University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research
Vol. 12, No. 2, Summer 2022 (187-205)
doi: 10.22124/CR.2023.23561.1752
pISSN: 2252-0163 eISSN: 2538-6115

RESEARCH PAPER OPEN ACCESS

Association mapping of physiological and biochemical traits of wheat using SNP markers under optimal and zinc deficiency stress conditions

Nasrin Valipour[1], Hadi Alipour[2*] and Reza Darvishzadeh[3]

1. Graduate M.Sc., Department of Plant Production and Genetics, Urmia University, Urmia, Iran
2. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Urmia University, Urmia, Iran
([*]Corresponding author: ha.alipour@urmia.ac.ir)
3. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Urmia University, Urmia, Iran

Comprehensive abstract

Introduction

Environmental stresses such as nutrients deficiency stress are serious threats to agricultural products. Zinc is one of the low-consumption essential nutrients but with high nutritional value, which plays an important role in root growth, increasing yield, plant resistance to diseases, photosynthesis, cell membrane integrity, pollen formation, energy production and increasing antioxidant enzymes and chlorophyll in plant tissues. Furthermore, zinc is essential for production of plant hormones such as abscisic acid, auxin, gibberellins and cytokinin, and its deficiency causes disruption in plant cell reprodution. Wheat grain contains zinc about from 20 to 30 mg/kg. About 50% of the soils used for cereal production in the world do not have enough usable zinc. One of the strategies to compensate for zinc deficiency is to improve zinc-efficient cultivars. Therefore, it is necessary to conduct basic research to identify the genes controlling zinc. In the current research, 64 spring wheat cultivars were studied under normal and zinc deficiency stress conditions, and the objective of this experiment was to identify genomic locations controlling phenological, physiological and biochemical characteristics using LD-based GWAS method based on SNP markers.

Materials and methods

To genome-wide association study of yield and physiological and biochemical traits in Iranian bread wheat varieties, 64 varieties of spring wheat were cultivated as a pot experiment in a simple lattice design under two normal and zinc deficiency stress conditions in the research farm of Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. The studied traits include days to germination, days to booting, days to pollination, days to physiological maturity, grain filling period, canopy temperature, total chlorophyll, leaf area index, fresh and dry shoot weight, relative water content, shoot zinc concentration, grain protein concentration and grain yield. Genotypic evaluation of the population was performed using 36360 SNP markers. To determine the population structure, principal component analysis (PCA) was used and PCA results were considered as covariate variables instead of the Q matrix for association analysis. For association analysis and identification of linked markers to the genes controlling the studied traits, GLM and MLM methods were used and significant marker-trait associations (MTAs) were separately identified for each of the experimental conditions.

Research findings

The results of association analysis using the GLM method identified 145 marker-trait associations (MTAs) under normal conditions and 135 MTAs under zinc deficiency stress conditions, while using the MLM method, 165 and 142 MTAs were identified under normal and zinc deficiency stress conditions, respectively. The highest and lowest number of significant marker-trait associations with both GLM and MLM methods under normal conditions were identified for dry weight and grain filling period, respectively, while under zinc deficiency stress conditions, the highest number of significant MTA with both association analysis methods was observed for leaf relative water content and the lowest number of MTA was observed for grain protein content and shoot zinc concentration. Identified markers can be used in breeding methods such as selection with in breeding programs. The significant marker-trait associations (MTAs) identified in this experiment can be used to increase the efficiency of breeding programs using the marker-assisted selection.

Conclusion

The results of the present study showed the efficiency of the association analysis method as well as the GLM and MLM models in identifying markers linked to evaluated traits in wheat. The information obtained from this experiment also showed that SNP markers are a powerful tool for evaluating genetic diversity and preparing the structure of wheat populations and can be used in breeding programs via marker-assisted selection. Although, it is necessary to investigate the markers identified in larger populations to ensure their relationship with the studied traits. In this study, several common and similar gene loci were also identified for the studied traits, which can be used for the simultaneous multi-traits selection in future breeding programs.

Keywords: Genome wide association studies (GWAS), Marker-trait association, Nutrient stress, Population structure, Spring wheat

Received: May 07, 2022 Accepted: July 05, 2022

Cite this article:

Valipour, N., Alipour, H. and Darvishzadeh, R. 2022. Association mapping of physiological and biochemical traits of wheat using SNP markers under optimal and zinc deficiency stress conditions. **Cereal Research** 12 (2): 187-205.

تحقیقات غلات
دوره دوازدهم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۱ (۲۰۵-۱۸۷)
doi: 10.22124/CR.2023.23561.1752

مقاله پژوهشی | دسترسی آزاد

نقشه‌یابی ارتباطی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گندم با استفاده از نشانگرهای SNP در شرایط بهینه و تنش کمبود روی

نسرین ولی‌پور[۱]، هادی علی‌پور[۲*] و رضا درویش‌زاده[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (* نویسنده مسئول: ha.alipour@urmia.ac.ir)
۳- استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده جامع

مقدمه: تنش‌های محیطی نظیر تنش کمبود عناصر غذایی، تهدیدات جدی برای تولیدات کشاورزی محسوب می‌شوند. عنصر روی از جمله عناصر ضروری کم‌مصرف، اما با ارزش تغذیه‌ای بالا است که نقش مهمی در رشد ریشه، افزایش عملکرد محصول، مقاومت گیاه در برابر بیماری‌ها، فتوسنتز، یکپارچگی غشای سلولی، تشکیل دانه گرده، تولید انرژی و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کلروفیل در بافت‌های گیاهی دارد. علاوه بر این، روی برای تولید هورمون‌های گیاهی مانند اسید آبسیزیک، اکسین، جیبرلین‌ها و سیتوکینین ضروری و کمبود آن باعث اختلال در تکثیر سلول‌های گیاهی می‌شود. میزان روی دانه گندم بین ۲۰ تا ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم است. حدود ۵۰ درصد از خاک‌هایی که برای تولید غلات در دنیا استفاده می‌شوند، مقدار روی قابل استفاده کافی ندارند. یکی از راه‌کارهای مقابله با کمبود روی، اصلاح ارقام روی-کارا است و بنابراین انجام تحقیقات پایه به‌منظور شناسایی ژن‌های کنترل کننده آن ضروری است. در تحقیق حاضر ۶۴ رقم گندم بهاره تحت شرایط بهینه و تنش کمبود روی مورد مطالعه گرفت و هدف از آزمایش، شناسایی مکان‌های ژنومی کنترل کننده صفات فنولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی با استفاده از روش GWAS مبتنی بر LD بر اساس نشانگرهای SNP بود.

مواد و روش‌ها: به‌منظور نقشه‌یابی در سطح ژنوم عملکرد و صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در ارقام گندم نان، تعداد ۶۴ رقم گندم بهاره به صورت یک آزمایش گلدانی در قالب طرح لاتیس ساده تحت دو شرایط بهینه و تنش کمبود روی در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ارومیه کشت شدند. صفات مطالعه شده شامل روز تا جوانه‌زنی، روز تا سنبله‌دهی، روز تا گرده‌افشانی، روز تا رسیدگی فیزیولوژیک، طول پرشدن دانه، دمای کانوپی، کلروفیل کل، شاخص سطح برگ، وزن تر و خشک اندام هوایی، محتوای آب نسبی برگ، غلظت روی اندام هوایی، غلظت پروتئین دانه و عملکرد دانه بودند. ارزیابی ژنوتیپی جمعیت با استفاده از ۳۶۳۶۰ نشانگر SNP انجام شد. برای تعیین ساختار جمعیت، از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) استفاده و نتایج PCA به‌جای ماتریس Q به‌عنوان متغیر کمکی جهت انجام تجزیه ارتباطی در نظر گرفته شد. برای انجام تجزیه ارتباطی و شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل کننده صفات مورد مطالعه نیز از دو روش GLM و MLM استفاده و ارتباط‌های نشانگر- صفت (MTA) معنی‌دار به‌طور جداگانه برای هر یک از شرایط آزمایشی شناسایی شد.

یافته‌های تحقیق: نتایج تجزیه ارتباطی با استفاده از روش GLM تعداد ۱۴۵ ارتباط نشانگر- صفت (MTA) تحت شرایط بهینه و ۱۳۵ MTA تحت شرایط تنش کمبود روی شناسایی کرد، در حالی‌که با استفاده از روش MLM تعداد ۱۶۵ MTA تحت شرایط بهینه و ۱۴۲ MTA تحت شرایط تنش کمبود روی شناسایی شد. بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد ارتباط نشانگر- صفت معنی‌دار با هر دو روش GLM و MLM تحت شرایط بهینه، به‌ترتیب برای صفت وزن خشک و طول دوره پرشدن دانه شناسایی شد، در حالی‌که تحت شرایط تنش کمبود روی، بیش‌ترین تعداد ارتباط نشانگر- صفت معنی‌دار با هر دو روش تجزیه ارتباطی مربوط به صفت محتوای آب نسبی برگ و کم‌ترین تعداد مربوط به صفات غلظت پروتئین دانه و غلظت روی اندام هوایی بود. از ارتباط‌های نشانگر- صفت معنی‌دار شناسایی شده در این آزمایش، می‌توان به‌منظور افزایش کارایی برنامه‌های به‌نژادی از طریق فرایند انتخاب به‌کمک نشانگر استفاده کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر، کارایی استفاده از روش نقشه‌یابی ارتباطی و مدل‌های GLM و MLM را در شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در گندم نشان داد. همچنین، اطلاعات به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که نشانگرهای SNP ابزار توانمندی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تهیه ساختار جمعیت‌های گندم هستند و می‌توانند از طریق انتخاب به‌کمک نشانگر در برنامه‌های به‌نژادی مورد استفاده قرار گیرند. البته لازم است نشانگرهای شناسایی شده در جمعیت‌های بزرگ‌تر مورد بررسی قرار گیرند تا از ارتباط آن‌ها با صفات مورد مطالعه اطمینان حاصل شود. در این مطالعه چندین مکان ژنی مشترک نیز برای صفات مورد مطالعه شناسایی شد که می‌توان از آن‌ها به‌منظور گزینش همزمان چند صفتی در برنامه‌های به‌نژادی آینده استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: ارتباط نشانگر- صفت، تنش عناصر غذایی، ساختار جمعیت، گندم بهاره، نقشه‌یابی در سطح ژنوم

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۴

نحوه استناد به این مقاله:

ولی‌پور، نسرین، علی‌پور، هادی و درویش‌زاده، رضا. ۱۴۰۱. نقشه‌یابی ارتباطی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گندم با استفاده از نشانگرهای SNP تحت شرایط بهینه و تنش کمبود روی. **تحقیقات غلات** ۱۲ (۲): ۲۰۵-۱۸۷.

مقدمه

گندم با نام علمی *Triticum aestivum* L.، یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی و به‌عنوان مهم‌ترین گیاه از خانواده غلات به‌شمار می‌رود و در کنار برنج و ذرت بخش اعظم رژیم غذایی مردم دنیا را تامین می‌کند (Ignaciuk and Mason-Dcroz, 2014). تولید گندم در سال ۲۰۲۱ به‌میزان ۷۸۱/۲ میلیون تن بود، اما در سال ۲۰۲۲ تولید آن به‌میزان ۲/۷ میلیون تن کاهش یافت (FAO, 2022).

مطالعه ژنتیکی صفات کمّی یکی از اهداف اصلی به‌نژادی گیاهی می‌باشد که امروزه با استفاده از مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی انجام می‌گیرد. اغلب صفاتی که ارزش اقتصادی دارند و با شایستگی افراد مرتبط هستند، به صورت کمّی و توسط چندین جایگاه ژنی کنترل می‌شوند (Stich *et al*., 2010). اطلاع از تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت جهت استفاده از منابع ژنتیکی در برنامه‌های به‌نژادی از اهمیت بالایی برخوردار است، و علاوه بر آن می‌تواند اطلاعات ارزش‌مندی برای انجام نقشه‌یابی ارتباطی و گزینش به‌کمک نشانگر فراهم آورد (Pour-Aboughadareh *et al*., 2022). در روش مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی، تفرق همزمان صفت کمی و نشانگرهای مولکولی بررسی و در نهایت تعداد ژن‌ها، نوع عمل آن‌ها و میزان اثر هر یک برآورد شده و مکان QTLها روی ژنوم شناسایی می‌شود. از این‌رو می‌توان از نتایج آن در گزینش به‌کمک نشانگر استفاده کرد (Liu, 2017). نشانگرهای مولکولی براساس تفاوت در توالی DNA افراد در سطح ژنوم توسعه می‌یابند و به‌دلیل عدم تاثیرپذیری از شرایط محیطی، پایداری و دقت بالاتری دارند و به یکی از پرکاربردترین ابزارها در شناسایی ژرم‌پلاسم گیاهی تبدیل شده‌اند (Liu *et al*., 2022). نشانگرهای SNP به‌دلیل فراوانی بالا نسبت به سایر نشانگرها و نیاز به زمان کم‌تر برای ارزیابی افراد، یکی از نشانگرهای پرکاربرد و ارجح در ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌ها هستند. همچنین تعداد جهش در این نشانگرها پایین است که این برای بررسی چگونگی تکامل ژنوم بسیار مفید است (Mansori *et al*., 2017). شناسایی مداوم SNPها و توسعه پلتفرم‌های تعیین ژنوتیپ SNP باعث شده است که این نشانگرها مورد توجه فراوان قرار گیرند (Edwards *et al*., 2013). امروزه آرایه‌های تعیین ژنوتیپ SNP با تراکم بالا، به‌طور گسترده برای مطالعه الگوهای ژنومی تنوع و روابط خویشاوندی و نیز شناسایی روابط نشانگر- صفت در ژرم‌پلاسم استفاده می‌شوند (Wang *et al*., 2014).

تنش‌های محیطی تهدید جدی برای تولیدات کشاورزی محسوب می‌شوند. از جمله تنش‌های غیر زیستی می‌توان به کمبود ریزمغذی‌ها در خاک اشاره کرد. از جمله عناصر ضروری کم مصرف، اما با ارزش تغذیه‌ای بالا روی می‌باشد (Welch, 2001). روی نقش مهمی در رشد ریشه، افزایش عملکرد محصول، مقاومت گیاه در برابر بیماری‌ها، فتوسنتز، یکپارچگی غشای سلولی، تشکیل گرده، تولید انرژی و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کلروفیل در بافت‌های گیاهی دارد. علاوه بر این، روی برای تولید هورمون‌های گیاهی مانند اسید آبسیزیک، اکسین، جیبرلین و سیتوکینین ضروری است و کمبود آن باعث اختلال در تکثیر سلول‌های گیاهی می‌شود. از سوی دیگر، گیاهان با میزان روی کم نسبت به عفونت‌های قارچی و همچنین آسیب‌های ناشی از نور و گرما حساس‌تر هستند (Khalid and Ahmed, 2022). میزان روی دانه گندم بین ۲۰ تا ۳۰ میلی‌گرم با متوسط ۲۷/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم است (Morgounov *et al*., 2013). حدود ۵۰ درصد خاک‌هایی که برای تولید غلات در دنیا استفاده می‌شوند، مقدار روی قابل استفاده کافی ندارند (Graham and Welch, 1996). کمبود روی در خاک می‌تواند منجر به تولید فرآورده‌هایی با کیفیت پایین از لحاظ تغذیه‌ای و سلامت غذایی شود (Broadley *et al*., 2007). یکی از راه‌کارهای مقابله با کمبود روی اصلاح ارقام روی-کارا است (Graham and Rengel, 1993). وجود یا تجمع عناصر کم‌مصرف (ریز مغذی‌ها) در بذر غلات شامل تعداد زیادی از فرایندها از جمله حرکت از خاک، جذب از محیط اطراف ریشه، انتقال و جابجایی از ریشه، انتقال مجدد از بافت‌های رویشی و تثبیت در شکل‌ها و فرم-های زیستی دسترس‌پذیر می‌باشد. هرکدام از این فرایندها توسط شبکه‌ای از ژن‌ها کنترل می‌شوند (Bouis and Welch, 2010). از این‌رو انجام تحقیقات پایه برای شناسایی آن‌ها ضروری است. مکان‌های ژنی کنترل‌کننده تجمع عناصر غذایی در گندم و سایر غلات با استفاده از جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب و دابل هاپلوئید شناسایی شده است. در آزمایشی روی ۲۸۷ ژنوتیپ گندم طی دو سال

در دو مکان با استفاده از ۱۸۶۳ نشانگر DarT، سه جایگاه ژنومی حاوی QTL برای عملکرد دانه روی کروموزوم‌های 2D، 5B و 1B نقشه‌یابی شد (Edae *et al*., 2013). راثان و همکاران (Rathan *et al*., 2022) با استفاده از تحلیل ارتباط در گستره ژنوم (GWAS) روی ۱۸۴ رقم گندم نان، دو ارتباط نشانگر- صفت (MTA = Marker Trait Association) برای غلظت روی دانه روی کروموزوم‌های 1A و 7B شناسایی کردند. در مطالعه دیگری روی ۳۳۰ ژنوتیپ گندم، ۳۹ MTA برای غلظت روی دانه شناسایی شد (Velu *et al*., 2012). کیرشناپا و همکاران (Krishnappa *et al*., 2022) نیز با مطالعه ۲۸۰ ژنوتیپ گندم نان و با استفاده از روش GWAS، تعداد پنج MTA برای غلظت روی دانه روی کروموزوم‌های 5B، 2B، 6A و 7B شناسایی کردند. آلوماری و همکاران (Alomari *et al*., 2018) با استفاده از نشانگرهای SNP در ۳۶۹ ژنوتیپ گندم، تعداد ۴۰ MTA بر اساس GWAS برای غظت روی دانه روی کروموزوم‌های 2A، 3A، 3B، 4A، 4D، 5A، 5B، 5D، 6D، 7A، 7B و 7D شناسایی کردند. در این آزمایش نیز تعداد ۶۴ رقم گندم بهاره تحت دو شرایط بهینه و تنش کمبود روی مورد مطالعه قرار گرفتند و هدف از اجرای آزمایش، شناسایی مکان‌های ژنومی مرتبط با صفات فنولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی با استفاده از روش GWAS مبتنی بر LD بر اساس نشانگرهای SNP بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی

مواد گیاهی این پژوهش تعداد ۶۴ رقم گندم بهاره (جدول ۱) بود که به‌منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی از طریق نقشه‌یابی ارتباطی در قالب طرح لاتیس ساده تحت شرایط بهینه و تنش کمبود روی در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه واقع در منطقه نازلو با طول جغرافیایی ۴۵ درجه و ۴ ثانیه و عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۳۲ ثانیه و ارتفاع ۱۳۲۰ متر از سطح دریا در سال زراعی ۹۹-۱۳۹۸ در شرایط گلدانی کشت شد. گلدان‌های چهار کیلوگرمی با ترکیب خاک رس و ماسه با نسبت (۲:۱) پر شدند. میزان روی ترکیب خاک گلدان‌ها ۰/۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. در هر گلدان تعداد ۱۵ عدد بذر کشت شد و بعد از تنک کردن تعداد شش بوته در هر گلدان باقی گذاشته شد. کوددهی و تأمین عناصر ریزمغذی با محلول هوگلند انجام گرفت. محلول هوگلند با نسبت‌های ۱/۱۶، ۱/۸، ۱/۴، ۱/۲ و ۱ آماده شد و در شرایط بهینه، میزان روی برای قدرت یک (۵۰)، قدرت یک‌دوم (۲۵)، قدرت یک‌چهارم (۱۲/۵)، قدرت یک‌هشتم (۶/۲۵) و قدرت یک‌شانزدهم (۳/۱۲) میلی‌گرم بر لیتر و در شرایط تنش کمبود روی، برای تمامی قدرت‌ها صفر در نظر گرفته شد. با توجه به اینکه گیاهان در مراحل اولیه رشد قدرت کمی دارند و همچنین جهت جلوگیری از سوختگی ناشی از تجمع مواد غذایی و شوری خاک، مواد مغذی بر اساس نیاز گیاه و با قدرت‌های کم هوگلند که هر کدام از قدرت‌ها در طول دو هفته به گلدان‌ها اضافه شد، انجام گرفت. آبیاری گلدان‌ها به‌صورت دستی هر دو روز یک‌بار صورت گرفت.

صفات مطالعه شده در این تحقیق، صفات فنولوژیک شامل تعداد روز تا جوانه‌زنی کامل ۵۰ درصد از بذرها)، تعداد روز تا سنبله‌دهی (خروج کامل ۵۰ درصد از سنبله‌ها از برگ پرچم)، تعداد روز تا گرده‌افشانی (خروج کامل ۵۰ درصد از پرچم‌ها از سنبله)، تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک (زرد شدن ۵۰ درصد از پدانکل‌ها)، تعداد روز تا رسیدگی کامل (زرد شدن کامل بوته‌ها) و طول دوره پر شدن دانه (تفاوت روز تا رسیدگی فیزیولوژیک از روز تا گرده‌افشانی) و صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی شامل دمای کانوپی، کلروفیل کل، شاخص سطح برگ، وزن تر و خشک بوته، محتوای آب نسبی برگ، غلظت پروتئین دانه، غلظت روی اندام هوایی و در نهایت عملکرد دانه بودند.

برای اندازه‌گیری محتوای آب نسبی برگ (RWC) با استفاده از روش سیلویرا و همکاران (Silveira *et al*., 2003)، از هر واحد آزمایشی برگ پرچم تازه با توسعه کامل انتخاب و جهت جلوگیری از پژمردگی نمونه‌ها، در داخل نایلون فریزر روی یخ قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های برگی توسط موکت‌بر ظریف به تکه‌های کوچک تقسیم و بلافاصله وزن تر آن‌ها با استفاده از ترازوی حساس اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت داخل پتری‌دیش حاوی آب مقطر در دمای اتاق قرار داده شدند و بعد از طی این زمان، آب اضافی آن‌ها توسط دستمال کاغذی گرفته و وزن اشباع اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت داخل آون با دمای ۷۲ درجه سلسیوس

قرار گرفتند و وزن خشک اندازه‌گیری شد. سپس محتوای آب نسبی نمونه‌ها با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد:

$$RWC=\frac{FW-DW}{TW-DW}\times 100 \quad (۱)$$

که در آن، FW، TW و DW به‌ترتیب وزن تر، وزن اشباع و وزن خشک برگ هستند.

برای اندازه‌گیری شاخص سطح برگ (LAI)، ابتدا با استفاده از دستگاه سطح‌سنج (Leaf Area Meter AM 200)، سطح برگ پرچم سه نمونه تصادفی از هر تکرار اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها ثبت شد و سپس از نسبت سطح برگ (LA) به مساحت گلدان (GA) شاخص سطح برگ محاسبه شد (رابطه ۲):

$$LAI=\frac{LA}{GA} \quad (۲)$$

جهت اندازه‌گیری دمای کانوپی، دمای برگ پرچم سه بوته تصادفی از هر تکرار با استفاده از دماسنج مادون قرمز (Infra-rad Thermometer, Model 8889) در ساعت ۱۰-۱۱ صبح اندازه‌گیری و میانگین آنها یادداشت شد.

برای اندازه‌گیری کلروفیل کل، سه برگ پرچم تصادفی از هر تکرار انتخاب و میانگین کلروفیل آن‌ها با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج (SPAD 502) اندازه‌گیری شد.

غلظت روی اندام هوایی با روش خوش‌گفتارمنش (Khoshgoftarmanesh, 2007) اندازه‌گیری شد. در این روش یک گرم از هر نمونه در داخل کروزه چینی در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس به‌مدت چهار ساعت در کوره سوزانده و سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک دو درصد به نمونه اضافه شد و تحت حرارت ملایم قرار گرفت تا نیمی از اسید تبخیر شود. نمونه‌ها در بالن ۵۰ میلی‌لیتری توسط کاغذ واتمن ۴۲ صاف شده و به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شدند و سپس غلظت روی آن‌ها با استفاده از دستگاه جذب اتمی (AAS, Perkin-Elmer model 3030) اندازه‌گیری شد.

پروتئین دانه به‌عنوان یک عامل مؤثر در جذب روی دانه، با روش پیک و همکاران (Peck *et al*., 2008) اندازه‌گیری شد. یک گرم نمونه آسیاب شده، به بالن هضم کجلدال انتقال یافت و با اسید سولفوریک غلیظ در مجاورت کاتالیزور (سولفات مس، سولفات پتاسیم و سلنیم) به‌مدت سه ساعت در دمای ۳۸۰ درجه سلسیوس هضم شد. سپس غلظت نیتروژن نمونه توسط دستگاه کجلدال قرائت و با استفاده از ضریب ۵/۷، غلظت نیتروژن به غلظت پروتئین تبدیل شد.

برای اندازه‌گیری عملکرد دانه نیز وزن کل دانه به‌دست آمده از هر واحد آزمایشی بر حسب گرم در بوته ثبت شد.

ارزیابی ژنوتیپی

در بخش ارزیابی ژنوتیپی از داده‌های ژنوتیپی به‌دست آمده توسط علی‌پور (Alipour, 2016) که در دانشگاه ایالتی کانزاس با استفاده از تکنولوژی Ion Torrent به‌دست آمد، استفاده شد. با توجه به تفاوت تعداد نمونه‌های این تحقیق با تحقیق اولیه (Alipour, 2016)، مجدداً برای ارقام گندم بهاره داده‌های حاصل از توالی‌یابی برای 64bp تیمار و خوانش‌های یکسان داخل تگ‌ها گروه‌بندی و سپس تگ‌های با توالی یکسان برای شناسایی‌SNPها داخل تگ‌ها هم‌ردیف شدند. سپس فراخوانی SNPها با استفاده از UNEAK (Universal Network Enabled Analysis Kit) (GBS pipeline) (Lu *et al*., 2013)، که بخشی از بسته بیوانفورماتیکی TASSEL 4.0 است، انجام شد (Bradbury *et al*., 2007). آنگاه برای کاهش خطای مثبت، SNPهای با هتروزیگوتی بیش‌تر از ۱۰٪، داده گمشده بیش‌تر از ۲۰٪ و فروانی آللی جزئی (Minor allele frequency) کم‌تر از پنج درصد حذف شدند. عدم تعادل پیوستگی مربوط به هر جفت نشانگر و آماره r^2 به‌طور جداگانه برای هر کروموزوم و نیز برای کل ژنوم با استفاده از نرم‌افزار TASSEL5 محاسبه شد. برای تعیین عدم تعادل پیوستگی فقط از نشانگرهایی استفاده شد که مکان کروموزومی آن‌ها مشخص بودند. برای تعیین الگوی کاهش عدم تعادل بین و درون کروموزومی، مقادیر r^2 و فاصله ژنتیکی (سانتی‌مورگان) روی یکدیگر ترسیم و رگرسیون LOESS (Jacoby, 2000) برازش داده شد. این روش رگرسیونی یک روش غیرپارامتریک است که برای وقتی که داده‌ها چولگی دارند، استفاده می‌شود. تجزیه ارتباطی نیز با استفاده از مدل خطی عمومی (General Linear Model) و مدل خطی مخلوط (Mixed Linear Model) بر اساس ماتریس‌های تجزیه به مولفه‌های اصلی و ضرایب خویشاوندی (Kinship) در نرم‌افزار TASSEL5 انجام شد.

جدول ۱- ارقام گندم بهاره مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Spring wheat cultivars used in this study

Row	Year	Genotype	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	1995	Alvand	1-27-6275/CF1770 OR CF17170 1-22-11
7	2006	Arta	HD2206/HORK//BUL/6/CMH80A.253/2/M2A/CML//ALD*4/5/BH1146/H56.71//BH1146/3/CMH78.390/4/SERI82/7/HEL/3*CNO79/7/2*SERI82
8	1974	Arvand	RSH/3/MTA//KY/MAYO58
9	1995	Atrak	JUP/BJY'S'//URES
10	2007	Bahar	HD2172/3/BB/2*7C//Y50E/3*KAL
11	2006	Bam	VEE#5/NAC//1-66-22 OR VEERY/NACOZARI-76//1-66-22
12	1976	Bayat	PUNJAB-76/CHENAB-70
13	1980	Biston	9-36/592/PIEVE
14	1997	Chamran1	ND/VG9144//KAL/BB/3/YACO/4/VEE#5
15	2013	Chamran2	ATTILA 50Y//ATTILA/BACANORA
16	1980	Darab1	RSH/IRN 149(60-61)//C271
17	1995	Darab2	MAYA'S'/NAC
18	2006	Darya	SHA4/CHIL
19	1960	Dastjerdi	DASTJERDI
20	1968	Deyhem	DIADEM/ITALIAI
21	2002	Dez	KAUZ*2/OPATA//KAUZ
22	---	DN11	
23	1990	Falat	KVZ/BUHO//KAL/BB
24	---	Fong	
25	---	Fontana	
26	1996	Gahar	ND/VG9144//KAL/BB/3/YACO'S'/4/VEE#5
27	1988	Gods	RHS/5/WT/4/NOR10/K54*2//FN/3/PTR/6/OMID//KAL/BB
28	1986	Golestan	D6301/NAI60//WRM/3/CNO*2/CHR
29	2002	Hamoon	FALAT/RSH
30	1969	INIA	LR64/SN64
31	2011	Karim	TRITICIM AESTIVUM/SPRW"S"//CA8055/3/BACONORA88
32	1980	Kaveh	FTA/PL
33	1997	Kavir	STM/3/KAL//V543/JIT716 OR SHORTIM/3/KALYANSONA//V-534/JIT-716
34	1974	Khazar	P4160//SN64/LR64
35	2002	Koohdasht	BB/RON//CNO67/TOTA/3/JAR
36	1995	Mahdavi	TI/PCH/5/MT48/3/WTE*3/NAR59/TOTA63/4/MUS
37	1991	Maroon	AVD/PCHU/5/N10/BR21.1C//KT54B/3/NAR59/1093/4/7C
38	1999	Marvdasht	HD2172/BLOUDAN//AZADI
39	1974	Moghan1	LR/N10B//3*ANE
40	1974	Moghan2	LR64A/HUAR
41	2006	Moghan3	Luan/3/V763.23/V879.c8//Pvn/4/Picus/5/Opata
42	2009	Morvarid	MILAN/SHANGHAI-7
43	1978	Naz	II12300//LR64A/8156/3/NOR
44	2006	Nishabour	1-63-31/3/12300/TOB//CNO67/SX
45	1995	Nicknejad	F134-71/CROW'S'
46	2012	Ofog	GF-gy54/Attila
47	1968	Panjamo	
48	2009	Parsi	DOVE"S"/BUC"S"//2*DARAB1 OR DOVE(SIB)/(SIB)BUCKBUCK(M-84-17)//2*DARAB
49	2008	Pishgam	BKT/90ZHONG87
50	2002	Pishtaz	ALVAND//ALDAN/IAS 58
51	2014	Qabous	Dryland Agricultural Research Institute
52	1942	Reyhani	RAYHANI
53	1960	Roshan	LANDRACE
54	2006	Sepahan	AZADI/5/L2453/1347/4/KAL//BB/KAL/3/Y50E/3*KAL
55	---	Shanghai	
56	2002	Shiraz	GV/D6301//ALD/3/AZADI OR GAVILAN,MEX/D-630//(SIB)ALONDRA/3/AZADI OR ALVAND//ALDAN/IAS-58
57	1997	Shiroodi	ND/VG9144//KAL/BB/3/YACO/4/VEE#5
58	2012	Sirvan	PRL/2*PASTOR
59	2006	Sistan	Bank"s"/Veery"s"
60	2009	Sivand	KAUZS /AZD OR KAUZ(SIB)/(AZD)AZADI
61	1995	Tajan	BOW/NKT
62	1969	Toubari	
63	1997	VEE/NAZ	Veery/Nacozari
64	1996	Zagros	TAN'S'/VEE'S'//OPATA

نتایج و بحث

نتایج حاصل از محاسبه آماره‌های توصیفی (جدول ۲) نشان داد که صفات وزن تر بوته، وزن خشک بوته، غلظت روی اندام هوایی، غلظت پروتئین و عملکرد دانه دارای بیش‌ترین ضرایب تنوع در هر دو شرایط بهینه و تنش کمبود روی بودند. مقایسه میانگین صفات در شرایط بهینه و تنش کمبود روی حاکی از بالا بودن عملکرد دانه، غلظت پروتئین، غلظت روی اندام هوایی، محتوای آب نسبی برگ، وزن تر و خشک بوته، شاخص سطح برگ، شاخص کلروفیل و دمای کانوپی در شرایط بهینه نسبت به شرایط تنش کمبود روی بود، در حالی‌که صفات فنولوژیک (تعداد روزهای تا جوانه‌زنی، سنبله‌دهی، گرده‌افشانی و رسیدگی فیزیولوژیک)، در شرایط بهینه مقادیر کم‌تری نسبت به شرایط تنش کمبود روی داشتند. به‌طور کلی تنوع قابل ملاحظه‌ای بین ارقام مورد مطالعه از نظر عملکرد و صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی وجود داشت که می‌توان از این تنوع جهت انتخاب ژنوتیپ‌های برتر و بهبود ویژگی‌های ارقام در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد. نتایج حاصل از بررسی تعداد ۳۶۳۶۰ نشانگر SNP نیز نشان داد که ۱۳۳۲۴ نشانگر در ژنوم A، ۱۸۸۴۳ نشانگر در ژنوم B، ۳۹۷۸ نشانگر در ژنوم D و ۲۱۵ نشانگر بدون موقعیت بودند. بیش‌ترین نشانگر را ژنوم B و کم‌ترین نشانگر را ژنوم D به‌خود اختصاص داد (شکل ۱).

اولین قدم در مطالعات نقشه‌یابی ارتباطی، مطالعه ساختار جمعیت برای درک تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد آزمایش می‌باشد (Mourad *et al*., 2020). در مطالعات ژنتیکی، ساختار جمعیت برای توضیح روابط افراد در درون و بین جمعیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. از طرفی در مطالعات تجزیه ارتباط، وجود ساختار در جمعیت می‌تواند عامل بازدارنده در جهت رسیدن به نتایج قابل اعتماد باشد و در صورتی که اثر عوامل ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباطی در نظر گرفته نشوند، ممکن است نتایج کاذب (شناسایی نشانگرهایی با ارتباط دروغین) به‌دست آید (Breseghello and Sorrells, 2006). با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان ساختار و خویشاوندی جمعیت‌ها را بررسی (VanRaden, 2008) و ارتباط نشانگر- صفت را شناسایی کرد (Bernardo, 2013). تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای داده‌های حاصل از ژنوتیپ‌سنجی انجام شد و نتایج PCA به عنوان متغییر کمکی (کوواریت) به جای ماتریس Q در تجزیه ارتباطی در نظر گرفته شد. همچنین برای انجام تجزیه‌های ارتباطی با روش MLM علاوه بر ساختار جمعیت نیازمند برآورد روابط خویشاوندی (ماتریس K) می‌باشد که با استفاده از داده‌های ژنوتیپی انجام شد (شکل ۲).

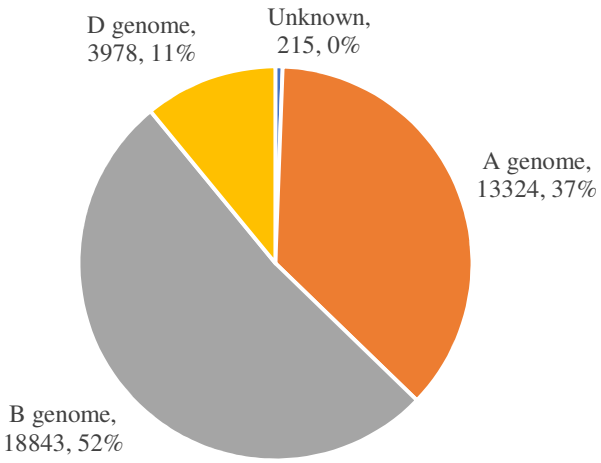
عدم تعادل پیوستگی (Linkage Disequilibrium= LD) با استفاده از نشانگرهای SNP در سطح کل ژنوم برآورد شد. همچنین مقادیر LD جفتی با استفاده از فراوانی آللی (r^2) بین نشانگرها نیز محاسبه شد (جدول ۳). آگاهی از عدم تعادل پیوستگی یا ارتباط غیر تصادفی آلل‌های بین جایگاه‌های ژنی، برای شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با صفات مورد بررسی دارای اهمیت می‌باشد (Hao *et al*., 2011; Al-Maskri *et al*., 2012). ارزیابی میزان LD و ساختار جمعیت، اطلاعات ارزشمندی را در طرح‌های نقشه‌یابی در سطح ژنوم (Genome-wide association studies) در گندم ارائه می‌دهد (Chao *et al*., 2010). در مجموع ۱۸۰۵۹۷۵ جفت نشانگر بر اساس SNP در کروموزوم‌های مختلف، با میانگین همبستگی فراوانی آللی r^2=۰/۲۴۶ در ارقام گندم مورد مطالعه مشاهده شد که از این تعداد ۶۱۵۰۴۰ (۳۴/۰۵ درصد) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. مقادیر بالای LD می‌تواند نتیجه گزینش باشد که باعث افزایش همبستگی‌های بین آللی در لوکوس‌های خاصی شود (Schlotterer, 2003). همچنین عدم تعادل پیوستگی در سطح ژنوم نیز بررسی شد. برای نمایش گستره عدم تعادل در سطح ژنوم، مقادیر r^2 درون کروموزومی نسبت به فاصله ژنتیکی بین نشانگرها به‌دست آمد (جدول ۳). به‌طور کلی، نتایج نشان داد که تنوع قابل ملاحظه‌ای در مقدار LD روی کروموزوم‌های مختلف گندم وجود داشت. سطح بالای عدم تعادل پیوستگی در بسیاری از نواحی کروموزومی در جمعیت نشان دهنده این است که نقشه‌یابی ارتباطی می‌تواند روش مؤثری برای شناسایی QTLها و تایید ارتباط آن‌ها با نشانگرها در این نواحی باشد (Zhang *et al*., 2010).

جدول ۲- آماره‌های توصیفی صفات مورد بررسی در ارقام گندم بهاره تحت شرایط بهینه و تنش کمبود روی

Table 2. Descriptive statistics of the investigated traits in spring wheat cultivars under normal and zinc deficiency stress conditions

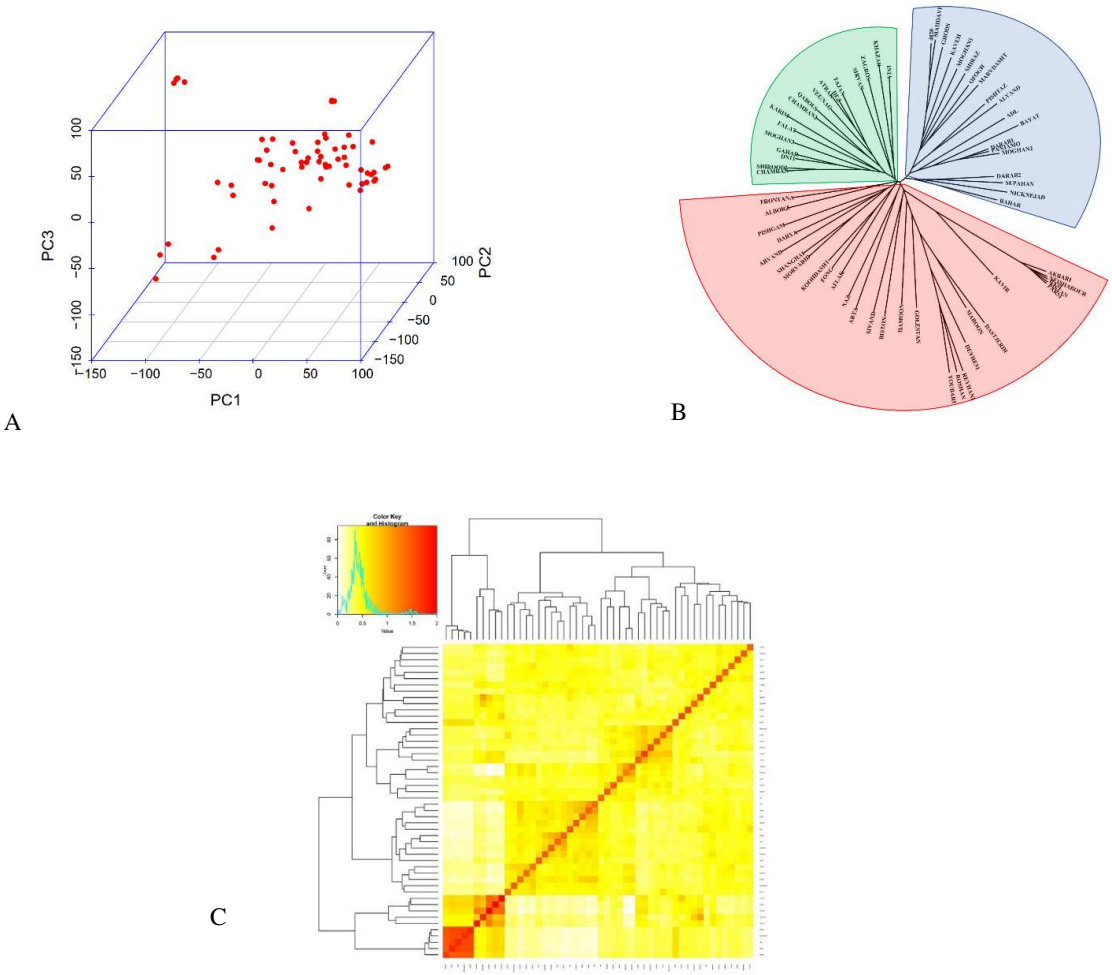
Trait	Mean		Minimum		Maximum		Range		Variance		CV		t-value
	Normal	Stress	Normal	Stress	Normal	Stress	Normal	Stress	Normal	Stress	Normal	Stress	
Days to germination	20.9	21.08	13	15	29	28	16	13	11.8	12.1	17.7	17.7	-0.23 ^{ns}
Days to booting	177.6	183.1	171	175.5	185	187	14	11	15.6	7.7	1.7	1.1	-9.24**
Days to pollination	194.01	194.4	190	190	198	197	7.5	7	4.88	3.21	1.05	1.2	-1.12 ^{ns}
Days to physiological maturity	216.8	216.9	215	215	219	219	4	4	1.6	1.5	0.2	0.3	-0.42 ^{ns}
Grain filling period	22.8	22.5	18	18.5	27	27	9.5	9	5.7	5.21	9.5	10.7	0.73^{ns}
Canopy temperature	28.6	27.4	26	25.3	31.6	33.2	5.4	7.9	1.2	2.20	5.2	6.4	5.17**
Chlorophyll index (SPAD)	40.9	39.4	27.6	24.5	59.5	57.5	31.8	33	40.5	46.9	19.3	14.6	1.34 ^{ns}
Leaf area index	9.49	10	6.96	5.1	18.23	16.9	11.27	11.8	3.71	5.74	21.1	27.2	-1.30 ^{ns}
Shoot fresh weight	0.15	0.148	0.03	0.03	0.49	0.41	0.46	0.37	0.005	0.005	48.1	51.1	0.69 ^{ns}
Shoot dry weight	0.04	0.043	0.01	0.01	0.1	0.1	0.08	0.09	0.0003	0.0004	38.4	45.6	0.55 ^{ns}
Leaf relative water content	76.62	74.14	40.75	34.71	87.8	85.38	47.12	50.67	59.9	66.32	13.1	14.4	1.76 ^{ns}
Shoot zinc concentration	0.56	0.39	0.09	0.02	1.08	0.87	0.99	0.85	0.03	0.03	25.6	33.4	5.21**
Grain protein content	5.11	3.95	1.17	0.88	11.4	9.92	10.32	9.04	9.03	6.22	21.7	16.6	2.36*
Grain yield	1.9	1.3	0.55	0.3	3.3	2.5	2.7	2.27	0.57	0.37	18.1	22.2	5.001**

^{ns}, * and **: Not-siginficant and siginficant at 5% and 1% probability levels, respectively.



شکل ۱- نمودار پراکنش نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق در سطح کروموزوم‌ها

Figure 1. Distribution diagram of markers used in this research at the level of chromosomes



شکل ۲- ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی. A) ژنوتیپ‌ها در فضای سه‌بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، B) خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها با داده‌های ژنوتیپی، C) روابط خویشاوندی

Figure 2. Population structure and kinship relationships. a) Genotypes in three dimentional space resulting from principal component analysis, b) Clustering of genotypes with genotypic data, c) Kinship relationships

جدول ۳- خلاصه‌ای از عدم تعادل پیوستگی (LD) مشاهده شده در بین جفت نشانگرها و تعداد جفت نشانگرهای معنی‌دار در هرکروموزوم و ژنوم با استفاده از نشانگرهای SNP

Table 3. A summary of observed LD among marker pairs and the number of significant marker pairs per chromosome and genome using original SNPs

Chromosome	TNSP†	r^2	Distance	NSSP‡
1A	81125	0.1715	1.832	22629
2A	129100	0.2189	1.091	42953
3A	34550	0.3011	4.894	13896
4A	117650	0.2985	0.985	48885
5A	166550	0.2171	0.860	59272
6A	46450	0.2476	2.386	14400
7A	84000	0.1700	2.608	21570
1B	72750	0.2685	0.900	71566
2B	23800	0.1506	7.108	4185
3B	116600	0.3720	1.502	54874
4B	60500	0.2205	2.176	18555
5B	11300	0.1540	10.747	1695
6B	59050	0.1831	2.448	15601
7B	133200	0.2246	1.451	48738
1D	21650	0.1660	10.240	4757
2D	83200	0.2027	1.546	26058
3D	149050	0.2378	0.844	57638
4D	27150	0.1477	5.911	5286
5D	123300	0.2515	1.414	42648
6D	131000	0.1610	1.125	30866
7D	34000	0.2248	6.080	8968
Genome A	664925	0.2487	1.664	322265
Genome B	942150	0.2235	1.101	329588
Genome D	198900	0.2136	5.829	53187
Whole genome	1805975	0.2317	1.829	615040

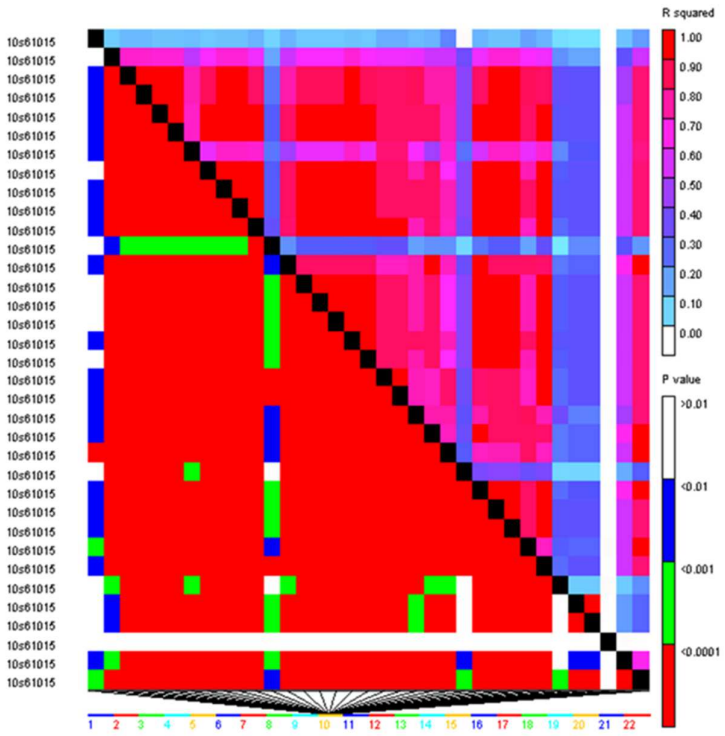
† TNSP, total number of SNP pairs.

‡ NSSP, number of significant ($p<0.001$) SNP pairs.

وجود LD پیش‌نیاز مکان‌یابی ارتباطی است. میزان وسعت LD در ژنوم گیاهان بین گونه‌های مختلف متغیر است. عواملی مانند اندازه جمعیت، خودگشنی، ایزولاسیون ژنتیکی بین اجداد، میزان کم نوترکیبی، هم‌ترکیبی جمعیت‌ها، رانش ژنتیکی و اپیستازی موجب افزایش LD می‌شوند، در حالی‌که عواملی از قبیل دگرگشنی، میزان نوترکیبی بالا، میزان جهش بالا و تغییر ژنی منجر به کاهش مقدار LD خواهند شد (Sahranavard Azartamar *et al.*, 2015). انحطاط LD در ژنوم D در فاصله بیش‌تر و درژنوم B در فاصله کم‌تر اتفاق افتاد و این فاصله ژنتیکی بالا به‌دلیل احتمال بیش‌تر نوترکیبی باعث کاهش مقدار نبود LD شده است (جدول ۳).

تجزیه عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرهای مورد ارزیابی در گروه‌های پیوستگی (کروموزوم‌های مختلف) در شکل ۳ در گستره ژنوم گندم ارایه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان بالایی از LD معنی‌دار بین نشانگرها وجود داشت که شرط لازم برای تحلیل ارتباط نشانگرهای ارزیابی شده در هر ژنوتیپ با صفات فنوتیپی ارزیابی شده برای آن‌ها می‌باشد.

نقشه‌یابی ارتباطی با استفاده از روش GLM و MLM برای شرایط بهینه و تنش کمبود روی به‌طور جداگانه انجام شد. برای تحلیل ارتباط صفات مورد مطالعه با نشانگرهای SNP و اجتناب از نتایج مثبت کاذب، در کنار در نظر گرفتن کوواریت‌ها در مدل (ماتریس ضریب تعلق افراد به زیر جمعیت‌ها و ماتریس خویشاوندی)، حداقل میزان معنی‌داری لحاظ شد، به‌طوری که در نمودار حاصل از منهتن پلات ترسیم شده برای هر یک از صفات، حد آستانه کم‌تر از یک‌هزارم (-Log P value>3) در نظر گرفته شد. نمودارهای مربوط به منهتن‌پلات صفات مورد بررسی تحت شرایط بهینه و تنش کمبود روی در شکل ۴ ارایه شده است.



شکل ۳- پلات عدم تعادل پیوستگی. بالای قطر میزان عدم تعادل پیوستگی و پایین قطر P-value برای جفت نشانگرها را نشان می‌دهد.

Figure 3. Continuity disequilibrium plot. The upper part of the diagonal shows the degree of linkage disequilibrium and the lower part of the diagonal shows the P-value for the pair of markers.

نقشه‌یابی ارتباطی تحت شرایط بهینه

تحت شرایط بهینه روی، در مجموع ۱۴۵ ارتباط نشانگر-صفت (Marker-Trait Association=MTA) با روش GLM و ۱۶۵ MTA با روش MLM شناسایی شدند. ژنوم B بیش‌ترین تعداد MTA و ژنوم D کم‌ترین تعداد MTA را داشتند. در بین صفات مورد بررسی تحت این شرایط، وزن خشک بوته با ۲۴ MTA بیش‌ترین تعداد و طول دوره پر شدن دانه فقط با یک MTA کم‌ترین تعداد MTA شناسایی شده را داشتند. برای صفت تعداد روز تا جوانه‌زنی، سه MTA روی کروموزوم 1B با روش GLM و سه MTA روی کروموزوم‌های 2B و 6B باروش MLM شناسایی شد. برای صفت تعداد روز تا سنبله‌دهی، نیز سه MTA روی کروموزوم‌های 1A، 2B و 5B با روش GLM و چهار MTA روی کروموزوم‌های 1A، 2A و 5B با روش MLM شناسایی شد. برای روز تا گرده‌افشانی، تعداد MTA۱۵ روی کروموزوم‌های 2A، 4A، 7A، 6B و 5B با هردو روش شناسایی شد، در حالی‌که برای روز تا رسیدگی فیزیولوژیک و با روش GLM، شش MTA روی کروموزوم‌های 2A، 2B، 6A و 7B و با روش MLM هفت MTA روی کروموزوم‌های 2A، 7B، 6A، 2B و 3A شناسایی شد. برای صفت طول پر شدن دانه با هر دو روش GLM و MLM فقط یک MTA روی کروموزوم 6A شناسایی شد. برای دمای کانوپی، با روش GLM هفت MTA روی کروموزوم‌های 4B و 3B و با روش MLM تعداد MTA۱۶ روی کروموزوم‌های 4B، 3B، 6A و 2B شناسایی شد. برای صفت شاخص کلروفیل و با هردو روش مکان‌یابی، تعداد چهار MTA روی کروموزوم‌های 7A، 6B و 3A شناسایی شد. برای صفات سطح برگ و شاخص سطح برگ، با روش GLM تعداد MTA۱۵ روی کروموزوم‌های 7B، 4B، 2D، 1B، 4A، 5B و 2B و با روش MLM تعداد MTA۱۷ روی کروموزوم‌های 2D، 4B، 4A، 5B، 7B، 1B، 7A و 6B شناسایی شد. برای وزن تر بوته، با روش GLM تعداد MTA۱۵ روی کروموزوم‌های 2A، 5B، 2B، 6A، 1A، 1B و 5A و با روش MLM تعداد MTA۱۷ روی کروموزوم‌های 5B، 6A، 1B، 2A، 1A، 2B، 2D و 5A شناسایی شد. تعداد MTA۲۴ روی کروموزوم‌های 6A، 7B، 1B، 7A، 2B، 5B و 4A برای وزن خشک بوته با هر دو روش مکان‌یابی

شناسایی شد. برای محتوای آب نسبی برگ، تعداد MTA۱۶ با روش GLM روی کروموزوم‌های 3B، 5B، 4B، 7A و 2B و تعداد MTA۱۸ با روش MLM روی کروموزوم‌های 5B، 7A، 2B، 3B، 4B، 6B و 2A شناسایی شد. با هر دو روش مکان‌یابی، تعداد دو MTA برای صفت غلظت پروتئین دانه روی کروموزوم‌های 2A و 7B و تعداد MTA۱۶ برای صفت غلظت روی اندام هوایی روی کروموزوم‌های 1D، 4B، 4D، 7A، 3A، 4A، 2A و 1A شناسایی شد. برای عملکرد دانه نیز با روش GLM تعداد سه MTA هر سه روی کروموزوم 7A و با روش MLM تعداد چهار MTA روی کروموزوم‌های 7A و 1D شناسایی شد.

نقشه‌یابی ارتباطی تحت شرایط تنش کمبود روی

تحت شرایط تنش کمبود روی در مجموع MTA۱۳۵ با روش GLM و MTA۱۴۲ با روش MLM شناسایی شدند. ژنوم B بیش‌ترین و ژنوم D کم‌ترین تعداد MTA را داشتند. در بین صفات مورد بررسی، محتوای آب نسبی برگ بیش‌ترین تعداد MTA و صفات غلظت پروتئین دانه و غلظت روی اندام هوایی کم‌ترین تعداد MTA را تحت شرایط کمبود روی به‌خود اختصاص دادند.

برای صفت تعداد روز تا جوانه‌زنی تعداد MTA۱۱ روی کروموزوم‌های 2A، 1B، 7A و 1A با روش GLM و تعداد MTA۱۴ روی کروموزوم‌های 2A، 7A، 1B، 4A، 1Aو 3A با روش MLM شناسایی شد. برای صفت تعداد روز تا سنبله‌دهی، تعداد سه MTA روی کروموزوم‌های 3A، 4A، 7D و 3B با هردو روش مکان‌یابی شناسایی شد. برای صفت تعداد روز تا گرده‌افشانی، با روش GLM تعداد هفت MTA روی کروموزوم‌های 4A، 3B، 4B و 1B و با روش MLM تعداد MTA۱۳ روی کروموزوم‌های 2B، 1B، 3B، 4A و 4B شناسایی شد. تعداد نه MTA با روش GLM روی کروموزوم‌های 6B، 7B، 2B و 6A و تعداد هشت MTA با روش MLM روی کروموزوم‌های 2B و 7B برای تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک شناسایی شد. برای طول پر شدن دانه با هر دو روش GLM و MLM تعداد ۱۴ MTA روی کروموزوم‌های 7A، 3B، 7B، 5A و 1B شناسایی شد. برای دمای کانوپی و با هردو روش مکان‌یابی، تعداد ۱۹ MTA روی کروموزوم‌های 5B، 3B، 1A، 5D، 5A و 3A شناسایی شد. تعداد هفت MTA روی کروموزوم‌های 2D، 7B، 1B، 1A و 1D با روش GLM و تعداد شش MTA روی کروموزوم‌های 2D، 1A و 1B با روش MLM برای صفت شاخص کلروفیل شناسایی شد. برای صفات سطح برگ و شاخص سطح برگ نیز چهار MTA روی کروموزوم‌های 1D، 7A و 2B با هر دو روش مکان‌یابی شناسایی شد. برای وزن تر بوته، تعداد ۱۴ MTA روی کروموزوم‌های 6A، 5A، 7A، 4A و 5B و برای وزن خشک بوته، تعداد هشت MTA روی کروموزوم‌های 7D، 5B، 1D و 7A با هردو روش مکان‌یابی شناسایی شد. برای محتوای آب نسبی برگ، تعداد ۲۳ MTA با روش GLM روی کروموزوم‌های 3B، 6A، 2B، 7A و 5B و تعداد ۲۲ MTA با روش MLM روی کروموزوم‌های 7A، 7D، 3A، 6B، 2B، 4B، 6A و 3B شناسایی شد. برای غلظت پروتئین دانه نیز تعداد سه MTA روی کروموزوم‌های 5A، 2A و 7B و برای غلظت روی اندام هوایی، تعداد سه MTA روی کروموزوم‌های 4A و 4B با هردو روش GLM و MLM شناسایی شد. در نهایت برای عملکرد دانه، تعداد پنج MTA با روش GLM روی کروموزوم‌های 3B و 2B و تعداد هفت MTA با روش MLM روی کروموزوم‌های 2B، 3B، 5A و 7A شناسایی شد.

تا کنون مطالعات قابل‌توجه و متعددی در مورد جایگاه‌های ژنی صفات مختلف با استفاده از نقشه‌یابی در گندم صورت گرفته است. مرزا و همکاران (Marza *et al*., 2006) و چو و همکاران (Chu *et al*., 2008) برای صفت تعداد روز تا سنبله‌دهی روی کروموزوم‌های 3B و 5B، کیریگوی و همکاران (Kirigwi *et al*., 2007)، کاسبرت و همکاران (Cuthbert *et al*., 2008) و وانگ و همکاران (Wang *et al*., 2009) برای صفت تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک روی کروموزوم 2B و برای صفت طول دوره پرشدن دانه روی کروموزوم‌های 5A و 3B، محمدی و همکاران (Mohammadi *et al*., 2004) برای صفت سطح برگ روی کروموزوم‌های 5B، 1B و 2D، حسینی و عبدالشاهی (Hosseini and Abdolshahi, 2011) برای صفت وزن تر و خشک بوته روی کروموزوم 1B، طباطبایی و همکاران (Tabatabaie *et al*., 2004) و تسلو و همکاران (Tsilo *et al*., 2010) برای غلظت پروتئین روی کروموزوم‌های 5A و 7B، مک‌دونالد و همکاران (McDonald *et al*., 2008) برای صفت غلظت روی اندام هوایی و بذر روی کروموزوم‌های 4B و 7A، و کاسبرت و همکاران (Cuthbert *et al*., 2008) و مرزا و

همکاران (Marza *et al*., 2006) برای صفت عملکرد دانه روی کروموزوم‌های 3B، 2B، 5A و 7A نشانگرهایی را شناسایی کردند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشتند.

تعدادی نشانگر مشترک برای صفات مورد ارزیابی با هر دو مدل خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مخلوط (MLM) شناسایی شدند که می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد (Jun *et al*., 2008). شناسایی این نشانگرها برای برنامه‌های به‌نژادی از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا گزینش هم‌زمان چندین صفت را امکان‌پذیر می‌سازد (Tuberosa *et al*., 2002). در این پژوهش تحت شرایط بهینه روی در هر دو روش GLM و MLM، نشانگرهای rs62796 و rs38044 مشترک بین صفات وزن خشک و شاخص سطح برگ، نشانگرهای rs38044، rs44657 و rs44658 مشترک بین صفت وزن تر و شاخص سطح برگ، نشانگرهای rs45935، rs51839، rs49483 و rs60201 مشترک بین صفات محتوای آب نسبی برگ و شاخص سطح برگ، نشانگرهای rs14768، rs9159، rsrs9160، rs61533 و rs52232 مشترک بین صفات وزن خشک و وزن تر بوته، نشانگرهای rs35364، rs64139، rs61533، rs17900، rs14768 و rs15407 مشترک بین صفات وزن خشک بوته و محتوای آب نسبی برگ، و نشانگرهای rs61533 و rs14768 مشترک بین صفات وزن تر بوته و محتوای آب نسبی برگ بودند. همچنین تحت شرایط تنش کمبود روی در هر دو روش GLM و MLM نشانگرهای rs3751 و rs63953 مشترک بین صفات شاخص سطح برگ و وزن خشک بوته و نشانگرهای rs17657، rs18039 و rs18116 مشترک بین صفات وزن خشک و وزن تر بوته شناسایی شدند. در نهایت از بین نشانگرهای معنی‌دار شناسایی شده، SNPsهای rs57092، rs31687، rs44494، rs36981، rs659، rs46347، rs58945 و rs58944 بین عملکرد و صفات شاخص کلروفیل، تعداد روز تا گرده‌افشانی و روز تا رسیدگی فیزیولوژیک، شاخص سطح برگ و مساحت برگ مشترک بودند که می‌توان از آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای کاندیدا در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد.

نتیجه‌گیری کلی

در کل نتایج مطالعه حاضر، کارایی استفاده از روش نقشه‌یابی ارتباطی و مدل‌های GLM و MLM را در شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در گندم نشان داد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای SNP ابزاری بسیار توانمند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت در گندم هستند و می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی از طریق انتخاب به‌کمک نشانگر مورد استفاده قرار گیرند. البته لازم است نشانگرهای شناسایی شده در چندین مطالعه روی جمعیت‌های بزرگ مورد بررسی قرار گیرند تا از ارتباط آن‌ها با صفات مورد مطالعه اطمینان کامل حاصل شود. در این مطالعه چندین مکان ژنی مشترک برای صفات مورد مطالعه شناسایی شد که از آن‌ها می‌توان به‌منظور گزینش هم‌زمان چند صفت در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد.

تضاد منافع

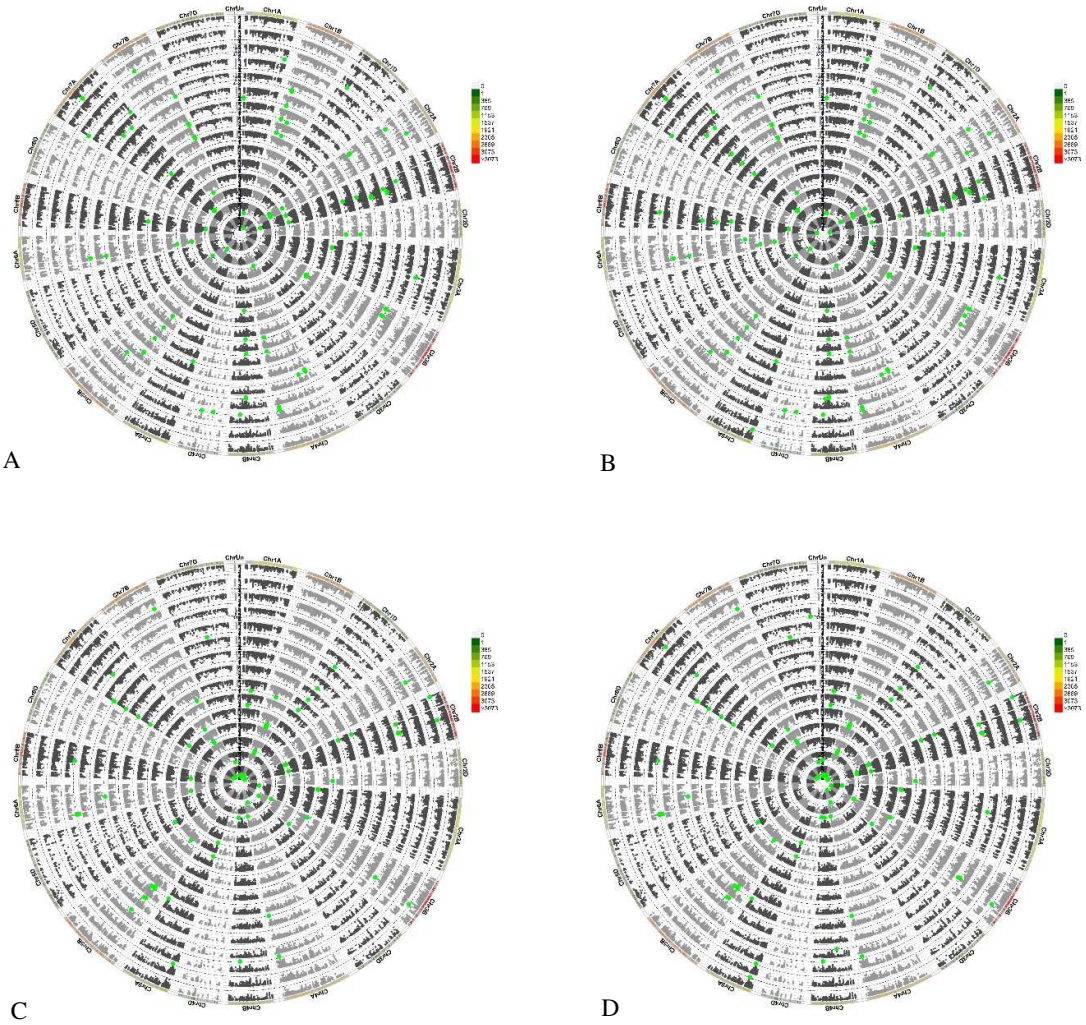
نویسنده (گان) تایید می‌کنند که این تحقیق در غیاب هر گونه روابط تجاری یا مالی که می‌تواند به‌عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

رعایت اخلاق در نشر

نویسنده (گان) اعلام می‌کنند که در نگارش این مقاله به‌طور کامل از اخلاق نشر از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پیروی کرده‌اند. همچنین این مقاله حاصل یک کار تحقیقاتی اصیل بوده و تا کنون به‌طور کامل به هیچ زبانی و در هیچ نشریه یا همایشی چاپ و منتشر نشده و هیچ اقدامی نیز برای انتشار آن در هیچ نشریه یا همایشی صورت نگرفته و نخواهد گرفت.

اجازه انتشار مقاله

نویسنده (گان) با چاپ این مقاله به صورت دسترسی باز موافقت کرده و کلیه حقوق استفاده از محتوا، جدول‌ها، شکل‌ها، تصویرها و غیره را به ناشر واگذار می‌کنند.



شکل ۴- نمودارهای دایره‌ای منهتن برای شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با صفات مورد مطالعه در شرایط بهینه روی با روش GLM (A) و MLM (B)، شرایط تنش کمبود روی با روش GLM (C) و MLM (D) در ارقام گندم بهاره. دایره‌های درونی به بیرونی به ترتیب نشان دهنده صفات روز تا جوانه‌زنی، روز تا سنبله‌دهی، روز تا گرده‌افشانی، روز تا رسیدگی فیزیولوژیک و طول پرشدن دانه، دمای کانوپی، کلروفیل کل، شاخص سطح برگ، وزن تر بوته، وزن خشک بوته، محتوای آب نسبی برگ، غلظت روی اندام هوایی، غلظت پروتئین دانه و عملکرد دانه می‌باشد. کروموزوم‌ها در بیرونی‌ترین قسمت دایره رسم می‌شوند که در آن خطوط آبی نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۰۱ (3 < log10(p) –) می‌باشد. نقاط سبز مربوط به SNPهای معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۰۱ می‌باشد. مقیاس بین ChrUn و Chr1A مقادیر log10 (p) را نشان می‌دهد. جعبه‌های رنگی بیرونی در قسمت راست نشان‌دهنده پراکنش SNPها در کل ژنوم که از سبز تا قرمز چگالی کمتر به متراکم است.

Figure 4. Manhattan pie charts to draw common regions associated to studied traits for optimal conditions with GLM (a) and MLM (b) methods, zinc deficiency stress conditions with GLM (c) and MLM (d) methods in spring wheat cultivars. Inner to outer circles represents average trait days to germination, days to booting, days to pollination, days to physiological maturity, along with of grain filling period, canopy temperature, total chlorophyll, Leaf area index, fresh weight, turgor weight, dry weight, relative water content, zinc concentration on shoots, grain protein concentration and Grain yield. The chromosomes are plotted at the outmost circle where thin dotted blue and red lines indicate significant level at p value < 0.001 (– log10 (p) > 3) respectively. Green and red dots indicate genome-wide significantly associated SNPs at *p* value < 0.001 and < 0.00001 probability level, respectively. Scale between ChrUn and Chr1A indicates – log10 (*p*) values. Colored boxes outside on the top right side indicate SNP density across the genome where green to red indicates less dense to dense.

References

Alipour, H. 2016. Association mapping of important agronomic traits in bread wheat. Ph.D. Dissertation, University of Tehran, Tehran, Iran. (In Persian).

Al-Maskri, A.Y., Sajjad, M. and Khan, S.H. 2012. Association mapping: A step forward to discovering new alleles for crop improvement. **International Journal of Agriculture and Biology** 14: 153-160.

Alomari, D.Z., Eggert, K., Von Wiren, N., Alqudah, A.M., Polley, A., Plieske, J., Ganal, M.W., Pillen, K. and Röder, M.S. 2018. Identifying candidate genes for enhancing grain Zn concentration in wheat. **Frontiers in Plant Science** 9: 1313. http://doi.org/10.3389/fpls.2018.01313.

Bernardo, R. 2013. Genome wide markers for controlling background variation in association mapping. **The Plant Genome** 6 (1): 2012-11. https://doi.org/10.3835/plantgenome2012.11.0028.

Bouis, H.E. and Welch, R.M. 2010. Biofortification—A sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global south. **Crop Science** 50: 20-32.

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: 2633-2635.

Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I. and Lux, A. 2007. Zinc in plants. **New Phytologist** 173: 677-702.

Breseghello, F. and Sorrells, M.E. 2006. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Genetics** 172: 1165-1177.

Cakmak, I. and Kutman, U.Á. 2018. Agronomic biofortification of cereals with zinc. A review**. Europian Journal of Soil Science** 69: 172-180.

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: 1-17.

Chu, C.G., Xu, S.S., Friesen, T.L. and Faris, J.D. 2008. Whole genome mapping in a wheat doubled haploid population using SSRs and TRAPs and the identification of QTL for agronomic traits. **Molecular Breeding** 22: 251-266.

Cuthbert, J.L., Somers, D.J., Brûlé-Babel, A.L., Brown, P.D. and Crow, G.H. 2008. Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 117: 595-608.

Edae, E.A., Byrne, P.F., Manmathan, H., Haley, S.D., Moragues, M., Lopes, M.S. and Reynolds, M.P. 2013. Association mapping and nucleotide sequence variation in five drought tolerance candidate genes in spring wheat. **The Plant Genome** 6 (2): 2013-04. https://doi.org/10.3835/plantgenome2013.04.0010.

Edwards, D., Batley, J. and Snowdon, R.J. 2013. Accessing complex crop genomes with next-generation sequencing. **Theoretical and Applied Genetics** 126: 1-11.

FAO. 2022. FAOSTAT. Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Database. Crop Prospects and Food Situation#4, December 2022. Ultima consulta 26.

Graham, R.D. and Rengel, Z. 1993. Genotypic variation in zinc uptake and utilization by plants. In: Robson, A.D. (Ed.). Zinc in Soils and Plants. Developments in Plant and Soil Sciences. Vol. 55. Springer, Dordrecht. pp: 107-118. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0878-2.

Graham, R.D. and Welch, R.M. 1996. Breeding for staple food crops with high micronutrient density. Project paper. Agricultural strategies for micronutrients. International Food Policy Research Institute. 79 p.

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: e17279.

Hosseini, T.A.S. and Abdolshahi, R. 2011. QTLs mapping controlling bread wheat germplasm (*Triticum aestivum* L.). Proceedings of the National Conference on Modern Agricultural Sciences and Technologies. September 10-12, 2011, Zanjan, Iran. (In Persian).

Ignaciuk, A. and Mason-D'Croz, D. 2014. Modelling adaptation to climate change in agriculture. **OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers** 57-70.

Jacoby, W.G. 2000. Loess: A nonparametric, graphical tool for depicting relationships between variables. **Electoral Studies** 9: 577-613.

Jun, T.H., Van, K., Kim, M.Y., Lee, S.H. and Walker, D.R. 2008. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. **Euphytica** 162: 179-191.

Khalid, S. and Amanullah and Ahmed, I. 2022. Enhancing zinc biofortification of wheat through integration of zinc, compost, and zinc-solubilizing bacteria. **Agriculture** 12 (7): 968.

Khoshgoftarmanesh, A.H. 2007. Assessment of plant nutritional status and optimal fertilizer management. Publication of Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. (In Persian).

Kirigwi, F.M., Van Ginkel, M., Brown-Guedira, G., Gill, B.S., Paulsen, G.M. and Fritz, A.K. 2007. Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. **Molecular Breeding** 20: 401-413.

Krishnappa, G., Khan, H., Krishna, H., Kumar, S., Mishra, C.N., Parkash, O., Devate, N.B., Nepolean, T., Rathan, N.D., Mamrutha, H.M., Srivastava, P., Biradar, S., Uday, G., Kumar, M., Shngh, G. and Singh, G.P. 2022. Genetic dissection of grain iron and zinc, and thousand kernel weight in wheat (*Triticum aestivum* L.) using genome-wide association study. **Scientific Reports** 12: 12444.

Liu, B.H. 2017. Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis. CRC press. United States.

Liu, C., Yu, W., Cai, C., Huang, S., Wu, H., Wang, Z., Wang, P., Zheng, Y., Wang, P. and Ye, N. 2022. Genetic diversity of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) germplasm resources in Wuyi Mountain of China based on single nucleotide polymorphism (SNP) markers. **Horticulturae** 8: 932.

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 Genet** 9: e1003215.

Mansori, S., Mehrabi, A.A., Mohammadi, V., Arminian, A. and Roder, M. 2017. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes using SNP markers. **Modern Genetics Journal** 1: 157-168.

Marza, F., Bai, G.H., Carver, B.F. and Zhou, W.C. 2006. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840×Clark. **Theoretical and Applied Genetics** 112: 688-698.

McDonald, G.K., Genc, Y. and Graham, R.D. 2008. A simple method to evaluate genetic variation in grain zinc concentration by correcting for differences in grain yield. **Plant and Soil** 306: 49-55.

Mohammadi, V., Ghanadha, M.R., Zali, A.A., Yazdi-Samadi, B. and Byrane, P. 2004. Mapping QTLs for morphological traits in wheat. **Iranian Journal of Agricultural Sciences** 36: 145-157. (In Persian with English Abstract).

Morgounov, A.I., Belan, I., Zelenskiy, Y., Roseeva, L., Tömösközi, S., Bekes, F., Abugalieva, A., Cakmak, I., Vargas, M. and Crossa, J. 2013. Historical changes in grain yield and quality of spring wheat varieties cultivated in Siberia from 1900 to 2010. **Canadian Journal of Plant Science** 93: 425-433.

Mourad, A.M., Belamkar, V. and Baenziger, P.S. 2020. Molecular genetic analysis of spring wheat core collection using genetic diversity, population structure, and linkage disequilibrium. **BMC Genomics** 21: 1-12.

Peck, A.W., McDonald, G.K. and Graham, R.D. 2008. Zinc nutrition influences the protein composition of flour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Cereal Science** 47: 266-274.

Pour-Aboughadareh, A., Poczai, P., Etminan, A., Jadidi, O., Kianersi, F. and Shooshtari, L. 2022. An analysis of genetic variability and population structure in wheat germplasm using microsatellite and gene-based markers. **Plants** 11 (9): 1205.

Rathan, N.D., Krishna, H., Ellur, R.K., Sehgal, D., Govindan, V., Ahlawat, A.K., Krishnappa, G., Jaiswal, J.P., Singh, J.B., Sv, S., Ambati, D., Singh, S.K., Bajpai, S.K. and Singh, A.M. 2022. Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for grain micronutrients and quality traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Scientific Reports** 12: 7037.

Sahranavard Azartamar, F., Darvishzadeh, R., Ghadimzadeh, M., Azizi, H. and Aboulghasemi, Z. 2015. Identification of SSR loci related to some important agromorphological traits in different oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines using association mapping. **Crop Biotechnology** 10: 73-87. (In Persian with English Abstract).

Schlötterer, C. 2003. Hitchhiking mapping–functional genomics from the population genetics perspective. **Trends in Genetics** 19: 32-38.

Silveira, J.A.G., de Almeida Viégas, R., da Rocha, I.M.A., de Oliviera Monteiro Moreira, A.C., de Azevedo Moreira, R. and Oliveira, J.T.A. 2003. Proline accumulation and glutamine

synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology** 160: 115-123.

Stich, B., Utz, H.F., Piepho, H.P., Maurer, H.P. and Melchinger, A.E. 2010. Optimum allocation of resources for QTL detection using a nested association mapping strategy in maize. **Theoretical and Applied Genetics** 120: 553-561.

Tabatabaie, S.M.T., Solouki, M., Fakhery, B., Ismailzadeh Moghadam, M. and Mehdinezhad, N. 2004. Linkage mapping of bread wheat quality characteristics in bread wheat under drought stress. **Journal of Modern Genetics** 13: 281-292. (In Persian with English Abstract).

Tsilo, T.J., Hareland, G.A., Simsek, S., Chao, S. and Anderson, J.A. 2010. Genome mapping of kernel characteristics in hard red spring wheat breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics** 121: 717-730.

Tuberosa, R., Gill, B.S. and Quarrie, S.A. 2002. Cereal genomics: Ushering in a brave new world. **Plant Molecular Biology** 48: 445-449.

VanRaden, P.M. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. **Journal of Dairy Science** 91: 4414-4423.

Velu, G., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., Peña, R.J., Arun, B., Mahendru-Singh, A., Mujahid, M.Y., Sohu, V.S., Mavi, G.S., Crossa, J. and Alvarado, G. 2012. Performance of biofortified spring wheat genotypes in target environments for grain zinc and iron concentrations. **Field Crops Research** 137: 261-267.

Wang, R.X., Hai, L., Zhang, X.Y., You, G.X., Yan, C.S. and Xiao, S.H. 2009. QTL mapping for grain filling rate and yield-related traits in RILs of the Chinese winter wheat population Heshangmai×Yu8679. **Theoretical and Applied Genetics** 118: 313-325.

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 90 000 single nucleotide polymorphism array. **Plant Biotechnology Journal** 12: 787-796.

Welch, R.M. 2001. Impact of mineral nutrients in plants on human nutrition on a worldwide scale. In: Horst, W.J., Schenk, M.K., *et al.*, (Eds.). Plant nutrition: Food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research Vol. 92. Springer, Dordrecht 284-285.

Zhang, D., Bai, G., Zhu, C., Yu, J. and Carver, B.F. 2010. Genetic diversity, population structure, and linkage disequilibrium in US elite winter wheat. **The Plant Genome** 3: 117-127.

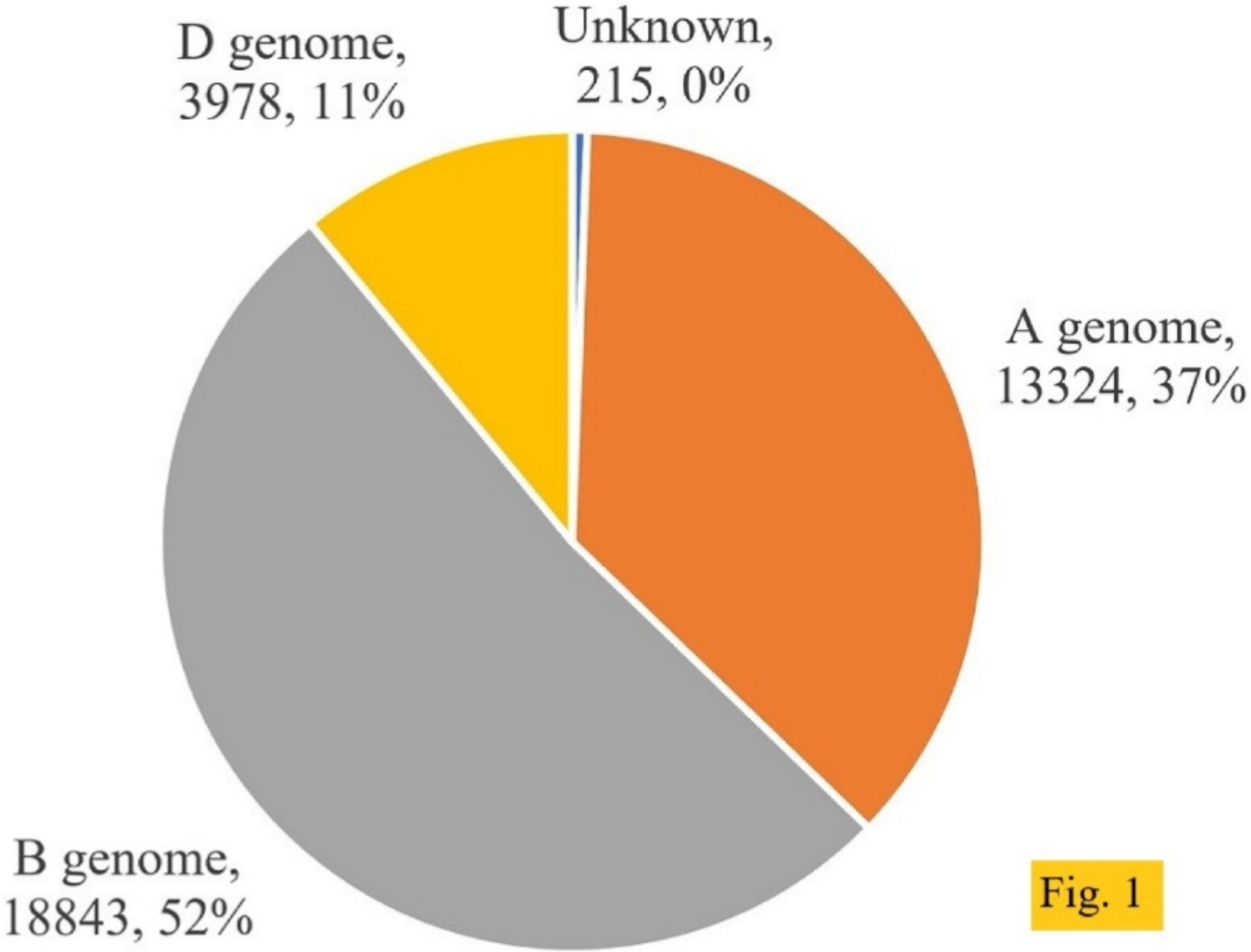

D genome,
3978, 11%
Unknown,
215, 0%
A genome,
13324, 37%
B genome,
18843, 52%

Fig. 1

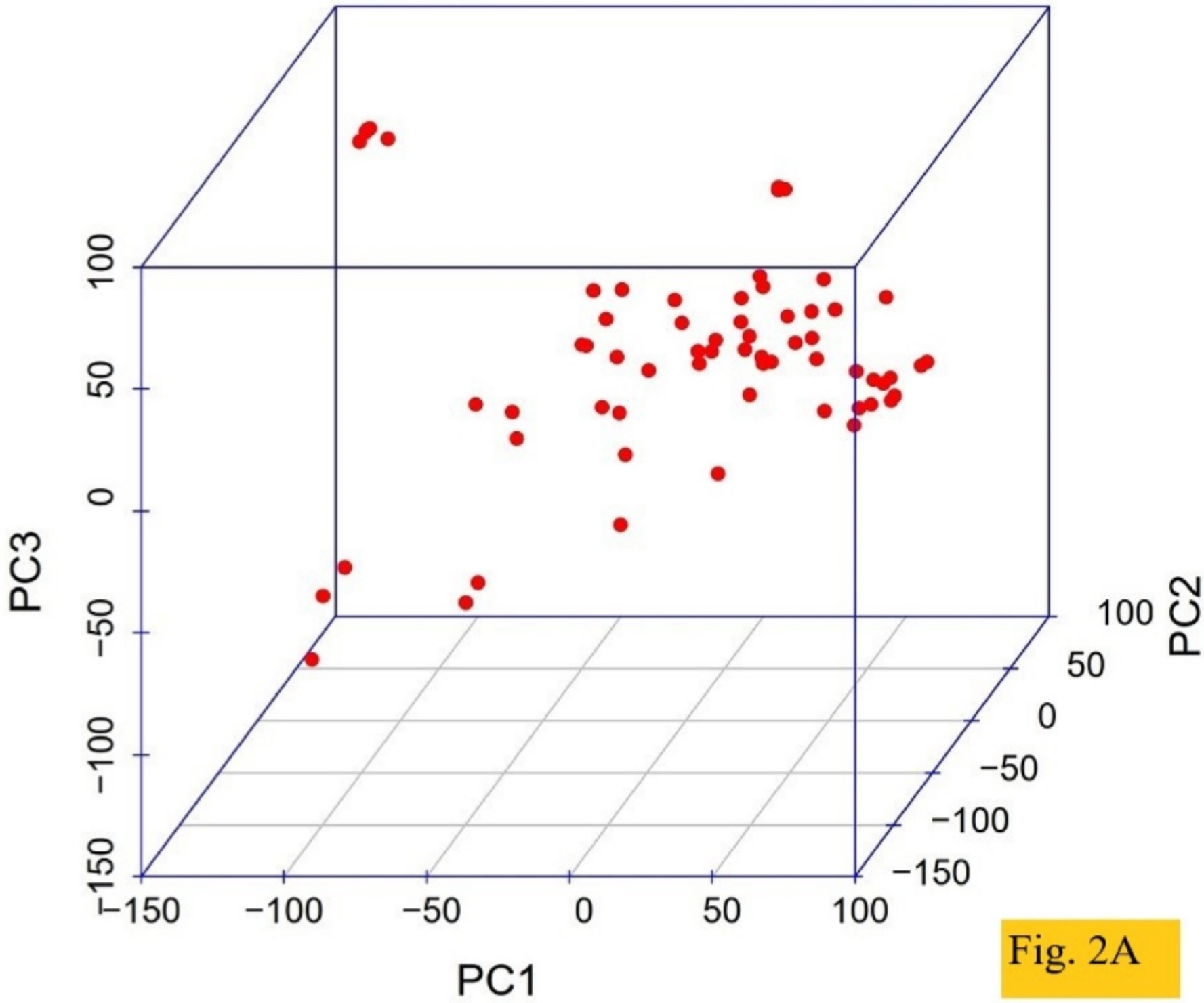

PC3
100
50
0
−50
−100
−150
−150
−100
−50
0
50
100
PC1
PC2
100
50
0
−50
−100
−150

Fig. 2A

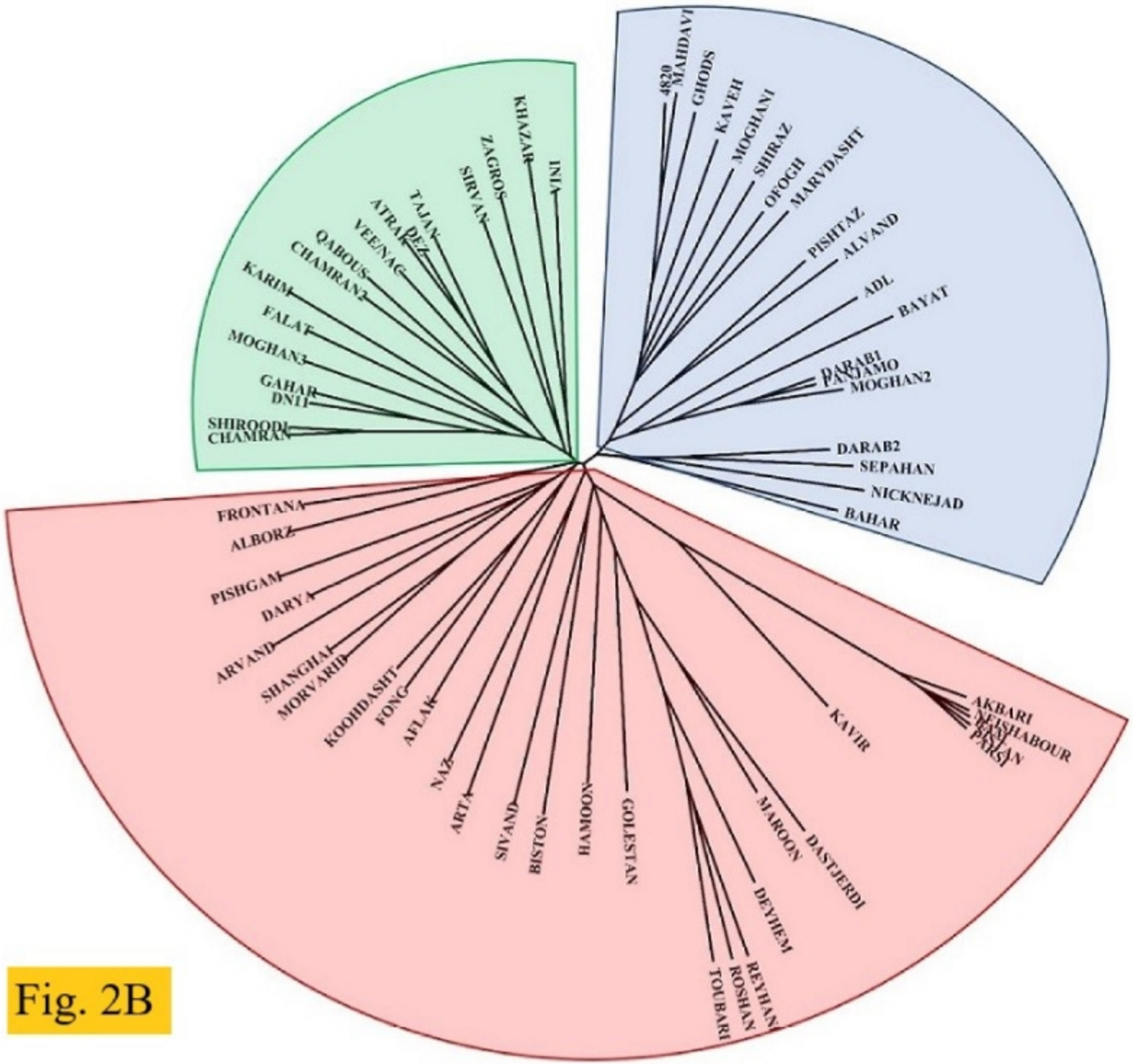

4820
MAHDAVI
GHODS
KAVEH
MOGHANI
SHIRAZ
OFOGH
MARVDASHT
PISHTAZ
ALVAND
ADL
BAYAT
DARAB1
PANJAMO
MOGHAN2
DARAB2
SEPAHAN
NICKNEJAD
BAHAR
KHAZAR
ZAGROS
SIRVAN
TAJAN
ATRAK
DEZ
VEE/NAG
QABOUS
CHAMRAN2
KARIM
FALAT
MOGHAN3
GAHAR
DN11
SHIROODI
CHAMRAN
FRONTANA
ALBORZ
PISHGAM
DARYA
ARVAND
SHANGHAI
MORVARID
KOOHDASHT
FONG
AFLAK
NAZ
ARTA
SIVAND
BISTON
HAMOON
GOLESTAN
MAROON
DASTJERDI
DEYHEM
REYHAN
ROSHAN
TOUBARI
KAVIR
AKBARI
NEYSHABOUR

Fig. 2B

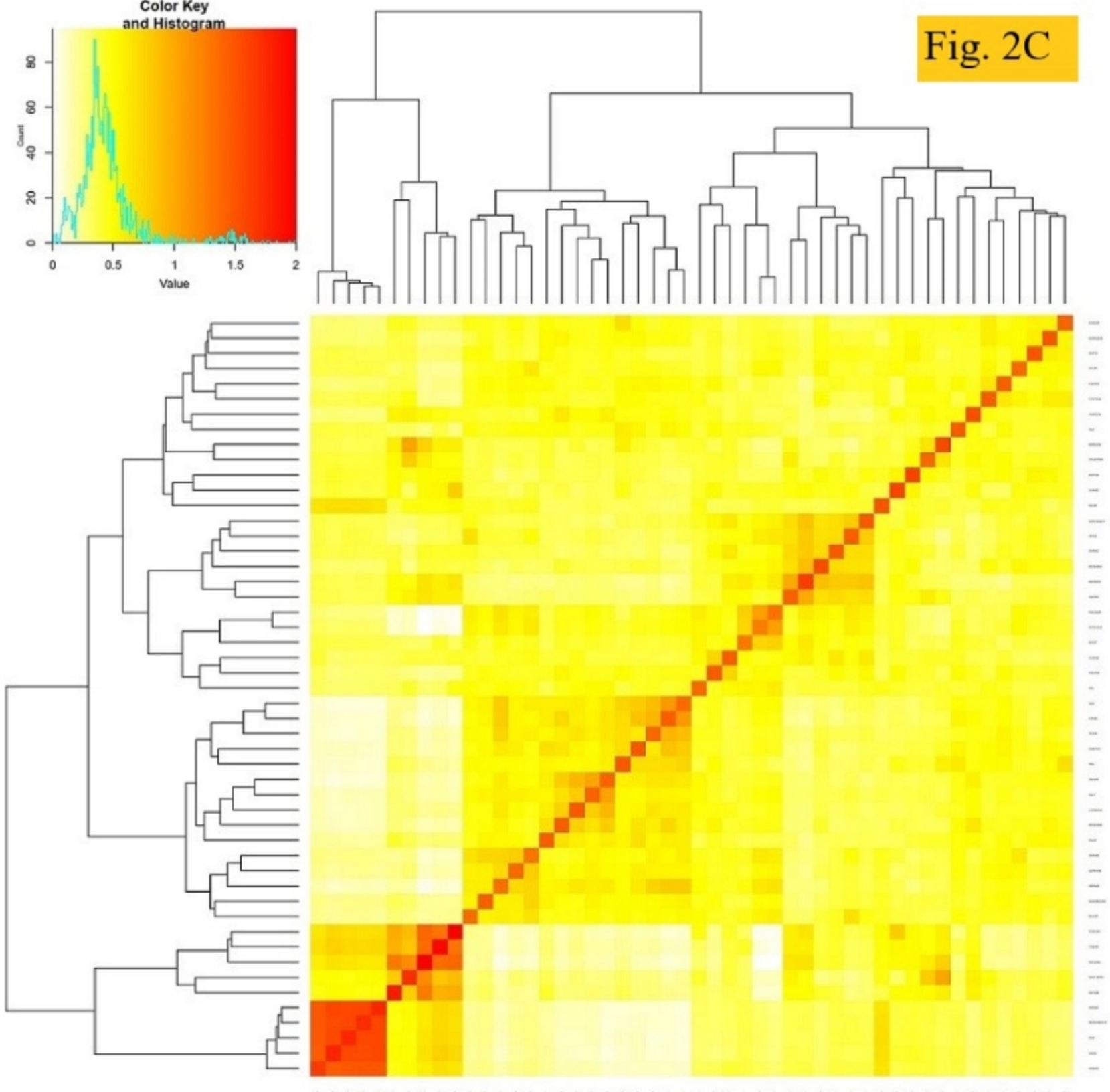


Fig. 2C

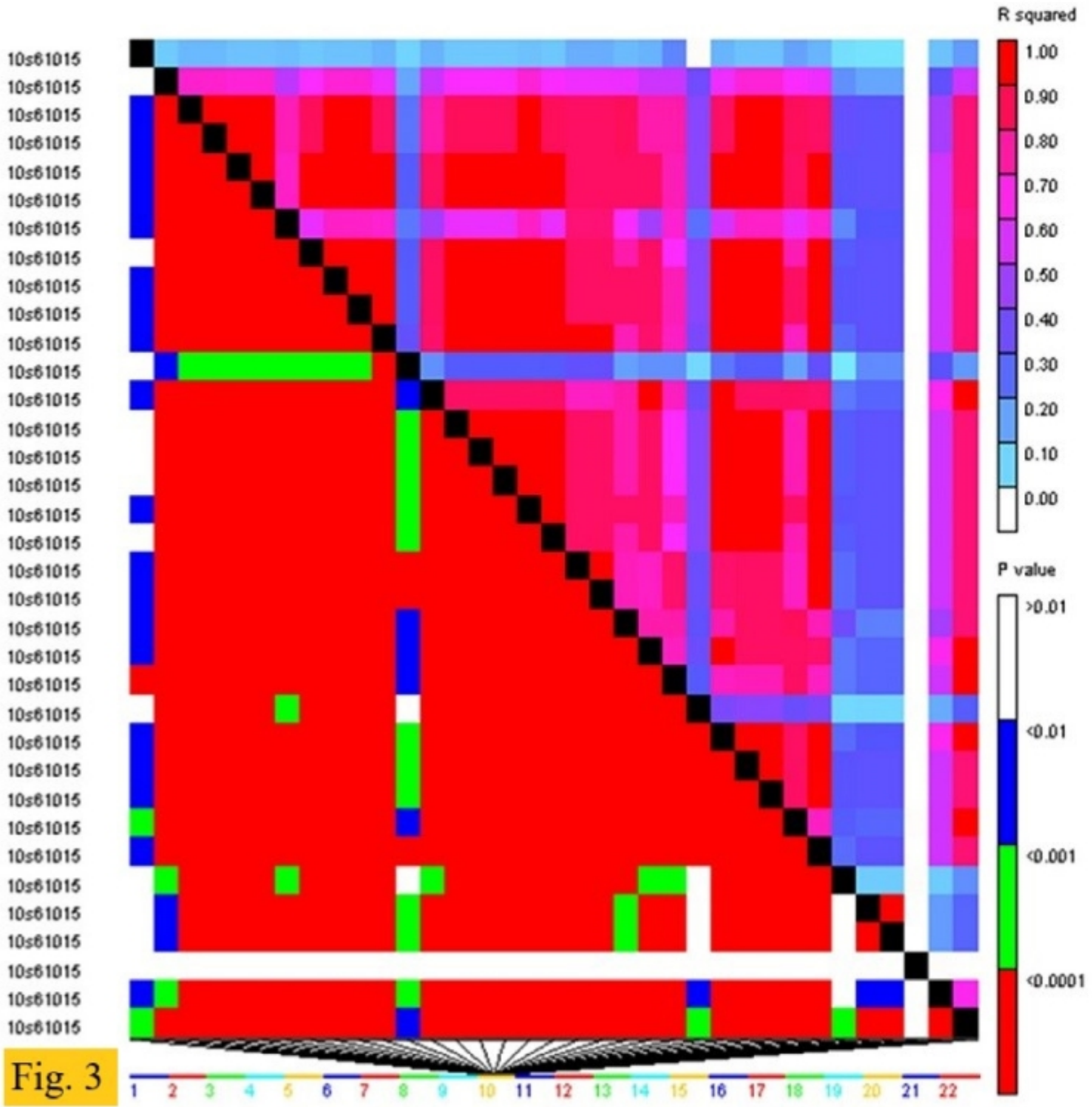

10s61015
R squared
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
P value
>0.01
<0.01
<0.001
<0.0001
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

Fig. 3

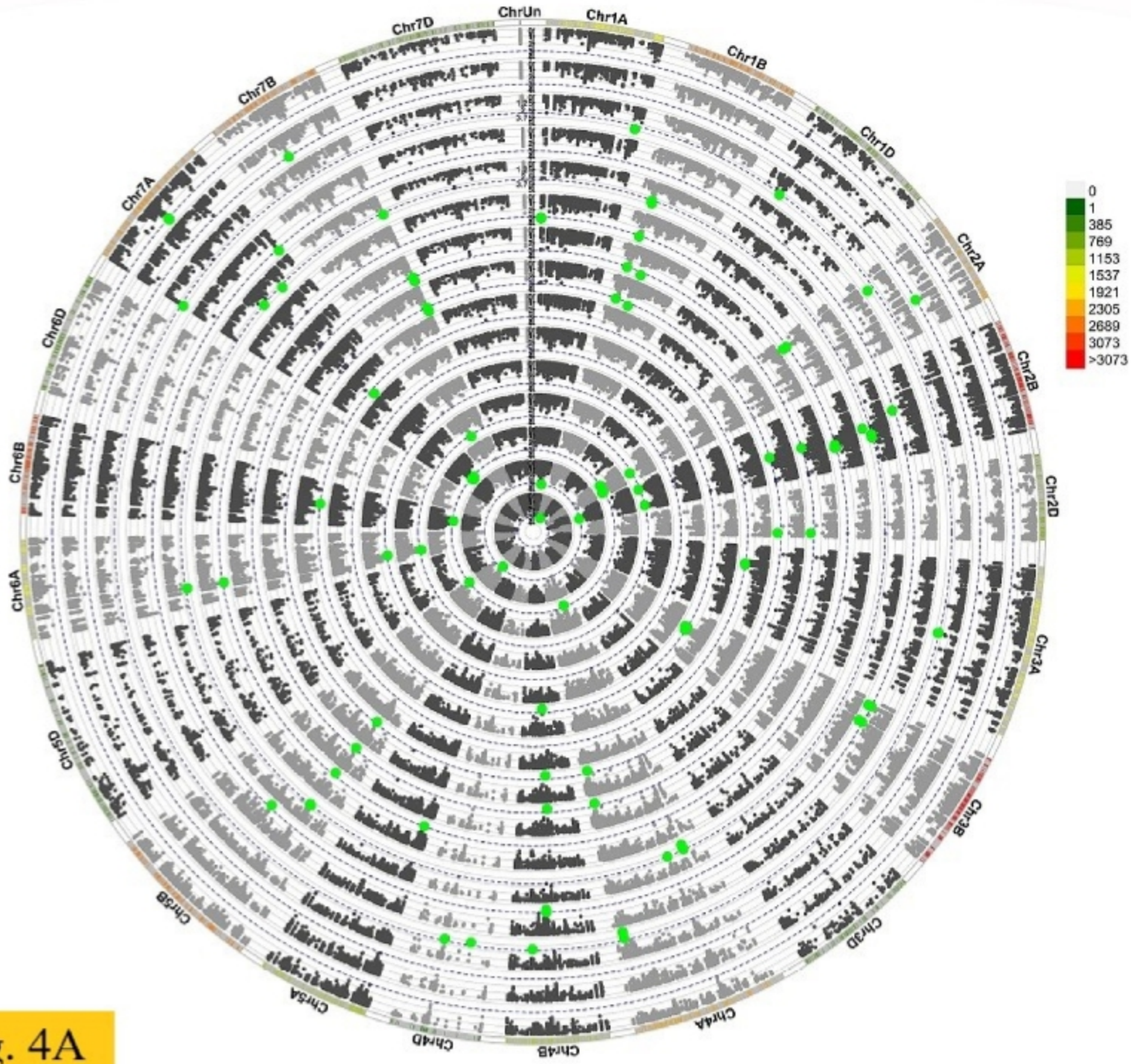

ChrUn
Chr1A
Chr1B
Chr1D
Chr2A
Chr2B
Chr2D
Chr3A
Chr3B
Chr3D
Chr4A
Chr4B
Chr4D
Chr5A
Chr5B
Chr5D
Chr6A
Chr6B
Chr6D
Chr7A
Chr7B
Chr7D
0
1
385
769
1153
1537
1921
2305
2689
3073
>3073

Fig. 4A

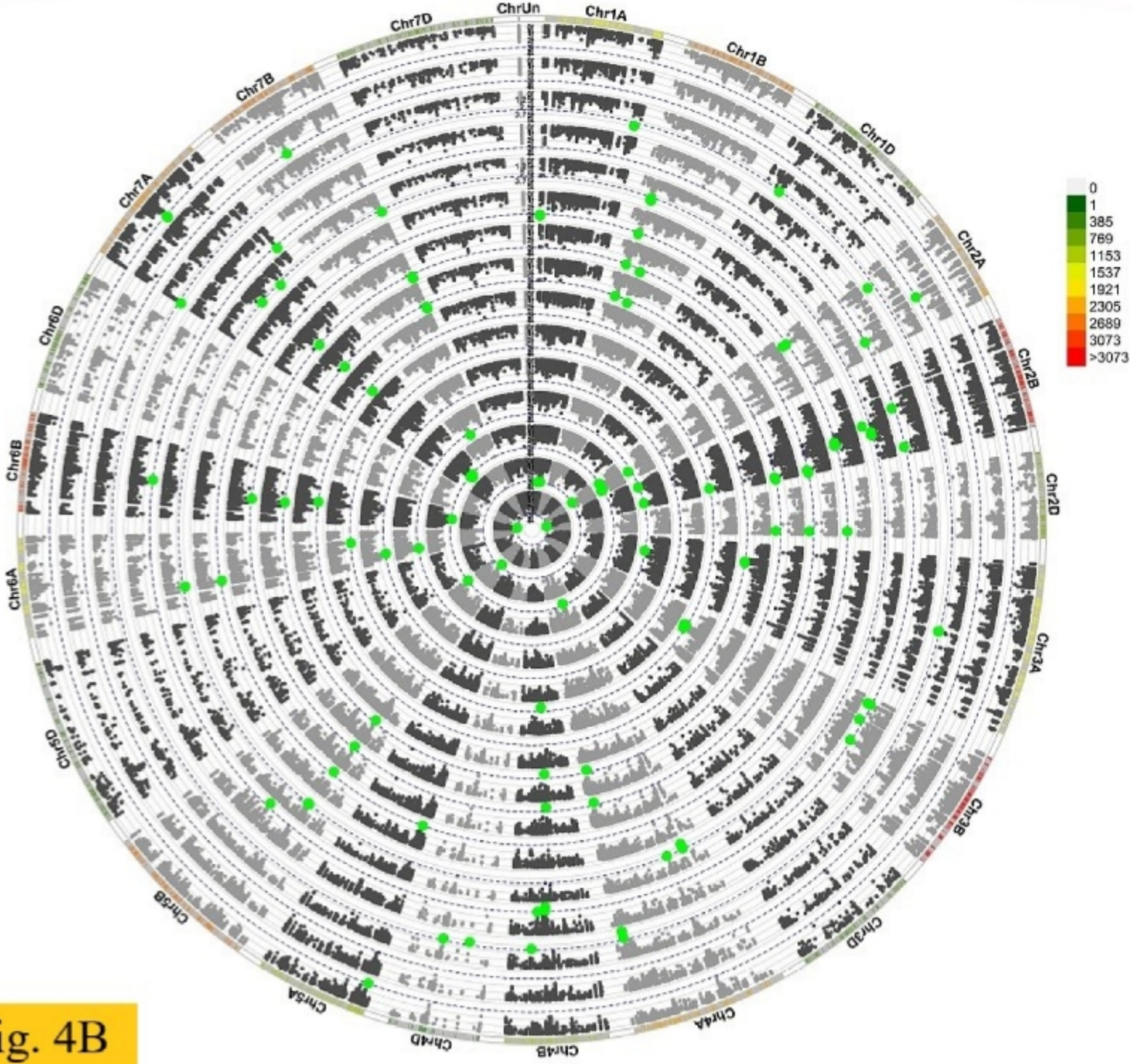

ChrUn
Chr1A
Chr1B
Chr1D
Chr2A
Chr2B
Chr2D
Chr3A
Chr3B
Chr3D
Chr4A
Chr4B
Chr4D
Chr5A
Chr5B
Chr5D
Chr6A
Chr6B
Chr6D
Chr7A
Chr7B
Chr7D
0
1
385
769
1153
1537
1921
2305
2689
3073
>3073

Fig. 4B

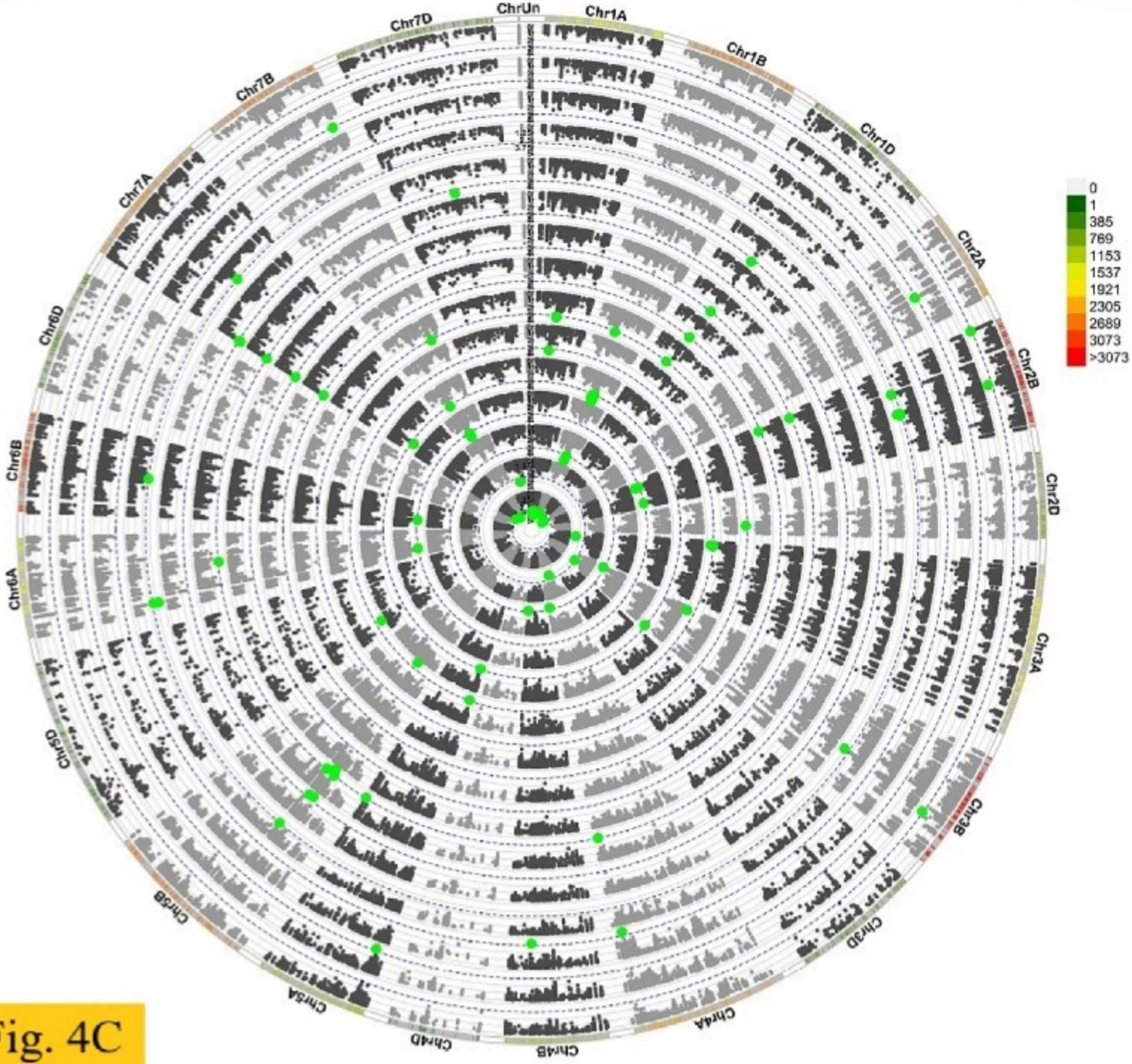

ChrUn
Chr1A
Chr1B
Chr1D
Chr2A
Chr2B
Chr2D
Chr3A
Chr3B
Chr3D
Chr4A
Chr4B
Chr4D
Chr5A
Chr5B
Chr5D
Chr6A
Chr6B
Chr6D
Chr7A
Chr7B
Chr7D
0
1
385
769
1153
1537
1921
2305
2689
3073
>3073

Fig. 4C

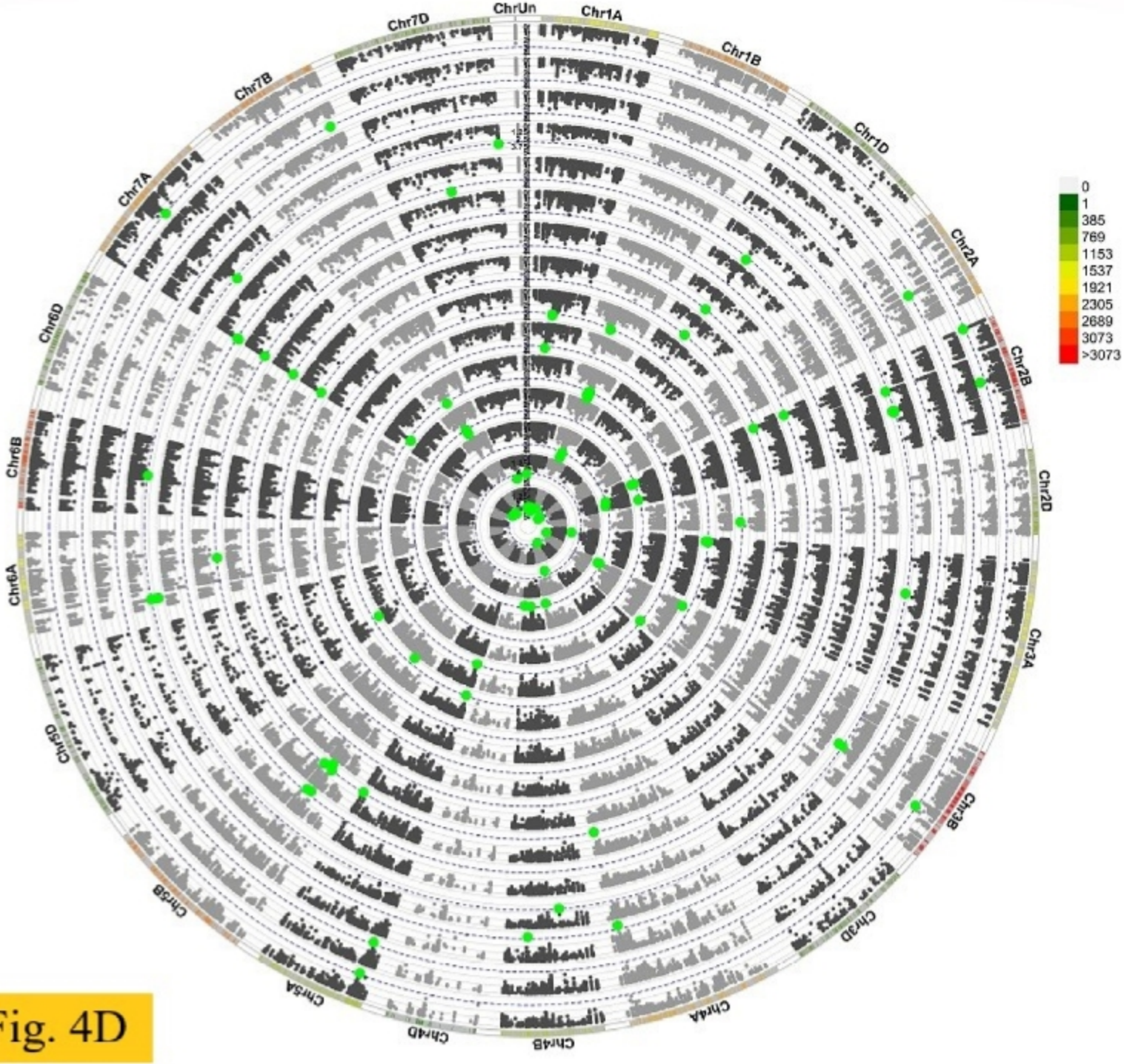

ChrUn
Chr1A
Chr1B
Chr1D
Chr2A
Chr2B
Chr2D
Chr3A
Chr3B
Chr3D
Chr4A
Chr4B
Chr4D
Chr5A
Chr5B
Chr5D
Chr6A
Chr6B
Chr6D
Chr7A
Chr7B
Chr7D
0
1
385
769
1153
1537
1921
2305
2689
3073
>3073

Fig. 4D