

تعیین ژنوتیپ نسل F_۲ با نشانگرهای EST-SSR مرتبط با زیرواحدهای گلوٹنین در یک تلاقی بین دو رقم گندم

Genetic analysis of F₂ by using EST-SSR markers associated with Glutenin subunits in a cross between two wheat cultivars

سیده مریم یوسف موسوی^۱، بهرام ملکی زنجان^{۱*}، عباس بهاری^۱

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی،
دانشگاه زنجان، ایران

Yousef mousavi SM¹, Maleki Zanjani B^{*1}, Bahari A¹

1- PhD Student, Associate Professor, Assistant Professor, Department of Agronomy
and plant breeding, Faculty of agriculture, University of Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bmalekiz@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۱۵)

چکیده

گندم نان به علت پتانسیل بالا و خصوصیات فیزیکی خاص پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه که امکان تولید انواع محصولات غذایی را فراهم می‌کند، مورد توجه است. ترکیب کلیدی آندوسپرم شامل پروتئین‌های گلوٹن است که ترکیبی از گلوٹنین و گلیادین هستند و کیفیت نانوائی آرد گندم را تعیین می‌کند. دسترسی به منابع ژنتیکی و داشتن اطلاعاتی درباره‌ی ساختار ژنتیکی و نحوه‌ی توارث صفات برای تولید واریته‌هایی با عملکرد بالا ضروری می‌باشد. نشانگرهای EST-SSR مرتبط با ژن‌های HMW-گلوٹنین و LMW-گلوٹنین جهت تجزیه ژنتیکی و بررسی میزان تنوع ژنتیکی ۷۰ گیاه نسل F_۲ حاصل از تلاقی دو واریته گندم نان (گلستان و خزر یک) مورد استفاده قرار گرفتند. از تعداد ۹ باند حاصل از نشانگرهای EST-SSR، ۷ باند چند شکل نشان دادند که بیش از ۷۰ درصد پلی مورفسم را شامل شد. هم‌چنین جهت ارزیابی تنوع مندلی بین نتاج F_۲ از این نشانگرها استفاده شد که طبق ۲٪ به‌دست آمده با احتمال ۹۵ درصد تعداد افراد مشاهده شده و مورد انتظار تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشتند و در نسل F_۲ از لحاظ تعداد قطعات تکثیر شده تنوع مندلی با نسبت‌های ۱:۲:۱ مشاهده شد و گروه‌بندی افراد با روش دوتایی افراد مورد بررسی را به چهار گروه تقسیم کرد که F_۱ و هر دو والدین در گروه‌های مجزا قرار گرفتند که پتانسیل بالای این تنوع برای انتخاب بر مبنای کیفیت برتر نانوائی در نتایج حاصل از ارقام مورد بررسی را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

کیفیت نانوائی

گلوٹنین

گندم نان

EST-SSR

گندم نان (*Triticum aestivum*) یکی از مهم‌ترین غلات جهان در زمینه‌های تولید و استفاده می‌باشد و به‌علت دارا بودن قابلیت سازگاری بالا با دامنه وسیعی از شرایط آب و هوایی و بهبود کیفیت دانه برای تولید آرد نان به یک محصول پایدار جهانی تبدیل شده‌است (Jia et al. 2013). کیفیت گندم به میزان زیادی تحت تاثیر محتوای پروتئین و نشاسته دانه است که خواص آرد و خمیر را تعیین می‌کند. ترکیب کلیدی آندوسپرم شامل پروتئین‌های گلوتن است که ترکیبی از گلوتنین و گلیادین هستند (Deng et al. 2013). پروتئین گلوتنین دارای دو زیرواحد پروتئینی با وزن مولکولی متفاوت، گلوتنین با وزن مولکولی پایین^۱ (LMW-GS) و گلوتنین با وزن مولکولی بالا^۲ (HMW-GS) می‌باشد (Mihaliket al. 2012). HMW-GS ها بر اساس اثرات ساختاری‌شان به‌عنوان تعیین‌کننده‌ای بزرگ در رابطه با کشش‌پذیری و چسبندگی خمیر و متعاقبا کیفیت فرآوری گندم نان و ماکارونی فعالیت می‌کنند و این خانواده‌ی ژنی اشکال الی مختلف را که با خواص قوی یا ضعیف بودن خمیر مرتبط هستند کد می‌کنند (Jianget al. 2010). استفاده از واریته‌های اصلاح شده با عملکرد بالا و کیفیت قابل قبول منجر به کاهش تنوع ژنتیکی و از دست رفتن بسیاری از ژن‌های مفید شده‌است که در نهایت این کاهش سریع ذخایر ژنتیکی موجب آسیب‌پذیری محصولات زراعی در برابر شرایط محیطی نامناسب و تنش‌های زنده و غیرزنده می‌شود (Osamnyand Siosemardeh 2009). یکی از روش‌های ایجاد تنوع انجام تلاقی بین دو رقم می‌باشد. تنوع و انتخاب دو رکن اصلی هر برنامه اصلاحی بوده و تنوع ژنتیکی مبنای همه گزینش‌ها است (Casaet al. 2005). نشانگر^۳ SSR به دلیل داشتن مزایای بسیاری مانند توزیع مناسب در ژنوم، چند شکلی بالا، چنداللی بودن و توارث هم‌بارز به‌عنوان نشانگری کارآمد در شناسایی ارقام، انگشت‌نگاری DNA، تعیین تنوع ژنتیکی و بررسی روابط ژنتیکی توده‌ها مطرح می‌باشد (Wanget al. 2005). از آنجایی‌که EST-SSR^۴ها متعلق به بخش‌های بیان شده‌ی ژنوم هستند بنابراین چند شکلی منعکس شده توسط این

نشانگرها می‌تواند روابط بین گونه‌ها و واریته‌ها را با کارایی بالاتری مشخص کند (Wanget al. 2007). اگر یک نشانگر EST پیوسته با صفت موردنظر پیدا شود این نشانگر می‌تواند امکان دستیابی به ژن و ردیابی ژن را فراهم کند و نقش نشانگرهای ژنتیکی را در ارزیابی تغییرات رونوشت‌های ژن و فعالیت‌های شناخته شده‌ی ژن افزایش می‌دهد (Yu et al. 2004). در پژوهش حاضر برای دستیابی به تنوع ژنتیکی از لحاظ کیفیت نانوائی دو رقم گلستان و خزر یک تلاقی داده شد. (Akbari Rad et al. 2010). در مطالعه ۸۵ لاین امیدبخش و رقم تجارتي گندم نان رقم گلستان را در گروه ارقام دارای بیشترین میزان درصد پروتئین (۱۳ درصد) و رقم خزر یک را در گروه ارقام دارای کمترین میزان پروتئین (۱۱ درصد) دسته‌بندی کردند. (Gupta et al. 1996). نیز گزارش کردند که بالا بودن میزان پروتئین آرد منجر به افزایش قابلیت کشش در خمیر می‌شود و همچنین بیان کردند که ۲۰ درصد از تغییرات مربوط به خواص کیفی نان از طریق میزان پروتئین آرد قابل توجیه است و بر اساس گزارش (2010) Akbari Rad et al. در گروه‌بندی ارقام گندم از لحاظ یکسری صفات کیفیت نانوائی این دو رقم در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند و از آنجایی که گلوتنین در کیفیت نانوائی نقش کلیدی دارد، افراد^۵ F₂ و به‌همراه والدین در سیستم مارکری SSR مبتنی بر EST‌های زیرواحدهای HMW و LMW ژن گلوتنین مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به اینکه در نسل F₂ بذر کافی برای انجام الکتروفورز پروتئین موجود نبود از نشانگر DNA جهت بررسی تنوع در نسل F₂ استفاده شد. هدف از این مطالعه دستیابی به تنوع از لحاظ صفات مرتبط با کیفیت نانوائی می‌باشد از این رو تلاقی بین دو رقم گندم که از لاین‌های امیدبخش و ارقام تجارتي در ایران بودند، صورت گرفت و تنوع ژنتیکی نتاج F₂ حاصل از تلاقی بین دو رقم گلستان و خزر یک بررسی شد.

استخراج DNA ژنومی بافت برگ از طریق روش (1983) Dellaporta et al. انجام شد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی در

^۵ نسل اول، Filial 1

^۶ نسل دوم، Filial 2

^۱ Low molecular weight glutenin subunit

^۲ High molecular weight glutenin subunit

^۳ Simple sequence repeat

^۴ Expressed sequence tag- simple sequence repeat

و به مدت ۱۱۰ تا ۱۲۰ دقیقه انجام شد. جهت تجزیه داده‌ها هر باند به‌عنوان یک صفت تعریف شد. فاصله ژنتیکی برای تمامی ترکیبات جفتی از طریق ضریب تشابه جفتی جاکارد محاسبه شد (Jaccard 1908). برای نمایش ساده‌ی فاصله‌ی ژنتیکی افراد از روش UPGMA استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 23 استفاده شد.

مطالعات نشان داده‌اند که EST-SSRها سطح بالایی از انتقال‌پذیری را برای خویشاوندان نزدیک و وحشی گندم نشان می‌دهند چون این نشانگرها از نواحی کدکننده‌ی محافظت شده طراحی شده‌اند، با اینکه چندشکلی کمتری نسبت به نشانگرهای SSR ژنومی نشان می‌دهند ولی برای ارزیابی کیفیت بالایی تولید می‌کنند (Eujaylet al. 2001) با این حال در تحقیق حاضر بیش از ۷۰ درصد از کل باندها چندشکلی نشان دادند که این درصد سطح بالایی از چندشکلی این نشانگر را نشان می‌دهد. استفاده از EST-SSRها جهت ژنوتایپینگ گندم در تحقیقات دیگر به‌منظور تعیین ارقام مقاوم به زنگ زرد در گندم (Hasancebi et al. 2014) و ارقام مقاوم به بیماری سفیدک پودری (Saidouet al. 2016) گزارش شده‌است و برای نشان دادن چندشکلی بین افراد جمعیت F₂ حاصل از تلاقی دو واریته Brrasicarapa نیز از نشانگرهای EST-SSR استفاده شده‌است (Wuet al. 2014). در نشانگر CA679329 سه آلل با اندازه‌ی باندهای ۲۲۵، ۲۶۰ و ۲۸۰ مشاهده شد (شکل ۲). بیش‌ترین تعداد آلل مشاهده شده در ارقام گندم نان مورد مطالعه مربوط به مکان ژنی BQ607256 با چهار آلل و کم‌ترین تعداد آلل مربوط به مکان ژنی TC84551 می‌باشد که دو آلل را نشان می‌دهد.

نسل‌های والدین، F₁ و F₂ از سه جفت آغازگر که از نواحی EST طراحی شده بود استفاده شد که ارتباط بین این نواحی EST و ژن HMW-گلوتنین گزارش شده‌است (Gadaleta et al. 2009). در جدول ۱ مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه آورده شده‌است. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر از یک میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانوگرم بر مول و یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ پیکومول، ۱۲/۵ میکرولیتر 2x Master Mix RED و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت چهار دقیقه، سپس ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل سه مرحله بود طرح‌ریزی شد. مرحله اول مرحله واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه انجام شد، مرحله دوم مرحله اتصال آغازگرها به رشته الگو است که این مرحله در ۱۰ چرخه اول به صورت Touch Down برنامه‌ریزی شده بود به این صورت که دمای اتصال آغازگرها به رشته الگو ۱۰°C بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و از چرخه اول تا دهم با کاهش یک درجه سانتی‌گراد از دمای اتصال همراه بود و از چرخه ۲۵ به بعد دمای اتصال آغازگرها به دمای اتصال واقعی رسید. در ۲۵ چرخه بعدی دمای اتصال ثابت و برحسب دمای اتصال آغازگر به رشته الگو و به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. مرحله سوم مرحله بسط توالی مورد نظر بود که در دمای ۷۲°C و به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. در نهایت یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲°C و به مدت ۸ دقیقه به چرخه حرارتی اضافه شد. تفکیک محصولات تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل متافور آگارز ۴٪ با ولتاژ ۸۰ ولت

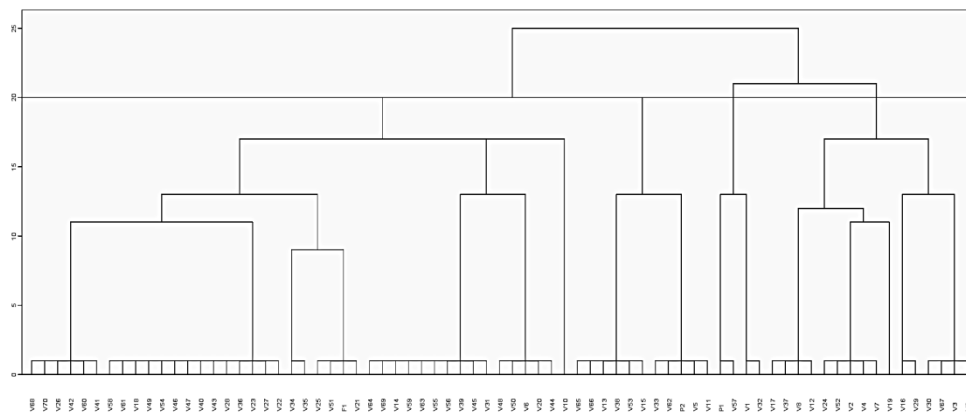
مخلوط آماده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قمرز^۱

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

توالی تکراری	دمای اتصال	نواحی EST	آغازگر پسرو	آغازگر پیشرو	آغازگر
AAC	۶۰	HMW-گلوتنین	ATTAGTTTCCTGCGTGCAG	ACAGGAGCCTCCAACACAAC	CA679329
AAC	۶۰	LMW-گلوتنین	CAAAATGGTGGTTGTTGCTG	GCATTCCTGGTTGGAGAGA	BQ607256
AAC	۶۱	HMW-گلوتنین	TAGCTGCTGCAAAATGGATG	ATCAAAGGCAAGCAAGCAGT	TC84551

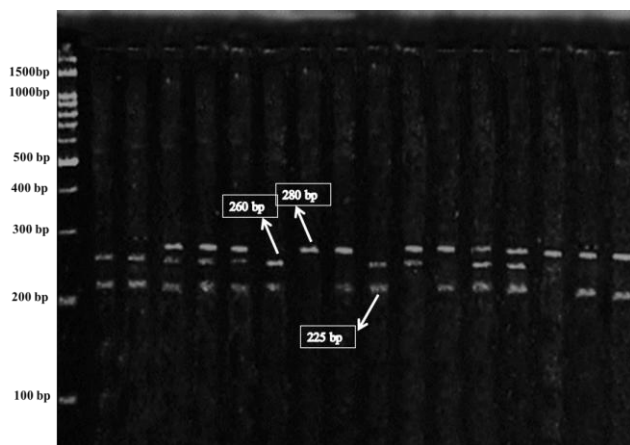
جدول ۲- نسبت‌های مشاهده شده و مورد انتظار افراد در نسل F_2

	نسبت‌های مشاهده شده (O_i)	نسبت‌های مورد انتظار (E_i)	$(O_i - E_i)^2$	$(O_i - E_i)^2 / E_i$
افراد با اندازه قطعه ۲۶۰	۱۵	۱۷/۵	۶/۲۵	۰/۳۵۷
افراد با اندازه قطعه ۲۸۰	۱۷	۱۷/۵	۰/۲۵	۰/۰۱۴
افراد با اندازه قطعه ۲۶۰ و ۲۸۰	۳۸	۳۵	۹	۰/۲۵۷
Σ	۷۰	۷۰	۱۵/۵	۰/۶۲۸



شکل ۱- دندروگرام به دست آمده از طریق روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد برای افراد نسل F_1 ، F_2 و والدین بر اساس نشانگرهای EST-SSR مرتبط با زیرواحدهای گلوتمین

قطعه‌ی ۲۸۰ در والد دیگر تکثیر شد و در نسل F_1 هر دو قطعه تکثیر شدند می‌توان وجود توارث هم‌باز را در این آغازگر مورد آزمون قرار داد.



شکل ۲- نمونه‌ای از ژل متافور برای نشانگر CA679329. در شکل نمایه‌ی اول لدر را نشان می‌دهد و نمایه‌های بعدی به ترتیب ارقام ۱ تا ۱۶ را نشان می‌دهند.

به طور کلی تعداد ۹ آلل برای سه مکان ژنی با تعداد متوسط آلل‌های مشاهده شده‌ی ۳ برای هر مکان ژنی در ارقام گندم مورد بررسی به دست آمد. (Akfirat and Uncuoglu 2013) نیز در مطالعه‌ای بر روی ژنوتیپ‌های گندم با استفاده از ۲۰ مارکر SSR تعداد آلل‌ها برای هر مکان ژنی را بین ۱ تا ۱۸ با میانگین آللی ۳/۰۵ گزارش کردند که این نتیجه به میانگین آللی به دست آمده در این تحقیق نزدیک می‌باشد. همچنین (Mardi et al. 2011) با استفاده از ۱۹ نشانگر SSR در ۱۲۲ واریته‌ی بومی گندم دوروم ایرانی (*Triticum turgidum* L.) میانگین آللی ۵/۵ را برای هر جایگاه ژنی گزارش کردند و نشان دادند که تعداد آلل‌ها از دو آلل تا ده آلل در جایگاه‌های ژنی SSR متغیر است و در مطالعه‌ای دیگر بر روی گندم نان تعداد ۲ تا ۱۱ آلل EST-SSR با میانگین آللی ۴/۷ گزارش شد (Fujita et al. 2009).

آغازگر CA679329 قطعانی چندشکل با اندازه‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ تکثیر کرد و با توجه به اینکه قطعه‌ی ۲۶۰ در یکی از والدین و

F_1 در گروه‌های مجزا قرار گرفتند و بیش‌ترین افراد در گروه اول قرار دارند که نسل F_1 نیز در همین گروه دسته‌بندی شده‌است (شکل ۱). امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی امکان بررسی تنوع ژنتیکی را مستقیماً در سطح DNA فراهم می‌سازند بنابراین می‌توانند جهت تأیید فرضیه وجود یا عدم وجود تنوع ژنتیکی میان افراد تحت آزمایش مورد استفاده قرار گیرند به‌طوری که در مطالعات مشابهی نیز گروه‌بندی و ارزیابی تنوع ژنتیکی پنبه‌های متحمل به شوری (Wanget al. 2014) و بررسی تنوع ژنتیکی و خویشاوندی واریته‌های گوجه فرنگی (Koriret al. 2014) به‌کمک نشانگرهای مولکولی EST-SSR انجام گرفت.

تنوع ژنتیکی زیر واحدهای گلوته‌نین به‌دست آمده در این پژوهش با تلفیق تحقیق موازی که بر روی تغییرات پروتئینی گلوته‌نین در والدین F_1 و F_2 در حال انجام است، می‌تواند در انتخاب یک جمعیت با کیفیت نانوائی بالا در یک برنامه‌ی اصلاحی و در نهایت تولید یک رقم با کیفیت نانوائی مطلوب در نسل‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

این پژوهش در پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان و آزمایشگاه ژنتیک دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انجام گرفت که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Akbari Rad M, Najafian G, Moghadam M and Khodarahmi M (2010) Study of genetic variation in baking quality related characteristics in bread wheat advanced lines and commercial cultivars. Iranian Journal of Crop Science 12: 213-226. (In Farsi).
- Akfirat FS and Uncuoglu AA (2013) Genetic diversity of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) revealed by SSR markers. Biochemical Genetics 51: 223-229.
- Casa A, MitchellS, HamblinM, SunH, BowersJ, PatersonA, Aquadro C and Kresovich S (2005) Diversity and selection in sorghum: simultaneous analyses using simple sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics 111: 23-30.
- Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.
- Deng Z, Hu S, Zheng F, Chen J, Zhang X, ChenJ, Sun C, Zhang Y, Wang S and Tian J (2013) Genetic dissection reveals effects of interaction between high-molecular-

بر اساس تنوع مندلی انتظار است تا نسبت ۱:۲:۱ بین نتایج F_2 مشاهده شود و برای بررسی اینکه آیا فراوانی توزیع افراد F_2 از لحاظ تعداد قطعات تکثیر شده از تنوع مندلی تبعیت می‌کند یا نه از آزمون χ^2 استفاده شد. در جدول (۲) تعداد افراد مشاهده شده و افراد مورد انتظار نوشته شده‌است.

χ^2 در سطح احتمال یک درصد با درجه آزادی ۲، ۴/۶۰۵ می‌باشد و χ^2 در این بررسی ۰/۶۲۸ محاسبه شده‌است که از χ^2 جدول کوچکتر است و این نشانگر این است که افراد F_2 از نظر توزیع اندازه‌ی این قطعات با احتمال ۹۹ درصد از تنوع مندلی تبعیت می‌کنند. تجزیه خوشه‌ای یکی از روش‌های آماری چند متغیره است که برای تعیین تنوع بین جوامع مختلف گیاهی و جانوری و دسته‌بندی آن‌ها به گروه‌های مختلف بر اساس فاصله ژنتیکی و یا تشابه ژنتیکی به‌کار گرفته می‌شود (Romesburg 2004). در این مطالعه گروه‌بندی افراد F_2 بر اساس اطلاعات الی حاصل از هر سه آغازگر توسط تجزیه خوشه‌ای انجام شد و برای گروه‌بندی افراد از روش $UPGMA^1$ با استفاده از ضریب تشابه Jaccard استفاده شد و در نهایت دندروگرام مربوط به افراد مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار SPSS رسم شد. افراد در سطح تشابه ۸۰ درصد به ۴ گروه تقسیم می‌شوند که در این گروه‌بندی P_1 ، P_2 و

¹ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

- weight glutenin subunits and waxy alleles on dough-mixing properties in commonwheat. Journal of Genetics 92: 69-79.
- Eujayl I, Sorrells M, Baum M, Wolters P and PowellW (2001) Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs. Euphytica 119: 39-43.
- Fujita Y, Fukuok H and Yano H (2009) Identification of wheat cultivars using EST-SSR markers. Breeding Science 59: 159-167.
- Gadaleta A, GiancasproA, GioveS, ZacheoS, ManginiG, SimeoneR, Signorile A and Blanco A (2009) Genetic and physical mapping of new EST-derived SSRs on the A and B genome chromosomes of wheat. Theoretical and applied genetics 118: 1015-1025.
- Gupta RB, MasciS, Lafiandra D, Bariana HS and MacRitchie F (1996) Accumulation of protein subunits and their polymers in developing grains of hexaploid wheats. Journal of Experimental Botany 47: 1377-1385.

- Hasancebi S, Mert Z, Ertugrul F, Akan K, Aydin Y, Akfirat F and Uncuoglu AA (2014) An EST-SSR Marker, bu099658, and its Potential Use in Breeding for Yellow Rust Resistance in Wheat. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 50: 11-18.
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles (44): 223-270.
- Jia J, Zhao S, Kong X, Li Y, Zhao G, He W, Appels R, Pfeifer M, Tao Y and Zhang X (2013) Aegilops tauschii draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. Nature 496: 91-95.
- Jiang QT, Wei YM, Lu ZX, Pu ZE, Lan XJ and Zheng YL (2010) Structural variation and evolutionary relationship of novel HMW glutenin subunits from Elymus glaucus. Hereditas 147: 136-141.
- Korir NK, Diao W, Tao R, Li X, Kayesh E, Li A, Zhen W and Wang S (2014) Genetic diversity and relationships among different tomato varieties revealed by EST-SSR markers. Genetics and Molecular Research 13: 43-53.
- Mardi M, Naghavi M, Pirseyedi S, Kazemi Alamooti M, Rashidi Monfared S, Ahkami A, Omidbakhsh M, Alavi N, Salehi Shanjani P and Katsiotis A (2011) Comparative assessment of SSAP, AFLP and SSR markers for evaluation of genetic diversity of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). Journal of Agricultural Science and Technology 13: 905-920.
- Mihalik D, Gregova E, Galuszka P, Ohnoutkova L, Klempova T, Ondreichkova K, Gubisova M, Gubis J and Kraic J (2012) Characterisation of a Novel High-Molecular-Weight Glutenin Subunit 1Dy12.3 from Hexaploid Wheat. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 48: 157-168.
- Osamny Z and Siosemardeh A (2009) A Study of Genetic Diversity in Sardari Wheat Ecotypes Using AFLP Markers and Agronomic Traits. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 13: 301-320.
- Romesburg C (2004) Cluster analysis for researchers. Lulu.com 340 pp.
- Saidou M, Wang C, Alam MA, Chen C, Ji W and Shaanxi C (2016) Genetic analysis of Powdery Mildew resistance gene using SSR markers in common wheat originated from wild emmer (*Triticum dicoccoides* Thell). Turkish Journal of Field Crops 21: 10-15.
- Wang B, Zhu P, Yuan Y, Wang C, Yu C, Zhang H, Zhu X, Wang W, Yao C and Zhuang Z (2014) Development of EST-SSR markers related to salt tolerance and their application in genetic diversity and evolution analysis in *Gossypium*. Genetics and Molecular Research 13: 3732-3746.
- Wang HY, Wei YM, Yan ZH and Zheng YL (2007) EST-SSR DNA polymorphism in durum wheat (*Triticum durum* L.) collections. Journal of Applied Genetics 48: 35-42.
- Wang Y, Luo J, Xue X, Korpelainen H and Li C (2005) Diversity of microsatellite markers in the populations of *Picea asperata* originating from the mountains of China. Plant Science 168: 707-714.
- Wu W, Zhou B, Luo D, Yan H, Li Y and Kawabata S (2014) Development of simple sequence repeat (SSR) markers that are polymorphic between cultivars in *Brassica rapa* subsp. *rapa*. African Journal of Biotechnology 11: 2654-2660.
- Yu JK, Dake TM, Singh S, Benscher D, Li W, Gill B and Sorrells ME (2004) Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. Genome 47: 805-818.