Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 49, No 4, Winter 2019 (87-96)
DOI: 10.22059/ijfcs.2017.231050.654304

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۷ (ص۹۶-۸۷)

بررسی تنوع ژنتیکی رقم‌های گندم نان (*Triticum aestivum* L.) به کمک نشانگرهای ریزماهواره و تجزیهٔ ارتباطی برای دو صفت پرولین و فروکتان در شرایط تنش سرمای بهاره

سولماز نادی[۱]، رضاقلی میرفخرایی[۲*]، علی‌رضا عباسی[۳]
۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح‌نباتات دانشگاه تربیت مدرس
۲. استادیارگروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۱/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۲۰)

چکیده

تنش‌های زنده و غیرزندهٔ محیطی عامل کاهش کمیت و کیفیت محصولات زراعی هستند. در فصل بهار، همزمان با آغاز دوبارهٔ زراعت گندم، مصونیت محیطی_ژنتیکی در تحمل به سرمای زمستانه به‌تدریج از بین می‌رود. نوعی از تنش سرما با عنوان سرمای دیررس بهاره وجود دارد که در صورت بروز، متناسب با مرحلهٔ رشدی زراعت، قادر است آسیب‌های زیادی به کشاورزان و تولیدکنندگان وارد آورد. بنابراین پرورش و دست یافتن به رقم‌های متحمل به این نوع از تنش سرما با برنامه‌های بهنژادی ضروری است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم گندم نان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره برای برآورد صفات فیزیولوژیک مرتبط با تحمل به تنش سرمای دیررس بهاره مانند میزان اسیدآمینهٔ پرولین و مقدار قند فروکتان، در شرایط کنترل‌شده بررسی شد. به این منظور آزمایش فاکتوریل با دو عامل رقم در ۲۲ سطح و دما در ۴ سطح ۸°C+ (شاهد)، ۲°C+، ۰°C و ۲°C- در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی اجرا شد. نتایج تجزیهٔ واریانس به‌دست‌آمده از داده‌های فیزیولوژیک نشان داد، اثر متقابل رقم‌ها در سرما در هر دو صفت در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار بود. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده، صفت پرولین در تنش ۲°C-، بالاترین میزان پرولین، متعلق به رقم مغان۲ و کمترین مقدار مربوط به رقم گلستان بود. همچنین در بررسی صفت فروکتان در تنش شدید، (۲°C-)، بالاترین مقدار قند فروکتان متعلق به رقم اوحدی و کمترین مقدار مربوط به رقم دز بود که رقم‌های بالا در برنامه‌های بهنژادی و تهیهٔ جمعیت‌های نقشه‌یابی برای شناسایی QTLهای مربوطه قابل استفاده هستند. برای بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی از ۲۱ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد که ۱۱ جفت توانستند چندشکلی مطلوبی را نشان دهند و درمجموع ۱۹ آلل شناسایی شد. شمار آلل‌های تولیدشده با میانگین ۲/۲۷ آلل در هر مکان ژنی، از ۲ تا ۴ آلل متغیر بود. میانگین سطح اطلاعات چندشکلی (PIC) برابر ۰/۶۲ و از ۰/۰۹ تا ۰/۹۸ متغیر بود. نژادگان (ژنوتیپ)ها با ضریب همانندی دایس و با استفاده از روش الگوریتم همبستگی متوسط در ۵ گروه قرار گرفتند که گویای توانایی این نشانگر مولکولی در شناسایی تنوع ژنتیکی مطلوب بین نژادگان‌های انتخابی بود. نتایج به‌دست‌آمده از رگرسیون گام‌به‌گام ارتباط معنی‌دار ۲ نشانگر واجد اطلاعات شامل Xgwm174 (مرتبط با صفت پرولین در شرایط تنش شدید) و Xgwm642 (مرتبط با صفت فروکتان در شرایط شاهد) نشان داد. نتایج این پژوهش نشان داد، تنش سرمای بهاره واکنش‌های متفاوتی را در بین رقم‌ها موجب شد و از این نظر تنوع ژنتیکی کافی بین نژادگان‌ها وجود دارد. همچنین بررسی‌های مولکولی نشان داد، نشانگرهای ریز ماهواره در تبیین تنوع موجود در بین نژادگان‌ها توانایی‌های مطلوبی دارند.

واژه‌های کلیدی: تجزیهٔ کلاستر، تنوع آللی، گندم نان، فاصلهٔ ژنتیکی، نشانگر مولکولی.

Genetic Diversity of Bread Wheat Cultivars Using SSR Marker and Relationship Analysis for Two Traits Prolin and Fructan under Spring Chilling Stress

Solmaz Nadi[1] , Reza Gholi Mirfakhraii[2*] and Alireza Abbasi[3]
M.Sc. master's graduate of Plant Breeding, Tarbiat Modarres University.
Assistant Professor of Plant Breeding and Agricultural Biotecnology, Tarbiat Modares University.
Associate Professor of Agronomy and Plant Breeding Tehran University .
(Received: April 12, 2017 - Accepted: November 11, 2017)

ABSTRACT

Biotic and abiotic environmental stresses are affecting factors that reduce quantity and quality of crops yields. In the spring, along with renewed wheat cultivation, the immunity of environmental-genetic cold tolerance would disappear. Spring cold stress is a wheat problem at heading time and also probably damaged other parts of the plant. Therefore, it is necessary to understanding the nature and identity of the cold stress and achieving tolerant cultivars through breading programs. In the present study, the genetic diversity of 22 bread wheat cultivars was investigated through microsatellite markers and physiological traits including Proline and Fructan contents under controlled condition. So, an experiment was conducted via wheat varieties and four cold stress levels (8 (control), +2, 0, -2 Celsius) in factorial arrangement based on randomized completely block design (RCBD). Results of variance analysis showed that the effects of interaction between cultivars and spring cold stress levels is signification at the 1% probability level. According the results of Proline content in -2ºC cold stress level, the highest amount was associated to Moqane2 variety and the Golestan had the lowest proline content. At the same cold stress level, Fructan content, had highest and lowest contents in Ohadi and Dez cultivars, respectively. These cultivars are useful in breeding programs in order to using in mapping population to detect relative QTLs. in order to investigate the genetic diversity at the molecular level 21 microsatellite primer pairs were used. Of microsatellite primer pairs, the11 pairs indicated good polymorphism and totally identified 19 alleles. The mean number of produced alleles was 2.27 alleles per marker locus and the range of alleles at loci was 1 to 4. The polymorphic information contents (PIC) values of the loci had ranged from 0.09 to 0.98 with average 0.62. Genotypes were grouped with Dice similarity coefficient and cluster analysis with the average correlation algorithms models that was suggest the ability of this molecular marker in detect genetic diversity among genotypes. Results of stepwise regression, shows the significant relationship between two markers, Xgwm174 (related to Proline content and sever stress condition) and Xgwm642 (related to Fructan content in control).The results showed that spring cold stress caused different reactions among cultivars and in this regard there is sufficient genetic variation among genotypes. Also Molecular studies showed that the microsatellite markers have desirable capabilities in explaining the variation among genotypes.

Key words: Allelic diversity, Bread Wheat , Cluster analysis, Genetic distance, Heterozygosity, Molecular marker, polymorphic information contents (PIC)

.

* Corresponding author E-mail: rezagholimirfakhraii@gmail.com

مقدمه

گیاهان اغلب در معرض طیف گسترده‌ای از تنش‌های محیطی هستند که این تنش‌ها تأثیر نامطلوبی بر بقاء، رشد، کیفیت و کمیت تولیدات کشاورزی دارند. دما یکی از عامل‌های مهم محیطی در رشد، گسترش و پراکنش گیاهان است (Masoumi *et al.*, 2013). خطرهای دمایی به‌طورمعمول متأثر از مرحلهٔ رشدی، شدت و طول مدت تنش است. تنش سرما در اشکال سرمازدگی، انجماد و سرمای دیررس بهاره، زراعت گندم را در اراضی واقع در اقلیم‌های سرد و فراسرد با آسیب‌های جدی روبه‌رو می‌سازد (Mirfakhraei *et al.*, 2010). در طول فصل پاییز و زمستان، مجموعه‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیک، باعث افزایش تحمل به سرما یا سرماسختی می‌شوند. گندم به‌تدریج این مصونیت محیطی_ژنتیکی را با پایان یافتن دورهٔ سرما از دست می‌دهد. درنتیجه در صورت رویارویی با بروز سرمای دیررس بهاره، تحمل کمتری به این نوع سرما خواهد داشت. دماهایی که حتی بالاتر از دماهای یخ‌زدگی هستند، می‌توانند به‌شدت در مرحلهٔ زایشی به گندم آسیب رسانده و به میزان زیادی محصول دانه را کاهش دهند (Lianhong *et al.*, 2008). با توجه به تحقیقات انجام‌گرفته می‌توان بیان کرد که حساس‌ترین مرحلهٔ رشد گندم، در زمان رشد زایشی است که با گرده‌افشانی در اواخر مرحلهٔ حبس سنبله در برگ پرچم یا خوشه‌دهی آغاز می‌شود (Shroyer *et al.*, 1995). بنابراین پرورش و دسترسی به رقم‌های متحمل به این نوع تنش با برنامه‌های بهنژادی ضروری است. آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد میزان آن در مجموعه‌های ذخایر توارثی (ژرم‌پلاسم‌های) گیاهی و تعیین رابطه‌های ژنتیکی بین آن‌ها، پایه و شالودهٔ بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات است. برآورد تنوع ژنتیکی در یک‌گونهٔ زراعی می‌تواند به ارزیابی مجموعه‌های ذخایر توارثی کمک کرده و درنهایت، با اجرای برنامه‌های بهنژادی مناسب، عملکرد رقم‌ها را بهبود بخشد. در این راستا نشانگرهای مولکولی این فرصت را فراهم کرده‌اند که تنوع در سطح توالی DNA ارزیابی شده و بدین ترتیب به‌عنوان ابزار مهمی در بهنژادی گیاهی استفاده شوند. نشانگرهای مولکولی می‌توانند اطلاعاتی را فراهم آورند که توصیف ویژگی‌های گونه‌ها و طبقه‌بندی آن‌ها بر پایهٔ شمار خویشاوندان نزدیک و موقعیت تبارزایی (فیلوژنیک) آن‌ها امکان‌پذیر شود (Naghavi *et al.*, 2004). نشانگرهای DNA گروه بزرگی از نشانگرها را تشکیل می‌دهند که از آن بین ریزماهواره‌ها (SSRs) با جایگاه ژنگانی (ژنومی) مشخص، امکان وجود چندشکلی و تکرارپذیری بالا، کاربرد بیشتری را در مقایسه با دیگر نشانگرها پیدا کرده‌اند (Khlestkina *et al.*, 2002). نشانگرهای ریزماهواره (SSR) با توجه به فراوانی شمار آلل در هر جایگاه ژنی (لوکوس) حتی قادر به تمایز بین رگه‌های بسیار همسان نیز هستند (Nachit *et al.*, 2001). بنابراین، نشانگرهایی با محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بالا برای تمایز نژادگان (ژنوتیپ)هایی با خویشاوندی نزدیک بسیار سودمند خواهند بود. در یک تحقیق Wei *et al.* (2003) در نتایج بررسی‌های خود، میانگین میزان اطلاعات چندشکلی را برای نشانگرهای ریزماهواره ۰/۶۷۴ گزارش کردند. همچنین Akkaya & Buykunal-Bal, (2004) با استفاده از ۱۹ نشانگر ریزماهواره در ۱۱ رقم گندم نان شمار ۹-۲ آلل با میانگین ۵/۴۲ آلل را به ازای هر جایگاه نشانگری گزارش کردند. در بررسی دیگر Ribeiro *et al.* (2004) محدودهٔ آللی را در ارزیابی ۵۹ رگهٔ (لاین) گندم با نشانگرهای ریزماهواره ۱۱-۲ آلل با میانگین ۴/۷۷ به دست آوردند. تفاوت‌ها در شمار آلل‌های شناسایی‌شده در بررسی‌های مختلف می‌تواند به‌دلیل منشأ و ویژگی‌های متفاوت نژادگان‌های مورد بررسی و نیز ماهیت نشانگرهای ریزماهواره از نظر شمار تکرارهای گروه‌های نوکلئوتیدی (موتیف[1]) باشند. در پژوهشی Roder *et al.* (1998)، ۲۷۹ نشانگر اختصاصی ریزماهواره و استفنسون و همکاران (Stephenson *et al.*, 1998) ۵۳ نشانگر ریزماهواره دیگر را در ژنگان گندم نان شناسایی و مکان‌یابی کردند. در یک بررسی توسط ونگ و همکاران Wang *et al.* (2010) نیز با استفاده از

1. Motif

۲۱۱ مکان ریزماهواره و ۷۸ توده از جمعیت تائوشی، ۳۰۸ آلل شناسایی شد که میانگین آلل برای هر جایگاه نشانگری ۸/۱۴ بود. در بررسی (Kudryavtsev *et al.* 2004)، تنوع ۴۵ رقم از انواع بهارهٔ گندم دروم را با ۲۸ نشانگر ریزماهواره نشان دادند که هر رقم ترکیب آللی ویژه‌ای را دارد. در این راستا اهمیت نشانگرهای ریزماهواره برای شناسایی رقم‌های گندم دروم تأیید شد. هدف‌های این تحقیق عبارت‌اند از: الف- بررسی تنوع ژنتیکی در بین رقم‌های گندم مورد بررسی با استفاده از ۱۱ جفت نشانگر ریزماهواره، ب- بررسی تنوع ژنتیکی بین رقم‌های این گندم با اندازه‌گیری مقدار دو صفت فیزیولوژیک پرولین و فروکتان، و ج- شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش مرتبط با صفات کمی مورد نظر با استفاده از سامانهٔ نشانگری SSR. نهایت آنکه بررسی‌ها درزمینهٔ تنش سرمای دیررس بهاره از موارد معدودی خارج نمی‌شود که بدین ترتیب این تحقیق را نیز می‌توان جزء نوآوری‌های تحقیق در این زمینه به‌شمار آورد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در گروه اصلاح نباتات دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد و دو عامل برای بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک در نظر گرفته شدند. عامل اول، رقم‌های مورد بررسی در ۲۲ سطح شامل آزادی، اوحدی، رصد، شهریار، کرج۳ ، شاه‌پسند و هما (پاییزه)، اترک، اینیا، بیات، دریا، دز، رسول، سیستان، کرج۱، گلستان، مغان، هامون، مروارید و هیرمند (بهاره) و سپاهان و کرج۲ (بینابین) بودند که بذرهای این رقم‌ها از بانک ژن مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج تهیه شدند و عامل دوم تنش سرما در سطوح دمایی ^{o}C ۸+ (شاهد)، ^{o}C ۲+ ، ^{o}C ۰ و ^{o}C ۲-. اثر اصلی و همچنین اثر متقابل بین آن‌ها بررسی شد. با رسیدن بوته‌ها به اوایل مرحلهٔ زایشی (سنبله‌دهی و گلدهی، کد زیداکی برابر ۵۰ الی ۶۸) (Zadoks *et al.*, 1974)، گلدان‌ها برای القای تنش سرما، برای هر سطح دمایی و به تفکیک به اتاقک رشد سرما منتقل و به مدت یک هفته در دمای ^{o}C ۱۶ روز به مدت ۱۶ ساعت و ^{o}C ۸ شب به مدت ۸ ساعت قرار گرفتند و پس از طی این مدت برای آغاز تنش، نمونه‌ها در دمای ^{o}C ۸ (دمای شاهد) و در تاریکی قرار داده شدند. این روش برای هریک از سطوح دمایی به‌طور مستقل انجام و پس از اعمال آخرین تیمار سطح دمایی، ^{o}C ۲-، دمای محیط هر ساعت ^{o}C۲ افزایش داده شد تا به شرایط پیش از آزمون تیمارهای دمایی (^{o}C۲۵) باز گردد. مقایسهٔ تأثیر سرما بر میزان اسیدآمینهٔ پرولین به روش (Bates *et al.* 1973) و بر مقدار قند فروکتان به روش (Jermyn 1956) انجام گرفت.

ارزیابی مولکولی

در این تحقیق ۲۱ جفت آغازگر ریزماهواره از سری Xgwm (جدول ۲) انتخاب و از شرکت پیشگام به‌صورت لیوفیلیزه تهیه شد. استخراج DNA ژنگانی با استفاده از کیت استخراج DNA که از "مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران" تهیه شده بود، انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنگانی (غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۲/۵ میکرومولار بر میکرولیتر)، ۰/۶ میکرولیتر از هرکدام از آغازگرهای پیشرو و پس‌رو (۱۰پیکومول بر میکرولیتر)، ۰/۱ واحد آنزیم تگ‌پلیمراز (۰/۱ واحد بر میکرولیتر)، ۰/۶ میکرولیتر از کلرید منیزیم ۲۵ میلی‌مولار و ۹/۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام شد. چرخهٔ دمایی شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ˚C ۹۴ به مدت ۴ دقیقه،۳۵ چرخهٔ دمایی (۱۰ چرخهٔ اول دمایی به‌صورت Touch Down) برنامه‌ریزی شده بود. دمای اتصال آغازگرها به رشتهٔ الگو ˚C۱۰بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته‌شده و در طی ۱۰ چرخهٔ بخش اول با کاهش ۱ درجهٔ سلسیوس در هر چرخه، به دمای اتصال واقعی می‌رسید. در ۲۵ چرخهٔ بعدی دمای اتصال (برحسب دمای اتصال آغازگر) ثابت و بسط رشته‌ها به مدت ۳۰

ثانیه در دمای C ° ۷۲ انجام شد. به‌منظور تأیید ترکیب‌های افزونشی، محصولات به‌دست‌آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در آغاز روی ژل آگارز ۱/۶٪ با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت بارگذاری شدند و همزمان با بارگذاری، رنگ‌آمیزی ژل با مادهٔ stain Safe به نسبت ۱:۱۰۰۰ میکرولیتر انجام شد. پس از پایان الکتروفورز با استفاده از دستگاه ژل‌داک از ژل با اشعهٔ UV عکس‌برداری شد تا کیفیت افزونش بررسی و در صورت تأیید، روی ژل متافور– آگارز برده شود.

تجزیه‌های آماری

داده‌های فیزیولوژیک بر پایهٔ طرح فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، وفق شرایط ویژهٔ آزمایشگاه، با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS 19 و SAS 9.1 تجزیه‌وتحلیل شدند. برای داده‌های مولکولی، ۱۱ جفت نشانگر توانستند چندشکلی مطلوب را بین رقم‌ها آشکار سازند که وجود باند امتیاز ۱ و نبود آن امتیاز ۰ برای هر جفت آغازگر اختصاصی کدگذاری شد و میزان اطلاعات چندشکلی آغازگرها با استفاده از رابطهٔ $PIC= 1-\Sigma P^2_i$ محاسبه شد (Rowell *et al.*, 1996). تجزیهٔ خوشه‌ای به‌منظور گروه‌بندی رقم‌های گندم توسط نرم‌افزار NTSYSpc 2.02 انجام شد. درنهایت تجزیهٔ ارتباطی صفات فیزیولوژیک با نشانگرهای ریزماهواره با استفاده از رگرسیون گام‌به‌گام با نرم‌افزار SPSS 19 انجام گرفت. نهایت آنکه در تجزیهٔ رگرسیونی هر آلل به‌عنوان یک متغیر مستقل (x) در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان می‌دهد، رقم‌های مورد بررسی به لحاظ زمینهٔ ژنتیکی، تنوع لازم را نسبت به ویژگی‌های فیزیولوژیک از یکدیگر دارند. به ترتیبی که این تفاوت‌ها در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار شد. همچنین سطح‌های تنش سرما نیز بین هر یک از دو صفت اسیدآمینهٔ پرولین و قند فروکتان توانستند اختلاف رقم‌ها را به‌خوبی آشکار سازند و از این راه انتخاب سطح‌های دمایی نیز با دقت همراه بوده است. در بررسی اثر متقابل رقم با سطح‌های تنش سرما، نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد، اثر متقابل معنی‌داری بین سطح‌های تنش سرما و نوع رقم در بین دو صفت پرولین و فروکتان وجود دارد (جدول ۱). به عبارت دقیق‌تر واکنش رقم‌ها نسبت به تغییر سطح‌های دمایی (از ۸°C+ تا ۲°C-) روند ثابت نداشته است. از بین ۲۱ جفت آغازگر اختصاصی مورد بررسی، ۱۱ جفت آغازگر توانستند افزونش خوبی در همه رقم‌ها و نژادگان‌های مورد بررسی داشته باشند و درمجموع ۱۹ آلل را شناسایی کردند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و تنوع ژنی، توان تفکیک یک نشانگر را به‌واسطهٔ شمار آلل‌های مکان ژنی نشانگر و فراوانی نسبی این آلل‌ها در جمعیت تحت بررسی را نشان می‌دهند (Farshadfar, 1995). بیشترین شمار آلل مشاهده‌شده ۴ و ۳ آلل به‌ترتیب‌مربوط به آغازگرهای Xgwm642 و Xgwm261 و کمترین شمار آلل مشاهده‌شده، ۲، مربوط به آغازگرهای Xgwm55، Xgwm129، Xgwm162، Xgwm302، Xgwm140، Xgwm192 وXgwm190 بود. میانگین کل شمار آلل‌ها برای آغازگرها برابر ۲/۲۷ بود (جدول ۲). تفاوت در شمار آلل مشاهده‌شده می‌تواند ناشی از اختلاف در شمار توالی‌های تکراری، نوع نوکلئوتیدهای آن‌ها و ساختار نوکلئوتیدی ژنگان باشد. Mohammadi *et al.* (2012)، در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم گندم نان با استفاده از ۱۲ جفت نشانگر ریزماهواره درمجموع توانستند ۴۰ آلل با میانگین ۳/۳۳ به ازای هر جایگاه نشانگری شناسایی کنند. شمار آلل‌های مشاهده‌شده در هر مکان ژنی بین ۲ تا ۶ آلل بود که آغازگرهای Xgwm165 و Xgwm33 با شش آلل بیشترین شمار را در میان آغازگرها داشتند. ازآنجاکه شمار آلل هر نشانگر ریزماهواره، میزان مناسب بودن آن جایگاه را برای برآورد تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (Roder, 1998)، لذا آغازگرهایی با شمار آلل بیشتر برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب‌تر هستند. با توجه به جدول ۲، مقدار PIC از ۰/۰۹ به‌عنوان کمترین میزان مربوط به آغازگرهای Xgwm55، Xgwm129 و Xgwm302 تا ۰/۹۸ به‌عنوان بیشترین مقدار مربوط به آغازگرهای

Xgwm140 و Xgwm174 متغیر و میانگین کل محتوای اطلاعات چندشکلی برابر ۰/۶۲ بود. در پژوهشی در میان ۱۵ هیبرید ذرت، ۳۰ نوار با استفاده از ده جفت نشانگر ریزماهواره افزونش شد که شمار آللها بین ۲ تا ۶ بود و بیشترین فراوانی آللی مربوط به آغازگرهای BNLG1194، PHI026، BNLG609 و PHI057 به ترتیب ۶، ۵، ۵ و ۵ آلل گزارش شد (Nikhou *et al*., 2013). همچنین درمجموع ۱۵۹ آلل برای ۳۴ ناحیهٔ SSR شناسایی‌شده در ارزن مرواریدی، شمار آللهای هر جایگاه SSR از ۲ (Xpsmp2059 و Xpsmp2202) تا ۸ (Xpsmp2069) با میانگین ۴/۶۸ آلل در هر جایگاه ژنی بود (Kannan *et al*., 2014).

جدول۱. نتایج تجزیهٔ واریانس محتوای پرولین و فروکتان در۲۲ نژادگان گندم نان در شرایط تنش سرمای بهاره

Table 1. Analysis of variance of proline and fructan in 22 bread wheat genotypes under chilling stress

S.O.V.	df	Mean Square	
		proline	fructan
Replication	2	0.0844^{ns}	0.064^{ns}
Cultivar	21	0.859^{**}	0.329^{**}
Cold Stress	3	19.396^{**}	2.22^{**}
Cultivar*Stress	63	0.682^{**}	0.499^{**}
Error	174	0.138	0.032
CV%		14.92	17.36

^{ns} و ** به‌ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۱درصد

**: significant at the 1% probability levels, respectively; ^{ns}: Non-significant

جدول ۲. ویژگی‌های آغازگرهای مورد بررسی شامل نام، شمار آلل چندشکل، فراوانی آلل رایج و محتوای اطلاعات چندشکلی

Locus name	Marker location	Forward primer	Reverse primer	Type of repetitive sequences	Annealing	The number of alleles	Common allele	PIC	Gene diversity
Xgwm55	6D	GCA TCT GGT ACA CTA GCT GCC	TCA TGG ATG CAT CAC ATC CT	(TC)3(T)3(CT)17	60	2	0.95	0.09	0.09
Xgwm129	2B	TCA GTG GGC AAG CTA CAC AG	AAA ACT TAG TAG CCG CGT	(GT)8(N)28(GT)16	50	2	0.95	0.09	0.09
Xgwm140	1B	ATG GAG ATA TTT GGC CTA CAA C	CTT GAC TTC AAG GCG TGA CA	(CT)42	55	2	0.14	0.98	0.99
Xgwm162	3A	AGT GGA TCG ACA AGG CTC TG	AGA AGA AGC AAA GCC TTC CC	(CA)14AA(CA)4	60	2	0.32	0.9	0.92
Xgwm174	5D	GGG TTC CTA TCT GGT AAA TCC C	GAC ACA CAT GTT CCT GCC AC	(CT)22	55	2	0.11	0.98	0.99
Xgwm190	5D	: GTG CTT GCT GAG CTA TGA GTC	GTG CCA CGT GGT ACC TTT	(CT)22	60	2	0.32	0.87	0.89
Xgwm192	5D	GGT TTT CTT TCA GAT TGC GC	CGT TGT CTA ATC TTG CCT TGC	(CT)46	60	2	0.73	0.47	0.48
Xgwm261	2D	: CTC CCT GTA CGC CTA AGG C	CTC GCG CTA CTA GCC ATT G	(CT)21	55	3	0.19	0.94	0.96
Xgwm264	1B	GAG AAA CAT GCC GAA CAA CA	GCA TGC ATG AGA ATA GGA ACT G	(CA)9A(CA)24	60	2	0.95	0.55	0.56
Xgwm302	7B	GCA AGA AGC AAC AGC AGT AAC	CAG ATG CTC TTC TCT GCT GG	(GA)21	60	2	0.95	0.09	0.09
Xgwm642	1D	ACG GCG AGA AGG TGC TC	CAT GAA AGG CAA GTT CGT CA	(GT)14	60	4	0.47	0.86	0.88
میانگین		-	-	-	-	2.27	0.55	0.62	0.63
SD		-	-	-	-	0.65	0.36	0.38	0.39

Table 2. Characteristics of primers including name, number of polymorphic alleles, Frequency of common allele and polymorphism information content

فراوانی آلل رایج (آللی که بیشترین فراوانی را بین آللهای یک جایگاه دارد) در این بررسی از ۰/۱۱ (Xgwm174) تا ۰/۹۵ (Xgwm55، Xwm129، Xgwm264 و Xgwm302) متغیر و میانگین کل فراوانی آلل رایج برابر ۰/۵۵ بود. مقایسهٔ شمار آلل و فراوانی آلل رایج در جایگاه‌های ریزماهواره نشان داد، نشانگرهایی با شمار آلل چندشکل کمتر، بیشترین فراوانی آلل رایج را داشتند. با بررسی سه فراسنجهٔ (پارامتر) میزان اطلاعات چندشکلی، تنوع ژنی و نیز فراوانی آلل رایج مشخص شد، نشانگرهایی با PIC و تنوع ژنی بالا، فراوانی آلل رایج کمتری داشتند. بنابراین، جایگاه‌هایی با فراوانی آلل رایج کمتر، توان ظهور چندشکلی بیشتری را خواهند داشت. مقایسهٔ نشانگرهایی با توالی تکراری متفاوت نشان داد، نشانگرهایی با توالی‌های تکراری دو نوکلئوتیدی بیشترین شمار آلل، میزان اطلاعات چندشکلی و تنوع

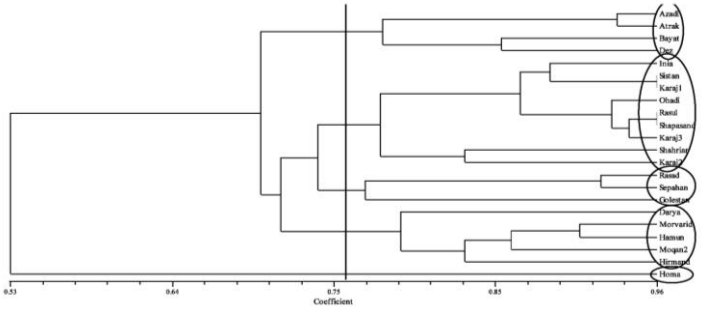
ژنی و کمترین میزان فراوانی آلل رایج را داشتند (جدول ۲). بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان گفت که نشانگرهای Xgwm140 و Xgwm174 با بیشترین PIC توانسته‌اند بهتر از دیگر نشانگرهای استفاده‌شده، در بروز تنوع ژنتیکی حضور داشته باشند. درنتیجه می‌توانند به‌عنوان نشانگرهایی که در تشخیص تنوع ژنتیکی مؤثر باشند، استفاده شوند. تاکنون مقادیر مختلفی برای محتوای اطلاعات چندشکلی در گندم گزارش شده است که از همهٔ این تحقیقات، می‌توان دانست که محتوای اطلاعات چندشکلی بستگی به عامل‌هایی مانند شمار آلل تولیدی توسط هر جایگاه نشانگری، تنوع موتیف در نواحی تکرارشونده و طول توالی تکراری دارد (Maccaferri *et al.* 2003). شمار نژادگان‌ها و شمار نشانگرها نیز همبستگی مثبتی با محتوای اطلاعات چندشکلی دارند، به‌طوری‌که Roder (1995)، میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی را در تحقیقی با ۱۸ نژادگان و ۱۵ نشانگر ریزماهواره در گندم ۰/۶۳ و هنگامی‌که شمار نژادگان‌ها را به ۶ رساندند، ۰/۵۴ گزارش کردند. در بررسی انجام‌گرفته توسط Askari *et al.* (2013) بیشترین و کمترین میزان PIC با مقدار ۰/۸۸ و ۰/۴۵ به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای Xgwm129 و Xgwm540 مشاهده شد که میانگین PIC به‌دست‌آمده برای همهٔ جایگاه‌ها برابر با ۰/۶۵ بود. همچنین در تحقیق Asadi *et al.* (2013) میزان PIC با میانگین ۰/۶، از ۰/۴۲ به‌عنوان کمترین مقدار مربوط به آغازگر Xgwm319 تا ۰/۸۴ به‌عنوان بیشترین مقدار مربوط به آغازگر Xgwm458 متفاوت بود. همچنین فراوانی آلل رایج از ۰/۴۲۵ (Xgwm264) تا ۰/۷ (Xgwm10) متغیر بود. در تحقیق انجام‌گرفته توسط Asghari *et al.* (2012)، آغازگر Xgwm55 که روی ژنگان D، 6D گندم قرار دارد بیشترین مقدار PIC (۰/۷) را به خود اختصاص داده است، درحالی‌که در این تحقیق آغازگرXgwm55 روی ژنگان B، 2B، گندم قرار دارد که کمترین میزان PIC (۰/۰۹) را دارد که دلیل این اختلاف را می‌توان به تفاوت در نژادگان‌های مورد استفاده از یک‌سو و از سوی دیگر به تفاوت در "شمار توالی‌های تکراری" نسبت داد. ناخالصی (هتروزیگوتی) مورد انتظار یا تنوع ژنی، یکی دیگر از معیارهای ارزیابی تنوع آللی نشانگرها و میزان اطلاعات نشانگری در بررسی‌های ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌هاست. با توجه به جدول ۲، مقدار ناخالصی مورد انتظار از ۰/۰۹ (Xgwm55، Xwm129 و Xgwm302) تا ۰/۹۹ (Xgwm140 و Xgwm174) با میانگین ۰/۶۳ متغیر بود. مقایسهٔ میزان اطلاعات چندشکلی و تنوع ژنی نشان می‌دهد، این دو فراسنجه رابطهٔ مستقیمی با یکدیگر دارند. در بررسی انجام‌گرفته توسط Dresigacker *et al.* (2004)، ۰/۴۷ و Huang *et al.* (2002)، ۰/۷۷ روی گندم گزارش کرده‌اند و درنهایت انحراف معیار ۴ ویژگی مورد بررسی نشان می‌دهد که در "شمار آلل" تولیدی به ازای ۱۱ نشانگر، میزان متوسط مجذور انحراف‌ها از میانگین بین نژادگان‌ها از دیگر ویژگی‌ها بیشتر است که خود نشان‌دهندهٔ تنوع نسبی بالاتر در آلل‌های تولیدی بین رقم‌ها است. در بررسی تنوع ژنتیکی، تجزیهٔ خوشه‌ای بهترین روش برآورد همانندی بین افراد در یک مجموعه ذخایر توارثی است. هدف از تجزیهٔ خوشه‌ای، انتساب نژادگان‌ها به گروه‌هاست به‌طوری‌که نژادگان‌های دارای همانندی و خویشاوندی بیشتر در یک گروه قرار می‌گیرند. بنابراین برای گروه‌بندی رقم‌های مورد بررسی، در آغاز ضریب همانندی دایس[2] محاسبه شد و آنگاه گروه‌بندی رقم‌ها بر پایهٔ این ضریب با استفاده از الگوریتم همبستگی متوسط (UPGMA) انجام شده و نتایج به‌دست‌آمده به‌صورت نمودار درختی (دندروگرام) ترسیم شده است (شکل۱). ضریب همبستگی کوفنتیک نمودار درختی به‌دست‌آمده برابر r =۰/۷۷ بود که همبستگی شایان پذیرشی را بین ماتریس نمودار درختی و ماتریس همانندی نشان می‌دهد. بر پایهٔ نمودار درختی ترسیم‌شده، (شکل ۱)، نژادگان‌های مورد بررسی در ۵ گروه شامل گروه اول: آزادی، اترک، بیات و دز، گروه دوم: اینیا، سیستان، کرج۱، اوحدی، رسول، شاه‌پسند، کرج۳، شهریار و کرج۲، گروه سوم: رصد، سپاهان و

2. Dice

گلستان، گروه چهارم: دریا، مروارید، هامون، مغان۲ و هیرمند و گروه پنجم: هما بود. رقم‌های گروه اول به غیر از رقم آزادی (دارای تیپ رشدی پاییزه) همگی تیپ رشدی بهاره (اترک، بیات و دز) دارند. رقم‌های موجود در گروه دوم سه تیپ رشدی دارند که رقم کرج۲ و اینیا تیپ رشدی بینابین، رقم‌های شهریار، کرج۳، شاه‌پسند و اوحدی تیپ رشدی پاییزه و رقم‌های رسول، کرج۱ و سیستان تیپ رشدی بهاره دارند. در گروه سوم نیز رقم‌های گلستان و سپاهان تیپ رشدی بهاره و رقم رصد تیپ رشدی پاییزه دارند. در گروه چهارم به غیر از رقم هامون با تیپ رشدی پاییزه، بقیه بهاره هستند و در آخر رقم هما به‌تنهایی در گروه پنجم قرار گرفته است که این رقم تیپ رشدی پاییزه دارد. قرار گرفتن رقم هما در گروه پنجم به‌صورت انفرادی بیانگر اختلاف قابل‌توجه ژنگان این رقم با دیگر رقم‌ها از نظر جایگاه‌های ریزماهواره است. با توجه به نمودار درختی به‌دست‌آمده از تجزیهٔ داده‌ها مشاهده می‌شود که تیپ رشدی نمی‌تواند عاملی در تفاوت‌های عمده نسبت به قرار گرفتن رقم‌ها در یک خوشه باشد، چراکه ناحیه‌های کنترل‌کنندهٔ تیپ رشدی بخش کوچکی از حجم و به عبارت دقیق‌تر، از کل ژنگان را به خود اختصاص می‌دهند و لذا رقم‌های با تیپ رشدی متفاوت هم در یک گروه قرار می‌گیرند. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ خوشه‌ای نشان داد، برخی از رقم‌ها به‌واسطهٔ داشتن همانندی بیشتر از نظر جایگاه ژنی و آلل‌های ریزماهواره در یک گروه قرار گرفته‌اند. به‌طوری‌که قرار گرفتن این رقم‌ها در یک گروه، بیانگر همانندی شجره‌ای از نظر جایگاه‌های ریزماهواره و یکنواختی نسبی ژنتیکی است. با این وجود نتایج تجزیهٔ کلاستر بیانگر این معنا نیز هست که رقم‌های مختلف گندم استفاده‌شده در این تحقیق از نظر جایگاه ژنگانی ریزماهواره‌ها تنوع خوبی داشته‌اند که این تنوع مناسب با توجه به ویژگی‌های مطلوب نشانگرهای ریزماهواره محقق شده است. وجود تنوع زیاد در بین رقم‌ها، امکان دست‌یابی به نتایج موفق در طراحی برنامه‌های بهنژادی، اعم از انتخاب والدین، دسترسی به جمعیت‌های نقشه‌یابی و گزینش به کمک نشانگر[1] را امکان‌پذیر می‌سازد. بر پایهٔ ماتریس همانندی به‌دست‌آمده (جدول ۳)، این همانندی از ۰/۳۸۱ تا ۰/۹۶ متفاوت بود. بیشترین همانندی برای نژادگان‌های رسول و شاه‌پسند، رسول و کرج۱، سیستان و کرج۱، شاه‌پسند و کرج۳ برابر ۰/۹۶ به دست آمد. که این ضریب همانندی به‌نسبت بالا، نشان‌دهندهٔ بیشترین همانندی ژنتیکی هم در بین رقم‌های مورد بررسی است. کمترین همانندی برای نژادگان‌های مروارید و هما برابر ۰/۳۸۱ به‌دست آمد. این وضعیت همانندی بیانگر وجود تنوع ژنتیکی مطلوب بین گندم‌های مورد بررسی است. رقم مروارید و هما به‌ترتیب تیپ رشدی بهاره و پاییزه دارند. منشأ رقم مروارید از مواد دریافتی از سیمیت بوده درحالی‌که رقم هما از تودهٔ گندم سرداری با استفاده از روش اصلاحی انتخاب لاین خالص در مدت ده سال بررسی در ایستگاه‌های مناطق سردسیری به‌دست‌آمده است.

شکل ۱. نمودار درختی متعلق به ژنگان ۲۲ رقم زراعی گندم نان بر پایهٔ فاصلهٔ ژنتیکی به‌دست‌آمده از کاربرد ۱۱ نشانگر ریزماهواره

Figure1. Dendrogram based on genetic distance from 11 SSR in the whole genome of 22 bread wheat cultivars



1. Marker Assisted Selection; MAS

جدول ۳. فاصلهٔ ژنتیکی ۲۲ رقم گندم نان به‌دست‌آمده از نشانگرهای SSR بر پایهٔ ماتریس همانندی دایس

Table 3- genetic distance of 22 varieties wheat obtained from SSR markers based on Dice similarity matrix

	آزادی	اترک	آبیا	اوحدی	بیات	دریا	در	رسول	رعد	سیلاطن	سیستان	شاهسند	شهریار	گ‌ت۱	گ‌ت۲	گ‌ت۳	گلستان	مروارید	مغان۲	هلمون	ها	هیرمند
آزادی	1																					
اترک	۰.۹۳۳	1																				
آبیا	۰.۷۰۶	۰.۷۳۸	1																			
اوحدی	۰.۷۷۸	۰.۸۵۳	۰.۸۵۷	1																		
بیات	۰.۸۳۳	۰.۸۸۹	۰.۷	۰.۷۶۲	1																	
دریا	۰.۵۵۶	۰.۶۳۳	۰.۶۶۷	۰.۶۳۶	۰.۷۶۲	1																
در	۰.۶۶۷	۰.۷۳۳	۰.۶۶۷	۰.۷۳۳	۰.۸۵۷	۰.۸۱۸	1															
رسول	۰.۷	۰.۷۶۶	۰.۷۸۷	۰.۹۱۷	۰.۶۶۷	۰.۶۶۷	۰.۶۶۷	1														
رعد	۰.۵۷۱	۰.۶۳۶	۰.۶۶۷	۰.۶۶	۰.۶۶۷	۰.۷۲۲	۰.۸	۰.۷۲	1													
سیلاطن	۰.۶۳۳	۰.۷	۰.۷۲۷	۰.۶۳۶	۰.۷۲۷	۰.۷۸۲	۰.۸۷	۰.۸	۰.۹۳۳	1												
سیستان	۰.۷	۰.۷۶۶	۰.۸۷	۰.۸۳۳	۰.۶۶۷	۰.۶۶۷	۰.۶۶۷	۰.۹۳۳	۰.۸۱۵	۰.۸	1											
شاهسند	۰.۷۲۷	۰.۸	۰.۸۱۸	۰.۹۵۷	۰.۷۲۷	۰.۷۲۷	۰.۶۶۷	۰.۶۶۷	۰.۶۶۷	۰.۷۵	۰.۸۸	1										
شهریار	۰.۶۶۷	۰.۷۲۷	۰.۷۶۲	۰.۷۲۷	۰.۷۶۲	۰.۷۲۷	۰.۶۳۶	۰.۷۵	۰.۶۶	۰.۶۶۶	۰.۷۵	۰.۶۶۶	1									
گ‌ت۱	۰.۷	۰.۸	۰.۹۰۹	۰.۸۷	۰.۷۲۷	۰.۶۶۶	۰.۶۶۶	۰.۷۵	۰.۷۲۹	۰.۸۳۳	۰.۹۱۷	۰.۹۱۷	۰.۷۸۳	1								
گ‌ت۲	۰.۷	۰.۷۶۲	۰.۷۸۳	۰.۷۵	۰.۷۶۲	۰.۷۶۲	۰.۵۸۳	۰.۹۳۳	۰.۷۲	۰.۷۲	۰.۸۶۶	۰.۸	۰.۶۶۶	۰.۷۲	1							
گ‌ت۳	۰.۷	۰.۷۶۲	۰.۷۸۳	۰.۷۱۷	۰.۶۶۶	۰.۶۶۶	۰.۶۳۶	۰.۷۲۱	۰.۷۲	۰.۷۲	۰.۸۶۶	۰.۸۸	۰.۷۲	۰.۸۸	۰.۸۸۶	1						
گلستان	۰.۱۵	۰.۵۷۱	۰.۶۶۶	۰.۶۶۶	۰.۶۶۶	۰.۵۸۳	۰.۵۸۳	۰.۹۳۳	۰.۸۱۵	۰.۷۲	۰.۸۶۶	۰.۷۲	۰.۶۶۶	۰.۸	۰.۷۶۹	۰.۷۶۹	1					
مروارید	۰.۷۷۸	۰.۸۳۳	۰.۸۵۷	۰.۷۱۷	۰.۷۲۷	۰.۷۲۷	۰.۶۳۶	۰.۷۲۳	۰.۷۲	۰.۶۶۶	۰.۹۱۷	۰.۷۸۳	۰.۸۱۸	۰.۷۸۷	۰.۷۸۳	۰.۷۷۵	۰.۷۷۵	1				
مغان۲	۰.۶۶۷	۰.۷۳۳	۰.۶۶۷	۰.۷۳۳	۰.۷۲۲	۰.۸۱۸	۰.۸۱۸	۰.۷۲۷	۰.۸	۰.۷۸۲	۰.۷۵	۰.۶۶۶	۰.۷۲۷	۰.۶۶۶	۰.۶۶۶	۰.۶۶۶	۰.۶۶۶	۰.۶۶۶	1			
هلمون	۰.۶۶۷	۰.۷۳۷	۰.۷۶۲	۰.۷۳۷	۰.۶۶۷	۰.۸۱۸	۰.۸۱۸	۰.۷۲۷	۰.۸	۰.۷۸۲	۰.۸۳۳	۰.۶۶۶	۰.۷۲۷	۰.۶۶۶	۰.۷۸۳	۰.۷۶۶	۰.۶۶۶	۰.۶۶۶	۰.۹۰۹	1		
ها	۰.۱۵	۰.۶۳۱	۰.۶۶	۰.۵۳۷	۰.۶۳۳	۰.۶۳۳	۰.۵۲۶	۰.۶۳۳	۰.۵۲۵	۰.۷۲۷	۰.۷۲۷	۰.۶۳۳	۰.۷۲۷	۰.۶۶۶	۰.۷۶۶	۰.۷۶۶	۰.۵۷۱	۰.۷۲۵	۰.۵۲۶	۰.۶۳۳	1	
هیرمند	۰.۱۵	۰.۵۸۸	۰.۶۳۳	۰.۷	۰.۵۲۶	۰.۸	۰.۶	۰.۶۶۶	۰.۶۶۶	۰.۶۶۷	۰.۷۲۷	۰.۵۷۱	۰.۷	۰.۶۶۷	۰.۶۳۶	۰.۶۶۷	۰.۵۲۵	۰.۵۲۵	۰.۸	۰.۸	۰.۹	۰.۷۱

جدول۴. نشانگرهای آگاهی‌بخش پیوسته با صفات فیزیولوژیک

Table 4. The informative markers associated with physiological traits

Trait	Growth condition	R^2	Regression coefficient	Related markers
Proline	Control	-	-	-
	Stress	0.257**	-0.825	Xgwm174
Fructan	Control	0.246**	-0.416	Xgwm642
	Stress	-	-	-

R^2: ضریب تبیین نشانگرهای آگاهی‌بخش برای صفات کمی

R^2: Coefficient of determination informative markers for quantitative traits

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد، تنش سرمای بهاره واکنش‌های متفاوتی را در بین رقم‌ها موجب شد و از این نظر تنوع ژنتیکی کافی بین نژادگان‌ها وجود دارد.

همچنین بررسی‌های مولکولی نشان داد، نشانگرهای ریز ماهواره در تبیین تنوع موجود در بین نژادگان‌ها توانایی‌های مطلوبی دارند.

سپاسگزاری

مراتب قدردانی خود را از همکاری مسئولان و محققان مؤسسهٔ تحقیقات و تهیهٔ نهال و بذر در اجرای این تحقیق، تقدیم می‌دارد.

REFERENCES

1. Akkaya, M. S. & Buykunal-Bal, E. B. (2004). Assessment of genetic variation of bread wheat varietes using microsatellite marker. *Euphytica*,135, 179-185.
2. Asadi, A., Mirfakhraii, R. & Abbasi, A. R. (2013). Genetic diversity of some of Bread wheat cultivars using SSR mlecular markers and some of physiological traits under chilling stress. MSc dissertation, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modares, Iran. (In Farsi).
3. Asghari, S., Mirfakhraii, R. & Abbasi, A. R.(2012). Genetic diversity of some of Bread wheat cultivars using SSR mlecular markers and some of physiological traits under chilling stress. MSc dissertation, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modares, Iran. (In Farsi).
4. Askari, S., Mirfakhraii, R., Abbasi, A. R. (2013). Genetic diversity of some of Bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using SSR mlecular markers and physiological traits chlorophyll and prolin under chilling stress. MSc dissertation, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modares, Iran. [In Farsi].
5. Bates, L. S., Walderen, R. D. & Taere, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Journal of Plant Soil*, 39, 205-207.
6. Ebrahimi, A., Naghavi, M.R., Sabokdast, M. & Moradi, A.S. (2011). Association analysis of agronomic traits with microsatellite markers in Iranian barley. *Modern Genetics Jurnal*, 6, 35-43. (In Farsi).
7. Farshadfar, A. (1995). The application of quantitative genetics in plant breeding. *Tagh Bostan Puplication*, 528p. (In Farsi).
8. Dresigacker, S., Zhang, P., Warburton, M. L., Ginkelt, M. L., Hoisington, D. A., Bohn, M. & Melchinger, A. E. (2004). SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted of different megaenviroments. *Crop Science*, 44, 381-388.
9. Huang, X. Q., Borner, A., Roder, M.S. & Ganal, M. W. (2002). Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor. Applied. Genetics*, 105, 699–707.
10. Jermyn, M. A. (1956). A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature*, 177, 38-39.
11. Kannan, B., Senapathy, S., Raj, A., Chandra, S., Muthiah, A., Dhanapal, A. & Hash, C. (2014). Association Analysis of SSR Markers with Phenology,Grain, and Stover-Yield Related Traits in Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Hindawi Publishing Corporation*, 1, 342-367.
12. Khlestkina, E. K., Pestsova, E. G., Salina, E., Roder, M. S., Arbuzova, V. S., Koval, S. F. & Borner, A. (2002). Genetic mapping and tagging of wheat genes using RAPD, STS, and SSR markers. *Cell and Molecular Biology Letters*, 7, 795-802.
13. Kolesnichenko, A. V., Pobezhimova, T. P., Grabelnych, O. I., Tourchaninova, V. V., Korzun, A. M., Koroleva, N. A., Zykova, V. V. & Voinikov, V. K. (2003). Difference between the temperature of nonhardened and hardened winter wheat seedling shoots during cold stress. *Journal of Thermal Biology*, 28,235.244.
14. Kudryavtsev, A. M., Martynov, S. P., Broggio, M. & Buiatti, M. (2004). Evaluation of polymorphism at microsatellite loci of spring durum wheat (*Triticum durum*) varieties and the use of SSR- based analysis in phylogenetic studies. *Genetika*, 40, 1102-1110.
15. Lianhong, G., Paul, J., Hanson, W., Mac P., Dale, P., Kaiser, B. Y., Ramakrishna, N., Stephen, G. P. & Tilden, M. (2008). The 2007 eastern U.S spring freeze: Increased cold damage in a warming world? *Journal of Biosciences*, 58 (3), 253-262.
16. Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Donini, P. & Tuberosa, R. (2003). Microsatellite analysis revealsa progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm, *Theoretical and Applied Genetics*, 107,783-797.
17. Masoumi, K., Asgharzadeh, A., Ganjimoghadam, E., Reyhani, M. & Keshmiri, F. (2013). Evaluation of Freezing Tolerance of Brassica oleraceae purple rosette and Brassica oleraceae white rosette under Controlled Conditions. *Advance in Agriculture and Biology*, 1(4), 84-88.
18. Mirfakhraei, R., Mardi, M., Talei, A., Mahfoozi, S. & Zali, A. (2010). Identification of Quantitative

Trait Loci Associated with Low-Temperature Tolerance in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Iran Journal of Crop Science*, 41, 105-112.
19. Mohammadi, M., Mirfakhraii, R. & Abbasi, A.R. (2012). Genetic diversity of some of Bread wheat cultivars using SSR mlecular markers and some of physiological traits under chilling stress. MSc dissertation, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modares, Iran. (In Farsi).
20. Nachit, M. M., Elouafi, I., Pagnotta, A., Saleh, E. L., Iacono, E., Labhilili, M., Asabati, A., Azarak, M., Hazzam, H., Benscher, D., Khairallah, M., Ribault, J. M., Tanzarella, O. A., Porceddu, E. & Sorrells, M. E. (2001). Molecular linkage maps for an intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 177-186.
21. Naghavi, M. R., Mardi, M., Ramshini, H. A. & Fazelinasab, B. (2004). Comparative analyses of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. *Iranian Journal of Biotechnologhy*, 2,450-472.
22. Nikhou, F., Ebrahimi, A. & Shiri, M. (2013). Genetic diversity assessment among Maize Hybrids with using SSR Markers. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*., 3, 3831-3834.
23. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Vgel, J., Tingey, S. & Rafalski, A. (1996). The comparision of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
24. Rashidi monfared, S., Mardi, M., Hossienzadeh, A. & Naghavi , M. R. (2008). Association analysis of important agronomic traits to retrotransposon markers SSAPs in durum wheat accessions. *Journal of Modern Genetic*, 3, 29-36. (In Farsi).
25. Ribeiro- Carvaiho, C., Guedes-Pinto, H. & Igregas, G. (2004). High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace Barbela. *Annals of Botany*, 94, 699-705.
26. Roder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixie, M. H., Leroy, P. & Canal, M. W. (1998). *A* microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149, 2007-2023.
27. Shroyer, J. M., Mikesell, M. E. & Paulsen, G. M. (1995). Spring freeze injury to kansas wheat, Kansas State University.
28. Stephenson, P., Bryan, G., Kirby, J., Ccollins, A., Devos, K., Busso, C. & Gale, M. (1998). Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 946-949.
29. Wang, Y., Wang, Ch., Liu, X. & Ji, W. (2010). Genetic diversity of Aegliops tauschii based on SSR marker. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 18, 493-500.
30. Wie, Y. M., Zhang, Y., Yan, Z., Wu, W., Zhang, Z. & Lan, X. (2003). Genetic diversity in Chinese endemic wheats based on STS and SSR markers. *Wheat Information Service*, 97, 9-15.
31. Zadoks, J. C., Chang, T. T. & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14, 415-421.