant height; SL, spike length; SDW, spike dry weight; NSPS, number of grain per spike; WSPS, grain weight per spike; PL, peduncle length; PW, peduncle weight; RWC, relative water content; RWL, relative water lose; TKW, 1000-kernel weight; YLD, grain yield.

\*: The numbers represent the alleles associated with trait in each primer combination. a) E-AGG/M-CTT; b) E-AGC/M-CTT; c) E-ACT/M-CTC; d) E-AGG/M-CTC; e) E-ACG/M-CTG; f) E-AGG/M-CTG; g) E-ACT/M-CTT; h) E-ACG/M-CAA.

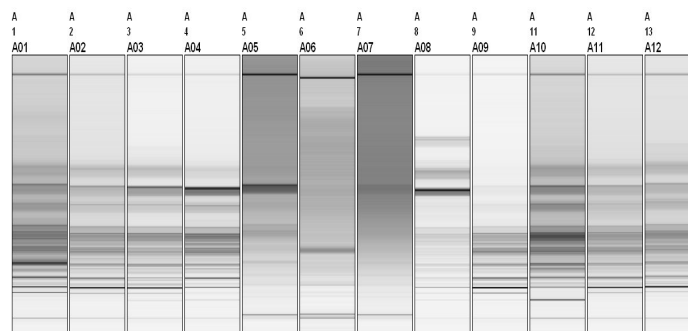
\*\* : The significance level of  $\beta$  using t test.

شد. بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد نشانگرهای مرتبط با صفات در شرایط آبیاری تکمیلی به‌ترتیب مربوط به ترکیبات آغازگری E-ACG/M-CAA (۱۷ نشانگر) و E-AGG/M-CTC (پنج نشانگر) و در شرایط تنش، متعلق به ترکیبات E-ACG/M-CAA (۲۱ نشانگر) و E-AGG/M-CTC (سه نشانگر) بود. در شرایط آبیاری تکمیلی از ۱۷ مکان مرتبط با ترکیب آغازگری E-ACG/M-CAA، تعداد سه مکان با صفات وزن هزار دانه، وزن دانه در سنبله و وزن پدانکل رابطه بسیار معنی‌دار مثبت داشتند.

همچنین تعداد شش مکان از ۲۱ نشانگر مربوط به ترکیب آغازگری E-ACG/M-CAA، در شرایط تنش با RWC عملکرد دانه، تاریخ سنبله‌دهی، وزن هزار دانه و طول پدانکل ارتباط قوی و مثبت نشان دادند. مکان ژنی E-AGG/M-CTT-24، در هر دو شرایط آبیاری تکمیلی و تنش خشکی، درصد بالایی از تغییرات تعداد دانه در سنبله (به‌ترتیب ۰/۳۶۷ و ۰/۴۵۱) و طول پدانکل (به‌ترتیب ۰/۱۳۲ و ۰/۵) را توجیه کرد و رابطه مثبت و قابل ملاحظه‌ای با هر دو صفت نشان داد. همچنین در هر دو شرایط آزمایشی، نشانگر E-ACT/M-CTT-8 درصد بالایی از تنوع وزن هزار دانه و ارتفاع بوته و نشانگر E-ACT/M-CTC-11 بیش‌ترین میزان تغییرات طول پدانکل و وزن پدانکل را توجیه کرد.

در شرایط آبیاری تکمیلی تعداد ۱۱ نشانگر با عملکرد دانه ارتباط معنی‌دار نشان دادند و مجموع کل  $R^2$  توجیه شده توسط این نشانگرها ۱۰۰ درصد بود. در بین نشانگرهای مرتبط با عملکرد دانه در شرایط آبیاری تکمیلی، نشانگر E-ACT/M-CTC-11 بیش‌ترین مقدار  $R^2$  (۰/۳۲۳) را نشان داد. در شرایط تنش آبی نیز ارتباط شش نشانگر با عملکرد دانه بسیار معنی‌دار بود که از بین آن‌ها نشانگر E-ACG/M-CAA-20 بیش‌ترین میزان  $R^2$  (۰/۴۰۹) را به‌خود اختصاص داد. در این پژوهش برخی از نشانگرها هم‌زمان با چندین صفت رابطه قوی نشان دادند، به‌طوری‌که در شرایط آبیاری تکمیلی، نشانگر E-ACT/M-CTC-11 با هفت صفت و پس از آن نشانگر E-ACT/M-CTT-8 با پنج صفت، بیش‌ترین تعداد رابطه معنی‌دار را داشتند.

در شرایط این آزمایش، بیش از ۵۰ درصد تغییرات مربوط به تعداد دانه در سنبله، وزن دانه در سنبله، طول پدانکل، وزن پدانکل و وزن خشک سنبله توسط نشانگر E-ACT/M-CTC-11 تبیین شد. در شرایط تنش نیز نشانگر E-ACG/M-CAA-21 با پنج صفت و پس از آن نشانگر E-ACT/M-CTT-8 با چهار صفت، بیش‌ترین تعداد رابطه معنی‌دار را نشان داد. در این شرایط نیز بیش از ۴۰ درصد تنوع وزن هزار دانه و RWC توسط نشانگر E-ACT/M-CTT-8 و صفات طول پدانکل و تعداد دانه در سنبله توسط نشانگر E-AGG/M-CTT-24 تبیین



شکل ۱- نمونه عکس ژل شبیه‌سازی شده توسط دستگاه کواکسل برای ترکیب آغازگری E-AGG/M-CTT

Figure 1. The sample of simulated gel image using the QIAxcel system for E-AGG/M-CTT primer combination



آغازگری در تفکیک نمونه‌های گندم مورد مطالعه انتخاب شد. برای صفات پیچیده‌ای همچون تحمل به خشکی می‌توان از ارتباط نشانگر-صفت جهت اصلاح از طریق انتخاب به‌کمک نشانگر (MAS) استفاده کرد تا راندمان انتخاب در جمعیت‌های در حال تفکیک افزایش یا بد (Zoric et al., 2012).

بر اساس تجزیه رگرسیون گام به گام داده‌های AFLP و صفات مورد مطالعه، در مجموع ۹۹ نشانگر در شرایط آبیاری تکمیلی و ۸۷ نشانگر در شرایط تنش خشکی رابطه معنی‌داری با این صفات نشان دادند. در این مطالعه، اغلب نشانگرهای مرتبط با صفات در شرایط آبیاری تکمیلی و تنش خشکی متفاوت بودند که نشان دهنده تأثیر محیط روی این صفات بود و به‌همین دلیل QTL‌های متفاوتی در شرایط آزمایشی مورد مطالعه شناسایی شدند. برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط داشت که می‌تواند ناشی از پیوستگی بسیار نزدیک و یا آثار پلیوتروپیک QTL‌های موثر بر صفات مختلف باشد (Watanabe et al., 2019). شناسایی نشانگرهای مشترک در اصلاح گیاهان بسیار مهم است، زیرا انتخاب هم‌زمان چندین صفت را ممکن می‌سازد. در شرایط آبیاری تکمیلی، نشانگر E-ACT/M-CTC-11 با هفت صفت ارتباط معنی‌داری نشان داد و بیش از ۵۰ درصد از تغییرات مربوط به صفات تعداد دانه در سنبله، وزن دانه در سنبله، طول پدانکل، وزن پدانکل و وزن خشک سنبله توسط این نشانگر تبیین شد. مطالعات متعددی در گندم وجود همبستگی معنی‌دار بین صفات مذکور را در شرایط نرمال تایید کرده است (Khan et al., 2019; Sallam et al., 2019). در شرایط تنش نیز نشانگر E-AGG/M-CTT-24 درصد بالایی از تغییرات صفات تعداد دانه در سنبله و طول پدانکل، نشانگر E-ACT/M-CTC-11 بیش‌ترین میزان تغییرات طول پدانکل و وزن پدانکل و نشانگر E-ACT/M-CTT-8، بالاترین میزان تغییرات وزن هزار دانه و RWC را توجیه کردند. با توجه به ضریب تبیین بالا و نیز تعداد نوارهای مرتبط، با اطمینان بالایی می‌توان در مورد کارایی این نشانگرها در گزینش برای صفات مورد اشاره اظهار نظر کرد. همبستگی معنی‌داری بین وزن هزار دانه و RWC در گندم توسط حفیظ و همکاران (Hafeez et al., 2016) در شرایط تنش خشکی گزارش شده است.

در این پژوهش، ۴۱ درصد از تغییرات عملکرد دانه و ۱۴/۲ درصد از تغییرات وزن هزار دانه تحت شرایط خشکی

در اصلاح تحمل به خشکی، شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات سازگار با تحمل به خشکی، برای فهم نحوه کنترل و بیان این صفات ضروری است (Sallam et al., 2019). آماره‌های توصیفی صفات مورد مطالعه همراه با توزیع نرمال آن‌ها نشان داد که این صفات توسط چندین مکان ژنی کنترل می‌شوند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه تنوع قابل ملاحظه‌ای از نظر صفات مورد ارزیابی دارند که ردیابی ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات از طریق تجزیه رگرسیون چندمتغیره را ممکن می‌سازد. مقادیر بالای وراثت‌پذیری تعداد دانه در سنبله، وزن خشک سنبله و وزن پدانکل نشان داد که این ویژگی‌ها می‌توانند به‌عنوان پارامترهای ژنتیکی برای بهبود و انتخاب ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا مورد استفاده قرار گیرند. این نتایج یافته‌های طالبی و فیاض (Talebi and Fayyaz, 2012) در گندم را مورد تایید قرار دادند.

تولید تعداد زیاد نوارهای چند شکل در مقابل تعداد کم نوارهای یک شکل در ترکیبات آغازگری مورد مطالعه نشان داد که نشانگر AFLP از پتانسیل بالایی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی برخوردار است. مطابق نظر بالتا و همکاران (Balta et al., 2014)، در استفاده از AFLP در گندم، یکی از ترکیبات آغازگری *EcoRI/MseI* اغلب بیش‌ترین چندشکلی را تولید کرده است. اگرچه نشانگرهای AFLP در حال حاضر به‌عنوان یک سیستم نشانگری قدیمی محسوب می‌شوند، با این حال ثابت شده است که یک راهکار کارآمد برای انگشت‌نگاری ژنتیکی و نیز بررسی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها فراهم می‌کنند (Roncallo et al., 2019). مقادیر حد واسط PIC برای آغازگرهای AFLP در این تحقیق می‌تواند به ماهیت متفاوت نمونه‌های گندم و یا نشانگرهای AFLP مورد استفاده نسبت داده شود. میانگین PIC برای نشانگرهای غالب در محدوده صفر تا ۰/۵ گزارش شده است (Roldan-Ruiz et al., 2000). در پژوهش حاضر، شاخص شانون با PIC همبستگی مثبت داشت که نشان می‌داد مقادیر بالای این دو شاخص می‌تواند به‌عنوان معیاری جهت انتخاب بهترین ترکیب آغازگری مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس مقادیر بالای آماره‌های PIC، He، I، EA در این آزمایش، ترکیب آغازگر E-ACT/M-CTT به‌عنوان بهترین ترکیب

پدانکل، بیش‌ترین میزان تغییرات را به‌طور مشترک در هر دو شرایط آبیاری تکمیلی و تنش خشکی توصیف کردند و می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای مطلوب در بهبود تحمل به خشکی در گندم نان مورد توجه قرار گیرند.

### نتیجه‌گیری کلی

ارتباط‌های معنی‌دار نشانگر- صفت شناسایی شده در این مطالعه برای انتخاب به‌کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاح گندم جهت معرفی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در مناطق خشک و نیمه‌خشک مفید خواهد بود. علاوه بر این در تهیه نقشه‌های پیوستگی، اطلاعات نشانگری به‌دست آمده از این تحقیق جهت انتخاب آغازگرهای مناسب، مفید خواهد بود. البته لازم است نشانگرهای مرتبط ردیابی شده در این پژوهش، در جمعیت‌های بزرگ و نیز در جمعیت‌های در حال تفکیک نیز ارزیابی شوند تا از پیوستگی آن‌ها با صفات مربوطه اطمینان حاصل و بر اساس آن، نقشه‌های پیوستگی تهیه و مکان‌های ژنی کنترل‌کننده این صفات روی کروموزوم‌ها مشخص شود و به این ترتیب کارایی استفاده از آن‌ها در پروژه‌های اصلاحی افزایش یابد.

توسط نشانگر E-ACG/M-CAA-20 توجه شد. در گندم ژنوتیپ‌های با عملکرد دانه بالا به‌همراه وزن هزار دانه، تعداد دانه در سنبله و وزن دانه در سنبله بیش‌تر مطلوب می‌باشند. بنابراین، اگر اثربخشی نشانگرها در کنترل ژنتیکی صفات مرتبط با عملکرد تأیید شود، می‌تواند ابزارهای مفیدی برای برنامه‌های اصلاح مولکولی گندم در شرایط خشکی فراهم کند. وجود نشانگرهای مولکولی با ضریب تبیین بالا برای صفات مورد مطالعه، این امکان را برای اصلاحگران فراهم می‌آورد که بدون توجه به اثر عوامل محیطی، QTL‌های مرتبط با تحمل به خشکی را انتخاب کنند. نشانگرهای E-ACT/M-CTC-2 و E-ACT/M-CTT-8 به‌طور مشترک بیش از ۶۰ درصد از تغییرات مربوط به ارتفاع بوته را در هر دو شرایط آزمایشی توجیه کردند. ارتفاع بوته به‌عنوان یک صفت مورفولوژیک در اصلاح واریته‌های پاکوتاه گندم با شاخص برداشت بالا و نیز ارتباط آن با اجزای عملکرد دانه جهت گزینش غیرمستقیم مهم می‌باشد (Thomas, 2017). همچنین نشانگر E-AGG/M-CTT-24 برای تعداد دانه در سنبله، نشانگر E-AGC/M-CTT-7 برای وزن دانه در سنبله، نشانگر E-ACT/M-CTT-8 برای وزن هزار دانه و نشانگر E-ACT/M-CTC-11 برای صفات طول و وزن

### References

- Altıntaş, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A. and Ozkan, H. 2008. Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. **Plant Breeding** 127: 9-14.
- Balta, H., Karakas, O., Senturk, F., Ertugrul, F., Hasancebi, S., Aydin, Y. and Mert, Z. 2014. Identification of an AFLP marker linked with yellow rust resistance in wheat. **Turkish Journal of Biology** 38: 371-379.
- Beyer, S., Daba, S., Tyagi, P., Bockelman, H., Brown, G. and Mohammadi, M. 2019. Loci and candidate genes controlling root traits in wheat seedlings- a wheat root GWAS. **Functional and Integrative Genomics** 19: 91-107.
- Bhatta, M., Morgounov, A., Belamkar, V. and Baenziger, P. S. 2018. Genome-wide association study reveals novel genomic regions for grain yield and yield-related traits in drought-stressed synthetic hexaploid wheat. **International Journal of Molecular Sciences** 19: 3011.
- Ejaz, M., Qidi, Z., Gaisheng, Z., Na, N., Huiyan, Z. and Qunzhua, W. 2015. Analysis of genetic diversity identified by amplified fragment length polymorphism marker in hybrid wheat. **Genetics and Molecular Research** 14 (3): 8935-8946.
- Hafeez, S., Zhangyong, L., Tao, J., Iqbal, S., Ahmad, I. and Chambi, C. 2016. Assessment of drought tolerance in wheat at different growth stages under the rainfed conditions of Rawalakot Kashmir Pakistan. **Advanced Research Journal of Agricultural Science** 5 (4): 132-140.
- Hu, H. and Xiong, L. 2014. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual Review of Plant Biology** 65: 715-741.
- Karakas, O., Turktas, M., Aslay, M. and Kaya, E. 2013. Evaluation of the genetic relationship between *Fritillaria* species from Turkey's flora using fluorescent-based AFLP. **Turkish Journal of Biology** 37: 273-279.

- Khalili, M. and Mohammadi, A. 2016.** Mapping QTLs associated with wheat seed germination under normal and drought stress conditions. **Crop Biotechnology** 9: 1-14. (In Persian with English Abstract).
- Khan, S., Anwar, S., Yu, S., Sun, M. and Gao, Z. 2019.** Development of drought-tolerant transgenic wheat: Achievements and limitations. **International Journal of Molecular Sciences** 20: 1-18.
- Lewontin, R. C. 1972.** The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology** 6: 381-398.
- Lynch, M. and Milligan, B. G. 1994.** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology** 3: 91-99.
- Mathew, I., Shimelis, H., Shayanowako, A., Laing, M. and Chaplot, V. 2019.** Genome-wide association study of drought tolerance and biomass allocation in wheat. **Plos One** 14 (12): e0225383.
- Ministry of Agriculture 2003.** Farm management and wheat technical instructions. Wheat project manager. Volume II. 57 p. (In Persian).
- Mohammadi, M., Mirfakhraee, R. and Abbasi, A. 2015.** Genetic diversity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) as revealed by microsatellite markers and association analysis of physiological traits related to spring cold stress. **Novel Genetics** 3: 279-288. (In Persian with English Abstract).
- Mwadingeni, L., Shimelis, H., Rees, D. and Tsilo, T. 2017.** Genome-wide association analysis of agronomic traits in wheat under drought-stressed and non-stressed conditions. **Plos One** 12 (2): e0171692.
- Nyquist, N. E. 1991.** Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. **Critical Reviews in Plant Sciences** 10: 235-322.
- Peakall, R. and Smouse, P. 2012.** GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics** 28: 2537-2539.
- Petrovic, S., Maric, S., Cupic, T., Drezner, G. and Karsai, I. 2012.** Assessment of genetic diversity in croatian winter wheat varieties using SSR and AFLP markers. **Poljoprivreda** 18 (2): 18-24.
- Qaseem, M., Qureshi, R., Muqaddasi, Q., Shahin, H. and Roder, M. 2018.** Genome-wide association mapping in bread wheat subjected to independent and combined high temperature and drought stress. **Plos One** 13: e0199121.
- Ranjbar, M., Naghavi, M., Zali, A., Aghaei, M. and Mardi, M. 2009.** Identification of informative markers of SSR in *Aegilops crassa* accessions of Iran. **Journal of Agriculture** 11: 47-56.
- Razegi Yadak, F. and Tavakkol Afshari, R. 2010.** Effect of drought stress on seed embryo axis phosphatase activities during early stages of germination of two bread wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. **Journal of Crop Science** 2: 385-393. (In Persian with English Abstract).
- Ritchie S. W., Nguyen H. T., and Holdy A. S. 1990.** Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. **Crop Science** 30: 105-111.
- Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., VanBockstaele, E., Depicke, A. and Loose, M. 2000.** AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding** 6: 125-134.
- Roncallo, P. F., Beaufort, V., Larsen, A. O. Dreisigacker, S. and Echenique, V. 2019.** Genetic diversity and linkage disequilibrium using SNP (KASP) and AFLP markers in a worldwide durum wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*) collection. **Plos One** 14 (6): e0218562.
- Sadeqi, M., Dadshani, S., Yousefi, M. and Ajir, G. 2019.** Investigation of genetic diversity in afghan bread wheat genotypes using SSR and AFLP markers. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology** 7 (9): 1263-1267.
- Saghai Maroof, M. A., Biyashev, R. M. and Yang, G. P. 1994.** Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley species diversity, chromosomal location, and population dynamics. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America** 91 (12): 5466-5570.
- Sallam, A., Alqudah, A. M., Dawood, M., Baenziger, P. S. And Borner, A. 2019.** Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research. **International Journal of Molecular Sciences** 20: 1-36.
- Saremi Rad, B., Shokrpour, M., Sofalian, O., Hashemi Nezhad, E., Avanes, A. and Esfandiari, E. 2016.** Evaluation of genetic diversity of wheat genotypes by AFLP markers. **Journal of Crop Breeding** 7 (16): 89-96. (In Persian with English Abstract).
- Senapati, N., Stratonovitch, P., Paul, M. J. and Semenov, M. A. 2019.** Drought tolerance during reproductive development is important for increasing wheat yield potential under climate change in Europe. **Journal of Experimental Botany** 70: 2549-2560.

- Sonmezoglu, O. and Terzi, B. 2018.** Characterization of some bread wheat genotypes using molecular markers for drought tolerance. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology** 24 (1): 159-166.
- Sukumaran, S., Reynolds, M. P. and Sansaloni, C. 2018.** Genome-wide association analysis identify QTL hotspots for yield and component traits in durum wheat grown under yield potential, drought, and heat stress environments. **Frontiers in Plant Science** 9: 81. doi: 10.3389/fpls.2018.00081.
- Talebi, R. and Fayyaz, F. 2012.** Quantitative evaluation of genetic diversity in Iranian modern cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) using morphological and amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Biharean Biologist** 6: 14-18.
- Talebi, R., Fayyaz, F. and Karami, E. 2012.** Morphometric and amplified fragment length polymorphism marker analysis in some landrace wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes collected from north-west Iran. **Environmental and experimental biology** 10: 49-56.
- Thomas, S. G. 2017.** Novel Rht-1 dwarfing genes: tools for wheat breeding and dissecting the function of DELLA proteins. **Journal of Experimental Botany** 68 (3): 354-358.
- Varshney, R., Chabane, K., Hendre, P. and Aggarwal, R. 2007.** Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science** 173: 638-649.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Peleman, J. and Kuiper, M. 1995.** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** 21: 4407-4414.
- Watanabe, K., Stringer, S., Frei, O., Umicevic, M., Leeuw, C., Polderman, T., Sluis, S., Andreassen O., Neale, B. and Posthuma, D. 2019.** A global overview of pleiotropy and genetic architecture in complex traits. **Nature Genetics** 51: 1339-1348.
- Zhu, Q., Zhang, X., Ejaz, M., Zhang, G. and Zhang, L. 2013.** Analysis of three wheat cytoplasmic malesterile lines mitochondrial DNA by AFLP. **Chinese Journal of Biotechnology** 29: 646-656.
- Zoric, M., Doding, D., Kobiljski, B., Quarrie, S. and Barnes, J. 2012.** Population structure in a wheat core collection and genomic loci associated with yield under contrasting environments. **Genetica** 140: 259-275.



## Drought tolerance related traits in bread wheat and its association with AFLP marker

Farzad Ahakpaz<sup>1\*</sup>, Eslam Majidi Hervan<sup>2</sup>, Mozaffar Roostaei<sup>3</sup>, Mohammad Reza Bihamta<sup>4</sup> and Soleyman Mohammadi<sup>5</sup>

Received: December 1, 2019

Accepted: February 9, 2020

### Abstract

To identify markers associated with drought tolerance related traits under two different moisture conditions including rainfed (drought stress) and supplementary irrigation, an experiment was conducted in two consecutive years (2013-2015). Among the AFLP primers used in this study, eight *EcoRI/MseI* primer combinations produced a total of 119 polymorphic bands with an average of 14.88 bands per marker. The average polymorphic information content (PIC) for all markers was calculated 0.298. Based on PIC, Shannon's index (I), expected heterozygosity (He) and effective allele (EA), the combination of E-ACT/M-CTT was identified as the best primer combination in distinguish of the studied genotypes. The relationship between agro-physiological traits as dependent variables and molecular data as independent variables was investigated using stepwise multiple regression analysis method and 76 and 98 markers associated with traits were identified under rainfed and supplementary irrigation conditions, respectively. Under supplementary irrigation conditions, the highest coefficient of determination ( $R^2$ ) was allocated for E-ACT/M-CTC-11 marker with more than 60% explanation of variations in peduncle weight, peduncle length, spike dry weight and grain weight per spike and E-ACT/M-CTT-8 with explanation of 62% variation of 1000 grain weight. Under rainfed conditions, the markers E-ACT/M-CTT-8 with 70%, E-ACG/M-CTG-2 with 57% and E-ACG/M-CAA-2 with 51%, explained the highest variation of 1000 grain weight, relative water lose and relative water content, respectively. The markers E-ACT/M-CTC-11 and E-ACG/M-CAA-20 explained 32% and 41% of the grain yield variance under supplemental irrigation and rainfed conditions, respectively. In this study, the marker E-ACT/M-CTT-8 explained more than 60% of the variation in 1000 grain weight under both experimental conditions. The results of this study can be useful in providing basic information for indirect selection of wheat traits using associated markers under rainfed conditions.

**Keywords:** Agro-physiological traits, Molecular markers, Regression analysis, Relative water content, Relative water lose

1. Ph. D. Student, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Research Assoc. Prof., Dept. of Cereals, Dryland Agricultural Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran

4. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran

5. Research Assist. Prof., Dept. of Cereals, Miandoab Agricultural Research Station, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Miandoab, Iran

\* Corresponding author: [majidi\\_e@yahoo.com](mailto:majidi_e@yahoo.com)