

مطالعه ارتباطی در سطح ژنوم صفات گیاهی در ارقام گندم نان تحت شرایط نرمال و تنش شوری

راضیه قربانی^۱، راحله قاسم‌زاده^{۲*} و هادی علی‌پور^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۲- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳- دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۲)

چکیده

به منظور شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مورفو-فیزیولوژیک گیاهیچه در ۸۸ رقم گندم نان، آزمایشی در شرایط نرمال و تنش شوری ۱۲۰ میلی‌مولار (معادل ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر)، در قالب طرح آلفا لایس ساده در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ انجام شد. صفات میزان کلروفیل a، b و کل، کاروتنوئید، پرولین، وزن تر و خشک گیاهیچه، طول گیاهیچه، محتوای نسبی آب برگ (RWC) و غلظت یون‌ها (سدیم، پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم) اندازه‌گیری شدند. پس از ژنوتیپ‌سنجی به وسیله توالی‌یابی با فناوری Ion Torrent و حذف SNP‌هایی با بیش از ۲۰ درصد داده گمشده و فراوانی آلل جزئی کمتر از ۵ درصد، تعداد ۵۸۶۹ SNP شناسایی شد. بر اساس نقشه‌یابی ارتباطی با روش مدل خطی مخلوط (MLM) برای شرایط نرمال در مجموع ۲۵ ارتباط نشانگر-صفت (MTA) شناسایی شد. ژنوم A بیشترین و ژنوم D کمترین تعداد MTA را به خود اختصاص دادند. در بین صفات مورد بررسی در شرایط نرمال، کلروفیل a بیشترین تعداد MTA را روی کروموزوم‌های 1A، 3B، 3D و 5B و 7A نشان داد و برای شرایط تنش شوری ۲۱ MTA شناسایی شد که ژنوم B بیشترین تعداد MTA و ژنوم D کمترین تعداد MTA را به خود اختصاص دادند. برای وزن تر گیاهیچه پنج MTA شناسایی شد که روی کروموزوم‌های 4A و 6B قرار داشتند. نتایج پژوهش حاضر، اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با مکان‌های ژنی مرتبط با صفات مورد مطالعه ارائه می‌دهد که می‌توان پس از تأیید در جمعیت‌های دو والدی و آزمایش‌های تکمیلی، در برنامه‌های به‌نژادی گندم در گزینش به کمک نشانگر از این یافته‌ها استفاده نمود.

واژگان کلیدی: ارقام گندم نان، تنش شوری، نشانگرهای SNP، نقشه‌یابی ارتباطی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: r.ghasemzade@urmia.ac.ir

مقدمه

گندم با نام علمی *Triticum aestivum* L. از تیره گرامینه، یک غله عمده در سراسر جهان است که ۱۷ درصد از اراضی کشاورزی جهان، زیر کشت آن قرار دارد و در محدوده وسیعی از شرایط آب و هوایی رشد می کند و از سازگارترین گونه های غلات است. این گیاه به تنهایی ۴۰ درصد غذای جهان را تأمین می کند. این گیاه از جنبه های گوناگون غذایی، اقتصادی، فرهنگی و حتی سیاسی حائز اهمیت است (Akbarpour and Dehghani, 2017).

تنش های محیطی از جمله شوری همواره عامل کاهش کمیت و کیفیت محصولات زراعی بوده اند که این تغییرات در گونه های مختلف گیاهی و حتی واریته های مختلف یک گونه و بسته به نوع و شدت تنش متفاوت هستند. با توجه به اینکه بیشتر محصولات زراعی حساس به شوری هستند، شوری یک خطر جدی برای گیاهان است (Flowers, 2004). عکس العمل گیاهان به تنش شوری بسیار پیچیده بوده و این پیچیدگی از غلظت نمک و نوع یون ها، عوامل محیطی، ژنوتیپ و مرحله رشدی گیاه متأثر می شود (Akbari Ghogdi et al., 2011). گندم به عنوان یکی از مهم ترین محصولات زراعی در ایران با آستانه تحمل ۶ دسی زیمنس بر متر در گروه متوسط از لحاظ تحمل به شوری قرار دارد. تنش شوری همه مراحل فنولوژیکی گیاه را تسریع نموده و عملکرد بیولوژیکی گیاه را به مقدار قابل توجهی کاهش می دهد (Zeeshan et al., 2020) و باعث کاهش قابل توجه وزن تر و خشک برگ ها، ساقه ها، پنجه ها، پنجه های بارور و ریشه می شود (Chartzoulakis and Klapaki, 2000). در مطالعه سلامی و همکاران (Salami et al., 2016) گزارش شده است که تنش شوری بیان ژن های *Hv TIP4;1* و *Hv TIP 2;3* (رمزکننده کانال های پروتئینی در طول غشاها) را تحت تأثیر قرار می دهد و با افزایش شدت تنش، میزان بیان نسبی ژن های *Hv TIP2;3* در ارقام متحمل افزایش می یابد. با توجه به نقش ژنوتیپ های متحمل در جلوگیری از کاهش عملکرد گندم در شرایط تنش شوری، تلاش های زیادی در جهت معرفی ژنوتیپ های متحمل به تنش در این گیاه انجام شده است. مشخص شده است که مسیرهای ژنی مختلفی در تحمل و واکنش به تنش شوری دخالت دارند (Flowers, 2004).

مکان های کنترل کننده صفات کمی یا QTL ها در واقع مناطقی از ژنوم هستند که کنترل صفات کمی را بر عهده دارند و می تواند شامل یک یا چند ژن پیوسته باشد (Shahinnia and Sayed Tabatabaei, 2013).

نقشه یابی پیوستگی و نقشه یابی ارتباطی دو روش رایج برای شناسایی و مکان یابی جایگاه های کنترل کننده صفات کمی هستند (Flint-Garcia et al., 2005). در نقشه یابی ارتباطی یا عدم تعادل پیوستگی که روش نسبتاً جدید و امیدوارکننده ای برای مطالعه صفات کمی است، برخلاف نقشه یابی پیوستگی که نقشه یابی روی جمعیت های حاصل از تلاقی دو والد انجام می شود، از وقایع نوترکیبی که در طول زمان های دور تا به امروز رخ داده است، در جهت نقشه یابی استفاده می شود؛ بنابراین وضوح نقشه در مقایسه با نقشه یابی پیوستگی بسیار زیاد بوده و تعداد آلل های بیشتری شناخته خواهد شد و از طرف دیگر نیازی به ایجاد جمعیت نبوده و در نتیجه مقرون به صرفه است (Ersoz et al., 2009). تحلیل ارتباط در گستره ژنوم (Genome-Wide Association Study: GWAS) بر پایه ژنوتیپ سنجی صدها فرد با رابطه ژنتیکی کم و ارتباط این داده ها با فنوتیپ مورد نظر به عنوان یک رویکرد جایگزین برای شناسایی روابط معنی دار نشانگر-صفت، ظهور یافته است. کارایی GWAS به عنوان یک ابزار مفید برای تجزیه و تحلیل مکانیسم های ژنتیکی پیچیده کنترل کننده تحمل تنش های زیستی (Jighly et al., 2015; Zegeye et al., 2014) و غیرزیستی (Long et al., 2013; Turki et al., 2015) در بسیاری از گیاهان ثابت شده است. نتایج حاصل از مکان یابی QTL های صفات زراعی درگیر در عملکرد، در مطالعات و بررسی های مختلفی از جمله بررسی آثار پلیوتروپی و اپیستازی مکان های کمی بر یکدیگر، اثرات ژنی و نحوه کنترل ژنتیکی، بررسی تکامل خصوصیات زراعی، همسانه سازی ژن های با وراثت کمی و غیره مورد استفاده قرار می گیرند (Shahinnia and Sayed Tabatabaei, 2013). هوو و همکاران (Hu et al., 2021) تعداد ۱۹۱ ژنوتیپ گندم را برای شناسایی نشانگرهای SNP مرتبط با صفات در مرحله بلوغ، با تحلیل ارتباط در گستره ژنوم (GWAS) مورد بررسی قرار دادند. جمعیت توسط آرایه SNP Wheat660K (Sun et al., 2020) تعیین ژنوتیپ شد و هشت ویژگی فنوتیپی در محیط های شوری

نسبت ۳:۱) در دو شرایط نرمال و تنش شوری ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl (معادل ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) مورد ارزیابی قرار گرفتند. کاشت بذور و کنترل علف‌های هرز به‌صورت دستی انجام شد. در ابتدا تعداد ۱۵ بذر به‌صورت دایره‌وار در درون گلدان‌ها کشت گردید که پس از استقرار گیاهچه‌ها تعداد ۱۰ بوته در هر گلدان نگهداری شدند. شروع اعمال تنش شوری در مرحله دو برگی نمونه‌ها انجام شد. برای جلوگیری از شوک تنش اسمزی، یک روز در میان به‌صورت تدریجی ۲۰ میلی‌مولار نمک NaCl اضافه شد تا در نهایت به ۱۲۰ میلی‌مولار رسانده شد. بعد از رسیدن تنش به ۱۲۰ میلی‌مولار، تنش به‌همین مقدار تا ۲۱ روز بعد ادامه پیدا کرد. در نهایت صفات وزن تر، وزن خشک، طول گیاهچه، غلظت کلروفیل a، b و کل، غلظت کاروتنوئید (Gunes et al., 2007)، پرولین (Bates et al., 1973)، محتوای نسبی آب برگ و غلظت یون‌های K^+ ، Na^+ و نسبت K^+/Na^+ (Rahnama et al., 2010) اندازه‌گیری شدند.

ارزیابی ژنوتیپی: برای ارزیابی ژنوتیپی از داده‌های ژنوتیپ‌سنجی مطالعه علی‌پور (Alipour, 2016) در دانشگاه ایالتی کانزاس آمریکا استفاده شد. فقط با توجه به تفاوت تعداد نمونه‌های مورد بررسی، دوباره برای ارقام زراعی مورد مطالعه، فراخوانی SNPها با استفاده از UNEAK (Universal Network Enabled Analysis Kit) GBS pipeline (Lu et al., 2013) از بسته بیوانفورماتیکی TASSEL 4.0 انجام شد (Bradbury et al., 2007). در نهایت SNPهایی با هتروزیگوسیتی بیشتر از ۱۰ درصد، داده گمشده بیشتر از ۲۰ درصد و فروانی آلی جزئی کمتر از ۵ درصد برای کاهش نتایج خطای مثبت، حذف شدند. در این آزمایش عدم تعادل پیوستگی مربوط به هر جفت نشانگر و آماره r^2 برای هر کروموزوم به‌طور جداگانه و همچنین برای کل ژنوم با استفاده از نرم‌افزار TASSEL نسخه ۵ محاسبه گردید.

برای تعیین عدم تعادل پیوستگی فقط از نشانگرهایی استفاده شد که مکان کروموزومی آنها مشخص بودند. در نهایت نقشه‌یابی ارتباطی صفات مورد بررسی تحت شرایط آبیاری نرمال و تنش شوری با استفاده از روش مدل خطی مخلوط (MLM) با ماتریس‌های PCA و Kinship در بسته GAPIT در نرم‌افزار R انجام شد که به‌صورت پیش‌فرض نرم‌افزار، سه مؤلفه اصلی به‌عنوان متغیرهای کمکی در مدل نقشه‌یابی ارتباطی در نظر گرفته شدند.

کم و زیاد مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۳۸۹ SNP شناسایی شد که ۱۱ QTL با ارتفاع بوته، تعداد سنبله، طول سنبله، تعداد دانه، وزن هزاردانه، عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیکی تحت تیمارهای مختلف شوری ارتباط معنی‌داری داشتند، این مکان‌ها بین ۹/۱۴ تا ۵۰/۴۵ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه کردند. کوان و همکاران (Quan et al., 2021) هشت صفت مربوط به تحمل به شوری را در مرحله گیاهچه‌ای در گندم مورد ارزیابی قرار داده و مکان‌های ژنی کنترل‌کننده تحمل به تنش شوری را با GWAS مشخص کردند. در این مطالعه تعداد ۳۱۷ ژنوتیپ با آرایه ژنوتیپی سنجی 60K مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع، ۲۷ SNP که در ۱۶ محل منحصربه‌فرد واقع شده بودند، شناسایی شدند و هرکدام ۳/۶ تا ۱۸/۶ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه کردند. ما و همکاران (Ma et al., 2022) مطالعه GWAS و توالی‌یابی پروفایل بیانی را به‌طور هم‌زمان مورد مطالعه قرار دادند تا مبنای ژنتیکی غلظت سدیم و پتاسیم و تحمل به شوری را در ۳۲۸ ژنوتیپ گندم بررسی کنند. در این مطالعه، نتایج تحلیل GWAS و RNA-seq برای شناسایی QTLها و ژن‌های جدید مرتبط با انتقال یون‌های Na^+ و K^+ و تحمل به شوری ترکیب شدند. در مجموع ۲۷ QTL مرتبط با غلظت Na^+ و K^+ شناسایی شد که ۸ QTL در گندم برای اولین بار گزارش شده بود. به‌علاوه ۳۱ ژن امیدوارکننده هم‌شناسایی شدند، به‌ویژه TaHAK25 که با غلظت Na^+ و K^+ و نسبت Na^+/K^+ مرتبط بود و می‌تواند در بهبود تحمل به شوری در گندم با استفاده از رهیافت ویرایش ژن استفاده شود. پژوهش حاضر با هدف تعیین الگوی عدم تعادل پیوستگی و شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مورفو-فیزیولوژیک در مرحله گیاهچه‌ای در شرایط نرمال و تنش شوری در ارقام گندم نان ایران با استفاده از ۵۸۶۹ نشانگر SNP انجام شد.

مواد و روش‌ها

ارزیابی فنوتیپی: تعداد ۸۸ رقم گندم نان ایران (جدول ۱) در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه واقع در منطقه نازلو با طول جغرافیایی ۴۵ درجه، صفر دقیقه و ۲۱ ثانیه و عرض جغرافیایی ۳۷ درجه، ۴۱ دقیقه و ۲ ثانیه و ارتفاع ۱۳۲۰ متر از سطح دریا در قالب طرح آلفا لاتیس ساده در شرایط کشت گلدانی (خاک و ماسه با

نتایج و بحث

نشان داد که تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار در صفات وزن تر و خشک گیاهچه، طول گیاهچه، غلظت کلروفیل a، b و کل، کاروتنوئید، محتوای نسبتی آب برگ، غلظت یون‌های پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم و افزایش معنی‌دار در صفات محتوای پرولین و تجمع سدیم شد (شکل ۱).

همان‌طور که انتظار می‌رفت از نظر تمامی صفات مورد بررسی، تفاوت آماری بسیار معنی‌داری بین ارقام مورد مطالعه در شرایط نرمال و تنش شوری وجود داشت. نتایج مقایسه پراکنش داده‌ها و میانگین صفات مورد بررسی تحت شرایط نرمال و تنش شوری

جدول ۱- نام و شجره واریته‌های گندم نان مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Name and pedigree of bread wheat varieties used in this study

شماره	سال	نام واریته	شجره
No.	Year	Variety name	Pedigree
1	1951	4820	
2	1976	ADL	TK/SHAHPASSAND
3	2010	AFLAK	HD160/5/Tob/Cno/23854/3/Nai60//Tit/Son64/4/LR/Son64
4	2006	AKBARI	1-63-31/3/12300/TOB//CNO67/SX
5	1978	ALBORZ	FN/MD//K117A/3/2*CLLF/4/SON64/KLRE/3/CNO//LR64*2/SON64
6	2006	ARTA	HD2206/Hork//Bul/6/CMH80A.253/2/M2A/CML//Ald*4/5/BH1146/H56.71// BH1146/3/CMH78.390/4/Seri 82/7/Hel/3*Cno79/7/2*Ser 82
7	1979	AZADI	4820/1.32.15409//8156
8	1957	AZAR	AZAR.LV
9	1976	BAYAT	PUNJAB-76/CHENAB-70
10	1980	BISTON	9-36/592/PIEVE or 9-36-562/PIAVE
11	1997	CHAMRAN	ND/VG9144//KAL/BB/3/YACO/4/VEE#5
12	2013	CHAMRAN2	Attila 50Y//Attila/Bacanora
13	1980	DARAB1	RSH/IRN 149(60-61)//C271
14	1995	DARAB2	MAYA'S/NAC
15	1960	DASTJERDI	DASTJERDI
16	1968	DAYHIM	DIADEM/ITALIAI
17	---	DN11	
18	1990	FALAT	KVZ/BUHO//KAL/BB
19	---	FONG	
20	---	FRONTANA	
21	1996	GAHAR	ND/VG9144//KAL/BB/3/YACO'S/4/VEE#5
22	1988	GHODS	RHS/5/WT/4/NOR10/K54*2//FN/3/PTR/6/OMID//KAL/BB
23	1986	GOLESTAN	D6301/NAI60//WRM/3/CNO*2/CHR
24	2009	HOMA	A pure Line of Sardari
25	1974	KARAJ1	200H/VFN/RSH
26	1974	KARAJ2	FA//TH/MTA/3/OMI or FA//TH/MT/3/OMID
27	1974	KARAJ3	DRC/MXP//ISWRN-297/3/NAI60
28	2011	KARIM	Triticum aestivum/Sprw "s"//CA8055/3/Baconora88
29	1994	GASCOGEN	
30	1980	KAVEH	FTA/PL
31	1974	KHAZAR1	P4160//SN64/LR64
32	2002	KOOHDASHT	BB/ROH//CNO67/TOTA/3/JAR
33	1995	MAHDAVI	TI/PCH/5/MT48/3/WTE*3/NAR59/TOTA63/4/MUS
34	1991	MAROON	AVD/PCHU/5/N10/BR21.1C//KT54B/3/NAR59/1093/4/7C
35	2010	MIHAN	Barkat/90Zhong87
36	1974	MOGHAN1	LR/N10B/3*ANE
37	2006	MOGHAN3	Luan/3/V763.23/V879.c8//Pvn/4/Picus/5/Oyata
38	2009	MORVARID	MILAN/SHANGHAI-7
39	1993	MV17	
40	1990	NAVID	HYS/7C
41	1978	NAZ	II12300//LR64A/8156/3/NOR
42	2006	NEISHABOUR	1-63-31/3/12300/TOB//CNO67/SX
43	1995	NICKNEJAD	F134-71/CROW'S
44	2012	OFOG	GF-gy54/Attila
45	1968	PANJAMO62	
46	2008	PISHGAM	Bkt/90Zhong87
47	2014	QABOOS	Dryland Agricultural Research Institute
48	1942	REYHANI	RAYHANI
49	2011	RIJAW	PATO/CAL/3/7C//BB/CNO/5/CAL//CNO/SN64/4/CNO//BAD/CHR/3/KL/6/SABALAN
50	1994	SISON	
51	1967	SHAHI	SHAHI
52	1942	SHAHPASSAND	SHAHPASSAND
53	2012	SIRVAN	PRL/2*PASTOR
54	2006	SISTAN	Bank"s"/Veery"s"
55	2013	TAKAB	Manning/Sdv1//Dogu88
56	2002	TOUS	SPN/MCD//CAM/3/NZR or SPN/MCD//CAMA/3/NZT
57	1969	TOUBARI	
58	2009	UROUM	Alvand//Ns732/Her
59	1997	VEE/NAC	Veery/Nacozari or Veery#5/NacozariF76

ادامه جدول ۱-

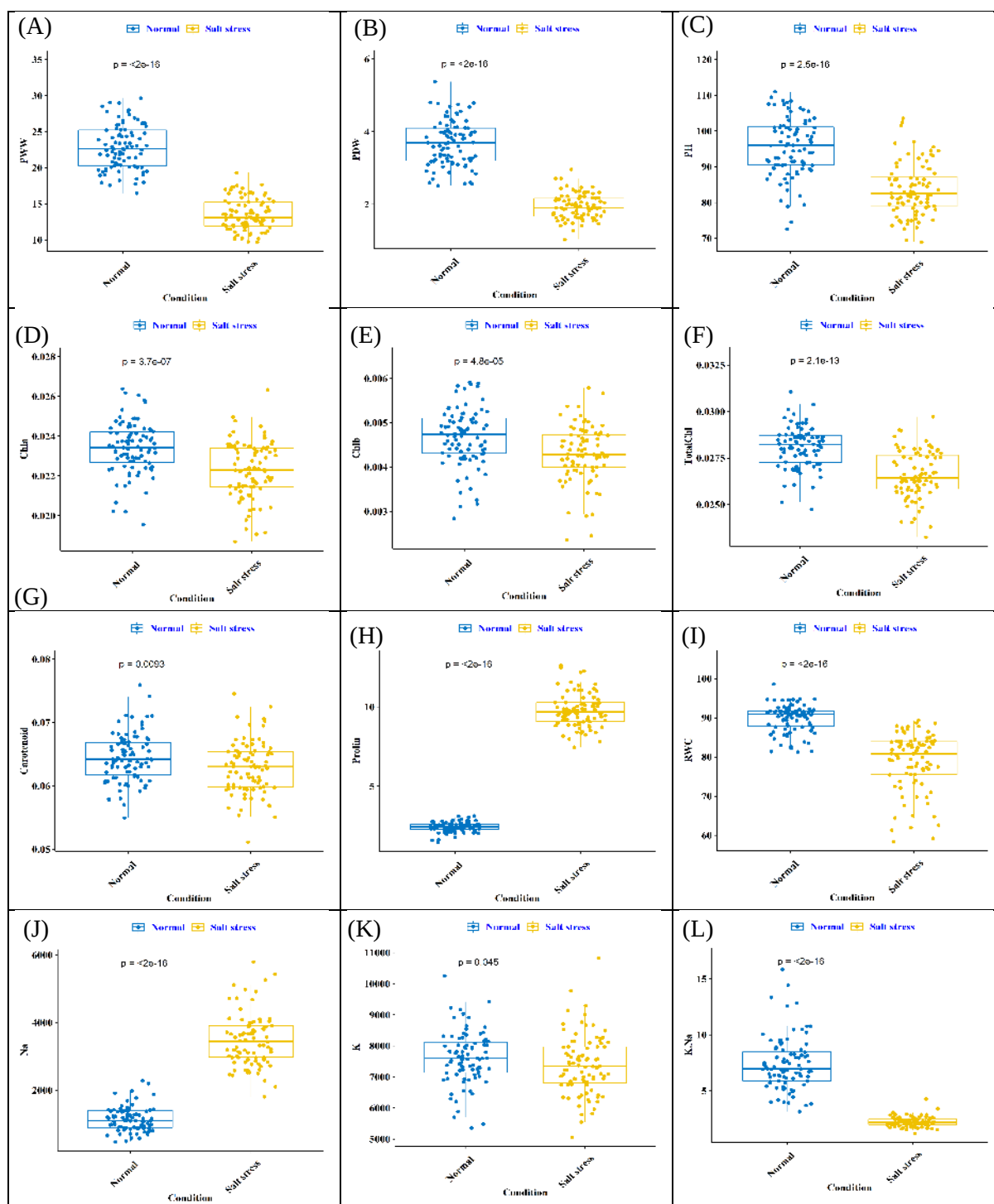
Table 1. (Continued)

شماره	سال	نام واریته	شجره
No.	Year	Variety name	Pedigree
60	2010	ZARE	130L1.11//F35.70/MO73/4/YMH/TOB//MCD/3/LIRA
61	1995	ZARRIN	NAI60/HVII//BUC/3/F59.71/GHK
62	---	SHANGHAI	
63	1969	INIA	LR64/SN64
64	1974	ARVAND	RSH/3/MTA//KY/MAYO58
65	1960	ROSHAN	Landrace
66	1968	RASHID	N.P.7881/AZAR 2/588
67	1980	SABALAN	(908//FN/A12)1-32-4382
68	2006	DARYA	Sha4/Chil
69	1995	ATRAK	JUP/BJY'S//URES
70	2007	BAHAR	HD2172/3/BB/2*7C//Y50E/3*KAL
71	2006	SEPAHAN	AZADI/5/L2453/1347/4/KAL//BB/KAL/3/Y50E/3*KAL
72	2006	BAM	VEE#5/NAC//1-66-22 or VEERY/NAC0ZARI-76//1-66-22
73	2002	SHIRAZ	GV/D6301//ALD/3/AZADI or GAVILAN,MEX/D-630//SIB)ALONDRA/3/AZADI or ALVAND//ALDAN/IAS-58
74	2002	PISHTAZ	ALVAND//ALDAN/IAS 58
75	2002	HAMOON	FALAT/RSH
76	2002	DEZ	KAUZ*2/OPATA//KAUZ
77	1997	SHIROODI	ND/VG9144//KAL/BB/3/YACO/4/VEE#5
78	1999	MARVDASHT	HD2172/BLOUDAN//AZADI
79	1996	ZAGROS	TAN'S'VEE'S//OPATA
80	1995	TAJAN	BOW/NKT
81	1995	ALVAND	1-27-6275/CF 1770 or CF17170 1-22-11
82	1997	KAVIR	Stm/3/Kal/V543/Jit716 or SHORTIM/3/KALYANSONA//V-534/JIT-716
83	2009	PARSI	Dove"S"/Buc"S"/2*Darab1 or DOVE(SIB)/(SIB)BUCKBUCK(M-84-17)//2*DARAB
84	2009	SIVAND	Kauz"S"/Azd or KAUZ(SIB)/(AZD)AZADI
85	1969	BEZOSTAYA	LUTESCENS17/SKOROSPELKA2
86	1958	AKOVA	
87	2002	SHAHRYAR	KVZ/TI//MAYA/26591-1T-7M-OY-115Y-OM/3/1-44-21863/4/ANZA/3/PI/NAR59//HYS or KAVKAZ/TANORI-71/3/MAYA-74(SIB)//BLUEBIRD/INIA/4/KARAJ-2/5/ANZA/3/PITIC- 62/NDR//HYSLOP
88	1997	AZAR2	KVZ/TI//MAYA/26591-1T-7M-OY-115Y-OM/3/SEFID

ژنوم B و ۵۳۸۰ SNP در ژنوم D گزارش شد. تعداد SNPها روی تک کروموزومها از ۳۲۷ SNP روی کروموزوم 4D تا ۱۲۵۱ SNP روی کروموزوم 2B متغیر بود. بر اساس تاریخچه تکاملی گندم، ژنوم D جوان‌ترین ژنوم در میان ژنومهای گندم است و منطقی است که ژنومهای قدیمی‌تر موتاسیون‌ها، مضاعف شدن ژنی و در نتیجه چندشکلی بیشتری نشان دهند (Naz et al., 2019). کروموزومهای 2B و 4D به ترتیب با تعداد ۴۸۱ و ۵۳ نشانگر SNP، بیشترین و کمترین تعداد را نشان دادند (شکل ۲B).

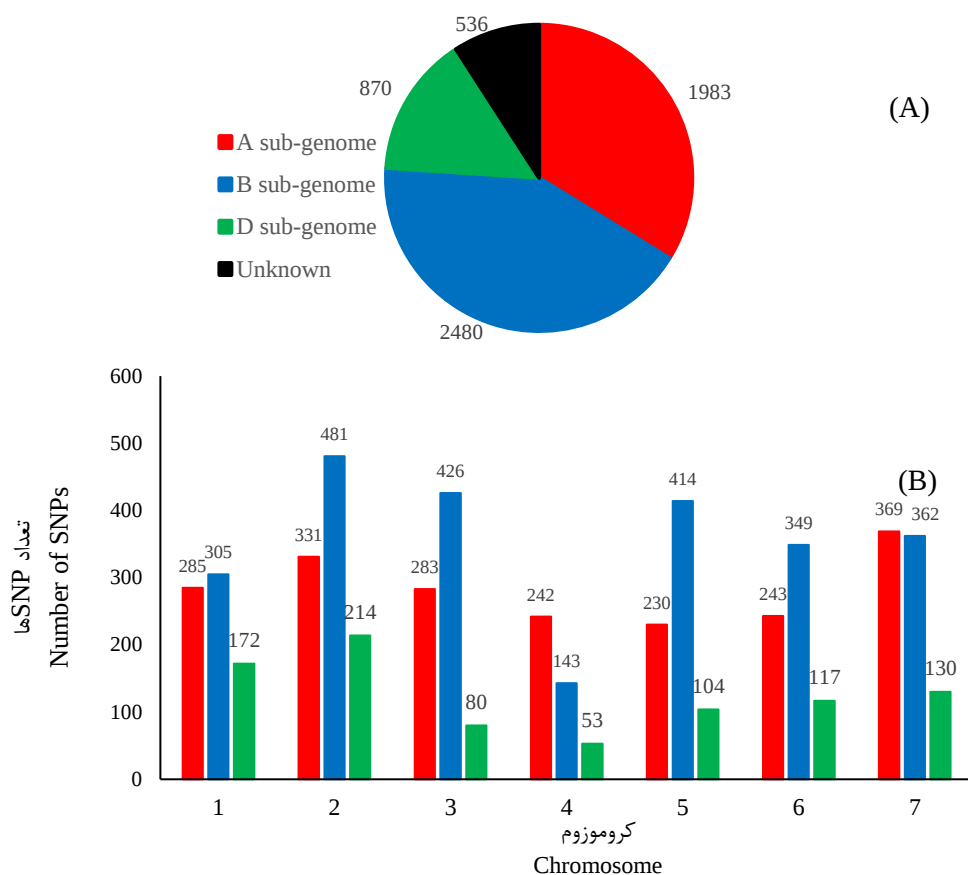
تجزیه عدم تعادل پیوستگی (LD) نشان می‌دهد که LD بین ژنومها، کروموزومها و در هر کروموزوم متفاوت است و LD به‌طورکلی با افزایش فاصله بین SNPها کاهش می‌یابد. در شکل ۳ عدم تعادل پیوستگی در بین SNPها برای ژنوم A، B و D و در سطح کل ژنوم محاسبه شد (شکل ۳).

در بخش ارزیابی ژنوتیپی، از مجموع تعداد ۵۸۶۹ نشانگر SNP شناسایی شده، تعداد ۱۹۸۳ نشانگر در ژنوم A، ۲۴۸۰ نشانگر در ژنوم B، ۸۷۰ نشانگر در ژنوم D و تعداد ۵۳۶ نشانگر بدون موقعیت مشخص شدند (شکل ۲A) که توزیع SNPها روی ژنومهای A، B و D در مطالعه حاضر با مطالعات قبلی گزارش شده بر اساس نشانگرهای SNP (Akhunov et al., 2010; Poland et al., 2012; Würschum et al., 2013; Marcussen et al., 2014; Shavrukov et al., 2014; Edae et al., 2015) و نشانگرهای SSR (Hao et al., 2011) منطبق بودند. در مطالعه ادا و همکاران (Edae et al., 2015) نیز بیشترین تعداد نشانگر SNP در کروموزومهای 3B و 2B و کمترین تعداد نشانگر SNP در کروموزوم 4D مشاهده شد. در مطالعه دیگری که توسط چائوراسیا و همکاران (Chaurasia et al., 2020) به‌منظور ارزیابی تحمل به شوری در مرحله رویشی بر روی ۱۳۵ ژنوتیپ مختلف گندم انجام شد، از مجموع ۱۷۹۲۷ SNP شناسایی شده، ۵۷۳۷ SNP در ژنوم A، ۶۸۱۰ SNP در

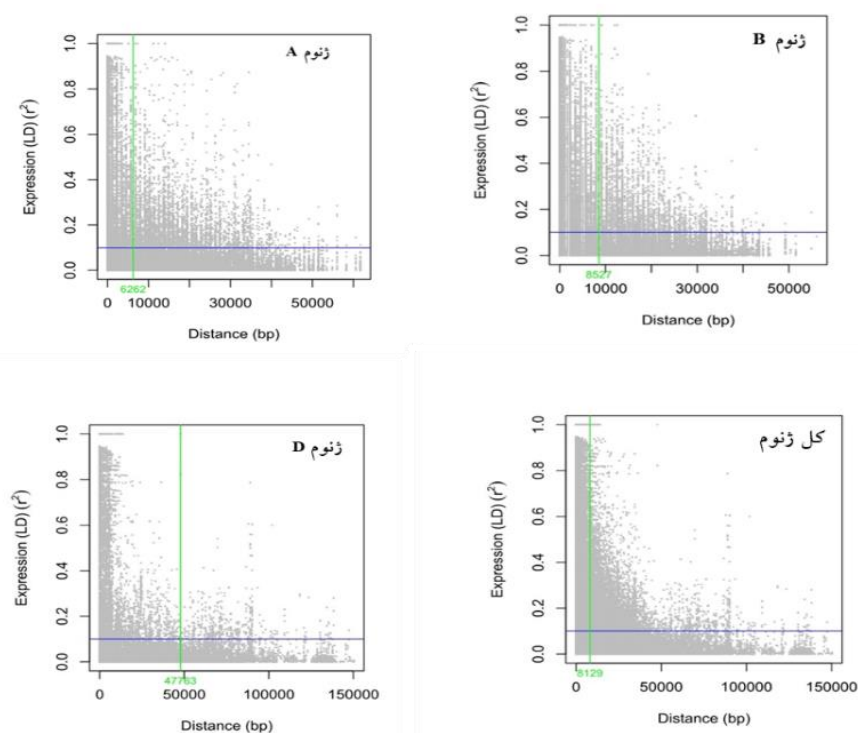


شکل ۱- نمودارهای جعبه‌ای صفات گیاهی شامل (A) وزن تر گیاهی؛ (B) وزن خشک گیاهی؛ (C) طول گیاهی؛ (D) کلروفیل a؛ (E) کلروفیل b؛ (F) کلروفیل کل؛ (G) کاروتنوئید؛ (H) پرولین؛ (I) محتوای نسبی آب برگ؛ (J) غلظت سدیم؛ (K) غلظت پتاسیم؛ (L) نسبت پتاسیم به سدیم در ارقام گندم نان تحت شرایط نرمال و تنش شوری.

Figure 1. Box plots of seedling characteristics including A) Plantlet fresh weight; B) Plantlet dry weight; C) Plantlet length; D) Chlorophyll a; E) Chlorophyll b; F) Total chlorophyll; G) Carotenoids; H) proline; I) Relative water content; J) Na^+ concentration; K) K^+ concentration; L) K^+/Na^+ ratio in bread wheat cultivars under normal and salt stress conditions.



شکل ۲- تعداد نشانگرهای SNP شناسایی شده در ژنوم‌ها (A) و کروموزوم‌های مختلف گندم
Figure 2. The number of identified SNP markers on wheat (A) genomes and (B) chromosomes



شکل ۳- نمودار عدم تعادل پیوستگی (r^2) همه کروموزوم‌ها در ژنوم A، B، D و کل ژنوم در ارقام گندم نان
Figure 3. Linkage Disequilibrium diagram (r^2) of the A, B, D and the whole genome in bread wheat cultivars

Nielsen *et al.*, 2014; Edae *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). دلیل بالا بودن میزان عدم تعادل پیوستگی در ژنوم D در مقایسه با ژنوم A و B ممکن است به علت بیشتر بودن طول عمر ژنومهای A و B در مقایسه با ژنوم D باشد و همچنین در نتیجه دورگ‌گیری گندم ترابلوئید با تعداد بسیار کمی ژنوتیپ *Aegilops tauschii* (حاوی ژنوم D) به‌نوعی اثر گردن بطری برای ژنوم D اتفاق افتاده که منجر به کاهش تنوع و افزایش اندازه بلوک‌های عدم تعادل پیوستگی در ژنوم D شده است (Warburton *et al.*, 2006; Chao *et al.*, 2010).

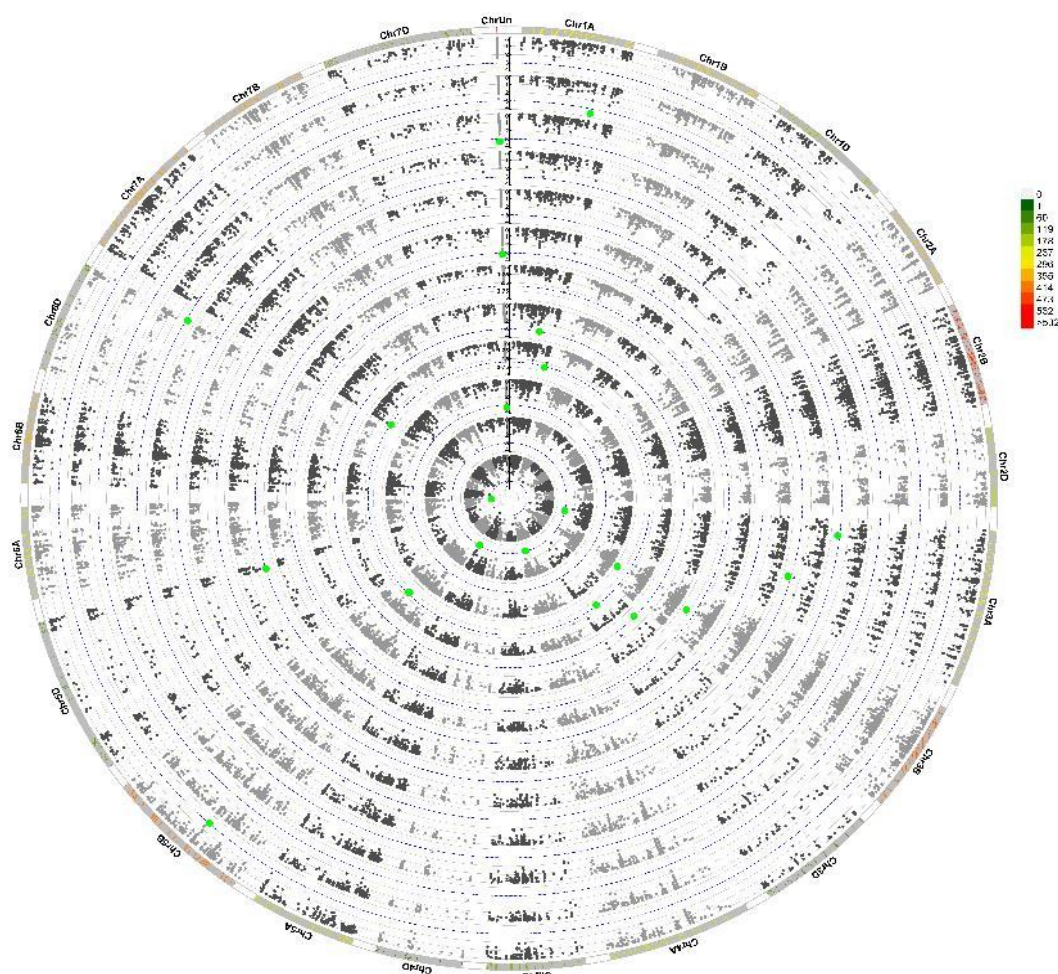
نقشه‌یابی ارتباطی با استفاده از روش MLM برای شرایط نرمال و تنش شوری به‌طور جداگانه انجام شد. در شرایط نرمال در مجموع ۲۵ ارتباط نشانگر-صفت (Marker-trait associations: MTA) در سطح احتمال معنی‌داری $P < 0.001$ ($-\log P\text{-value} > 3$) شناسایی شد. ژنوم A بیشترین تعداد MTA و ژنوم D کمترین تعداد MTA را به خود اختصاص داد (جدول ۲ و شکل ۴).

نمودارهای پراکندگی LD به‌عنوان تابعی از فاصله بین نشانگرها در کروموزوم یکسان برای همه ژنوتیپ‌ها نشان دهنده کاهش واضح LD با فاصله ژنتیکی است. مقادیر بحرانی r^2 برای هر سه ژنوم، $r^2 = 0.1$ تخمین زده شد که فراتر از این حد آستانه، LD احتمالاً توسط یک پیوند فیزیکی واقعی ایجاد می‌شود. تقاطع منحنی مقادیر r^2 با این آستانه به‌عنوان برآوردی از محدوده LD در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج رگرسیون LOESS، آستانه انحطاط عدم تعادل پیوستگی در ژنومهای A، B و D به‌ترتیب در فاصله‌های ۶۲۶۲، ۸۵۲۷ و ۴۷۷۶۳ مشاهده شد؛ بنابراین انحطاط عدم تعادل پیوستگی در ژنوم D در مقایسه با سایر ژنومهای A و B در فاصله بسیار دورتری اتفاق افتاده است که بیانگر بزرگ بودن اندازه بلوک‌های پیوستگی در ژنوم D است. مطالعات قبلی نیز نشان دادند که در حالت کلی انحطاط عدم تعادل پیوستگی در ژنوم D نسبت به ژنومهای A و B در فاصله دورتری اتفاق می‌افتد (Chao *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012).

جدول ۲- مکان و تعداد ارتباطات نشانگر-صفت در ارقام گندم نان در شرایط نرمال

Table 2. Location and number of marker-traits associations in bread wheat cultivars under normal conditions

صفات Traits	مکان کروموزومی Chromosomal location	تعداد کل SNP Total SNP	SNP	موقعیت Position	R ² (%)	-log P-value	MAF
وزن تر گیاهیچه Plant fresh weight	6A	1	rs26597	89156	16.10	3.00	0.270
وزن خشک گیاهیچه Plant dry weight	3A, 4A, 5A	4	rs2748 rs29009 rs58519 rs58520	110830 112315 78686 78686	15.13 15.11 14.91 14.91	3.06 3.06 3.02 3.02	0.275 0.235 0.419 0.419
ارتفاع گیاهیچه Plant height	Unknown	1	rs11033	0	19.63	3.26	0.218
کلروفیل a Chlorophyll a	1A, 3B, 3D, 5B, 7A	8	rs32151 rs43307 rs43308 rs43309 rs2284 rs30602 rs3281 rs64889	58028 96276 96276 96276 10225 114237 74138 9204	26.24 16.79 16.79 16.79 16.52 16.28 15.92 14.28	4.75 3.24 3.24 3.24 3.20 3.15 3.09 3.09	0.276 0.310 0.310 0.310 0.293 0.098 0.494 0.362
کلروفیل b Chlorophyll b	1A, 3D	2	rs46080	74.76	13.89	3.02	0.178
کلروفیل کل Total chlorophyll	3B	1	rs32151	58028	25.61	4.22	0.275
کارتنوئید Carotenoid	Unknown, 5D	2	rs22797 rs33757	0 159327	15.50 14.72	3.16 3.02	0.316 0.298
پروлін Proline	3A	1	rs36606	106630	27.84	3.37	0.339
محتوای نسبی آب برگ Relative leaf water content	3A	1	rs14704	23905	16.68	3.23	0.316
سدیم Sodium	Unknown, 6D	2	rs44589 rs22190	0 121074	13.56 12.89	3.30 3.19	0.276 0.178
پتاسیم Potassium	1A	1	rs38043	87736	24.67	3.55	0.235
پتاسیم/سدیم Potassium/sodium	5B	1	rs50178	62719	11.01	3.06	0.285



شکل ۴- نمودار منتهن پلات ارتباطات نشانگر-صفت در ارقام گندم نان تحت شرایط نرمال. نمودارهای دایره‌ای از داخل به خارج به ترتیب نتایج نقشه‌یابی ارتباطی صفات وزن تر گیاهچه، وزن خشک گیاهچه، ارتفاع گیاهچه، غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، پرولین، محتوای نسبی آب برگ، غلظت سدیم، پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم را نشان می‌دهد. کروموزوم‌ها در خارجی‌ترین دایره نمایش داده شده‌اند. خطوط نقطه‌چین آبی حد آستانه معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۰۱ را نشان می‌دهند. نقطه‌های سبز نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار نشانگر-صفت در سطح احتمال ۰/۰۰۱ می‌باشد.

Figure 4. Manhattan plot for the marker-traits associations in bread wheat cultivars under normal conditions. Inner to outer circles represents plant fresh weight, plant dry weight, plant height, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoid, prolin, RWC, Na, K, and K/Na, respectively. Chromosomes are plotted at the outmost circle and thin dotted blue lines indicate significant level at p value < 0.001. Green dots indicate genome-wide significantly associated SNPs at p-value < 0.001 probability level.

معنی‌داری نشان داد و ۲۵/۶۱ درصد از تغییرات صفت مربوطه را نیز توجیه نمود. برای صفات کلروفیل b، تعداد دو MTA روی کروموزوم 1A و 3D، دو MTA برای کاروتنوئید روی کروموزوم 5D و موقعیت کروموزومی ناشناخته و برای صفت غلظت سدیم نیز تعداد دو MTA در کروموزوم 6D و موقعیت کروموزومی ناشناخته شناسایی شد. برای سایر صفات مورد بررسی تنها یک MTA شناسایی شد (جدول ۲ و شکل ۴).

در بین صفات مورد بررسی در شرایط نرمال، صفت کلروفیل a با تعداد هشت MTA روی کروموزوم‌های 1A، 3B، 3D، 5B، 7A و صفت وزن خشک گیاهچه با تعداد چهار MTA در کروموزوم‌های 3A و 4A، 5A، بیشترین تعداد ارتباط نشانگر-صفت را نشان دادند. نشانگر rs32151 در کروموزوم 3B به‌تنهایی ۲۶/۲۴ درصد از تغییرات صفت کلروفیل a را توجیه نمود. این نشانگر همچنین تنها نشانگری بود که با صفت کلروفیل کل ارتباط

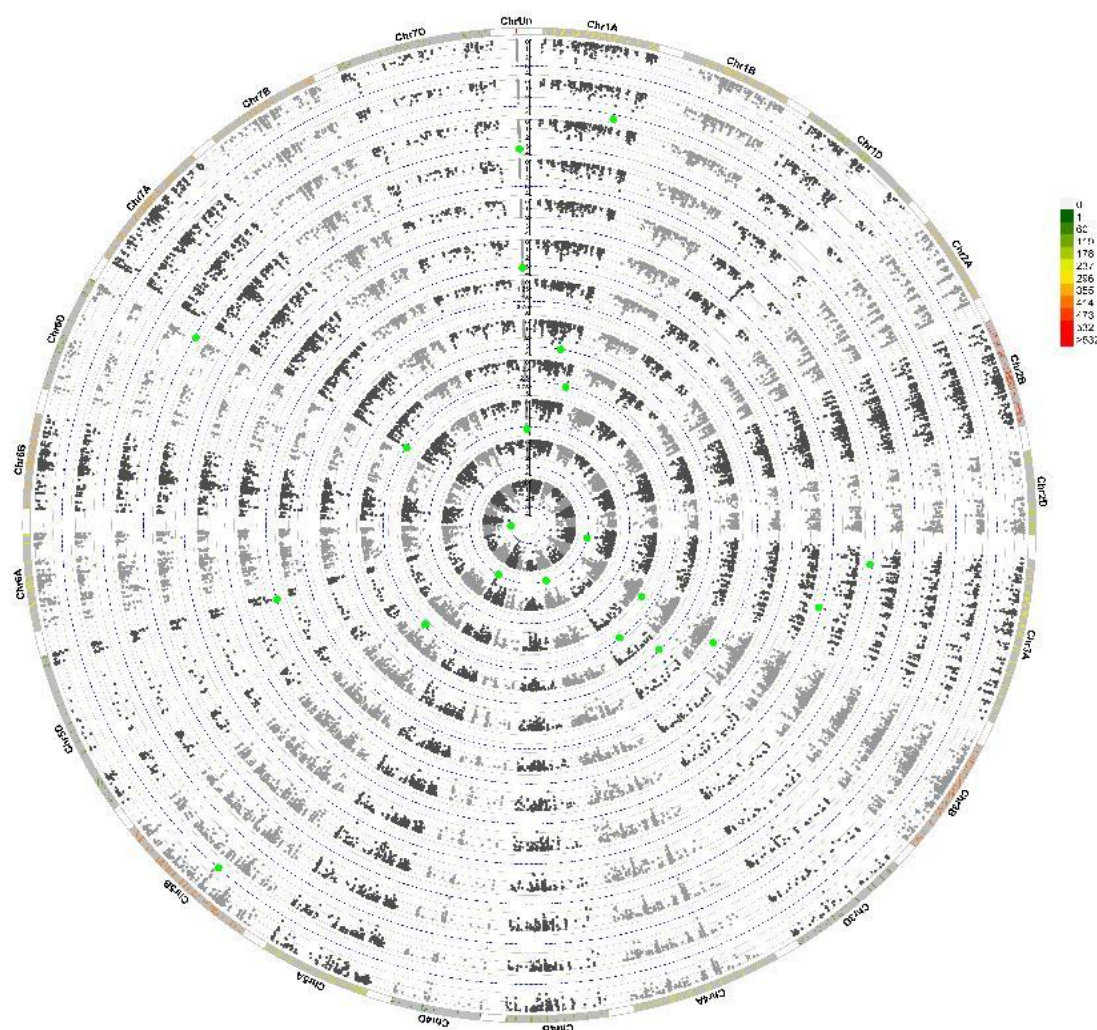
در مطالعه کوان و همکاران (Quan *et al.*, 2021) نیز QTLهای مشابهی برای صفات وزن تر و خشک گیاهیچه و غلظت سدیم در کروموزومهای 5B و 6B مشاهده شد. برآیه فرد و همکاران (Barajehfard *et al.*, 2017) برای هر کدام از صفات وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه در گندم، به ترتیب تنها یک QTL روی کروموزومهای 3D و 4A و برای صفت نسبت وزن خشک ساقه‌چه به وزن خشک ریشه‌چه سه QTL روی کروموزومهای 2D و 3D مکان‌یابی کردند. مونس و همکاران (Munns *et al.*, 2003) کوان و همکاران (Quan *et al.*, 2021)، QTLهای مربوط به غلظت سدیم در کروموزوم 2A را مرتبط با ژن *Nax1* شناسایی نمودند که با موقعیت نسبی QTL شناسایی شده در کروموزوم 2A در پژوهش حاضر منطبق بود. هرچند در تحقیقات انجام شده QTL دیگری در کروموزوم 5B مرتبط با ژن *Nax2* شناسایی شده بود که در تحقیق حاضر شناسایی نشد؛ اما در تحقیق حاضر QTLهای جدید در کروموزومهای 2B، 6B و 7B شناسایی شدند.

تحت شرایط تنش شوری مجموعاً ۲۱ MTA برای صفات مورد بررسی شناسایی شد. ژنوم B تعداد ۱۴ MTA، ژنوم A تعداد شش MTA و یک MTA بدون موقعیت کروموزومی شناسایی شد (جدول ۳ و شکل ۵). برای صفت وزن تر گیاهیچه تعداد پنج MTA شناسایی شد که روی کروموزومهای 4A و 6B قرار داشتند. از میان پنج MTA، چهار نشانگر در کروموزوم 6B قرار داشته که سه مورد از آنها در یک موقعیت کروموزومی قرار داشتند. برای وزن خشک دو MTA روی کروموزومهای 1B و 5B شناسایی شد. برای کلروفیل b یک MTA روی کروموزوم 3A و برای کلروفیل کل یک MTA روی کروموزومهای 1B شناسایی شد. برای محتوای نسبی آب برگ دو MTA شناسایی شد که بر روی کروموزومهای 2B و 7B واقع بودند. غلظت سدیم با تعداد هفت MTA، بالاترین تعداد MTA در شرایط تنش شوری را نشان داد که روی کروموزومهای 2B، 2A، 6B و 7B قرار داشتند و در ارتباط با صفت غلظت پتاسیم تعداد دو MTA در موقعیت یکسان در کروموزوم 4A شناسایی شدند (جدول ۳ و شکل ۵).

جدول ۳- مکان و تعداد ارتباطات نشانگر-صفت در ارقام گندم نان در شرایط تنش شوری

Table 3. Location and number of marker-traits associations in bread wheat cultivars under salt stress conditions

صفات Traits	مکان کروموزومی Chromosomal location	تعداد کل SNP Total SNP	SNP	موقعیت Position	R ² (%)	-log P-value	MAF
وزن تر گیاهیچه Plant fresh weight	4A, 6B	5	rs20173	79672	28.94	4.27	0.125
			rs26711	47831	24.25	3.44	0.284
			rs26710	47831	24.25	3.44	0.284
			rs58964	80808	23.32	3.26	0.113
			rs5445	136190	23.21	3.24	0.255
وزن خشک گیاهیچه Plant dry weight	Unknown, 1B, 5B	3	rs7778	0	3.94	20.13	0.170
			rs47853	92205	3.50	17.48	0.131
			rs23698	38769	3.09	15.02	0.125
کلروفیل b Chlorophyll b	3A	1	rs41063	119706	15.42	3.48	0.125
کلروفیل کل Total chlorophyll	1B	1	rs56613	47847	20.73	3.23	0.431
محتوای نسبی آب برگ Leaf relative water content	2B, 7B	2	rs56489	33023	24.42	3.44	0.465
			rs58764	1185551	23.70	3.31	0.147
			rs40089	58062	15.62	3.41	0.306
			rs40677	65407	14.27	3.18	0.227
			rs4334	48975	13.96	3.13	0.170
سدیم Sodium	2A, 2B, 6B 7B	7	rs4335	48975	13.96	3.13	0.170
			rs44247	73937	13.85	3.11	0.244
			rs61514	73937	13.32	3.02	0.397
			rs61515	92739	13.32	3.02	0.397
			rs23848	122547	15.01	3.02	0.346
پتاسیم Potassium	4A	2	rs23849	122547	15.01	3.02	0.346



شکل ۵- نمودار منهن پلات ارتباطات نشانگر-صفت در ارقام گندم نان تحت شرایط تنش شوری. نمودارهای دایره‌ای از داخل به خارج به ترتیب نتایج نقشه‌یابی ارتباطی صفات وزن تر گیاهچه، وزن خشک گیاهچه، ارتفاع گیاهچه، غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، پرولین، محتوای نسبی آب برگ، غلظت سدیم، پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم را نشان می‌دهد. کروموزوم‌ها در خارجی‌ترین دایره نمایش داده شده‌اند. خطوط نقطه‌چین آبی حد آستانه معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۰۱ را نشان می‌دهند. نقطه‌های سبز نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار نشانگر-صفت در سطح احتمال ۰/۰۰۱ می‌باشند.

Figure 5. Manhattan plot for the marker-traits associations in bread wheat cultivars under salt stress conditions. Inner to outer circles represents plant fresh weight, plant dry weight, plant height, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoid, prolin, RWC, Na, K, and K/Na, respectively. Chromosomes are plotted at the outmost circle and thin dotted blue lines indicate significant level at p value <0.001. Green dots indicate genome-wide significantly associated SNPs at p value <0.001 probability level.

را نشان دادند. از طرف دیگر اندازه بلوک‌های پیوستگی در ژنوم D در مقایسه با ژنوم‌های A و B بسیار بزرگ‌تر بود. مطالعه نقشه‌یابی در سطح ژنوم نشان داد که ژنوم D نقش بسیار کمتری در کنترل صفات گیاهچه‌ای مرتبط با تحمل به تنش دارد، در حالی که در ژنوم B و ژنوم A ارتباطات معنی‌دار بیشتری با صفات گیاهچه‌ای مرتبط با تحمل تنش مشاهده شد. نشانگرهای شناسایی شده در تحقیق حاضر

بر اساس نتایج ارزیابی فنوتیپی، تنش شوری تأثیر معنی‌داری در کاهش صفات وزن تر و خشک گیاهچه، طول گیاهچه، غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، محتوای نسبی آب برگ، غلظت یون‌های پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم و افزایش در صفات محتوای پرولین و تجمع سدیم داشت. در نتایج ژنوتیپ-سنجی ژنوم B و D به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد SNP

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه به جهت تأمین بخشی از هزینه‌های پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌گردد.

پس از تأیید در سایر جمعیت‌ها با استفاده از طراحی نشانگرهای KASP و یا نقشه‌یابی دقیق، می‌توانند در مطالعات آینده برای گزینش به کمک نشانگر مورد استفاده قرار گیرند و باعث تسریع روند برنامه‌های به‌نژادی گندم نان شوند.

References

- Akbari Ghogdi, E., Izadi-Darbandi, A., Borzouei, A. and Majdabadi, A. (2011). Evaluation of morphological changes in some wheat genotypes under salt stress. *Journal of Soil and Plant Interactions-Isfahan University of Technology*, **1(4)**: 71-83 (In Persian).
- Akbarpour, O. and Dehghani, H. (2017). Genetic dissection of grain yield and some morphological traits in Iranian bread wheat under field normal and salt stress conditions using Jinks-Hayman approach. *Cereal Research*, **7(2)**: 155-169.
- Akhunov, E.D., Akhunova, A.R., Anderson, O.D., Anderson, J.A., Blake, N., Clegg, M.T., Coleman-Derr, D., Conley, E.J., Crossman, C.C., Deal, K.R. and Dubcovsky, J. (2010). Nucleotide diversity maps reveal variation in diversity among wheat genomes and chromosomes. *BMC Genomics*, **11(1)**: 1-22.
- Alipour, H. (2016). Association mapping of important agronomic traits in bread wheat. Ph.D. Thesis, University of Tehran, Tehran, Iran (In Persian).
- Barajehfard, M., Siahpoosh, M.R., and Modarresi, M. (2017). QTLs associated with stemlet and rootlet growth in the early stages of germination of wheat. *Plant Genetic Researches*, **3(2)**: 59-68 (In Persian).
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, **39(1)**: 205-207.
- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y. and Buckler, E.S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, **23(19)**: 2633-2635.
- Chao, S., Dubcovsky, J., Dvorak, J., Luo, M.C., Baenziger, S.P., Matnyazov, R., Clark, D.R., Talbert, L.E., Anderson, J.A., Dreisigacker, S. and Glover, K. (2010). Population-and genome-specific patterns of linkage disequilibrium and SNP variation in spring and winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, **11(1)**: 1-17.
- Chartzoulakis, K. and Klapaki, G. (2000). Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia Horticulturae*, **86(3)**: 247-260.
- Chaurasia, S., Singh, A.K., Songachan, L.S., Sharma, A.D., Bhardwaj, R. and Singh, K. (2020). Multi-locus genome-wide association studies reveal novel genomic regions associated with vegetative stage salt tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genomics*, **112(6)**: 4608-4621.
- Chen, X., Min, D., Yasir, T.A. and Hu, Y.G. (2012). Genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium in elite Chinese winter wheat investigated with SSR markers. *PLoS One*, **7(9)**: e44510.
- Edae, E.A., Byrne, P.F., Haley, S.D., Lopes, M.S. and Reynolds, M.P. (2014). Genome-wide association mapping of yield and yield components of spring wheat under contrasting moisture regimes. *Theoretical and Applied Genetics*, **127(4)**: 791-807.
- Edae, E.A., Bowden, R.L. and Poland, J. (2015). Application of Population Sequencing (POPSEQ) for ordering and imputing genotyping-by-sequencing markers in hexaploid wheat. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, **5(12)**: 2547-2553.
- Ersoz, E.S., Yu, J. and Buckler, E.S. (2009). Applications of Linkage disequilibrium and association mapping in maize. In: Kriz, A.L. and Larkins, B.A., Eds., *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*, pp.173-195. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Flint-Garcia, S.A., Thuillet, A.C., Yu, J., Pressoir, G., Romero, S.M., Mitchell, S.E. and Buckler, E.S. (2005). Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *The Plant Journal*, **44(6)**: 1054-1064.
- Flowers, T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **55(396)**: 307-319.
- Gunes, A., Inal, A., Alpuslan, M., Frasan, F., Guneri, E. and Cicek, N. (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, **164**: 728-736.
- Hao, C., Wang, L., Ge, H., Dong, Y. and Zhang, X. (2011). Genetic diversity and linkage disequilibrium in Chinese bread wheat (*Triticum aestivum* L.) revealed by SSR markers. *PLoS One*, **6(2)**: e17279.
- Hu, P., Zheng, Q., Luo, Q., Teng, W., Li, H., Li, B. and Li, Z. (2021). Genome-wide association study of yield and related traits in common wheat under salt-stress conditions. *BMC Plant Biology*, **21(1)**: 1-20.
- Jighly, A., Oyiga, B.C., Makdis, F., Nazari, K., Youssef, O., Tadesse, W. and Ogonnaya, F.C. (2015). Genome-wide DArT and SNP scan for QTL associated with resistance to stripe rust (*Puccinia striiformis* f.

- sp. tritici) in elite ICARDA wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, **128**(7): 1277-1295.
- Long, N.V., Dolstra, O., Malosetti, M., Kilian, B., Graner, A., Visser, R.G. and van der Linden, C.G. (2013). Association mapping of salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **126**(9): 2335-2351.
- Lu, F., Lipka, A.E., Glaubitz, J., Elshire, R., Cherney, J.H., Casler, M.D., Buckler, E.S. and Costich, D.E. (2013). Switchgrass genomic diversity, ploidy, and evolution: novel insights from a network-based SNP discovery protocol. *PLoS Genetics*, **9**(1): e1003215.
- Ma, Y., Qiu, C.W., Fan, Y., Huang, X., Khan, W., Wu, F., Zhou, M., Wang, Y. and Cao, F. (2022). Genome-wide association and transcriptome analysis reveals candidate genes for potassium transport under salinity stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, **202**: 105034.
- Marcussen, T., Sandve, S.R., Heier, L., Spannagl, M., Pfeifer, M., Jakobsen, K.S., Wulff, B.B., Steuernagel, B., Mayer, K.F., Olsen, O.A. and Rogers, J. (2014). Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science*, **345**(6194): 1250092.
- Munns, R., Rebetzke, G.J., Husain, S., James, R.A. and Hare, R.A. (2003). Genetic control of sodium exclusion in durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, **54**(7): 627-635.
- Naz, A.A., Dadshani, S., Ballvora, A., Pillen, K. and Léon, J. (2019). Genetic analysis and transfer of favorable exotic QTL alleles for grain yield across d genome using two advanced backcross wheat populations. *Frontiers in Plant Science*, **10**: 711.
- Nielsen, N.H., Backes, G., Stougaard, J., Andersen, S.U. and Jahoor, A. (2014). Genetic diversity and population structure analysis of European hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *PLoS One*, **9**(4): p.e94000.
- Poland, J.A., Brown, P.J., Sorrells, M.E. and Jannink, J.L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS One*, **7**(2): 1-8.
- Quan, X., Liu, J., Zhang, N., Xie, C., Li, H., Xia, X. and Qin, Y. (2021). Genome-wide association study uncover the genetic architecture of salt tolerance-related traits in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Genetics*, **12**: 1-11.
- Rahnama Ghahfarokhi, A., Poostini, R., Tavakol Afshar, A., Ahmadi, V. and Alizadeh, H. (2010). Physiological study of sodium excretion in different tissues of susceptible and tolerant cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Iranian Journal of Field Crop Science*, **41**(1): 79-92 (In Persian).
- Salami, R., Mohammadi, S.A., Ghafarian, S., and Moghaddam, M. (2016). Expression analysis of *Hv TIP2;3* and *Hv TIP4;1* in sensitive and tolerant barley genotypes under salinity stress. *Plant Genetic Researches*, **2**(2): 1-14 (In Persian).
- Shahinnia, F., and Sayed Tabatabaei, B.E. (2013). EST-based marker discovery and SNP genotyping in plants genome. *Modern Genetics Journal's*, **8**(2): 117-130 (In Persian).
- Shavrukov, Y., Suchecki, R., Eliby, S., Abugalieva, A., Kenebayev, S. and Langridge, P. (2014). Application of next-generation sequencing technology to study genetic diversity and identify unique SNP markers in bread wheat from Kazakhstan. *BMC Plant Biology*, **14**(1): 1-13.
- Sun, C., Dong, Z., Zhao, L., Ren, Y., Zhang, N., and Chen, F. (2020). The Wheat 660K SNP array demonstrates great potential for marker-assisted selection in polyploid wheat. *Plant Biotechnology Journal*, **18**(6): 1354-1360.
- Turki, N., Shehzad, T., Harrabi, M and Okuno, K. (2015). Detection of QTLs associated with salinity tolerance in durum wheat based on association analysis. *Euphytica*, **201**(1): 29-41.
- Wang, S., Wong, D., Forrest, K., Allen, A., Chao, S., Huang, B.E., Maccaferri, M., Salvi, S., Milner, S.G., Cattivelli, L. and Mastrangelo, A.M. (2014). Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnology Journal*, **12**(6): 787-796.
- Warburton, M.L., Crossa, J., Franco, J., Kazi, M., Trethowan, R., Rajaram, S., Pfeiffer, W., Zhang, P., Dreisigacker, S. and Van Ginkel, M. (2006). Bringing wild relatives back into the family: recovering genetic diversity in CIMMYT improved wheat germplasm. *Euphytica*, **149**(3): 289-301.
- Würschum, T., Langer, S.M., Longin, C.F.H., Korzun, V., Akhunov, E., Ebmeyer, E., Schachschneider, R., Schacht, J., Kazman, E. and Reif, J.C. (2013). Population structure, genetic diversity and linkage disequilibrium in elite winter wheat assessed with SNP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **126**(6): 1477-1486.
- Zeeshan, M., Lu, M., Sehar, S., Holford, P. and Wu, F. (2020). Comparison of biochemical, anatomical, morphological, and physiological responses to salinity stress in wheat and barley genotypes differing in salinity tolerance. *Agronomy*, **10**(1): 1-15.
- Zegeye, H., Rasheed, A., Makdis, F., Badebo, A. and Ogbonnaya, F.C. (2014). Genome-wide association mapping for seedling and adult plant resistance to stripe rust in synthetic hexaploid wheat. *PLoS One*, **9**(8): 1-18.
- Zhang, L., Liu, D., Guo, X., Yang, W., Sun, J., Wang, D., Sourdille, P. and Zhang, A. (2011). Investigation of genetic diversity and population structure of common wheat cultivars in northern China using DArT markers. *BMC Genetics*, **12**(1): 1-11.

Genome-Wide Association Study of Seedling Characteristics in Bread Wheat Cultivars Under Normal and Salt Stress Conditions

Razieh Ghorbani¹, Raheleh Ghasemzadeh^{2,*} and Hadi Alipour³

- 1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: July 9, 2022 – Accepted: September 13, 2022)

Abstract

In order to identify loci controlling seedling morpho-physiologic characteristics in 88 bread wheat cultivars, a greenhouse experiment based on simple alpha lattice was conducted under both normal and 120 mM (12 ds/m) salt stress condition of the Faculty of Agriculture, Urmia University in 2020-2021 cropping season. Chlorophyll a, b and carotenoid content, proline, plant fresh and dry weight, plant height and leaf relative water content (RWC), Na⁺, K⁺ and K⁺/Na⁺ concentrations were measured. After genotyping by sequencing with Ion Torrent technology and removal of SNPs with more than 20% of missing data and minor allele frequency less than 5%, a total of 5869 SNP markers were identified. Based on association mapping with the mixed linear model (MLM) method, a total of 25 marker-trait associations were detected under normal conditions. The A and D genomes had the highest and lowest number of significant marker-trait associations (MTAs). Among the studied traits under normal conditions, chlorophyll a had the highest number of MTAs on 1A, 3B, 3D, 5B, 7A chromosomes with eight MTAs. A total of 21 MTAs were identified under salt stress conditions which the genome B and D had the highest and lowest number of MTAs, respectively. Five MTAs were identified for plant fresh weight, which were located on chromosomes 4A and 6B. The results of this study provide valuable information about the loci associated with the studied traits, which can be used in marker assisted selection in wheat breeding programs after confirmation in biparental populations and additional experiments.

Keywords: Bread wheat cultivars, GWAS, Salt stress, SNP markers

* Corresponding Author, E-mail: r.ghasemzade@urmia.ac.ir