Crop Biotech.
Winter (2016) 16: 75-89.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال ششم، شماره شانزدهم، زمستان ۱۳۹۵ (۸۹-۷۵)

بررسی تحمل به تنش شوری و تنوع آللی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با شوری در ژنوتیپ‌های گندم ایرانی

اشکبوس امینی[1]*، حبیب‌اله قزوینی[2]، رضا امیرنیا[3]
۱. استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲. دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳. دانشیار گروه زراعت واصلاح نباتات دانشگاه ارومیه، ارومیه ، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۱۳- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۰/۱۷)

Study on salinity tolerance and allelic diversity of microsatellite markers associated with salinity in Iranian wheat genotypes

Ashkboos Amini[1]*, Habibollah Gazvini[2], Reza Amirnia[3]
1. Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Associate Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Urmia University, Uromieh, Iran
(Received: Oct. 4, 2016 -Accepted: Dec. 7, 2016)

چکیده

به منظور بررسی تنوع آللی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با نواحی QTLهای دخیل در تحمل به شوری و ارتباط این نشانگرها با عملکرد تحت شرایط نرمال و تنش شوری در گندم‌های ایرانی، تعداد ۲۵ ژنوتیپ گندم نان (شامل ارقام و لاین‌های بومی و اصلاح شده متحمل تا حساس) با استفاده از ٤٥ جفت آغازگر ریزماهواره مرتبط با شوری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین عملکرد دانه در هر دو شرایط محیطی حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ژنوتیپ‌ها بود. در شرایط تنش ژنوتیپ‌های شماره ۲۵ (Pishtaz/Karchia) و ۱٦ (Sissons/3/ Alvd//Aldan/Ias58) به ترتیب بیشترین و کمترین عملکرد دانه را نشان دادند. بر اساس میانگین عملکرد دانه (در شرایط تنش و بدون تنش) و شاخص‌های تحمل و حساسیت به تنش ژنوتیپ‌ها به گروه‌های متحمل، نیمه متحمل و حساس تقسیم شدند. بر اساس نتایج ارزیابی مولکولی از بین ٤٥ نشانگر SSR مورد استفاده، تعداد ۲۷ نشانگر، الگوی نواربندی چندشکل (پلی‌مورف) نشان دادند. در این نشانگرها در مجموع ۹۵ آلل مشاهده شد که ۸۹ آلل دارای چندشکلی بودند به طوریکه تعداد آلل برای هر آغازگر از دو تا هفت آلل متغیر و میانگین تعداد آلل ۳/۵۲ برای هر جفت نشانگر بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای نشانگرهای مختلف از ۰/۰۷۷ تا ۰/٤٥٤ با میانگین ۰/۲۵۸ و میزان شاخص نشانگر (MI) از ۰/۱۵ تا ۱/۱۹ با میانگین ۰/۷۹ بود. تجزیه خوشه ای بر اساس داده‌های مولکولی، ضمن هم‌خوانی نسبی با نتایج حاصله از ارزیابی مزرعه‌ای به خوبی توانست ژنوتیپ‌های متحمل و حساس را از هم تفکیک نماید و با گروه‌بندی بر اساس تجزیه به بردارهای اصلی با استفاده از نشانگرهای مولکولی نیز مطابقت زیادی داشت. نتایج حاصله نشان داد که نشانگرهای gwm291، gpw345، wmc249، barc353.1، cfa2170.2، gwm339 و wmc326 به‌طور نسبی از PIC و MI بیشتری برخوردار بوده و در نتیجه از قدرت تفکیک بالاتری در مقایسه با سایر آغازگرها برخوردار می باشند و می توانند به عنوان نشانگرهای مفید جهت بررسی تنوع ژنتیکی و برنامه-های به‌نژادی برای تنش شوری استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: تنوع آللی، نشانگرهای SSR، تنش شوری و گندم.

Abstract

In order to evaluate allelic diversity of microsatellite markers in QTL regions associated with salinity tolerance and to assess relatedness of these markers with yield performance of Iranian wheats under normal and salt stress conditions, twenty-five wheat genotypes (comprising tolerant and sensitive Iranian landraces, commercial cultivars and breeding lines), were studied using 45 microsatellite primers. Results of yield mean comparison showed that there were significant differences among genotypes in both environmental conditions. Under stress conditions, genotypes no 25 (Pishtaz/Karchia) and 16 (Sissons/3/Alvd//Aldan/Ias58) had the highest and lowest grain yields, respectively. Based on grain yield mean under both stress and non-stress conditions as well as tolerance and susceptibility indices, the genotypes were classified into tolerant, moderately tolerant and sensitive groups. From 45 microsatellite primer pairs used, 27 markers were polymorphic. In total, these markers generated 95 alleles, from which 89 alleles were polymorphic, possessing 2-7 alleles with the average of 3.52 alleles per locus. The polymorphic information content (PIC) varied from 0.077 to 0.454 with the average of 0.258 and the Marker Index (MI) ranged from 0.151 to 1.19 with the average of 0.79 for different primers. Cluster analysis based on molecular data, could completely separate sensitive and tolerant genotypes and relatively was concordant with grouping of genotypes based on field results. Principal coordinate analysis (PCOA), mostly confirmed the results of cluster analysis. Results of molecular data demonstrated that SSR markers: gwm291, gpw345, wmc249, barc353.1, cfa2170.2, gwm339 and wmc326 had higher PIC & MI values and can be considered as suitable microsatellite markers to assess the genetic diversity among the wheat genotypes in salinity stress breeding programs.

Keywords: Allelic diversity, microsatellites, salinity stress, wheat**.**

* نویسنده مسئول: اشکبوس امینی
E-mail: amini_ashk@ yahoo.com

مقدمه

گندم بخش اعظم نشاسته جیره غذایی مردم جهان و کشور را تشکیل می‌دهد و هر ساله تقاضای جهانی برای تهیه آن افزایش می‌یابد (Bakhshandeh *et al.*, 2010). برآوردها نشان می‌دهد که در سال ۲۰۵۰ میلادی نیاز غذایی مردم جهان نسبت به حال، ۱۱۰-۷۰ درصد افزایش خواهد یافت و این در حالی است که منابع تولید دارای محدودیت زیادی است (Tilman *et al.*, 2011). پژوهش‌ها نشان داده است که تنش-های غیرزنده از جمله تنش شوری عملکرد گیاهان زراعی را ۵۰ درصد و در گندم تا ۸۰ درصد کاهش می‌دهند (Rahaie *et al.*, 2012). برآوردها نشان می‌دهد حدود ۲۰ درصد از اراضی کشور ایران (حدود ۳۴ میلیون هکتار) تحت تأثیر شوری قرار دارد که ۸/۵ میلیون هکتار آن شدیداً متأثر شوری است (Cheraghi, 2009). ژن‌های زیادی در کنترل صفاتی که در تحمل به شوری مؤثر می‌باشند، نقش دارند. این ژن‌ها در طول دوره زندگی گیاهان و در بافت‌های مختلف بیان می‌شوند و به وسیله عوامل محیطی مختلفی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Roy *et al.*, 2011). شناسایی معیارهای مؤثر و QTLهای دخیل در تحمل به تنش شوری می‌تواند باعث تسریع برنامه‌های به‌نژادی جهت توسعه ارقام متحمل به شوری گردد (Wang *et al.*, 2011). ارزیابی اغلب صفات مورفو- فیزیولوژیکی مرتبط با تنش‌های غیرزنده (مانند تنظیمات اسمزی و رشد ریشه) با استفاده از روش‌های به‌نژادی مرسوم مشکل است. از این رو تکنولوژی نشانگرهای مولکولی می‌تواند برای تحمل به تنش‌های محیطی مورد استفاده قرار گیرد (Sing & Diwivedi, 2002).

آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌های گیاهی و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات است (Donini *et al.*, 1998). نشانگرهای مولکولی، ابزار قدرتمندی جهت اداره مجموعه‌های ژرم‌پلاسم گیاهی هستند. از میان نشانگرهای مولکولی شناخته شده، ریزماهواره‌ها (Microsatellites) یا SSRها (Simple Sequence Repeats) به‌دلیل چندشکلی و تکرارپذیری بالا، چندآللی بودن و امتیازدهی هم‌بارز، فراوانی نسبی و پوشش وسیع ژنومی مزیت زیادی در مطالعه ساختار ژرم‌پلاسم دارند (Meszaros *et al.*, 2007).

تنوع ژنتیکی ۳۱ ژنوتیپ جو با استفاده از ۴۴ جفت آغازگر ریزماهواره توسط Ganjekhanloo *et al.* (2012) مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ۲۶۸ آلل چندشکل با میانگین ۷/۴۴ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر شد و ژنوتیپ‌ها بر اساس این نشانگرها به سه گروه منتسب شدند که با شجره آنها مطابقت داشت. در بررسی انجام شده توسط Ahmad *et al.* (2013)، تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری گندم پاکستان و کشورهای دیگر خاورمیانه با استفاده از ۵۳ نشانگر ریزماهواره و ۲۶ نشانگر راپید (RAPD) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از وجود تنوع گسترده‌ای در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش بود. همچنین، تنوع ژنتیکی و نقشه‌یابی ارتباطی توده‌های بومی برنج متحمل به شوری بنگلادش با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و STS مورد مطالعه قرار گرفت (Emon *et al.*, 2015). در یک بررسی دیگر، Sardouie-Nasab *et al.* (2013) با استفاده از ۳۷ نشانگر ریزماهواره مرتبط با تحمل به شوری، تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ امیدبخش گندم نان را مورد مطالعه قرار دادند و اظهار نمودند که نشانگرهای ریزماهواره، نشانگرهای سریع و مطمئنی برای بررسی تنوع مولکولی در گندم هستند. تنوع ژنتیکی و ارتباط نشانگرهای ریزماهواره و راپید ژنوتیپ‌های متحمل به شوری گندم نان و دوروم مصر توسط Moghaieb *et al.* (2011) مورد بررسی قرار گرفت و این محققین اظهار نمودند که علاوه بر تنوع ژنتیکی مشاهده شده در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش تعدادی از نشانگرهای مورد مطالعه با تحمل به شوری ارتباط دارند. در مطالعه انجام شده توسط Shahzad

et al. (2012) با استفاده از ۴۵ نشانگر SSR در گندم، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۱۳ تا ۰/۶۶ متغیر بود. هدف این مطالعه بررسی واکنش به شوری و بررسی تنوع آللی نشانگرهای ریزماهواره شناسایی و گزارش‌شده مرتبط با تحمل به شوری در ارقام و لاین-های متحمل به شوری گندم ایرانی و تعیین روابط ژنتیکی آن‌ها جهت شناسایی والدین مناسب در برنامه-های اصلاحی و ژنتیکی برای تنش شوری است.

مواد و روش‌ها

ارزیابی مزرعه‌ای

در این تحقیق به منظور بررسی واکنش ژنوتیپ‌های گندم نان نسبت به تنش شوری، تعداد ۲۵ ژنوتیپ گندم (شامل ارقام شاهد تجاری و محلی متحمل، حساس و لاین‌های امیدبخش) (جدول ۱) در ایستگاه تحقیقاتی بیرجند در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به مدت دو سال زراعی در دو آزمایش جداگانه تحت شرایط تنش شوری و بدون تنش مورد بررسی قرار گرفتند. آبیاری در شرایط تنش با آب ۱۰-۸/۸ دسی زیمنس برمتر و شرایط بدون تنش یا معمولی با آب ۲/۱ دسی زیمنس برمتر انجام گرفت. کاشت در کرت‌هایی به مساحت ۳ متر مربع انجام گرفت. در زمان برداشت با حذف نیم متر حاشیه (۲۵ سانتیمتر از هرطرف)، مساحت برداشت ۲/۴ = ۲×۱/۲ متر مربع بود. میزان کود مصرفی مطابق فرمول کودی و آزمون خاک مناطق بوده و میزان بذر هر رقم بر اساس۵۰۰ دانه در متر مربع منظور گردید. علف‌های هرز در اواسط فروردین و با دست وجین شدند. بعد از برداشت و توزین عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیک، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین برای هردو شرایط آزمایش انجام و ژنوتیپ‌ها از نظر تحمل به شوری با استفاده از شاخص‌های تحمل (TOL)، میانگین بهره-وری (MP)، حساسیت به تنش (SSI)، میانگین هندسی عملکرد (GMP) و تحمل به تنش (STI) (Rosielle & Hamblin, 1981; Fernandez, 1992; Fischer & Maurer, 1987) مورد بررسی قرار گرفتند و گروه‌بندی (تجزیه خوشه‌ای) ژنوتیپ‌ها بر اساس شاخص‌ها صورت گرفت.

بررسی مولکولی

کلیه مراحل انجام ارزیابی‌های ژنوتیپی (آزمایش مولکولی) این تحقیق در آزمایشگاه ژنتیک و مارکرهای مولکولی بخش تحقیقات غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر واقع در کرج انجام شد. بذر ژنوتیپ‌های مورد نظر (جدول ۱) در گلدان‌های پلاستیکی در شرایط گلخانه کشت و پس از دو هفته زمانی که گیاهان در مرحله ۳-۲ برگی بودند، برگ‌های آنها را جدا کرده، استخراج DNA از نمونه‌های برگی به روش CTAB انجام گرفت (Saghai-Maroof *et al.*, 1984). خصوصیات کمی و کیفی DNA استخراج شده، شامل غلظت و خلوص آن، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید. در این آزمایش تعداد ۴۵ نشانگر ریزماهواره مورد استفاده قرار گرفت (جدول۲). نشانگرهای مورد استفاده که مرتبط با نواحی گزارش شده QTLهای مرتبط با تحمل به شوری در گندم بودند (Sardouie-Nasab *et al.*, 2013; Shahzad *et al.*, 2012; Genc *et al.*, 2010; Byrt *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2007)، بر اساس نقشه فیزیکی گندم (Wheat-composite, 2004) (wheat.pw.usda.gov) تهیه و توالی پرایمرها نیز از سایت گرامینه (www.gramene.org) استخراج گردید. تکثیر نشانگرهای مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای تخصصی هر یک از ژن‌ها از طریق پی.سی.آر (PCR) صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر برای هر واکنش با استفاده از PCR Buffer (10X)، ۱۰پیکومول از هر آغازگر، یک واحد از آنزیم Taq polymerase، dNTPs ۰/۲ میلی-مولار، کلریدمنیزیم ۲ میلی‌مولار و ۵۰ نانوگرم از DNA هر نمونه برای هر واکنش انجام شد. جهت

انجام واکنش PCR برنامه حرارتی برای هریک از آغازگرها با توجه به دمای ذوب آغازگر (دمای اتصال) برای هر آغازگر استفاده گردید. برنامه حرارتی PCR به‌طور کلی به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال بسته به دمای اتصال نشانگرها به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در خاتمه یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم گردید. در این پژوهش دستگاه‌های ترموسایکلر Eppendorf و BIO-RAD مورد استفاده قرار گرفتند. محصولات حاصل از PCR پس از مخلوط شدن با ماده رنگی (بافر بارگذاری)، بصورت جداگانه درون چاهک‌های ژل بارگذاری گردیدند. در نهایت محصول حاصل از PCR بسته به ماهیت باندهای تولید شده و تفاوت طول باندها بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۶٪ تفکیک و رنگ-آمیزی ژل‌ها توسط اتیدیوم‌بروماید با غلظت µg/ml ۰/۵ صورت گرفت و سپس عکس‌برداری از ژل‌ها با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت (Uvitec BTS-20-MS) انجام شد و نمره‌دهی آلل‌ها با مقایسه با ارقام کنترل و مارکر وزنی به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) انجام و جهت آنالیز داده‌های محصولات پی.سی.آر، اطلاعات به‌دست‌آمده به نرم‌افزار آماری Excel وارد و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

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

$$MI = PIC.N.\beta$$

که در این فرمول‌ها: Pi فراوانی آلل i ام و n تعداد آلل N تعداد کل باندها برای هر نشانگر و β نسبت چندشکل برای هر نشانگر می‌باشند (Anderson *et al*., 1993; Powell *et al*., 1996). در نهایت تجزیه خوشه‌ای (کلاستر) بر اساس ماتریس تشابه جاکارد با استفاده از روش UPGMA و تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) با استفاده از نرم افزار NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 2000) انجام گرفت.

نتایج و بحث

بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیک (بیوماس) اختلاف معنی داری وجود داشت، این امر بیانگر وجود تنوع ژنتیکی زیاد بین مواد گیاهی مورد بررسی و احتمال وجود ساز وکارهای متفاوت بین آنها در واکنش به تنش شوری است. مقایسه میانگین دو ساله عملکرد دانه در شرایط تنش نشان داد که ژنوتیپ‌های شماره ۲۵، ۲۲ ،۲۰، ۲۱ و ۲۴ عملکرد بیشتری نسبت به شاهدهای متحمل (نارین، افق، ارگ، بم و سیستان) دارند و این لاین‌ها در شرایط نرمال نیز از عملکرد بالایی برخوردار بودند (جدول ۱). همچنین ژنوتیپ‌های شماره ۱۷ و ۱۶ و ارقام مغان ۳ و شیرودی در هر دو شرایط تنش و بدون تنش با اختلاف معنی دار، عملکرد کمتری نسبت به ارقام شاهد تولید نمودند. البته این اختلاف در شرایط تنش چشمگیرتر بود. ارقام بومی روشن، ماهوتی و سرخ تخم علیرغم برخورداری از عملکرد نسبتاً خوب در شرایط تنش، در شرایط بدون تنش عملکرد کمتری از ارقام و لاین‌های به نژادی متحمل به شوری داشتندکه این ناشی از پتانسیل محدود ارقام بومی در شرایط بهینه می باشد. بالاترین عملکرد بیولوژیک در هر دو شرایط محیطی مربوط به ارقام بومی ماهوتی و روشن و کمترین آن در شرایط تنش، مربوط به ژنوتیپ‌های شماره ۱۶، ۱۵و ۱۷ و ارقام مغان ۳ و شیرودی بود (جدول ۱). عملکرد دانه در گندم را به عنوان یکی از شاخص‌های مهم تحمل به تنش شوری گزارش شده است (Goudarzi & Pakniyat, 2008). به علت آنکه بالاترین و پایین‌ترین میانگین عملکرد در شرایط معمولی و تنش متعلق به ژنوتیپ ثابتی نبود لذا محاسبه شاخص‌های تحمل و حساسیت به تنش در ارزیابی و تعیین ژنوتیپ(های) برتر ضروری می‌باشد (Amini

et al., 2015; Askar *et al*., 2010). محاسبه شاخص‌های حساسیت و تحمل به تنش شوری برای صفت عملکرد دانه (میانگین دو سال) نشان داد که ژنوتیپ‌های ۲۵، ۲۰، ۲۲، ۱۳، ۲۱، ۲۴ در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها از مقادیر بالایی از شاخص‌های تحمل به تنش (STI)، شاخص میانگین بهره‌وری (MP) و شاخص میانگین هندسی عملکرد (GMP)، برخوردار بوده و نسبت به ارقام شاهد متحمل (سیستان، افق، ارگ و بم) برتر می باشند (جدول ۱). ژنوتیپ‌های مذکور ضمن احراز بالاترین مقادیر STI، MP و GMP در بین ژنوتیپ‌های تحت مطالعه، از لحاظ میانگین عملکرد در شرایط تنش، پرمحصول ترین ژنوتیپ‌ها و در شرایط نرمال نیز از عملکرد بالایی برخوردار بودند.

جدول ۱. شاخص‌های حساسیت و تحمل به تنش و مقایسه میانگین عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیک (بیوماس) در ژنوتیپ‌های گندم در شرایط تنش و بدون تنش شوری

Gen No	Pedigree	شرایط تنش Stress		شرایط نرمال Non stress		شاخص‌های تحمل و حساسیت به تنش Tolerance and susceptibility indices				
		YLD_S	BY_S	YLD_N	BY_N	GMP	MP	STI	SSI	TOL
1	Sistan (Check1)	4.763	12.412	7.869	18.083	6.122	6.316	0.755	1.178	3.107
2	Mahooti(Local variety)	4.619	14.249	6.192	18.772	5.348	5.405	0.576	0.758	1.573
3	Sorkhtokhm(Local variety)	4.562	12.675	6.639	17.844	5.504	5.601	0.610	0.934	2.077
4	Neishabour	4.732	11.746	7.397	18.122	5.916	6.064	0.705	1.076	2.665
5	Arg (Check2)	4.962	12.730	7.400	16.806	6.060	6.181	0.739	0.983	2.438
6	Kavir	4.635	12.236	7.075	17.606	5.726	5.855	0.660	1.030	2.441
7	Bam (Check3)	4.833	11.552	7.122	16.317	5.867	5.977	0.693	0.960	2.290
8	Roshan(Local variety)	4.663	14.637	6.013	18.883	5.295	5.338	0.565	0.670	1.350
9	Moghan3	3.416	10.230	6.241	13.978	4.617	4.829	0.429	1.351	2.825
10	Shiroodi	3.433	10.509	6.218	13.600	4.620	4.825	0.430	1.337	2.786
11	Ofough(Check4)	5.008	12.487	7.397	17.817	6.086	6.202	0.746	0.964	2.389
12	Sakha 8/Darab#2//1-66-22	4.788	13.285	7.575	18.217	6.023	6.182	0.730	1.098	2.787
13	1-66-22/3/Alvd//Aldan/Ias58	5.309	13.280	7.608	18.128	6.355	6.459	0.813	0.902	2.299
14	Desprez80/Rsh//1-66-22/Inia	4.568	10.999	7.233	17.972	5.748	5.901	0.665	1.100	2.665
15	1-66-22/Passarinho/3/Vee/Nac//1-66-22	4.417	9.937	6.692	15.128	5.437	5.554	0.595	1.015	2.276
16	Sissons/ 3/Alvd//Aldan/Ias58	2.986	9.691	5.911	13.744	4.201	4.448	0.355	1.477	2.925
17	W3918A/Jup//Gru90-201736/3/Moghan1/Falat	3.612	10.167	6.768	14.378	4.944	5.190	0.492	1.392	3.156
18	Mrn/Catbird	4.993	12.606	7.172	16.611	5.984	6.083	0.721	0.907	2.179
19	Gv/D630//Ald"s"/3/Azd/4/Rsh/5/Kauz/Stm	5.011	12.978	7.178	16.694	5.997	6.094	0.724	0.901	2.167
20	1-66-22/3/Kauz*2/Opata//Kauz	5.317	12.755	7.728	17.867	6.410	6.523	0.827	0.932	2.412
21	1-66-22/SNH.9	5.314	13.964	7.327	17.139	6.240	6.320	0.784	0.820	2.013
22	Atrak/3/Chen/Aeg.sq(Taus)//BCN CMBW98, Y5554	5.322	12.423	7.617	16.939	6.367	6.469	0.816	0.900	2.296
23	Kauz*2/Opata//Kauz/3/Sakha 8/4/TAM 200	5.106	12.392	7.000	16.456	5.978	6.053	0.719	0.808	1.895
24	Pishtaz/Karchia	5.312	13.295	7.111	18.039	6.146	6.211	0.760	0.755	1.799
25	Pishtaz/Karchia	5.517	13.317	7.706	17.750	6.520	6.611	0.856	0.848	2.189
	Mean	4.688	12..262	7.048	16.916	5.740	5.868	0.671	1.004	2.360
	LSD5%	0.648	1.553	0.646	0.628					

YldS & YldN: به ترتیب عملکرد دانه (تن در هکتار) در شرایط بدون تنش و تنش؛ YldS &YldN: به ترتیب عملکرد بیولوژیک (تن درهکتار) در شرایط بدون تنش و تنش.

BY_S and BY_N: Biological yield in stress and non-stress conditions respectively (t ha^{-1}); Yld_S &Yld_N: Grain yield in stress and non-stress conditions respectively (t ha^{-1})

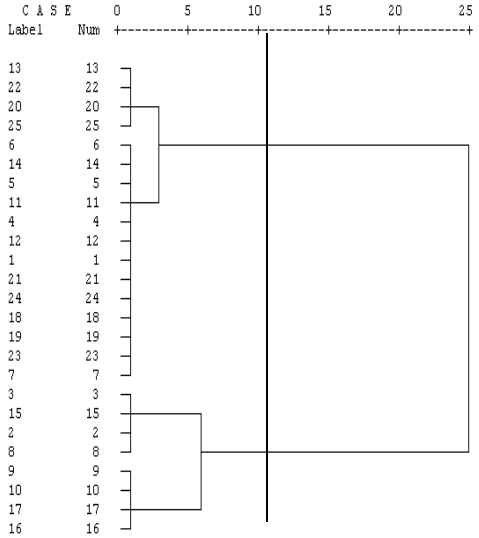
در مقابل ژنوتیپ‌های شماره ۱۶ و ۱۷ و ارقام شیرودی و مغان ۳ نیز بر اساس این شاخص‌ها به عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها شناخته شدند. این ژنوتیپ‌ها از لحاظ میانگین عملکرد در شرایط تنش وبدون تنش در

گروه ژنوتیپ‌های کم محصول قرار داشتند کمترین عملکرد در هر دو شرایط محیطی (تنش و بدون تنش) مربوط به لاین شماره ۱۶ بود (جدول ۱).

محاسبه شاخص حساسیت به تنش (SSI) نشان داد که ژنوتیپ‌های ۸ (روشن)، ۲ (ماهوتی)، ۲۴، ۲۳، ۲۱، ۲۵، ۱۹، ۱۳و ۱۸ در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها از حساسیت کمتری برخوردار بودند. این ژنوتیپ‌ها علاوه بر احراز مقدار کمی SSI، فقط در شرایط تنش از لحاظ میانگین عملکرد درگروه ژنوتیپ‌های پر محصول قرار داشتند. بررسی میزان تحمل ژنوتیپ‌ها با استفاده از شاخص تحمل (TOL) حاکی از برتری ژنوتیپ‌های روشن، ماهوتی، ۲۴ ،۲۳ و ۲۱ در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها بود. گزینش ژنوتیپ‌ها بر اساس TOLبا SSI مطابقت داشت در کل شاخص‌های TOL و SSI در شناسایی ژنوتیپ-هایی که در هر دو محیط تنش و بدون تنش دارای عملکرد مناسب باشند، نسبتاً موفق نبودند، در مقابل شاخص‌های STI، MP وGMP به لحاظ گزینش ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا در هر دو شرایط بدون تنش و تنش از کارایی بالایی برخوردار می‌باشند (جدول ۱).

Kanafi *et al.* (2014) در مطالعه ژنوتیپ‌های گندم در شرایط تنش شوری و نرمال شاخص‌های GMP، MP و STI را مناسب‌ترین شاخص‌ها برای گزینش ارقام معرفی نمودند.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر مبنای شاخص‌های GMP، MP و STI و عملکرد در دو شرایط محیطی تنش و بدون تنش با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش وارد (Ward's method) انجام و ژنوتیپ‌ها در ۴ گروه قرار گرفتند (شکل۱). ژنوتیپ‌های ۲۵، ۲۲، ۱۳ و ۲۰ در گروه اول قرار گرفتند که این ژنوتیپ‌ها دارای عملکرد بالا در هر دو شرایط تنش و بدون تنش بوده و بالاترین مقدار MP، GMP و STI را به خود اختصاص دادند و به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به تنش با عملکرد پایدار و بالا تعیین شدند. در کلاستر چهارم، ژنوتیپ‌های ۱۶، ۱۷ و ۹ و ارقام مغان ۳ و شیرودی قرار دارند و برخلاف گروه اول به عنوان ژنوتیپ‌های حساس به تنش تعیین شده و از مقادیر پایینی از شاخص‌های MP، GMP و STI و عملکرد دانه در هر دو شرایط برخوردار می‌باشند.



شکل ۱. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گندم بر اساس شاخص‌های MP، STI و GMP و میانگین عملکرد دانه در شرایط تنش شوری و بدون تنش با استفاده از روش Ward

ارقام بومی ماهوتی (ژنوتیپ ۲)، روشن (ژنوتیپ ۸)، و سرخ تخم (ژنوتیپ ۳) همراه با ژنوتیپ ۱۵، به‌طور جداگانه در گروه سوم قرار گرفتند. این ژنوتیپ‌ها از عملکرد نسبتاً بالا و قابل قبول در شرایط تنش برخوردار

بوده ولی به علت محدود بودن ظرفیت پتانسیل تولید، دارای عملکرد پایینی در شرایط بدون تنش بودند. بقیه ژنوتیپ‌ها که ارقام شاهد ارگ (ژنوتیپ ۵)، افق (ژنوتیپ ۱۱)، بم (ژنوتیپ ۷)، سیستان (ژنوتیپ ۱) و نیشابور (ژنوتیپ ۴) نیز شامل می‌گردند، در گروه دوم قرار گرفتند که دارای عملکرد بالا و مقادیر بالایی از شاخص‌های فوق بوده ولی نسبت به ژنوتیپ‌های کلاستر اول در وضعیت پایین‌تر (نیمه‌متحمل) قرار دارند، در این گروه ژنوتیپ‌های ۲۱، ۲۳ و ۲۴ هر چند از نظر عملکرد در شرایط تنش همانند گروه اول بوده ولی از نظر عملکرد شرایط بدون تنش و شاخص‌های MP، GMP و STI در وضعیت پایین‌تری بودند و به همین علت از آن گروه تفکیک شدند.

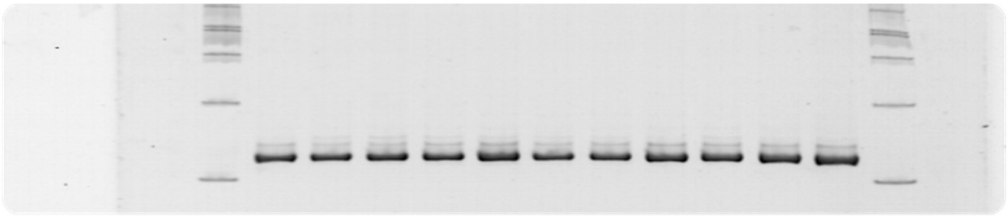
نتایج بررسی مولکولی

در این بررسی از تعداد ۴۵ جفت نشانگر ریزماهواره (جدول ۲) مورد استفاده بر روی ۲۵ ژنوتیپ گندم، برای تعداد ۸ نشانگر (wmc261، wmc109، gwm515، wmc11، wmc296، gwm609، gwm624 و barc48) باندی مشاهده نشد و تعداد ۱۰ نشانگر (cfa2058، cfa212، gwm328، gwm674، wmc206، barc206، barc196، wmc416، gwm10 و wmc96) نیز فقط یک باند مونومورف که قابل امتیازدهی نبود، تولید نمودند. لذا در مجموع تعداد ۲۷ جفت نشانگر با الگوی نواربندی چندشکل (پلی‌مورف) برای بررسی‌های مولکولی ژنوتیپ‌های گندم استفاده و ارزیابی‌ها براساس آنها صورت گرفت. به عنوان نمونه، شکل ۲-الف، الگوی نواری حاصل از جفت آغازگر cfa2058 که فقط یک باند مونومورف تولید نمود، در تعدادی از ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد. در این نشانگرها در مجموع ۹۵ آلل مشاهده شد که ۸۹ آلل دارای چندشکلی بودند به طوریکه تعداد آلل برای هر آغازگر از دو تا هفت آلل متغیر و میانگین تعداد آلل ۳/۵۲ برای هر جفت نشانگر بود (جدول ۲). نشانگر gwm47 با تعداد هفت آلل بیشترین تعدادآلل را در میان آلل‌های تولیدی توسط آغازگرها داشت. الگوی نواربندی آغازگرهای gwm47 و gwm372 در شکل ۲-ب ارائه شده است. در مطالعه Shahzad *et al.* (2012) با ۴۵ نشانگر ریزماهواره بر روی ۱۸۸ ژنوتیپ گندم، تعداد آلل‌ها از یک تا سه و میانگین ۲/۰۷ آلل برای هر مکان ژنی بود. در بررسی انجام شده توسط Esmaili *et al.* (2012)، نیز تعداد آلل‌ها بین دو تا هفت متغیر بود و میانگین تعداد آلل‌ها برای هر لوکوس ۴/۶ محاسبه شد.

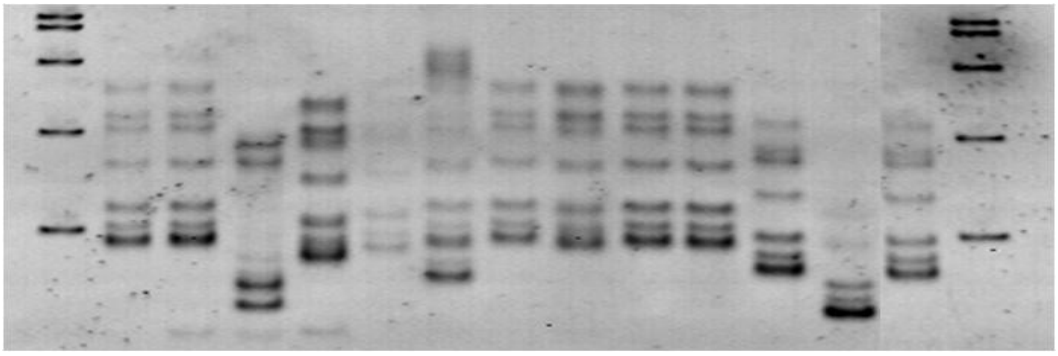
بررسی Ogbayanna *et al.* (2007) با استفاده از ۵۴ نشانگر SSR در تعیین ژنوتیپ ۲۸ لاین و رقم گندم، ۳۸۰ آلل با میانگین هفت آلل برای هر لوکوس گزارش کردند. اختلافات در گزارشات متعدد را می‌توان به عواملی مانند میزان تنوع و اندازه نمونه‌ها، روش آشکارسازی و ارزیابی اندازه قطعات تکثیر شده نسبت داد. تعداد آلل‌های تکثیر شده از مکان‌های ژنی، تحت تأثیر مستقیم میزان هتروزیگوسیتی، فراوانی ژنوتیپی و محتوای اطلاعات چندشکلی آن ریزماهواره می باشد. با افزایش تعداد آلل تکثیر شده در یک مکان، میزان اطلاع‌رسانی آن مکان برای تعیین تنوع ژنوتیپ‌ها افزایش می‌یابد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) هر آغازگر، به طور جداگانه محاسبه گردیدکه نتایج در جدول ۲ آمده است.

نشانگرهای gwm291، gpw345 و gwm249 با بیشترین میزان PIC (به ترتیب ۰/۴۵۴، ۰/۴۳۵ و ۰/۴۳۵) و نشانگرهای gwm312 و cfa2170.2 با داشتن بیشترین MI (۱/۱۹)، قدرت تفکیک بالاتری در مقایسه با سایر آغازگرها داشتند.کمترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۰۷۷) و شاخص نشانگر (۰/۱۵) برای نشانگر barc84 به‌دست آمد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی و میانگین شاخص نشانگر برای کل ۲۷ نشانگر مورد استفاده به ترتیب برابر ۰/۲۵۸ و ۰/۷۹ محاسبه شد. شاخص MI یک معیار کارایی نشانگر در تخمین چندشکلی است به‌طوری‌که MI می‌تواند به‌عنوان یک معیارکلی در

پیشگویی کارایی نشانگر در ژرم‌پلاسم استفاده شود (Powell *et al*., 1996). معیار PIC یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه نشانگرها از نظر قدرت تمایز آنها است. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد و بیانگر قدرت تفکیک بالای آن نشانگر است (Carvalho *et al*., 2009). میانگین تعداد آلل، PIC و MI مشاهده شده در جایگاه‌های ریزماهواره، بیانگر کارآمدی نشانگرهای استفاده شده برای تمایز ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و وجود تنوع بین ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، نشانگرهای gwm291، gpw345، wmc249، barc353.1، cfa2170.2، gwm339 و wmc326 به‌طور نسبی از محتوای چندشکلی و شاخص نشانگر بیشتری برخوردار بوده و در نتیجه از قدرت تفکیک بالاتری در مقایسه با سایر آغازگرها برخوردار می‌باشند و می‌توانند به عنوان نشانگرهای مفید جهت بررسی تنوع ژنتیکی برای تنش شوری استفاده شوند. در مطالعه Shahzad *et al*. (2012) با استفاده از ۴۵ نشانگر SSR در گندم، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۱۳ تا ۰/۶۶ متغیر بود. در یک مطالعه دیگر Thomas & Bebeli (2010)، تنوع ژنتیکی گونه‌های آژیلوپس را بررسی و میانگین PIC را ۰/۲۲ و میانگین شاخص نشانگر را ۳/۷۱ گزارش کردند.



(الف)



(ب)

شکل ۲. الگوی نواربندی آغازگرهای cfa2058 (الف) و gwm47 (ب) در تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم مطالعه شده

جدول ۲. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)، شاخص نشانگر (MI) و تعداد آلل‌های تکثیری نشانگرهای ریزماهواره در ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی

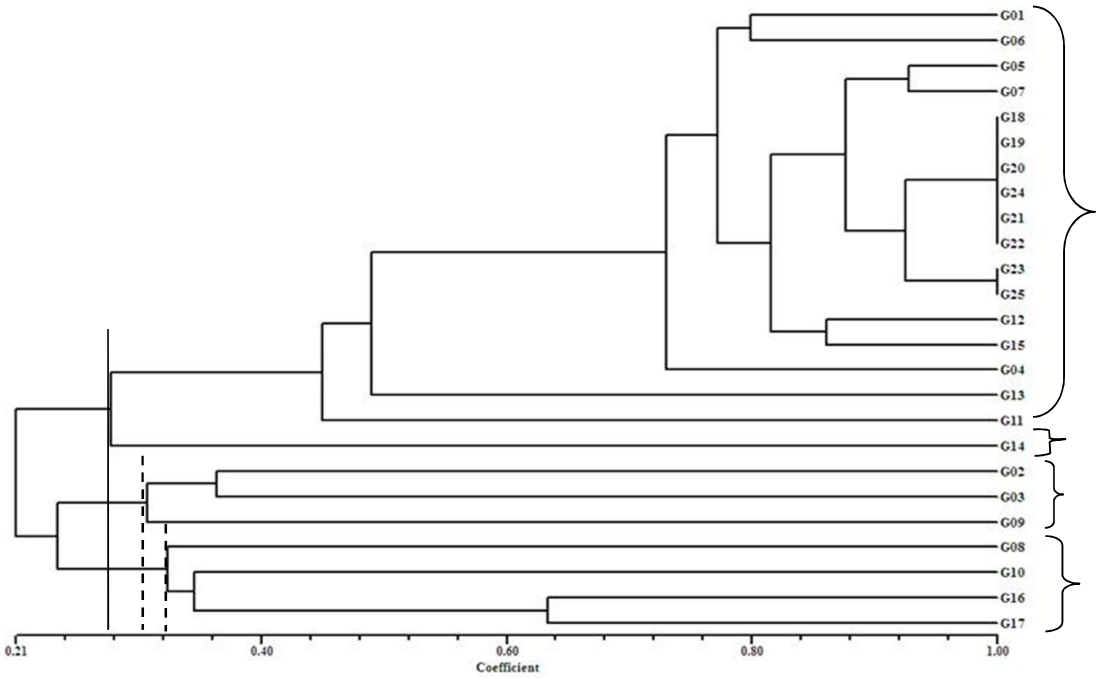
نشانگر	تعداد نوارها	تعداد نوارهای چند شکل	*PIC*	*MI*
cfa2043	3	2	0.269	0.54
barc353.1	3	3	0.373	1.12
gwm445	3	3	0.322	0.97
gpw2206	4	4	0.226	0.9
gwm47	7	7	0.148	1.04
gwm294	4	4	0.224	0.9
gwm372	4	4	0.200	0.8
gwm339	3	3	0.350	1.05
gwm249	3	2	0.435	0.87
gwm95	3	3	0.324	0.97
gwm312	5	5	0.237	1.19
wmc170	4	4	0.200	0.8
gwm108	3	3	0.222	0.67
wmc326	3	3	0.350	1.05
wmc291	3	3	0.220	0.66
cfa2170.1	2	2	0.147	0.29
cfa2170.2	3	3	0.397	1.19
wmc687	4	4	0.200	0.8
barc84	3	2	0.077	0.15
gwm194	3	3	0.186	0.56
gpw345	2	2	0.435	0.87
cfd9	5	5	0.183	0.92
cfd18	6	6	0.117	0.7
cfd183	2	2	0.365	0.73
wmc405	3	2	0.172	0.34
gwm291	2	2	0.454	0.91
gwm410	5	3	0.145	0.44
تعداد کل	95	89	6.978	21.41
میانگین	3.52	3.3	0.258	0.79

در ارزیابی ۵۵۱ ژنوتیپ بومی و ۲۱ رقم تجاری و لاین اصلاحی جو توسط Shuorvazdi *et al.* (2014) با استفاده از ۴۱ جفت آغازگر ریزماهواره، در مجموع ۲۲۱ آلل با دامنه دو تا ۱۴و میانگین پنج آلل به ازای هر جایگاه مشاهده گردید. در مطالعه آنها میزان PIC برای نشانگرها بین ۰/۰۵ تا ۰/۹ با میانگین ۰/۵۱ متغیر بود. علت تفاوت در میانگین تعداد آلل در مطالعات مختلف، به دلیل تفاوت در تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، پایه ژنتیکی آنها و جایگاه ژنومی نشانگر مورد استفاده است. تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم UPGMA و روش ضریب تشابه جاکارد با استفاده از داده‌های SSR با استفاده از نرم افزار NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 2000) انجام شد. پس از به دست آوردن ماتریس شباهت و کوفنتیک، توسط نرم افزار NTSYS ضریب همبستگی بین این دو ماتریس محاسبه و با توجه به معنی‌دار بودن ضریب همبستگی کوفنتیک (r=۰/۹۸۷) در سطح احتمال یک درصد، مناسب بودن روش تجزیه خوشه‌ای مشخص شد. ارزش‌های تشابه بین جفت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بین ۰/۰۸ تا ۱ متغیر بود که نشان‌دهنده تنوع بالای موجود در سطح ژنوم این ژنوتیپ‌ها بود.

میانگین ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌ها نیز ۰/۴۷ به‌دست آمد. کمترین تشابه بین ژنوتیپ‌های ۱ (سیستان، شاهد متحمل) و ژنوتیپ ۹ (مغان ۳) و بین ژنوتیپ ۱۱ (افق، شاهد متحمل) و ژنوتیپ ۱۰ (شیرودی) با مقدار ۰/۰۸ به‌دست آمد. ضریب تشابه

بین ژنوتیپ ۲۳ (لاین متحمل) و رقم شیرودی نیز ۰/۰۹ به‌دست آمد. لازم به ذکر است که بر اساس نتایج مزرعه‌ای هر دو رقم مغان۳ و شیرودی جز ژنوتیپ‌های حساس به شوری در این مطالعه بودند (جدول ۱). بیشترین ضریب تشابه (با مقدار یک) نیز بین ژنوتیپ-های ۱۸، ۲۰، ۲۲ و ۲۴ حاصل شد که این ژنوتیپ‌ها همان‌طوری‌که قبلاً در نتایج ارزیابی مزرعه‌ای نیز مشاهده شد از لاین‌های متحمل به شوری می‌باشند.

تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی، ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه کلی طبقه‌بندی کرد. در گروه اول ژنوتیپ‌های که بیشترین تشابه را داشتند و شامل لاین‌های متحمل به شوری (ژنوتیپ‌های شماره ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴ و ۲۵) و ارقام شاهد: بم (ژنوتیپ ۷)، سیستان (ژنوتیپ ۱)، ارگ (ژنوتیپ ۵) و افق (ژنوتیپ ۱۱) بود. این گروه در یک کلاستر در بالای دندروگرام مشاهده می‌شوند. در این گروه رقم شاهد افق (ژنوتیپ ۱۱) و ژنوتیپ ۱۳ فاصله ژنتیکی بیشتری با بقیه ژنوتیپ‌ها داخل گروه داشتند به‌طوری-که در ناحیه میزان ضریب تشابه حدود ۰/۵ از بقیه جدا می‌شدند و در این ناحیه قابل تفکیک به گروه‌های جداگانه بودند. همین امر به خوبی در وضعیت قرارگیری آنها در دندروگرام مربوطه قابل رویت می-باشد (شکل ۳). لاین شماره ۱۴ به علت قرابت و تشابه ژنتیکی کم و فاصله زیاد با سایر لاین‌های اصلاحی از بقیه تفکیک و گروه جداگانه‌ای به خود اختصاص داد و به تنهایی در گروه دوم قرار گرفت. این لاین، در شجره خود گندم زمستانه Desprez80 را دارد که متفاوت از بقیه بوده و نسبت به بقیه لاین‌های اصلاحی مورد بررسی دیررس‌تر است (جدول ۱). در مطالعه انجام شده توسط Javdekar *et al.* (2011)، ژنوتیپ های گندم مورد مطالعه توسط نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با تحمل به شوری به دو گروه عمده گروه‌بندی شدند.



شکل ۳. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گندم براساس داده‌های مولکولی با استفاده از روش جاکارد و الگوریتم UPGMA

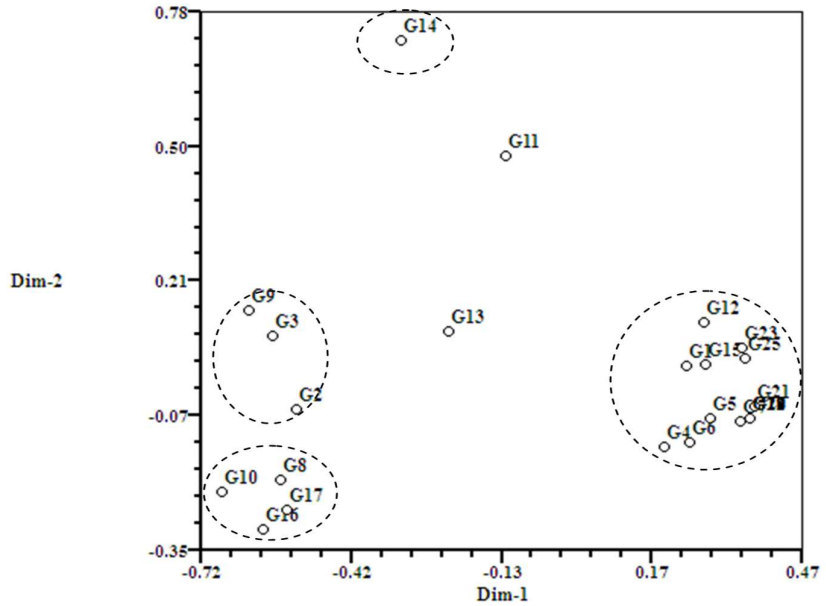
نکته دیگر در این طبقه‌بندی جدا شدن ارقام بومی ماهوتی (ژنوتیپ ۲)، روشن (ژنوتیپ ۸) و سرخ تخم (ژنوتیپ ۳) از ارقام شاهد ارگ (ژنوتیپ ۵)، بم (ژنوتیپ ۷) و افق (ژنوتیپ ۱۱) و سایر لاین‌های اصلاحی متحمل است که شاید ناشی از متفاوت بودن مارکرهای مرتبط به تحمل شوری متفاوت در آنها است. به عبارتی می‌توان نتیجه گرفت که ارقام بومی متحمل با ارقام و لاین‌های اصلاحی متحمل از نظر نشانگرهای مرتبط به شوری مورد استفاده متفاوت عمل نموده و از نظر این نشانگرها، ساختار ژنتیکی متفاوت دارند. ارقام بومی ماهوتی (ژنوتیپ ۲) و سرخ تخم (ژنوتیپ ۳) همراه رقم مغان۳ (ژنوتیپ ۹) در گروه سوم قرار گفتند که ژنوتیپ‌های این گروه را از ناحیه میزان تشابه ژنتیکی حدود ۰/۳۵ می توان به دو زیرگروه ارقام بومی متحمل (ماهوتی و سرخ تخم) و رقم گندم حساس به شوری مغان۳ تقسیم‌بندی نمود (شکل ۳). در نهایت ژنوتیپ‌های حساس به شوری ۱۶، ۱۷و ۱۰ (شیرودی) همراه با رقم بومی روشن (ژنوتیپ ۸) در گروه چهارم قرار دارند که این ژنوتیپ‌ها را از ناحیه با میزان ضریب تشابه حدود ۰/۳۵، باز می‌توان به دو زیرگروه حساس (ژنوتیپ‌های ۱۶، ۱۷ و شیرودی) و متحمل (روشن) تفکیک نمود (شکل ۳). برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های گندم در کشور هند، Vaja Komal *et al.* (2016) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با شوری در گندم بیان کردند که ژنوتیپ گندم متحمل به شوری KH-65 در گروه متمایز از دیگر ژنوتیپ های مورد مطالعه قرار دارد. تنوع ژنتیکی ۸۸ ژنوتیپ جو شامل ارقام بومی و تجاری با منشأ چین و گندم های تجاری با منشأ غیر چین با استفاده از ۳۳ نشانگر SSR، توسط Jia *et al.* (2010) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از گروه‌بندی با استفاده از الگوریتم UPGMA ژنوتیپ‌ها را به دو گروه تقسیم نمود، به‌طوری‌که در حدود ۹۰ درصد از ژنوتیپ‌های بومی چین در گروه دو و بقیه ژنوتیپ‌های بومی چین و همچنین ارقام تجاری منشاء غیر چین در گروه یک قرار گرفتند.

نتایج تجزیه به بردارهای اصلی (PCOA) با استفاده از داده‌های مولکولی و براساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از نرم افزار NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 2000) (جدول ۳) نشان داد که سه بردار اصلی اول، دوم و سوم به ترتیب با ۳۳/۰۲ ، ۹/۰۶ و ۸/۹۸ مجموعا بیش از ۵۱ درصد تغییرات مولکولی کل را توجیه نمودند که توجیه این مقدار تغییرات مولکولی توسط سه بردار اول نشان دهنده ارتباط بین نشانگرهای مورد استفاده و یا به عبارت دیگر نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق دارای پراکنش نسبتاً متوسط در ژنوم می‌باشند (Mohammadi & Prasanna, 2003). تجزیه به بردارهای اصلی از روش های آماری چندمتغیره متداول در بررسی روابط ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها می‌باشد که به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای بکار می‌رود. نمایش گرافیکی و نمودار دو بعدی بر اساس بردارهای اول و دوم در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطوری‌که مشاهده می‌شود. نتایج تجزیه به بردارهای اصلی موید گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای بود و توانست ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی از هم تفکیک نماید. به‌طوری‌که که گروه‌های حاصل از دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس تجزیه خوشه‌ای در نمودار تجزیه به بردارهای اصلی نیز دیده می‌شوند (شکل ۴). اختلاف بین گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به بردارهای اصلی در جدا شدن ژنوتیپ‌های ۱۱ (افق) و ۱۳ از سایر ژنوتیپ‌های گروه اول (گروه اول تجزیه خوشه‌ای، شکل ۳) می‌باشد، علت این امر همان‌گونه که ذکر شد فاصله ژنتیکی بیشتر این ژنوتیپ‌ها با سایر ژنوتیپ‌های داخل گروه است به همین علت در دندروگرام تجزیه خوشه‌ای نیز این ژنوتیپ‌ها از ناحیه با میزان ضریب تشابه حدود ۰/۵ از بقیه ژنوتیپ‌های گروه مربوطه جدا می‌شدند. در مجموع نتایج تجزیه به بردارهای اصلی با تجزیه خوشه‌ای هم‌خوانی زیادی داشت (شکل‌های ۳ و ۴).

جدول ۳. مقدار ویژه، در صد واریانس هر مولفه و درصد واریانس تجمعی برای ده بردار اصلی

بردار اصلی	مقدار ویژه	درصد واریانس	درصد واریانس تجمعی
1	4.213	33.02	33.02
2	1.155	9.06	42.08
3	1.146	8.98	51.06
4	0.927	7.27	58.33
5	0.63	5.98	64.31
6	0.738	5.79	70.1
7	0.636	4.98	75.08
8	0.584	4.58	79.65
9	0.561	4.4	84.05
10	0.530	4.15	88.2

در خصوص عدم پراکنش و روی هم افتادن بیشتر ژنوتیپ‌های گروه اول، می توان گفت یکی از دلایل احتمالی این موضوع می‌تواند شباهت زیاد بین ژنوتیپ-ها باشد به طوریکه شش ژنوتیپ ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۴ دارای تشابه صدرصد بودند (شکل ۳). از جمله دلایل دیگر این موضوع مربوط به نشانگر و پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق بود که به دلیل عدم پوشش مناسب ژنومی و این‌که تنها قسمت‌های خاصی از ژنوم (نقاط مرتبط با مکان‌های مرتبط با صفت تحمل به شوری) را مورد پوشش قرار داده بودند قادر به تفکیک مناسب ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش‌های چند متغیره مورد استفاده (از جمله PCOA) نبودند. بنابراین، این احتمال وجود دارد که با استفاده از تعداد پرایمر بیشتر و یا نشانگرهای دیگر بتوان تمایز و پراکنش خوبی از ژنوتیپ‌های داخل این گروه به‌دست آورد. بررسی تنوع ۸۸ ژنوتیپ جو شامل ارقام بومی و تجاری با استفاده از ۳۳ نشانگر SSR، توسط Jia *et al.* (2010) نشان داد که در تجزیه به بردارهای اصلی، دو بردار اول و دوم ۴۳/۲ درصد واریانس کل را توجیه می‌کنند و ژنوتیپ‌ها براساس این دو بردار، به دو گروه مجزا تقسیم شدند به‌طوری‌که ژنوتیپ‌های بومی چین در هر دو گروه و ارقام تجاری چین و غیر چین تقریباً از هم جدا شدند.



شکل ۴. نمودار گرافیکی دو بعدی ژنوتیپ‌های گندم بر اساس دو بردار اول حاصل از تجزیه به بردارهای اصلی با استفاده از داده‌های مولکولی حاصل از نشانگرهای SSR

در مجموع با توجه به نتایج حاصله می‌توان اظهار داشت که تجزیه به بردارهای اصلی به دلیل توجیه درصد واریانس بالای دو مولفه اول، توانست تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی نمایش دهد، به‌طوری‌که گروه‌بندی بر اساس تجزیه به بردارهای اصلی با گروه-بندی بر اساس تجزیه خوشه‌ای مطابقت زیادی داشت و فاصله ژنوتیپ‌ها در این نمودار با ماتریس تشابه ژنتیکی (داده ها نشان داده نشده اند) شباهت داشت. هم چنین تجزیه خوشه و بردارهای اصلی بر اساس داده‌های مولکولی، ضمن مطابقت و هم‌خوانی نسبی با نتایج حاصله از ارزیابی مزرعه‌ای به خوبی توانستند ژنوتیپ‌های متحمل (ارقام بومی و لاین‌های اصلاحی متحمل) و حساس را از هم تفکیک نمایند و نشانگرهای SSR به‌خوبی توانسته‌اند تنوع و اختلاف موجود میان ژنوتیپ‌های گندم را آشکار سازند. از این تنوع و فواصل ژنتیکی می‌توان در اصلاح گندم استفاده کرد. این امر نشان دهنده توانایی و کارایی مناسب نشانگرهای ریزماهواره در تمایز ژنوتیپ‌های گندم است. توجه به این امر مهم است که اگر بین گروه‌بندی حاصل از داده‌های مولکولی و صفات زراعی و فیزیولوژیکی هماهنگی وجود نداشته باشد، ایرادی به دندروگرام حاصل از داده‌های مولکولی وارد نمی‌گردد. زیرا که صفات کمی از توارث‌پذیری پایینی برخوردار بوده و محصول اثر کل ژنوم به همراه تأثیر محیط می‌باشند درصورتی‌که نشانگرهای مولکولی مانند SSR به دلیل تعداد محدود آغازگر، احتمال ارزیابی بخش بسیار کوچکی از ژنوم گیاه را دارد که احتمال این که ژن‌های مدنظر ما را پوشش دهد بسیار پایین است. همچنین امکان دارد بخشی از ژنوم که توسط آغازگرهای SSR تکثیر می‌گردد، حاوی ژن‌های کدکننده صفات زراعی و فیزیولوژیکی نباشد (Soleimani *et al*., 2002).

REFERENCES

Ahmad M, Shahzad A, Iqbal M, Asif M, Hirani AH (2013) Morphological and molecular genetic variation in wheat for salinity tolerance at germination and early seedling stage. Aust. J. Crop Sci. 7(1): 66-74.

Amini A, Amirnia A, Ghazvini H (2015) Evaluation of salinity tolerance in bread wheat genotypes under field conditions. Seed and Plant Improvement Journal, 31(1): 95-115.

Anderson JA, Church JE, Autrique SD, Thanksley S, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage map. Genome, 36(1): 181-188.

Askar M, Yazdansepas A, Amini A (2010) Evaluation of winter and facultative bread wheat genotypes under Irrigated and post-anthesis drought stress conditions. Seed and Plant Improvement Journal, 26(1): 313-329.

Bakhshandeh A, Keshavarz A, Khalili Y (2010) Global Agriculture and cereal production prospects on the horizon 2050. In: Proceeding of the 11th Iranian Congress of Crop Production and Breeding, Iran.

Byrt CS, Platten JD, Spielmeyer W, James RA, Lagudah ES, Dennis ES, Tester M, Munns R (2007) HKT 1;5-like cation transporters linked to Na+ exclusion loci in wheat, *Nax2* and *KNa1*. Plant Physiol. 143: 1918–1928.

Carvalho A, Lima-Brito J, Maces B, Guedes-Pinto H (2009) Genetic diversity and variation among botanical varieties of old Portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. Biochem. Genet. 47: 70-74.

Cheraghi SAM, Hasheminejhad Y, Rahimian MH (2009) An overview of the salinity problem in Iran: Assessment and monitoring technology. In: Advances in the assessment and monitoring of salinization and status of biosaline agriculture reports of expert consultation held in Dubai, United Arab

Emirates, 26–29 November 2007. World Soil Resources Reports No. 104. FAO, Rome, p 21-22.

Donini P, Stephenson P, Bryan GY, Kobner RMD (1998) The potential of microsatellite for high throughput genetic diversity assessement in wheat barley. Gen. Res. Crop Evo. 45: 415-421.

Emon RM, Islam MM, Halder J, Fan Y (2015) Genetic diversity and association mapping for salinity tolerance in Bangladeshi rice landraces. Crop J. 3: 440-444.

Esmaili K, Mehrabi AA, Etminan AR, Azizian E, Mansoury S, Hossein Abadi M, Haidarnezhadian M (2012) Study of genetic diversity in *Aeghilops tauschii* accessions using SSR marker. Genetics-novin 7(4): 333-342.

Fernandez, GCJ (1992) Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. pp. 257-270. In: Kuo, C.G. (Ed.). Proceedings of International Symposium on Adaptation of Food Crops to Temperature and Water stress, AVRDC, Taiwan.

Fischer R, Maurer R (1987) Drought resistant in spring wheat cultivars. I: Grain Yield response. Aus. J. Agric. Res. 29: 895-97.

Genc Y, Oldach K, Verbly A P, Lott G, Hassan M, Tester M, Wallwork H, McDonald GK (2010) Sodium exclusion QTL associated with improved seedling growth in bread wheat under salinity stress. Theo. Appl. Genet. 121(5): 877-94.

Goudarzi M, Pakniyat DH (2008) Evaluation of wheat cultivars under salinity stress based on some agronomic and physiological traits. Journal of agriculture and social sciences, 4: 35-38.

Javdekar V, Singh NP, Kumar P (2011) Monograph: Study the effect of salt stress on morpho-molecular characters of wheat. International Journal of Scientific and Research Publications. p37.

Jia, QJ, Zhu JH, Wang JM, Yang JM (2010) Fusarium head blight evaluation and genetic diversity assessment by simple sequence repeats in 88 barley cultivars and landraces. In: Proceedings of the 10th International Barley Genetics Symposium (Ceccarelli, S. and Grando, S., Eds.) pp. 298-311, ICARDA, Allepo, Syria.

Kanafi M L, Dehghani H, Dvorake J (2015) Response of salt stress in some bread wheat varieties by tolerance indices. Cereal Res. 5(2): 145-157.

Ma L, Zhou E, Hou N (2007) Genetic analysis of salt tolerance in a recombinant inbred population of wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica, 153: 109-117.

Meszaros K, Ildiko K, Csaba K, Judit B, Laszlo L, Zoltan B (2007) Efficiency of different marker systems for genotype fingerprinting and for genetic diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.). S. Afr. J. Bot. 73: 43-48.

Moghaieb REA, Abdel-Hadi AA, Talaat NB (2011) Molecular markers associated with salt tolerance in Egyptian wheats. Afr. J. Biotechnol. 10(79): 18092-18103.

Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. Crop Sci. 43:1235-1248.

Ogbayanna F, Imtiaz A, Depauw R (2007) Haplotype diversity of pre-harvest sprouting QTLs in wheat. Genome 50: 107-118.

Powell W, Morgante M, Ander C, Hanafey M, Vogel J, Tingy S, Rafalaski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. Mol. Breed. 2(3): 225-238.

Rahaie M, Gomarian M, Alizadeh H, Malboobi MA, Naghavi MR (2012) The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern

blot technique. Iranian J. Crop Sci. 13(3): 580-595.

Rohlf, FJ (2000) NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Ver. 2.02. Exeter software. Setauket, New York.

Rosielle AT, Hamblin J (1981) Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments. Crop Sci. 21: 943-945.

Roy SJ, Tucker EJ, Tester M (2011) Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. Curr. Opin. Plant Biol. 14: 232-239.

Saghai-Maroof MA, Soliman K, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-lenth polymorphism in barely: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81: 8014-8018.

Sardouie-Nasab S, Mohammadi-Nejad Gh, Nakhoda B (2013) Assessing genetic diversity of promising wheat (*Triticum aestivum* L.) lines using microsatellite markers linked with salinity tolerance. Journal of Plant Molecular Breeding, 1(2): 28-39.

Shahzad A, Ahmad M, Iqbal M, Ahmed I, Ali GM (2012) Evaluation of wheat landrace genotypes for salinity tolerance at vegetative stage by using morphological and molecular markers. Genet. Mol. Res. 11 (1):679-692.

Shuorvazdi A, Mohammadi SA, Norozi M, Sadeghzadeh B (2014) Molecular analysis of genetic diversity and relationships of barley landraces based on microsatellite markers. Journal of Plant Genetic Research, 1:51-64.

Singh SP, Diwivedi VK (2002) Character association and path analysis in wheat (*Triticum aestivum* L.). Agric. Sci. Dig. 22: 225-547.

Soleimani VD, Baum BR, Jonson DA (2002) AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp durum (Desf.) Husn.). Theor. Appl. Genet. 104: 350-357.

Tilman D, Balzer C, Hill J, Belfort BL (2011) Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108: 20260-20264.

Thomas KG, Bebeli PJ (2010) Genetic diversity of Greek Aegilops species using different types of nuclear genome markers. Mol. Phylogenet. Evol. 56: 951-961.

Vaja Komal N, Gajera HP, Katakpara Zinkal A, Patel SV, Golakiya BA (2016) Microsatellite markers based genetic diversity analysis for salt tolerance in wheat genotypes. Indian J. Agric. Biochem. 29(2): 140-145.

Wang ZF, Wang JF, Bao YM, Wu YY, Zhang HS (2011) Quantitative trait loci controlling rice seed germination under salt stress. Euphytica, 178: 297-307.