

Identification of microsatellite markers associated with genomic regions controlling proline and fructan in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) under cold stress

Mohammad Allahabadi

MSc Student, Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: mohamad.9420693@gmail.com

Reza Qoli Mirfakhrai

Assistant Professor, Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: abdhoorz@modares.ac.ir

Reza Darvishzadeh 

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

Fatemeh Abbaszadeh Panjali Kharabsi

MSc Student, Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: fatemehabbaszadeh7425@gmail.com

Abstract

Objective

Cold stress as one of the most limiting factors in wheat (*Triticum aestivum* L.) production, significantly reduces the yield of this strategic crop. Identifying molecular markers associated with genomic regions controlling traits related to cold stress tolerance such as the accumulation of protective metabolites like proline and fructan is therefore of great importance. This study aimed to investigate the genetic structure and to perform association analysis between simple sequence repeat (SSR) markers and physiological traits related to cold stress tolerance in a diverse panel of bread wheat genotypes. The goal was to detect significant associations between SSR markers and traits related to cold tolerance, ultimately contributing to the development of functional markers for wheat breeding programs aimed at enhancing low-temperature stress tolerance.

Materials and methods

Seeds of 70 bread wheat genotypes were vernalized and grown in a completely randomized design with three replications under greenhouse conditions. At the early heading stage (Zadoks GS41-49), plants were exposed separately to +8°C (as normal conditions) and -2°C (as cold stress

conditions). After temperature treatment, proline and fructan contents were measured in plant genotypes. To determine the population's genetic structure and detect possible admixtures, SSR marker data were analyzed via Bayesian approach in STRUCTURE software v2.3.4. Linkage disequilibrium (LD) and association analysis between SSR markers and physiological traits (proline and fructan contents under normal and cold stress conditions) were performed using the mixed linear model (MLM) in TASSEL software (v2.1).

Results

A significant difference was observed in the amount of proline and fructan between studied wheat genotypes and temperature levels. Analysis of the population structure based on the data of 24 SSR markers showed that 70 genotypes were subdivided into three subgroups; the first group included of 20 genotypes, the second group included of 27 genotypes, and the third group included of 23 genotypes. Based on Linkage disequilibrium (LD) analysis, 0.91% of possible pairs SSR markers were absolutely in linkage disequilibrium. The results of association analysis revealed eight SSR loci that significantly associated with the amount of proline and fructan content. In this context, Xgwm44 showed the strongest relation with the proline trait under cold stress conditions.

Conclusions

SSR markers, especially Xgwm44 and Xgwm319, have high value for use in marker-assisted selection in wheat breeding. The hybridization of the genotypes Dez and Shiroodi with Azadi and Gonbad 2 is considered a suitable option for the development of cold-resistant lines. These findings highlight the strategic role of molecular markers in accelerating wheat improvement under abiotic stress conditions.

Keywords: cold stress, fructan, linkage disequilibrium, population structure, proline

Paper Type: Research Paper.

Citation: Allahabadi, M., Mirfakhrai, R.Q., Darvishzadeh, R., & Abbaszadeh Panjali Kharabsi, F. (2025). Identification of microsatellite markers associated with genomic regions controlling proline and fructan in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) under cold stress. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17(3), 153-176

Agricultural Biotechnology Journal, 17(3), 153-176

DOI: 10.22103/jab.2025.23673.1579

Received: May 20, 2025.

Received in revised form: June 30, 2025.

Accepted: July 01, 2025.

Published online: August 30, 2025.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

Introduction

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.), with a chromosome number of $2n = 6x = 42$ and a genomic formula of AABBDD, originates from the southwestern region of Asia. It serves as a staple food for more than 33% of the global population and contributes more to the world's caloric and protein intake than other cereals such as maize, rice, barley, oat, rye, and sorghum. Cold stress is one of the major limiting factors affecting wheat growth and yield in Iran. It significantly impacts critical developmental stages such as germination, flowering, and grain filling. Plants require optimal temperatures for proper growth, and any deviation from this range such as exposure to cold stress can severely disrupt biological and physiological processes. One of the key physiological responses of plants under stress conditions is the accumulation of carbohydrates, which play a vital role in stress tolerance due to their direct involvement in cellular processes. Carbohydrates increase intracellular solute concentrations, thereby preventing freezing damage and protecting plasma membranes and proteins. Among these carbohydrates, fructans are particularly important under low-temperature stress. They accumulate in the vegetative tissues of wheat and play a role in grain development. In many plant species, the accumulation of the amino acid; proline, is also crucial for tolerance to abiotic stresses. Proline is considered an active component in enhancing stress resistance, especially to cold. Under stress conditions, proline contributes to osmotic adjustment, protection of protein structures, maintenance of cellular integrity, stabilization of subcellular structures, and scavenging of reactive oxygen species (ROS). In recent decades, advances in cell and molecular biology particularly the development and application of DNA markers have greatly facilitated the identification of genomic regions associated with complex traits in crop plants. One modern approach in this context is association mapping, or linkage disequilibrium-based mapping, which leverages existing genetic diversity and the non-random association between markers and trait-controlling genes to enable more precise identification of QTLs. In the present study, SSR markers were used to analyze the genetic structure and identify markers associated with cold tolerance traits in a diverse panel of bread wheat genotypes.

Materials and methods

In this study, 70 bread wheat genotypes were obtained from the Seed and Plant Improvement Institute (SPII) in Karaj, Iran. After undergoing a vernalization period, germinated seeds of these genotypes were grown in a completely randomized design with three replications in pots under greenhouse conditions. At the early booting stage (Zadoks GS41–49), plants were exposed separately to two temperature regimes: $+8^{\circ}\text{C}$ (as a normal conditions) and -2°C (as a cold stress conditions). Following these treatments, the contents of proline and fructan were quantitatively

assessed in the plant tissues of the various genotypes. To determine the genetic structure of the population and to identify potential admixed genotypes, SSR marker data were analyzed using the Bayesian method implemented in STRUCTURE software (v2.3.4). Furthermore, linkage disequilibrium (LD) and association analysis between SSR markers and physiological traits (proline and fructan content under normal and stress conditions) were carried out using a mixed linear model (MLM) in TASSEL software (v2.1).

Results

Analysis of variance revealed significant differences ($P \leq 0.01$) among wheat genotypes and temperature treatments for fructan content. The interaction between genotype and cold stress was also significant, indicating differential responses of genotypes to temperature changes. Under $+8^{\circ}\text{C}$, the Azadi genotype had the highest fructan content ($1.51 \mu\text{g ml}^{-1}$), while the Barat genotype exhibited the lowest ($0.35 \mu\text{g ml}^{-1}$). At -2°C , Shahpasand showed the highest fructan content ($1.47 \mu\text{g ml}^{-1}$), and Dez had the lowest ($0.34 \mu\text{g ml}^{-1}$). Analysis of variance for proline content similarly showed significant differences ($P \leq 0.01$) among genotypes and temperature levels. The genotype $\times$ temperature interaction for proline content was also significant, indicating genotype rankings varied under different thermal conditions. At $+8^{\circ}\text{C}$, the Talaeae genotype showed the highest proline level ($10.95 \mu\text{g ml}^{-1}$), and Tirgan had the lowest ($1.49 \mu\text{g ml}^{-1}$). Under -2°C , Gonbad 2 recorded the highest proline content ($13.24 \mu\text{g ml}^{-1}$), whereas Shiroudi had the lowest ($3.96 \mu\text{g ml}^{-1}$). To minimize false positives in genetic association studies, the genetic structure of the 70 genotypes was assessed using 24 SSR markers and a model-based clustering approach. STRUCTURE analysis was used for population structure inference, and the optimal number of subpopulations (K) was determined using the ΔK method in Structure Harvester. The highest ΔK was observed at $K = 3$, indicating the presence of three genetic subpopulations among the genotypes. Association analysis based on the MLM, accounting for population structure (Q matrix) and kinship (K matrix), identified eight SSR markers significantly associated with proline and fructan traits at a 5% significance level ($P \leq 0.05$). Under cold stress conditions, five markers—particularly Xgwm44 with a high coefficient of determination ($R^2 = 0.65$)—were significantly associated with proline content, suggesting a major role of this marker in explaining phenotypic variance and highlighting its potential for marker-assisted selection (MAS). Under normal temperature, three markers showed significant associations with the target traits, with the highest R^2 observed for Xgwm319 ($R^2 = 0.44$) in relation to proline content. The absence of significant marker–trait associations for fructan under stress conditions may suggest a more dominant role of proline in cold stress response mechanisms.

Conclusions

SSR markers, especially Xgwm44 and Xgwm319, demonstrate high potential for use in marker-assisted breeding programs aimed at improving cold tolerance in wheat. Crosses between cold-sensitive genotypes such as Dez and Shiroudi with tolerant genotypes like Azadi and Gonbad 2 are recommended for the development of cold-tolerant lines. These findings underscore the strategic role of molecular markers in accelerating the genetic improvement of wheat under abiotic stress conditions.

Author Contributions

Mohammad Allahabadi: Data curation, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft; Reza Qoli Mirfakhrai: Project administration, Supervision, Funding acquisition; Reza Darvishzadeh: Supervision, Writing – review & editing; Fatemeh Abbaszadeh Panjali Kharabsi: Writing - review & editing.

Data Availability Statement

Data available on request from the corresponding author.

Acknowledgements

The authors express their sincere gratitude to Tarbiat Modares University, for supporting this research.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

The study was supported by the Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با نواحی ژنومی کنترل کننده پرولین و فروکتان در

ارقام گندم نان (*Triticum aestivum* L.) تحت تنش سرما

محمد اله آبادی

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه:

mohamad.9420693@gmail.com

سید رضا قلی میرفخرایی

استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

رایانامه: abdhoorz@modares.ac.ir

 رضا درویش زاده

*نویسنده مسئول: استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه:

r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

فاطمه عباس‌زاده پنجعلی خرابسی

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه:

fatemehabbaszadeh7425@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۳۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۰

چکیده

هدف: تنش سرمایی به عنوان یکی از محدودکننده‌ترین عوامل تولید گندم (*Triticum aestivum* L.)، به طور قابل توجهی عملکرد این محصول استراتژیک را کاهش می‌دهد. در این راستا، شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن‌های دخیل در کنترل صفات مرتبط با مکانیسم‌های تحمل به تنش سرمایی، از جمله تجمع متابولیت‌های محافظتی نظیر پرولین و فروکتان، از اهمیت بسزایی برخوردار است. مطالعه حاضر با هدف بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت و انجام تجزیه ارتباط نشانگرهای تکرار ساده توالی (SSR) با صفات فیزیولوژیک مرتبط با تحمل به تنش سرمایی در مجموعه‌ای متنوع از ژنوتیپ‌های گندم نان انجام گرفت. این پژوهش در پی آن است تا با شناسایی ارتباطات معنی‌دار بین نشانگرهای SSR و صفات مرتبط با تحمل به سرما، گامی مؤثر در راستای توسعه نشانگرهای کاربردی برای برنامه‌های به‌نژادی گندم و تولید ارقام مقاوم به تنش‌های دمای پایین بردارد.

مواد و روش‌ها: بذور جوانه‌زده ۷۰ ژنوتیپ گندم نان پس از گذراندن دوره بهاره‌سازی، در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلدان در گلخانه کشت شدند. در مرحله آغازین خوشه‌دهی (Zadoks GS41-49)، گیاهان به طور جداگانه تحت سطوح دمایی نرمال (+۸ درجه سانتی‌گراد) و تنش سرمایی (-۲ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. پس از اعمال تیمارها، میزان پرولین و فروکتان در بافت‌های گیاهی ژنوتیپ‌های مختلف مورد ارزیابی کمی قرار گرفت. به منظور تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت و شناسایی احتمالی ژنوتیپ‌های مختلط، تجزیه و تحلیل داده‌های نشانگرهای SSR با استفاده از نرم‌افزار Structure V.2.3.4 و روش Bayesian انجام شد. در نهایت، میزان عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium) و تجزیه ارتباطی (Association analysis) بین نشانگرهای SSR و صفات فیزیولوژیک مورد مطالعه (محتوای پرولین و فروکتان تحت شرایط تنش و نرمال) با استفاده از مدل خطی مخلوط (Mixed linear model) در نرم‌افزار TASSEL 2.1 محاسبه گردید.

نتایج: بین ژنوتیپ‌ها و سطوح مختلف دما اختلاف معنی‌دار از لحاظ میزان پرولین و فروکتان مشاهده شد. تجزیه ساختار جمعیت بر اساس داده‌های ۲۴ نشانگر SSR نشان داد ۷۰ ژنوتیپ در سه زیرگروه؛ گروه اول شامل ۲۰ ژنوتیپ، گروه دوم شامل ۲۷ ژنوتیپ و گروه سوم شامل ۲۳ ژنوتیپ تقسیم شدند. ۰/۹۱ درصد از جفت مکان‌های SSR ممکن در عدم تعادل پیوستگی مطلق بودند. نتایج تجزیه ارتباطی نشان داد که هشت مکان SSR ارتباط بسیار معنی‌داری با میزان پرولین و فروکتان دارند. در این میان، Xgwm44 قوی‌ترین ارتباط را با صفت پرولین در شرایط تنش نشان داد.

نتیجه‌گیری: نشانگرهای SSR، به‌ویژه Xgwm44 و Xgwm319، دارای ارزش بالایی برای کاربرد در انتخاب به کمک نشانگر در به‌نژادی گندم هستند. تلاقی ژنوتیپ‌های دز و شیرودی با آزادی و گنبد ۲، گزینه‌ای مناسب برای توسعه لاین‌های مقاوم به سرما به‌شمار می‌رود. این یافته‌ها نقش استراتژیک نشانگرهای مولکولی در تسریع بهبود گندم تحت شرایط تنش غیرزیستی را برجسته می‌کنند.

کلیدواژه‌ها: پرولین، تنش سرما، ساختار جمعیت، فروکتان، عدم تعادل پیوستگی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: اله آبادی محمد، میرفخرایی سیدرضا قلی، درویش زاده رضا، عباس‌زاده پنجعلی خرابسی فاطمه (۱۴۰۴). شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با نواحی ژنومی کنترل کننده پرولین و فروکتان در ارقام گندم نان (*Triticum aestivum* L.) تحت تنش سرما. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۳)، ۱۵۳-۱۷۶.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

گندم نان با اسم علمی *Triticum aestivum* L. عدد کروموزومی $2n = 6x = 42$ ، فرمول ژنومی AABBDD و با خاستگاه جنوب غربی آسیا محصول غذایی اصلی برای بیش از ۳۳ درصد از کل جمعیت جهان بوده و سهم آن در تأمین کالری و پروتئین در جهان بیش از سایر غلات (ذرت، برنج، جو، یولاف، چاودار و سورگوم) است (Gupta et al., 2021)؛ به طوری که حدود یک پنجم کالری و پروتئین مصرفی انسان را تأمین می کند. دانه آن حاوی ۱/۸ درصد فیبر، ۹/۴ درصد پروتئین، ۶۹ درصد کربوهیدرات و ۲/۵ درصد چربی است (Ahmad et al., 2022). گندم نان سالانه در سطحی بیشتر از هر محصول دیگری (۴۱ درصد زمین های قابل کشت) کاشته می شود و در تهیه محصولات غذایی از جمله نان، شیرینی، کلوچه، رشته فرنگی و ... کاربرد دارد (Zhu et al., 2021). پیش بینی می شود که تقاضای جهانی برای گندم تا سال ۲۰۵۰، تحت تأثیر رشد جمعیت و افزایش درآمد سرانه، به طور قابل توجهی افزایش یابد. در حالی که برای پاسخ گویی به این تقاضا، رشد سالانه عملکرد گندم باید حدود ۲/۴ درصد باشد، آمارها نشان می دهد که افزایش عملکرد جهانی گندم در حال حاضر حدود ۱ درصد در سال است (FAO 2023). در سال های اخیر، تغییرات اقلیمی منجر به کاهش پی در پی تولید گندم در برخی مناطق شده است (Zhang et al., 2022). برای نمونه، شرایط آب و هوایی نامساعد در سال ۲۰۲۴ موجب کاهش ۳۰ تا ۴۰ درصدی عملکرد محصولات زمستانه در اروپا از جمله گندم شد (Le Monde, 2024). بر اساس گزارش فائو، متوسط عملکرد گندم در جهان در سال ۲۰۲۳ حدود ۳۷۰۰ کیلوگرم در هکتار برآورد شده است، در حالی که این مقدار در ایران حدود ۱۵۵۰ کیلوگرم در هکتار بوده است (FAO, 2023). ایران در سال ۲۰۲۲ با تولید حدود ۱۳ میلیون تُن گندم، رتبه سیزدهم تولید جهانی را به خود اختصاص داد (Tehran Times, 2023). تنش سرمایی یکی از عوامل عمده محدودکننده رشد و عملکرد گندم در ایران به شمار می رود و تأثیر چشمگیری بر مراحل حساس رشد گیاه مانند جوانه زنی، گل دهی و پر شدن دانه دارد. گیاهان برای رشد بهینه به دمای مناسب نیاز دارند و هرگونه انحراف از این دامنه، به عنوان نمونه؛ مواجهه با تنش سرما، می تواند فرآیندهای زیستی و فیزیولوژیکی را به طور جدی مختل کند (Yadav & Sharma, 2021). سرما با ایجاد تغییرات گسترده در ساختار سلولی و فعالیت های متابولیکی، موجب کاهش فتوسنتز، آسیب به غشای سلولی، کاهش جذب آب و عناصر غذایی، و تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) می شود. در پاسخ، گیاه فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT) را افزایش می دهد تا از آسیب اکسیداتیو جلوگیری کند (Wang et al., 2022; Cheong et al., 2022). در مرحله جوانه زنی، تنش سرما با کاهش انرژی متابولیک و ایجاد محدودیت در جذب آب و مواد معدنی، منجر به اختلال در استقرار گیاهچه می شود و این موضوع مستقیماً عملکرد نهایی را تحت تأثیر قرار می دهد. سرما تعداد پنجه های بارور، تعداد دانه در سنبله و سرعت پُر شدن دانه را کاهش می دهد که در مجموع باعث افت شدید عملکرد می شود (Ji et al., 2023). کاهش عملکرد اغلب با کاهش سطح برگ، کوتاه شدن میان گره ها و افت ظرفیت فتوسنتزی همراه است (Malko et al., 2023). یکی از مهم ترین مشخصات گیاهان در شرایط تنش انباشته شدن کربوهیدرات ها به دلیل رابطه مستقیم آنها با فرآیندهای فیزیولوژیک است. در واقع کربوهیدرات ها با بالا بردن غلظت درون سلولی، مانع یخ زدن گیاهان در اثر سرما می شوند و از غشای پلاسمایی و

پروتئین‌ها محافظت می‌کنند (Jahanbakhsh-Godehkahriz et al., 2009). یکی از مهم‌ترین کربوهیدرات‌ها در شرایط تنش فروکتان می‌باشد که تحت شرایط دما پایین در بافت‌های رویشی گندم تجمع می‌یابد و در رشد دانه گندم نقش دارد. متابولیسم فروکتان با مقاومت به سرما در گندم مرتبط است (Vagujfaliv et al., 1999). رابطه بین فروکتان و تحمل تنش‌های محیطی به اختلاف مولکول‌های فروکتان (اندازه، ساختار و انتقال آنها) مرتبط است (Livingston et al., 2006). در بسیاری از گیاهان انباشتن اسید آمینه پرولین در تحمل به تنش‌های غیرزیستی مهم است و از عناصر فعال در تحمل به تنش‌ها به‌خصوص تنش سرمایی محسوب می‌شود. پرولین، تحت شرایط تنش می‌تواند عملکردهای متفاوتی مانند ایجاد تعادل اسمزی، حفاظت از ساختارهای پروتئینی، حفظ حالت طبیعی سلول، تثبیت ساختارهای درون‌سلولی و حذف رادیکال‌های آزاد را داشته باشد (Matysik et al., 2002). در دهه‌های اخیر، پیشرفت‌ها در زیست سلولی و مولکولی، به‌ویژه توسعه و کاربرد نشانگرهای DNA، به شناسایی نواحی ژنومی مؤثر بر صفات پیچیده در گیاهان زراعی کمک شایانی کرده است. یکی از رویکردهای نوین در این زمینه، تجزیه ارتباطی یا نقشه‌یابی مبتنی بر جمعیت‌های طبیعی است که با تکیه بر تنوع ژنتیکی موجود و عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرها و ژن‌های کنترل‌کننده صفات، امکان شناسایی دقیق‌تر QTL‌ها را فراهم می‌سازد (Alqudah et al., 2020). این روش نسبت به نقشه‌یابی مبتنی بر جمعیت‌های دو والدی (Bi-parental mapping)، دقت بالاتر، توان تفکیک ژنتیکی بیشتر و گستره ژنومی وسیع‌تری را پوشش می‌دهد و به‌ویژه در گیاهانی مانند گندم با ژنوم پیچیده، بسیار سودمند است. در میان انواع مختلف نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ریزماهورای یا SSR به دلیل ویژگی‌هایی مانند چندشکلی بالا، توزیع یکنواخت در ژنوم، هم‌بارز بودن، پایداری بالا و سهولت استفاده، در برنامه‌های به‌نژادی مبتنی بر نشانگر جایگاه ویژه‌ای دارند (Rahimi et al., 2021). این نشانگرها هم در مناطق رمزکننده و هم غیررمزکننده ژنوم حضور داشته و توانایی بالایی در آشکارسازی تفاوت‌های ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها دارند (Agarwal et al., 2023). تاکنون از SSRها در مطالعات ساختار جمعیت، آنالیز تنوع ژنتیکی و شناسایی QTL‌های مرتبط با صفاتی همچون تحمل به سرما، خشکی و شوری در گندم و سایر گیاهان زراعی به طور موفقیت‌آمیزی استفاده شده است (Yang et al., 2023). تحمل به سرما یکی از صفات مهم در گندم است که با مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و ژنتیکی متعددی کنترل می‌شود. استفاده از نشانگرهای SSR در تجزیه ارتباطی صفات مرتبط با تحمل سرما می‌تواند به شناسایی ژن‌های مؤثر در این فرایند کمک کرده و توسعه ارقام مقاوم از طریق انتخاب به کمک نشانگر را تسهیل کند (Li et al., 2022). به‌علاوه، تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از داده‌های نشانگرهای SSR، امکان درک دقیق‌تر روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد و زمینه مناسبی برای انتخاب ژرم‌پلاس‌های مناسب در برنامه‌های اصلاحی فراهم می‌نماید. در پژوهش حاضر از نشانگرهای SSR برای تحلیل ساختار ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مرتبط تحمل به سرما در ژنوتیپ‌های متنوع گندم نان استفاده شده است. نتایج این بررسی می‌تواند در جهت انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم، افزایش دقت گزینش و تسریع فرایند اصلاح گندم کاربرد داشته باشد و در نهایت به افزایش عملکرد در شرایط اقلیمی متغیر کمک نماید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش ۷۰ ژنوتیپ گندم نان شامل ۴۱ ژنوتیپ با تیپ رشدی بهاره (اترک، احسان، ارگ، افق، افلاک، آرتا، آزادی، برات، برزگر، بهار، بهاران، بیات، پارسی، پیشتاز، تیرگان، چمران، چمران ۲، خلیل، دریا، دز، رخشان، رسول، روشن BC، سارنگ، ستاره، سیروان، سیوند، شاوور، شوش، شیرودی، طلایی، کاسکوژن، کلاته، گلستان، گنبد، گنبد ۲، مروارید، معراج، مغان ۲، مهرگان و نیشابور)، ۱۸ ژنوتیپ با تیپ رشدی پاییزه (الموت، امید، اوحدی، آذر ۲، بزوستایا، رصد، زارع، زرین، زرینه، سای سون، سبلان، شاهپسند، شهریار، کرج ۱، کرج ۲، کرج ۳، گاسپارد و میهن)، هفت ژنوتیپ با تیپ رشدی بینابین (بم، ترابی، حیدری، کویر، مهدوی، نارین و نیک‌نژاد) و چهار ژنوتیپ با تیپ رشدی نیمه‌پاییزه (از جمله الوند، سپاهان، قدس و مرودشت) از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و بررسی شد (جدول ۱).

کشت و اعمال تنش سرما: بذره‌های گندم نان (*Triticum aestivum* L.) پیش از کاشت با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس دو تا سه بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند. پس از خشک شدن سطحی، بذرها در پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند و به مدت چهار روز در شرایط تاریکی، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد در دستگاه جوانه‌زنی نگهداری شدند تا جوانه‌زنی کامل صورت گیرد (Li et al., 2023). پس از رسیدن طول نورسته‌ها به حدود ۲ سانتی‌متر، به‌منظور بهاره‌سازی، پتری‌دیش‌ها به مدت شش هفته در دمای ۱ تا ۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس، گیاهچه‌ها به گلدان‌هایی با قطر ۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر که با مخلوطی از خاک مزرعه، کود دامی و پرلیت به نسبت ۱:۱:۱ پر شده بودند، منتقل شدند. کشت در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. گلدان‌ها در گلخانه‌ای با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب، با طول روز ۱۶ ساعت و شب ۸ ساعت نگهداری شدند. رطوبت نسبی محیط در ۶۵ درصد حفظ گردید. گیاهان تا رسیدن به مرحله زایشی (کد زادوکس ۴۸ تا ۶۰) در این شرایط رشد کردند (Wang et al., 2023). در مرحله آغازین زایشی، گلدان‌ها به دو گروه تقسیم شدند: گروه کنترل و گروه تنش سرما. برای اعمال تنش، دما به‌تدریج از ۲۴ درجه سانتی‌گراد به ۲ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت (کاهش ۲ درجه سانتی‌گراد در هر ساعت). گیاهان به مدت ۲ ساعت در این دما نگهداری شدند و سپس دما به‌تدریج به ۲۴ درجه سانتی‌گراد بازگردانده شد. ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش، نمونه‌برداری از برگ‌ها انجام گرفت (Chen et al., 2024). نمونه‌های برگي بلافاصله پس از برداشت در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا زمان انجام آزمایش‌های فیزیولوژیکی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش میزان پرولین: برای تهیه محلول واکنش نین‌هیدرین، مقدار ۰/۴ گرم نین‌هیدرین در ۲۴ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال سرد و ۸/۳۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۸ درصد حل شده و حجم نهایی محلول به ۴۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول تهیه شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردید (Carillo & Gibon, 2011). برای استخراج پرولین، ۵۰ میلی‌گرم از برگ پرچم گیاه با نیتروژن مایع پودر شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با

دمای ۸۰ درجه سانتی گراد گرم شدند و پس از سانتیفریوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد (Forlani & Funck, 2020). به منظور انجام واکنش رنگ سنجی، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با ۲۰۰ میکرولیتر محلول نین هیدرین مخلوط شد و مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در بن ماری قرار گرفت.

جدول ۱. ارقام گندم نان مورد مطالعه

Table 1. Studied bread wheat cultivars

ردیف Row	رقم Cultivars	ردیف Row	رقم Cultivars	ردیف Row	رقم Cultivars
1	اترک Atrak	25	چمران ۲ Chamran 2	48	شوش Shoosh
2	احسان Ehsan	26	حیدری Heydari	49	شیروودی Shiroudi
3	آذر ۲ Azar 2	27	خلیل Khalil	50	طلایی Talaeae
4	آرتا Artta	28	دریا Darya	51	کرچ ۱ Karaj 1
5	ارگ Arg	29	دز Dez	52	قدس Ghods
6	آزادی Azadi	30	رخشان Rakhshan	53	کاسکوژن Cascogene
7	افق Ofogh	31	رسول Rasoul	54	کرچ ۳ Karaj 3
8	افلک Aflak	32	رصد Rasad	55	کرچ ۲ Karaj 2
9	الموت Almot	33	روشن BC Roshan BC	56	کلاته Kalate
10	امید Omid	34	زارع Zare	57	کویر Kavir
11	اوحدی Ohadi	35	زرین Zarin	58	گاسپارد Gaspard
12	الوند Alvand	36	زرینه Zarineh	59	گلستان Golestan
13	برات Barat	37	سارنگ Sarang	60	گنبد Gonbad
14	برزگر Barzegar	38	سای سون Saison	61	مروارید Morvarid
15	بزوستایا Bezostaia	39	سبلان Sabalan	62	مروداشت Marvdasht
16	بم Bam	40	سپاهان Sepahan	63	معراج Meraj
17	بهار Bahar	41	ستاره Setareh	64	مژگان ۲ Moghan 2
18	بهاران Baharan	42	سیروان Sirvan	65	مهدوی Mahdavi
19	بیات Bayat	43	گنبد ۲ Gonbad 2	66	مهرگان Mehrgan
20	پارسی Parsi	44	سیوند Sivand	67	میهن Mihan
21	پیشتاژ Pishtaz	45	شاهپسند Shahpasand	68	نارین Narian
22	ترابی Torabi	46	شاوور Shavoor	69	نیشابور Neishabour
23	تیرگان Tirgan	47	شهریار Shahryar	70	نیک نژاد Niknezhad
24	چمران Chamran				

پس از خنک شدن، ۱۵۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های میکروپلیت منتقل شده و جذب نوری در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ BioTek مدل Epoch اندازه‌گیری شد (Carillo & Gibon, 2011). منحنی استاندارد با استفاده از محلول‌های استاندارد پرولین در بازه‌های مشخص تهیه شد و معادله رگرسیون خطی به‌دست آمد. با استفاده از مقدار جذب نمونه‌های مجهول و جای‌گذاری در معادله رگرسیونی، غلظت پرولین به‌صورت $\mu\text{g ml}^{-1}$ تعیین شد. اعداد به‌دست آمده جهت تعیین مقدار کمی پرولین در رابطه ۱ قرار داده شد:

$$(\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ FW}) = (\text{A520}-\text{Blank})/\text{Slope} * \text{Volextract}/\text{Volaliquot} * 1/\text{FW} \quad (\text{رابطه ۱})$$

در این رابطه، $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ FW}$: ماکرومول پرولین در میلی‌گرم برگ، Slope: شیب (به‌صورت جذب در μmol^{-1}) که با رگرسیون خطی تعیین می‌شود، Volextract: حجم کل عصاره، Volaliquot: حجم مورد استفاده در سنجش FW (بیان شده بر حسب میلی‌گرم) مقدار مواد گیاهی استخراج شده می‌باشد (Forlani & Funck, 2020).

سنجش میزان فروکتان: برای سنجش میزان فروکتان، از نمونه‌های برگ که در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند، استفاده شد. برای هر نمونه، ۰/۲ گرم از ماده گیاهی با ۳ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار مخلوط و سائیده شد (Jermyn, 1956). سپس همگن حاصل به فلاسک ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد (Matros et al., 2019). مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل به ۲/۵ میلی‌لیتر معرف آنترون با غلظت ۰/۰۲ درصد اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷/۵ دقیقه قرار گرفت (Jermyn, 1956). پس از سرد شدن نمونه‌ها، جذب نوری آن‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (Matros et al., 2019). برای سنجش فروکتان، از استاندارد اینولین با غلظت‌های مختلف بین ۰ تا ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (Jermyn 1956).

بررسی مولکولی: استخراج DNA ژنومی از بافت برگ ارقام گندم نان با استفاده از کیت استخراج DNA گیاهی ساخت شرکت ویراژن (Viragene Co., Iran) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. به‌منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده، از دستگاه نانودراپ مدل Epoch ساخت شرکت BioTek (USA) و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ۳۰ جفت آغازگر ریزماهواره (SSR) انجام شد (جدول ۲). واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR غلظت نهایی (IX)، ۰ تا ۱ میکرولیتر منیزیم کلراید (با غلظت نهایی بین ۱/۵ تا ۲/۵ میلی‌مولار)، ۰/۲ تا ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (با غلظت نهایی ۰/۱ تا ۰/۲ میکرومولار)، ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو انجام گرفت. حجم نهایی با آب دیونیزه تنظیم شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Bio-Rad (USA) با برنامه حرارتی شامل مراحل زیر انجام گرفت: واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای خاص هر

آغازگر (مطابق با دمای T_m هر جفت آغازگر در جدول ۲)، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان، یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. به‌منظور تفکیک محصولات PCR، از ژل آگارز ۳ درصد استفاده شد. استفاده از غلظت بالای ژل آگارز به دلیل افزایش دقت تفکیک قطعات کوچک DNA (محدوده ۱۰۰-۳۰۰ جفت‌باز که معمولاً برای نشانگرهای SSR رایج است) ضروری است (شکل ۱). ژل‌های با غلظت بالاتر، به دلیل چگالی بیشتر، توانایی بهتری در جداسازی باندهای نزدیک به هم دارند و این ویژگی برای تحلیل دقیق الگوهای باندهای SSR بسیار مهم است (Sambrook & Russell, 2001; Green & Sambrook, 2012). برای تعیین اندازه قطعات حاصل، از نشانگر مولکولی DNA 1 kb استفاده گردید. الگوهای باندهای حاصل از الکتروفورز، به‌صورت هم‌بارز (Codominant scoring) امتیازدهی شدند.

تجزیه‌های آماری: پیش از انجام تجزیه و تحلیل داده‌های فنوتیپی، همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون بارتلت و نرمال بودن توزیع باقی‌مانده‌ها با آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد (Shapiro & Wilk, 1965; Bartlett, 1937). تجزیه واریانس صفات فنوتیپی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد، با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.26 انجام گرفت. برای بررسی ساختار جمعیت و تعیین تعداد بهینه زیرجمعیت‌های ژنتیکی (K)، از رویکرد بیزی در نرم‌افزار STRUCTURE v.2.3.4 استفاده شد (Pritchard et al., 2000). این روش بر مبنای مدل Admixture و فرض استقلال فراوانی آللی، به تخصیص احتمالی هر ژنوتیپ به زیرجمعیت‌های مفروض می‌پردازد، به‌گونه‌ای که عدم تعادل پیوستگی (LD) درون زیرجمعیت‌ها به حداقل و تعادل گامتی به حداکثر برسد. تحلیل‌ها با مقادیر اولیه K از ۱ تا ۱۰ و در هر حالت با ۱۰ تکرار، و با اجرای ۱۰۰,۰۰۰ چرخه Burn-in و ۱,۰۰۰,۰۰۰ تکرار در زنجیره مارکوف (MCMC) انجام گرفت. جهت تعیین مقدار بهینه K، از روش پیشنهادی (Evanno et al., 2005) استفاده شد که بر پایه تغییرات مشتق اول تابع احتمال لگاریتمی بین Kهای متوالی استوار است. ماتریس Q که بیانگر ضرایب احتمال تعلق هر ژنوتیپ به زیرجمعیت‌هاست، از خروجی STRUCTURE استخراج گردید. برای تحلیل عدم تعادل پیوستگی نیز از نرم‌افزار TASSEL v.2.1 استفاده شد. این عدم تعادل نشان‌دهنده‌ی ارتباط غیرتصادفی بین آلل‌های جایگاه‌های مختلف ژنی است که می‌تواند در تعیین مکان ژن‌های مؤثر بر صفات مورد استفاده قرار گیرد (Yu et al., 2006). جهت اجرای تجزیه ارتباطی (Association analysis)، داده‌های فنوتیپی، ژنوتیپی و ماتریس‌های Q و K به نرم‌افزار TASSEL وارد شدند. تحلیل ارتباط با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) انجام شد تا اثرات ساختار جمعیت (Q) و روابط خویشاوندی (K) به‌درستی در مدل لحاظ گردد و از بروز روابط کاذب بین نشانگرها و صفات جلوگیری شود. ماتریس Q به‌عنوان عامل ثابت و ماتریس K به‌عنوان عامل تصادفی در مدل وارد شدند. نشانگرهای مرتبط با صفات مورد مطالعه بر اساس سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ انتخاب گردیدند.

جدول ۲. نشانگرهای SSR مورد استفاده در تجزیه ارتباطی ۷۰ ژنوتیپ گندم نان

Table 2. SSR primers used in the study of genetic diversity of 70 bread wheat varieties

ردیف Row	نشانگر Satellite marker	توالی آغازگر Primer sequence	کروموزومی جایگاه Choromosal location	دمای اتصال Binding Temperture
1	Xgwm264	F: GAG AAA CAT GCC GAA CAA CA R: GCA TGC ATG AGA ATA GGA	1B	60
2	Xgwm445	F: TTT GTT GGG GGT TAG GAT TAG R: CCT TAA CAC TTG CTG GTA GTG A	2A	55
3	Xgwm613	F: CCG ACC CGA CCT ACT TCT CT R: TTG CCG TCG TAG ACT GG	6B	60
4	Xgwm44	F: CGC ACC ATC TGT ATC ATT CTG R: TGG TCG TAC CAA AGT ATA CGG	2 A	50
5	Xgwm55	F: TGC CCA CAA CGG AAC TTG R: GCA ACC ACC AAG CAC AAA GT	1-2B	55
6	Xgwm129	F: TCA GTG GGC AAG CTA CAC AG R: AAA ACT TAG TAG CCG CGT	5A	50
7	Xgwm133	F: ATC TAA ACA AGA CGG CGG TG R: ATC TGT GAC AAC CGG TGA GA	6B	60
8	Xgwm140	F: ATG GAG ATA TTT GGC CTA CAA C R: CTT GAC TTC AAG GCG TGA CA	1B	55
9	Xgwm162	F: AGT GGA TCG ACA AGG CTC TG R: AGA AGA AGC AAA GCC TTC CC	3A	60
10	Xgwm174	F: GGG TTC CTA TCT GGT AAA TCC C R: GAC ACA CAT GTT CCT GCC AC	5D	55
11	Xgwm190	F: GTG CTT GCT GAG CTA TGA GTC R: GTG CCA CGT GGT ACC TTT G	2D	60
12	Xgwm192	F: GGT TTT CTT TCA GAT TGC GC R: CGT TGT CTA ATC TTG CCT TGC	5D	60
13	Xgwm261	F: CTC CCT GTA CGC CTA AGG C R: CTC GCG CTA CTA GCC ATT G	2D	55
14	Xgwm291	F: CAT CCC TAC GCC ACT CTG C R: AAT GGT ATC TAT TCC GAC CCG	5A	60
15	Xgwm294	F: GGA TTG GAG TTA AGA GAG AAC CG R: GCA GAG TGA TCA ATG CCA GA	2A	55
16	Xgwm302	F: GCA AGA AGC AAC AGC AGT AAC R: CAG ATG CTC TTC TCT GCT GG	7B	60
17	Xgwm339	F: AAT TTT CTT CCT CAC TTA TT R: AAA CGA ACA ACC ACT CAA TC	2A	50
18	Xgwm372	F: AAT AGA GCC CTG GGA CTG GG R: GAA GGA CGA CAT TCC ACC TG	2A	60
19	Xgwm382	F: GTC AGA TAA CGC CGT CCA AT R: CTA CGT GCA CCA CCA TTT TG	2A	60
20	Xgwm410	F: GCT TGA GAC CGG CAC AGT R: CGA GAC CTT GAG GGT CTA GA	2B	55
21	Xgwm443	F: GGG TCT TCA TCC GGA ACT CT R: CCA TGA TTT ATA AAT TCC ACC	5B	60
22	Xgwm469	F: CAA CTC AGT GCT CAC ACA ACG R: CGA TAA CCA CTC ATC CAC ACC	6D	60
23	Xgwm518	F: AAT CAC AAC AAG GCG TGA CA R: CAG GGT GGT GCA TGC AT	6B	55
24	Xgwm540	F: TCT CGC TGT GAA ATC CTA TTT C R: AGG CAT GGA TAG AGG GGC	5B	55
25	Xgwm583	F: TTC ACA CCC AAC CAA TAG CA R: TCT AGG CAG ACA CAT GCC TG	5D	60
26	Xgwm608	F: ACA TTG TGT GTG CGG CC R: GAT CCC TCT CCG CTA GAA GC	2D	60
27	Xgwm610	F: CTG CCT TCT CCA TGG TTT GT R: AAT GGC CAA AGG TTA TGA AGG	4A	60
28	Xgwm611	F: CAT GGA AAC ACC TAC CGA AA R: CGT GCA AAT CAT GTG GTA GG	7B	55
29	Xgwm642	F: ACG GCG AGA AGG TGC TC R: CAT GAA AGG CAA GTT CGT CA	1D	60
30	Xgwm10	F: CGC ACC ATC TGT ATC ATT CTG R: TGG TCG TAC CAA AGT ATA CGG	2A	50



شکل ۱. محصول PCR نشانگر ریزماهواره Xgwm610 در ژنوتیپ‌های گندم نان روی ژل آگارز ۳ درصد

Figure 1. PCR product of the microsatellite marker Xgwm610 in bread wheat genotypes on 3% agarose gel

نتایج و بحث

صفات فنوتیپی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مختلف گندم و سطوح مختلف تنش سرمایی، از نظر میزان فروکتان، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت. اثر متقابل ژنوتیپ $\times$ تنش سرما نیز معنی‌دار بود، که نشان‌دهنده تفاوت واکنش ژنوتیپ‌ها به تغییرات دما می‌باشد. در شرایط دمای $+8$ درجه سانتی‌گراد، ژنوتیپ آزادی بیش‌ترین میزان فروکتان ($1/51 \mu\text{g ml}^{-1}$) و ژنوتیپ برات کمترین مقدار ($0/35$) را نشان داد. در حالی که در دمای -2 درجه سانتی‌گراد، بیش‌ترین مقدار فروکتان در ژنوتیپ شاهپسند ($1/47 \mu\text{g ml}^{-1}$) و کمترین مقدار در ژنوتیپ دز ($0/34 \mu\text{g ml}^{-1}$) مشاهده شد. فروکتان‌ها به‌عنوان ترکیبات ذخیره‌ای کربن، نقش مهمی در تنظیم فشار اسمزی و حفاظت سلولی در برابر تنش‌های غیرزیستی، از جمله سرما، ایفا می‌کنند. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز فروکتان مانند Ta1SST و Ta6SFT در گندم با افزایش تجمع فروکتان در برگ، ساقه و دانه، به‌ویژه در شرایط تنش سرمایی و خشکی همراه بوده است (Perry et al. 2024). همچنین، رابطه نزدیکی بین افزایش فروکتان و تحریک مسیرهای ژنتیکی مرتبط با پاسخ به سرما مانند ICE-CBF-COR گزارش شده است (Guo et al., 2019). نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای محتوای پرولین نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و سطوح مختلف دمایی، اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد. اثر متقابل ژنوتیپ $\times$ تنش سرما بر میزان پرولین نیز معنی‌دار بود و نشان داد که رتبه‌بندی ژنوتیپ‌ها تحت دماهای مختلف تغییر می‌کند. در دمای $+8$ درجه سانتی‌گراد، ژنوتیپ طلایی با مقدار $10/95 \mu\text{g ml}^{-1}$ بیش‌ترین و ژنوتیپ تیرگان با $1/49 \mu\text{g ml}^{-1}$ کمترین میزان پرولین را داشت. در دمای -2 درجه سانتی‌گراد نیز، ژنوتیپ گنبد ۲ با $13/24 \mu\text{g ml}^{-1}$ بیش‌ترین و ژنوتیپ شیرودی با $3/96 \mu\text{g ml}^{-1}$ کمترین میزان پرولین را نشان داد. پرولین از مهم‌ترین اسمولیت‌های سازگار در پاسخ به تنش سرماست و با تثبیت ساختارهای پروتئینی، تنظیم اسمزی، و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو نقش محافظتی ایفا می‌کند. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما، میزان بیش‌تری از پرولین را تحت شرایط تنش تجمع می‌دهند و این تفاوت می‌تواند در انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب در برنامه‌های اصلاحی مؤثر باشد (Koua et al., 2022).

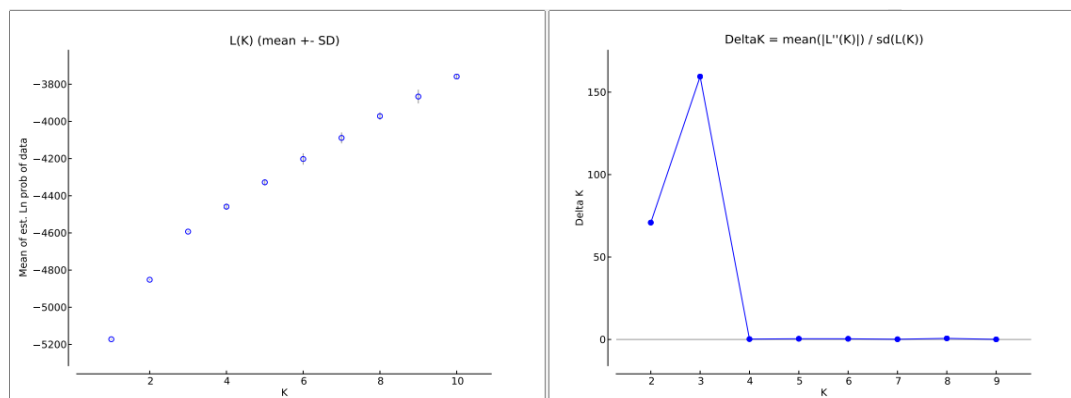
همین راستا، تجمع بیش تر پرولین به عنوان شاخصی از ظرفیت تحمل تنش در نظر گرفته شده و در ارزیابی ژنوتیپ ها برای تنش های غیرزیستی کاربرد دارد.

ساختار جمعیت: به منظور کاهش بروز نتایج مثبت کاذب در مطالعات ژنتیکی، ساختار ژنتیکی ۷۰ ژنوتیپ گندم با استفاده از ۲۴ نشانگر SSR و روش مدل محور مورد بررسی قرار گرفت (Pritchard et al., 2000). تحلیل ساختار جمعیت با بهره گیری از نرم افزار STRUCTURE انجام شد (جدول ۳) و برای تعیین تعداد بهینه زیرجمعیت ها از روش ΔK در نرم افزار Structure Harvester استفاده گردید (Evanno et al., 2005). مقدار بیشینه ΔK برای $K=3$ به دست آمد، که بیانگر وجود سه زیرجمعیت ژنتیکی در میان ژنوتیپ ها است (شکل ۲). این تقسیم بندی توسط تحلیل مختصات اصلی (PCoA) نیز تأیید شد (Türkoğlu et al., 2023a, b). مطالعات جدید نشان می دهند که تجزیه ساختار جمعیت نقشی اساسی در اصلاح نژاد گندم ایفا می کند، زیرا شناسایی گروه های ژنتیکی متفاوت امکان انتخاب والدین متنوع را فراهم کرده و موجب افزایش تنوع ژنتیکی در نسل های بعدی می شود (Jabari et al., 2023). در پژوهشی که روی ۶۳ ژنوتیپ گندم نان در ترکیه انجام شد، بر اساس داده های ۱۲۰ نشانگر SSR ژنوتیپ ها به سه زیرجمعیت تقسیم شدند و تنوع بالایی در جمعیت مشاهده شد (Türkoğlu et al., 2023a, b). شاخص PIC در این مطالعه بین ۰/۰۳۱ تا ۰/۹۱۵ متغیر بود که نشان دهنده توان تفکیک بالا در نشانگرهای به کاررفته است. شناسایی ساختار جمعیت برای مطالعات ارتباط ژنومی (GWAS) حیاتی است، چرا که در صورت عدم در نظر گرفتن آن، خطر شناسایی QTL های کاذب افزایش می یابد (Wang et al., 2014; Zhao et al., 2018). بنابراین، لحاظ کردن ساختار جمعیت در مدل های آماری باعث بهبود دقت نتایج می شود. در این پژوهش، تفکیک ژنوتیپ ها به سه گروه ژنتیکی، اطلاعات ارزشمندی را برای طراحی تلاقی های هدفمند فراهم می نماید. انتخاب والدین از زیرجمعیت های مختلف امکان تجمع آلل های مطلوب را فراهم می سازد و موجب تولید واریته هایی با صفات برتر می شود. در برنامه های انتخاب به کمک نشانگر (MAS) و انتخاب ژنومی (GS)، آگاهی از ساختار ژنتیکی جمعیت موجب افزایش دقت انتخاب می گردد (Zhao et al., 2018).

جدول ۳. آماره های محاسبه شده برای مقادیر بهینه K با استفاده از نرم افزار Structure

Table 3. Calculated statistics for optimal values of K using Structure software

K	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln"(K)	ΔK
1	-5172	0.6348	—	—	—
2	-4852	0.8643	320.22	61.26	70.879
3	-4593	0.7829	258.96	124.84	159.45
4	-4459	12.68	134.12	3.02	0.2382
5	-4328	12.78	131.1	5.68	0.4444
6	-4202	28.1	125.42	11.88	0.4228
7	-4089	26.878	113.54	3.6	0.1339
8	-3972	17.467	117.14	11.82	0.6767
9	-3866	34.471	105.32	2.32	0.0673
10	-3759	9.9568	107.64	—	—



شکل ۲. نمودارهای دوطرفه برای تعیین تعداد مناسب زیرجمعیت در ۷۰ ژنوتیپ گندم نان مورد مطالعه بر اساس ΔK و $L(K)$

Figure 2. Two-way graphs to determine the appropriate number of subpopulations in 70 studied bread wheat genotypes based on ΔK and $L(K)$

بر اساس نتایج حاصل از بارپلات ایجاد شده در نرم‌افزار STRUCTURE و با در نظر گرفتن آستانه عضویت ۷۰ درصد، ۷۰ ژنوتیپ گندم نان در سه زیرساختار ژنتیکی متمایز قرار گرفتند (جدول ۴). این زیرساختارها به ترتیب با رنگ‌های قرمز (زیرساختار ۱)، سبز (زیرساختار ۲) و آبی (زیرساختار ۳) مشخص شدند (شکل‌های ۳ و ۴). ژنوتیپ‌هایی که احتمال تعلق آن‌ها به هر یک از زیرساختارهای تعیین شده کمتر از ۷۰ درصد بود، به عنوان ژنوتیپ‌های مختلط (Admixed) طبقه‌بندی شدند و به دلیل ماهیت ژنتیکی ترکیبی، به هیچ‌یک از گروه‌ها به طور قطعی تعلق نداشتند (Pritchard et al., 2000; Türkoğlu et al., 2023a, b). از منظر کاربردی در اصلاح نژاد، این نتایج بسیار حائز اهمیت‌اند. ژنوتیپ‌های با عضویت بالا در یک زیرساختار به عنوان والدین خالص در برنامه‌های انتخاب تثبیتی قابل استفاده‌اند، در حالی که ژنوتیپ‌های مختلط به دلیل برخورداری از تنوع ژنی بالا، گزینه‌های مناسبی برای تلاقی‌های هدفمند به منظور افزایش هتروزیس و ترکیب صفات مطلوب به شمار می‌روند (Zhao et al., 2018; Jabari et al., 2023). بهره‌گیری از چنین اطلاعاتی در طراحی برنامه‌های اصلاحی موجب افزایش کارایی انتخاب به کمک نشانگر و انتخاب ژنومی خواهد شد، به‌ویژه در شرایط چالش برانگیز اقلیمی که تنوع ژنتیکی نقش کلیدی در سازگاری دارد (Wang et al., 2014).

عدم تعادل پیوستگی: برای بررسی عدم تعادل پیوستگی (LD) میان جایگاه‌های ژنی، از ترسیم ماتریس دو به دو عدم تعادل بین جفت نشانگرهای SSR استفاده شد. این ماتریس، ساختاری قطری دارد که در آن هر دو محور شامل جایگاه‌های ژنی هستند. عناصر بالای قطر اصلی نشان‌دهنده شدت LD و عناصر پایین قطر بیانگر میزان معنی‌داری آزمون دقیق فیشر برای هر جفت نشانگر هستند. شدت و معنی‌داری این روابط از طریق بلوک‌های رنگی و براساس طیف رنگی مشخص در کنار شکل، قابل تفسیر است (Barrett et al., 2005). در این نمودار، رنگ قرمز در قسمت بالای قطر اصلی نمایانگر عدم تعادل پیوستگی قوی و رنگ سفید نمایانگر تعادل ژنتیکی بین جفت جایگاه‌هاست. در بخش پایین قطر نیز، رنگ قرمز نشان‌دهنده معنی‌داری بالا در سطح

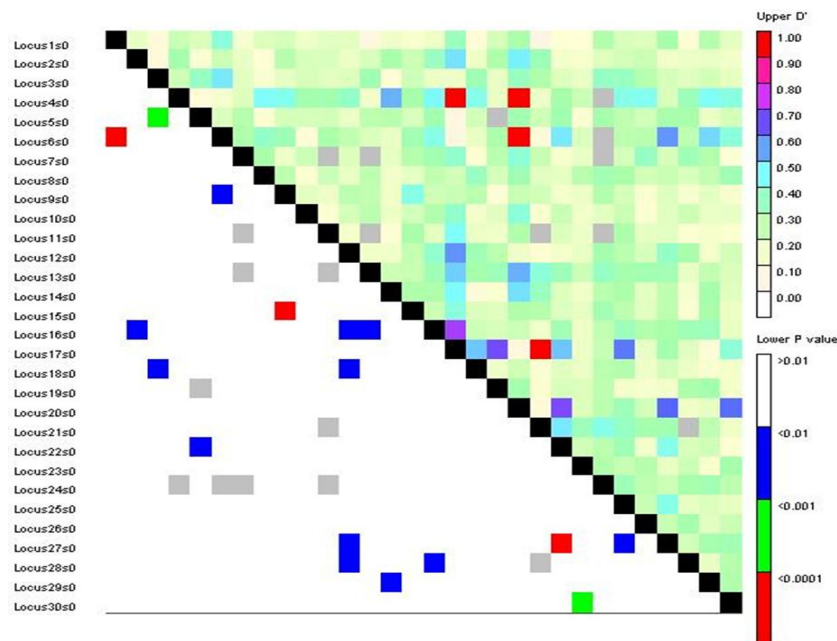
احتمال کمتر از ۰/۰۰۰۱ و رنگ سفید نشان‌دهنده عدم معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱ است. تحلیل داده‌ها نشان داد که از مجموع ۳۰ جفت ممکن بین نشانگرهای SSR، حدود ۰/۹۱ درصد در سطح احتمال ۱ درصد دارای LD معنی‌دار بودند که نشان‌دهنده ساختار ژنتیکی منسجم و وجود بلوک‌های LD پایدار در جمعیت است (Yu et al., 2006). از دیدگاه اصلاح نژادی، وجود درصد بالایی از جفت نشانگرهای دارای عدم تعادل پیوستگی معنی‌دار، فرصت مناسبی برای مطالعات تجزیه ارتباطی (Association analysis) فراهم می‌آورد. در چنین شرایطی می‌توان با دقت بالاتری نشانگرهای پیوسته با صفات مطلوب را شناسایی کرد و آنها را در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر (MAS) مورد استفاده قرار داد. این امر به‌ویژه در گندم، که گونه‌ای با ساختار ژنتیکی پیچیده است، در افزایش بهره‌وری انتخاب‌های اصلاحی بسیار مؤثر خواهد بود (Maccaferri et al., 2015; Gupta et al., 2022).

جدول ۴. انتساب ۷۰ ژنوتیپ گندم نان مورد مطالعه به زیرساختارها با حد آستانه ۷۰ درصد

Table 4. Assignment of 70 studied bread wheat genotypes to substructures with a threshold limit of 70%

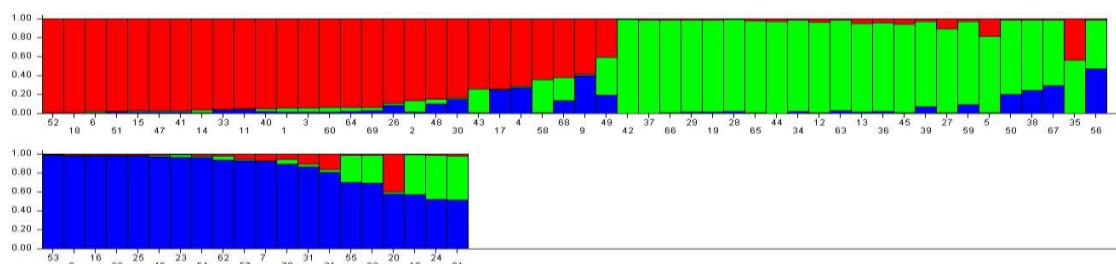
درصد Percent	ژنوتیپ‌ها Genotypes	حد آستانه K Threshold limit of K
42.85	4-17-43-30-48-2-26-69-64-60-1-3-40-11-33-14-41-15-47-51-6-18-52	زیرساختار قرمز Red substructure
28.57	38-50-5-59-27-39-45-36-13-63-12-34-44-28-65-19-29-66-37-42	زیرساختار سبز Green substructure
21.42	55-21-31-70-7-57-62-54-23-46-25-32-16-8-53	زیرساختار آبی Blue substructure
17.14	58-68-9-49-67-35-56-22-20-10-24-61	ژنوتیپ‌های ترکیبی Combined genotypes

تجزیه ارتباطی: به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات پرولین و فروکتان در شرایط تنش سرمایی و نرمال، تجزیه ارتباطی با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) انجام شد. این مدل با در نظر گرفتن ساختار جمعیت و ماتریس خویشاوندی، توانایی بالایی در کاهش خطاهای نوع اول دارد (Yu et al., 2006). نتایج حاصل از این مدل نشان داد که هشت نشانگر SSR با صفات مورد مطالعه ارتباط معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$) داشتند. در شرایط تنش (۲- درجه سانتی‌گراد)، پنج نشانگر شامل Xgwm44، Xgwm133، Xgwm55، Xgwm192، Xgwm174 با صفت پرولین ارتباط معنی‌داری داشتند. بالاترین ضریب تبیین ($R^2 = 0.65$) مربوط به نشانگر Xgwm44 بود که حاکی از توان بالای این نشانگر در توضیح واریانس فنوتیپی صفت پرولین است و آن را بالقوه به کاندیدای مناسبی برای انتخاب به کمک نشانگر (MAS) در برنامه‌های اصلاحی تبدیل می‌کند (Kamruzzaman et al., 2023).



شکل ۳. پلات عدم تعادل پیوستگی (LD plot) در ۷۰ ژنوتیپ گندم نان با استفاده از نرم افزار TASSEL. قسمت بالایی قطر نشان دهنده میزان عدم تعادل پیوستگی با استفاده از آماره D' قسمت پایینی قطر P-Value برای جفت نشانگرها را نشان می دهد

Figure 3. Linkage disequilibrium plot (LD plot) in 70 bread wheat genotypes using TASSEL software. The upper part of the diameter shows the degree of linkage disequilibrium using the D statistic, and the lower part of the diameter shows the P-Value for the pair of markers



شکل ۴. گروه بندی مبتنی بر مدل Bayesian ۷۰ ژنوتیپ گندم نان بر اساس نشانگرهای SSR

Figure 4. Bayesian model-based grouping of 70 bread wheat genotypes based on SSR markers

در شرایط شاهد (+۸ درجه سانتی گراد)، سه نشانگر با صفات مورد بررسی ارتباط معنی دار داشتند. نشانگر Xgwm319 با پرولین و دو نشانگر Xgwm443 و Xgwm642 با صفت فروکتان ارتباط آماری معنی دار نشان دادند. بیشترین مقدار R^2 در این شرایط مربوط به نشانگر Xgwm319 با مقدار ۰/۴۴ بود که قابلیت استفاده در غربالگری ژنوتیپ های دارای تجمع بیشتر پرولین را داراست (جدول ۵). مقادیر بالای R^2 به ویژه در شرایط تنش، به خوبی نشان دهنده اهمیت نشانگرهای مذکور در اصلاح ژنتیکی تحمل

به سرما است. از این نتایج می‌توان در تهیه نقشه‌های ژنی و در انتخاب‌های هدفمند برای بهبود تحمل به تنش‌های غیرزیستی مانند سرما و خشکی استفاده نمود (Li et al., 2023). به‌علاوه، شناسایی QTL‌های مرتبط با پرولین در شرایط تنش و عدم شناسایی آن‌ها برای فروکتان، می‌تواند احتمالاً بر نقش غالب‌تر پرولین در پاسخ به سرما تأکید داشته باشد (Bohnert et al., 2006). در ادامه این مسیر تحقیقاتی، پیشنهاد می‌شود ژنوتیپ‌ها در شرایط مزرعه‌ای نیز مورد ارزیابی قرار گرفته و تحمل به تنش آنها بررسی شود.

جدول ۵. نشانگرهای میکروساتلایت پیوسته با نواحی کنترل‌کننده پرولین و فروکتان در ۷۰ ژنوتیپ گندم نان

Table 5. Microsatellite markers associated with genomic region controlling proline and fructan content in 70 bread wheat genotypes

صفت	نشانگر	دما (°C)	P-value	r ²
Treat	Marker	Temperature (°C)		
پرولین Proline	Xgwm174	-2	0.0020	0.32
	Xgwm192	-2	0.0056	0.32
	Xgwm55	-2	0.0122	0.35
	Xgwm133	-2	0.0122	0.35
	Xgwm44	-2	0.0125	0.65
	Xgwm319	+8	0.0481	0.44
فروکتان Fructan	Xgwm443	+8	0.0170	0.33
	Xgwm642	+8	0.0493	0.27

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، با هدف شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با تحمل تنش سرما، ۷۰ ژنوتیپ گندم نان برای پرولین و فروکتان تحت شرایط نرمال و تنش (۲- درجه سانتی‌گراد) و همچنین با نشانگرهای SSR مورد ارزیابی قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های دز و شیرودی به عنوان حساس‌ترین و آزادی و گنبد ۲ به عنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها شناسایی شدند. استفاده از آن‌ها در تلاقی‌های اصلاحی با هدف ایجاد هتروزیس و افزایش تحمل به تنش سرمایی پیشنهاد می‌شود. تحلیل ساختار جمعیت با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE، ژنوتیپ‌ها را در سه زیرجمعیت مجزا طبقه‌بندی کرد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجه در بین ژنوتیپ‌ها بود. تجزیه ارتباط بر پایه مدل خطی مخلوط (MLM) با کنترل ساختار جمعیت و ماتریس خویشاوندی، منجر به شناسایی هشت نشانگر SSR با ارتباط معنی‌دار با صفات پرولین و فروکتان در سطح ۵ درصد ($P \leq 0.05$) شد. در شرایط تنش سرما، پنج نشانگر از جمله Xgwm44 با ضریب تبیین بالا ($R^2 = 0.65$) با پرولین ارتباط نشان دادند که بالقوه بیانگر نقش برجسته این نشانگر در توجیه واریانس فنوتیپی و ارزش بالای آن برای انتخاب به کمک نشانگر (MAS) است. در شرایط نرمال نیز، سه نشانگر

با صفات هدف رابطه معنی‌دار داشتند؛ بالاترین R^2 در این شرایط متعلق به Xgwm319 برای پرولین بود. نبود ارتباط معنی‌دار بین نشانگرها و فروکتان در شرایط تنش، احتمالاً نقش پررنگ‌تر پرولین در پاسخ به سرما را تقویت می‌کند.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به خاطر حمایت مالی/ حمایت معنوی / همکاری در

اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- Agarwal, M., Srivastava, R., Singh, V., & Singh, R. (2023). Utility of SSR markers in plant genomics: Advances and applications. *Plant Molecular Biology Reporter*, 41(1), 67–82. <https://doi.org/10.1007/s11105-022-01359-7>
- Ahmad, M., Javed, M. T., Rehman, R. U., & Iqbal, M. (2022). Nutritional profile and health benefits of wheat grain. *Journal of Cereal Science*, 105, 103479. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103479>
- Alqudah, A. M., Sallam, A., Baenziger, P. S., & Börner, A. (2020). GWAS: Fast-forwarding gene identification and characterization in temperate cereals: Lessons from barley—a review. *Journal of Advanced Research*, 22, 119–135. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.013>
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), 263–265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>
- Bartlett, M. S. (1937). Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 160(901), 268–282. <https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>
- Bohnert, H. J., Farago, L., & Grene, R. (2006). The role of proline in plant adaptation to environmental stress. *Plant and Cell Physiology*, 47(5), 1191–1201. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj092>
- Carillo, P., & Gibon, Y. (2011). Protocol: Determination of proline content. *Plant Stress*, 5(1), 32–38. <https://bio-protocol.org/exchange/minidetail?type=30&id=10096794>
- Chen, L., Xu, D., & Zhang, W. (2024). Cold stress responses in wheat during reproductive stages: Physiological and molecular insights. *Plant Physiology and Biochemistry*, 205, 105432. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.105432>
- Cheong, B.-E., Ho, W. W. H., & Adiredjo, A. L. (2022). Role of antioxidant enzymes in plant tolerance to abiotic stresses. *Plant Physiology Reports*, 27, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40502-022-00627-z>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- FAO. (2023). FAOSTAT: Crops and livestock products. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <https://www.fao.org/faostat>

- Forlani, G., & Funck, D. (2020). Methods for proline quantification in plants: A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.09.019>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Molecular cloning: A laboratory manual (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guo, X., Zhang, Z., Zhang, Y., Huang, C., & Ma, X. (2019). Cold stress signaling and cold tolerance mechanism in plants: From signal perception to the ICE-CBF-COR pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4201. <https://doi.org/10.3390/ijms20174201>
- Gupta, P. K., Balyan, H. S., & Gahlaut, V. (2021). Wheat genomics: Present status and future prospects. *International Journal of Plant Genomics*, 2021, 1–25. <https://doi.org/10.1155/2021/6618157>
- Gupta, P. K., Rustgi, S., & Kulwal, P. L. (2022). Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*, 110, 1–28. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01225-9>
- Jabari, A., Ahmadi, J., & Hashemi, A. (2023). Genetic structure and diversity analysis of Iranian wheat landraces for breeding programs. *Euphytica*, 219, 45. <https://doi.org/10.1007/s10681-023-03210-z>
- Jahanbakhsh-Godehkahriz, S., Karimzadeh, G.H., & Rastgar, F. (2009). Influence of vernalization on some physiological characteristics and cold tolerance in two susceptible and tolerant cultivars of bread wheat. *Electronic Journal of Crop Production*, 2(3), pp.85-106. <https://doi.org/20.1001.1.2008739.1388.2.3.6.8>
- Jermyn, M. A. (1956). Increasing the sensitivity of the anthrone method for carbohydrate. *Analytical Biochemistry*, 1(2), 420–423. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90038-6)
- Ji, Y., Liu, X., Tang, L., Li, Z., & Liu, S. (2023). Cold stress reduces wheat yield through impairment of physiological traits. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1110192. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1110192>
- Kamruzzaman, M., Zhang, Y., Haque, M. A., & Wang, Z. (2023). Molecular markers linked to drought tolerance and proline accumulation in wheat under stress conditions. *Euphytica*, 219(4), 61. <https://doi.org/10.1007/s10681-023-03512-w>
- Koua, M. H., Diouf, D., & Kane, N. A. (2022). Proline accumulation and its role in plant tolerance to abiotic stresses: A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 185, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.04.001>
- Le Monde. (2024). Drought and frost slash European winter wheat yields by up to 40%. Le Monde Agricole. Retrieved from <https://www.lemonde.fr>
- Li, H., Wang, X., & Chen, Y. (2023). Association mapping of cold tolerance in wheat using SSR markers. *Crop Journal*, 11(3), 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.09.005>
- Li, H., Zhang, Y., Liu, G., Wang, X., & Liu, J. (2022). Marker-assisted selection for cold tolerance in wheat using SSR-based association analysis. *Molecular Breeding*, 42, 49. <https://doi.org/10.1007/s11032-022-01342-3>

- Li, Y., Zhao, J., Sun, S., Liu, Y., & He, W. (2023). Molecular mapping of quantitative trait loci associated with proline content and its impact on abiotic stress tolerance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 136(1), 95-112. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-03992-6>
- Livingston, D. P., Hinch, D. K., & Heyer, A. G. (2006). Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 2759–2774. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6160-7>
- Maccaferri, M., El-Feki, W., Nazemi, G., Salvi, S., Canè, M. A., Colalongo, M. C., ... & Tuberosa, R. (2015). Prioritizing quantitative trait loci for root system architecture in tetraploid wheat. *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 195–213. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv454>
- Malko, M., Novak, J., & Polakova, K. (2023). Impact of cold stress on wheat growth and physiological performance. *Agronomy*, 13(1), 12. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010012>
- Matros, A., Peshev, D., Peukert, M., Mock, H. P., & Van den Ende, W. (2019). Sugars as hydroxyl radical scavengers: Proof-of-concept by studying the fate of sucralose in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 98(3), 509–526. <https://doi.org/10.1111/tpj.14225>
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., & Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 82(5), 525–532. <https://www.jstor.org/stable/24105959>
- Perry, M. J., Liu, R., Xu, B., Zhang, J., & Xie, Q. (2024). Functional characterization of Ta1SST and Ta6SFT genes reveals their critical roles in fructan accumulation and abiotic stress tolerance in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 205, 107541. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.107541>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Rahimi, M., Kahrizi, D., & Zarei, L. (2021). Application of SSR markers in plant breeding programs. *Genetika*, 53(2), 509–524. <https://doi.org/10.2298/GENSR2102509R>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591–611. <https://doi.org/10.2307/2333709>
- Tehran Times (2023). Iran ranks 13th in world wheat production in 2022. Retrieved from <https://www.tehrantimes.com>
- Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Mohammadi, S. A., Öztürk, A., Bolouri, P., Özkan, G., Bocianowski, J., Pour-Aboughadareh, A., & Jamshidi, B. (2023a). Genetic Diversity and Population Structure in Türkiye Bread Wheat Genotypes Revealed by Simple Sequence Repeats (SSR) Markers. *Genes*, 14(6), 1182. <https://doi.org/10.3390/genes14061182>

- Türkoğlu, F., Kaya, Y., & Aktaş, H. (2023b). Genetic diversity and population structure analysis of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using SSR markers. *Cereal Research Communications*, 51(2), 183–192. <https://doi.org/10.1556/0806.2023.00012>
- Wang, S., Wong, D., Forrest, K., Allen, A., Chao, S., Huang, B. E., ... & Cavanagh, C. (2014). Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 787–796. <https://doi.org/10.1111/pbi.12183>
- Wang, W., Cheng, Y., Chen, D., & Wang, H. (2022). Antioxidant response in plants to cold stress. *Plant Cell Reports*, 41(2), 315–328. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02777-9>
- Wang, Y., Liu, J., & Chen, K. (2023). Heat stress in wheat: A global challenge to feed billions in the current era of the changing climate. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7, 1203721. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1203721>
- Yadav, S. K., & Sharma, R. K. (2021). Low temperature stress in wheat: Physiological and molecular insights. *Plant Science Today*, 8(4), 857–863. <https://doi.org/10.14719/pst.2021.8.4.1104>
- Yang, H., Zhao, L., Liu, S., & Wei, Y. (2023). Application of SSR markers in association analysis for abiotic stress tolerance in crops. *Molecular Genetics and Genomics*, 298, 157–170. <https://doi.org/10.1007/s00438-023-02090-4>
- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W. H., Bi, I. V., Yamasaki, M., Doebley, J. F., ... & Buckler, E. S. (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 38(2), 203–208. <https://doi.org/10.1038/ng1702>
- Zhang, Y., Qiu, X., Yin, T., Liao, Z., Liu, B., & Liu, L. (2022). The impact of global warming on the winter wheat production of China. *Agronomy*, 12(1), 1845. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010123>
- Zhao, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Liu, S., Yu, J., & Li, C. (2018). Incorporating population structure and kinship into GWAS for complex traits in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(1), 249–262. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2998-1>
- Zhu, X., Li, Y., & Liu, Z. (2021). Wheat-based food products: Consumption trends and nutritional quality. *Cereal Foods World*, 66(3), 103–112.