Crop Biotech.
Autumn and Winter (2013) 5: 41-48

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۴۸- ۴۱)

شناسایی آلل‌های کنترل‌کننده صفات مهم زراعی انتقال یافته از *Hordeum spontaneum* تحت شرایط تنش خشکی

منیره رحیمی[۱]*، روهام عشقی[۲] و فرشاد ابراهیم‌پور[۳]

۱، دانشجوی دکتری تخصصی اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

۲، دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح نباتات، ۳، دانشیار گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۶ - تاریخ تصویب:۹۲/۱۰/۴)

Detection of Exotic Alleles for Important Agronomical Traits Introgressed from *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* under Drought Stress

M. RAHIMI [1]*, R. ESHGHI[2] AND F. EBRAHIMPOUR [3]

1, Ph. D. Student, Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2, Ph. D., Genetics and Plant breeding, 3, Associate Professor, Department of Agricultural Science, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Sep. 28, 2013 - Accepted: Dec. 25, 2013)

Abstract

Drought stress is a major constraint for barley production and yield stability in rainfed ecosystems. An advanced backcross breeding strategy was used to identify quantitative trait loci (QTLs) associated with yield and yield components in a BC_3 population derived from an interspecific cross between six-rowed spring barley (*H. vulgare*) 'Azhul' and wild barley (*H. spontaneum*) line 'Spontaneum I', under drought stress. The linkage map constructed by 170 SSR molecular markers covered a total length of about 1008.7 cM. For ten agronomical characteristics, 27 QTLs were determined. The phenotypic variation explained by individual QTLs ranged from 5.7% to 34.8% and the LOD scores ranged between 3 and 12.4. A total of 12 new QTLs were identified, where at ten QTLs the exotic introgression caused an improved trait performance, under drought stress. Four QTLs contributed by 'Spontaneum I' on chromosomes 1H, 2H, 3H and 7H were found to significantly increase chlorophyll content, days to maturity, flag leaf length and number of tillers per spike, respectively. In conclusion, the results of this study showed that *Hordeum spontaneum*, the wild progenitor of barley, is a potential source of useful genetic variation for barley breeding programs.

Keywords: Wild barley, Drought stress, AB-QTL mapping, Linkage map, Marker-assisted selection.

چکیده

تنش خشکی مهمترین عامل محدودکننده تولید و پایداری عملکرد گیاه جو در کشت‌های دیم محسوب می‌شود. در این تحقیق برای شناسایی نواحی ژنومی کنترل‌کننده صفت عملکرد و اجزاء آن در شرایط تنش رطوبتی از روش اصلاحی تلاقی برگشتی پیشرفته استفاده شد. به این منظور یک جمعیتBC3 حاصل از تلاقی جو بهاره شش‌ردیفه (*H. vulgare*) Azhul و لاین جوی وحشی (*H. spontaneum*) Spontaneum I مورد استفاده قرار گرفت. نقشه پیوستگی توسط ۱۷۰ نشانگر مولکولی ریزماهواره که طولی در حدود ۱۰۰۸/۷ سانتی‌مورگان از ژنوم جو را پوشش داد، تهیه شد. برای ۱۰ صفت زراعی، ۲۷ جایگاه ژنومی شناسایی شد. این نواحی توانستند دامنه‌ای از ۵/۷ تا ۳۴/۸ درصد از واریانس فنوتیپی صفات مورد بررسی را توجیه نمایند. دامنه مقادیرLOD این جایگاه‌ها نیز از ۳ تا ۱۲/۴ در نوسان بود. در مجموع ۱۲ مکان ژنی جدید که والد آن‌ها جوی وحشی بود، شناسایی شد که در میان آن‌ها ۱۰ جایگاه باعث افزایش عملکرد در شرایط تنش خشکی می‌شدند. از این جایگاه‌ها چهار QTL بزرگ اثر بر روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 3H و 7H شناسایی شد که به میزان قابل توجهی موجب بهبود صفات محتوای کلروفیل، تعداد روز تا رسیدگی، طول برگ پرچم و تعداد پنجه در شرایط تنش رطوبتی شدند. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که جوی *Hordeum spontaneum*، جد وحشی جوی زراعی، منبعی متنوع و مناسب برای استفاده در برنامه های اصلاحی جو می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: جوی وحشی، تنش خشکی، مکان‌یابی AB-QTL، نقشه ژنتیکی، گزینش به‌کمک نشانگر

* نویسنده مسئول: منیره رحیمی
E-mail:breeding60@yahoo.com

مقدمه

این فرضیه که جوهای وحشی *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* جد جوهای زراعی امروزی هستند دیری است که در میان اغلب دانشمندان جهان پذیرفته شده است. براساس یافته‌های باستان‌شناسی اولین تغییرات تکاملی در گیاه جو مربوط به ایجاد ساقه‌های غیرشکننده بوده که در حدود ۹۵۰۰ تا ۱۰۵۰۰ سال پیش به‌وقوع پیوسته است (Zohary and Hopf, 2000). در ۸۰۰۰ تا ۸۸۰۰ سال قبل نیز جوهای شش‌ردیفه از جوهای دوردیفه و جوهای بدون پوشینه از جوهای پوشینه‌دار مشتق شدند (Salamini *et al.*, 2002). جوهای بدون‌پوشینه در مقایسه با جوهای معمولی به‌علت نداشتن پوشینه، دارای مقدار فیبر کمتر و نشاسته و پروتئین بیشتری می‌باشند. علاوه بر آن این نوع از جو در زمینه حمل و نقل و انبارداری نسبت به جوهای معمولی مزیت دارد (Newman and Newman, 2006). با این وجود تا به حال توجه اغلب برنامه‌های اصلاحی بر روی جوهای معمولی متمرکز بوده و این گیاه با وجود تمامی قابلیت هایی که دارد هنوز جایگاه واقعی خود را در میان گیاهان زراعی نیافته است. یکی از عوامل مهم محدودکننده کشت گسترده این گیاه در ایران حساسیت ارقام موجود در برابر استرس‌های محیطی به‌ویژه خشکی است. خشکی از جمله تنش‌های محیطی است که پس از بیماری‌ها به‌عنوان مهمترین عامل محدودکننده رشد و تولید گیاهان زراعی شناخته شده است (Mahajan and Tuteja, 2005). آب مولکول مهمی برای تمامی فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان بوده و برای مثال بین ۸۰ تا ۹۰٪ بیوماس گیاهان علفی را آب تشکیل می‌دهد (Nevo and Chen, 2010). خشکی در حقیقت یک رویداد هواشناختی است که با عدم‌وقوع بارندگی در یک دوره زمانی همراه می‌باشد، دوره‌ای که به اندازه کافی بلند است تا باعث تخلیه رطوبتی خاک و تنش کمبود آب همراه با کاهش پتانسیل آب در بافت‌های گیاهی گردد. ناکافی بودن مقدار و توزیع آب قابل استفاده در طی دوره رشد گیاه موجب کاهش بروز توان کامل ژنتیکی گیاه شده و اثر مخرب آن بر عملکرد و درآمد نهایی زارع کاملاً شناخته شده است (Jaleel *et al.*, 2009). مقاومت به خشکی عبارت است از توانایی یک گیاه زراعی برای تولید محصول اقتصادی با حداقل کاهش عملکرد در شرایط تنش نسبت به شرایط بدون تنش و برای اینکه بتوانیم ژنوتیپ‌هایی مقاوم به این عارضه طبیعی ایجاد نماییم لازم است که درک درستی از اساس ژنتیکی مقاومت به خشکی داشته باشیم (Nevo and Chen, 2010; Eshghi *et al.*, 2010).

در طول مسیر تکاملی هزاران ساله گیاهان زراعی تنها دامنه محدودی از ژن‌ها توانسته‌اند باقی بمانند. به عبارت دیگر بسیاری از ژن‌های اجداد وحشی گیاهان زراعی در مسیر تکامل این گیاهان حذف شده‌اند که به‌طور حتم در میان این ژن‌ها تعداد زیادی از ژن‌های مفید نیز وجود داشته است. در نتیجه اجداد وحشی گیاهان زراعی با داشتن گنجینه‌ای از ژن‌های مقاومت به انواع تنش‌های زنده و غیرزنده از جمله تنش خشکی، می‌توانند منابع ژنتیکی با اهمیتی برای اصلاح گیاهان زراعی به‌شمار آیند (Salamini *et al.*, 2002; Saal *et al.*, 2011). لذا تحقیق حاضر با هدف شناسایی نواحی ژنومی مفید در اداره برخی از صفات مهم زراعی در شرایط تنش خشکی و به نوعی انتقال آن‌ها از جامعه جوهای وحشی به جمعیت ژنی جوهای بدون‌پوشینه، مورد اجرا قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جو بهاره زراعی شش‌ردیفه *(Hordeum vulgare* subsp. *vulgare)* Azhul که یکی از مهمترین ارقام جو بدون‌پوشینه است و توسط دانشگاه آریزونا در سال ۱۹۹۳ آزاد شده، و جوی وحشی *(Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum)* Spontaneum I که در سال ۱۹۶۰ از جمهوری آذربایجان جمع‌آوری شده به‌ترتیب به‌عنوان والدین تکرارشونده و بخشنده در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. این ژنوتیپ‌ها از بانک‌ژن انستیتو ذخایر ژنتیکی باکو تهیه شده بود.

لاین Spontaneum I به‌عنوان والد نر با رقم Azhul تلاقی داده شد. گیاهان F_1 در گلخانه کاشته شد و بین ۱۰ گیاه F_1 و رقم Azhul (به‌عنوان والد ماده) تلاقی برگشتی انجام شد. ۵۰ گیاه BC_1F_1 به‌دست‌آمده برای تولید ۳۶۰ بذر نسل BC_2 با رقم Azhul (به‌عنوان والد نر) تلاقی داده شدند. در مرحله بعد ۳۶۰ گیاه BC_2F_1 با Azhul جهت تولید۱۲۸۰ بذر BC_3F_1 تلاقی داده شدند. لاین‌هایی با محور سنبله شکننده حذف و ۲۰۰ خانواده BC_3F_1 برای دو نسل جهت افزایش بذر خودگشن شدند. بذور ژنوتیپ‌ها در شرایط گلخانه در درون گلدان‌هایی به وزن ۱۰ کیلوگرم کشت شد و به‌طور مرتب هر روزه مورد آبیاری قرار گرفت. تنش رطوبتی از اواسط مرحله گلدهی آغاز شد و صفات روز تا رسیدگی، تعداد پنجه، وزن هزار دانه، ارتفاع بوته، طول پدانکل، طول خوشه، طول ریشک، طول برگ پرچم، عرض برگ پرچم، تعداد دانه

در خوشه، محتوای کلروفیل، بیوماس و عملکرد دانه در بوته مورد بررسی قرار گرفتند.

برای تهیه نقشه پیوستگی، ابتدا چندشکلی والدین با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره بررسی شد. بدین صورت که پس از کشت بذور والدین در دستگاه ژرمیناتور، DNA از برگ‌های جوان به‌روش Dellaporta و همکاران (۱۹۸۳) استخراج شد. پس از تعیین خلوص DNA استخراج‌شده، نمونه‌ها پس از آماده‌کردن محلول‌های لازم جهت انجام فرایند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، توسط ۲۸۸ آغازگر ریزماهواره اختصاصی PCR شدند. سپس محصولات تکثیریافته در واکنش PCR، توسط ژل پلی‌آکریل‌آمید الکتروفورز شده و ژل‌ها به‌وسیله نیترات‌نقره رنگ‌آمیزی شد. اندازه تقریبی باندهای تکثیرشده براساس باندهای نشانگر ۱۰۰ جفت بازی تخمین زده شد. جفت آغازگرهای فاقد تکثیر و یا دارای تکثیر نامطمئن از ادامه آزمایش‌ها حذف گردید و تکرارپذیری مابقی آغازگرها حداقل دو بار امتحان شد. سپس نشانگرهایی که در میان والدین چندشکل بودند برای غربال نتاج به‌کار گرفته شد. در مرحله بعد انحراف تفرق از نسبت‌های مندلی در هر مکان نشانگر به‌کمک آزمون χ^2 بررسی شد. برای تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار Map Manager و برای مکان‌یابی QTLهای کنترل‌کننده صفات زراعی از نرم‌افزار QTL Cartographer استفاده شد. تعیین QTLهای کنترل‌کننده صفات مورد بررسی از طریق روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب انجام گرفت. تمامی مراحل مختلف این تحقیق در مزرعه و آزمایشگاه‌های دانشگاه پیام نور تهران به اجرا درآمده است.

نتایج و بحث

از مجموع ۲۸۸ جفت آغازگر ریزماهواره مورداستفاده در این تحقیق، ۲۳۷ آغازگر توانستند در میان والدین نوارهای چندشکل تولید کنند. از این تعداد، ۱۷۰ جفت آغازگر نوارهای شفاف و قابل امتیازدهی در میان افراد BC_3F_3 ایجاد نمودند. نقشه ژنتیکی با میانگین تراکم ۵/۹۳ سانتی‌مورگان ترسیم شد که توانست ۱۰۰۸/۷ سانتی‌مورگان از ژنوم جو را پوشش دهد. مقایسه نقشه ژنتیکی تهیه‌شده در این مطالعه با نقشه‌های ارائه شده قبلی نشان داد که در تمامی گروه‌های پیوستگی، فاصله بین نشانگرها متفاوت با نتایج سایر نقشه‌های موجود بود (Ramsay *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Varshney *et al.*, 2007; Rahimi *et al.*, 2013). ازآنجا که نقشه‌های ژنتیکی حاصل تلاقی والدین و جمعیت‌های متفاوت است، اختلاف در فاصله بین نشانگرها منطقی به‌نظر می‌رسد. در جمعیت مورد بررسی روش مکان یابی فاصله‌ای مرکب توانست ۲۷ جایگاه‌ژنی را برای ۱۰ صفت مهم زراعی در شرایط تنش رطوبتی شناسایی نماید (جدول ۱). در این مطالعه هیچ ناحیه ژنومی برای صفات تعداد روز تا خوشه‌دهی ،طول خوشه، طول پدانکل و بیوماس شناسایی نشد.

روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب توانست برای صفت تعداد روز تا رسیدگی سه QTL را شناسایی کند. این نواحی ژنومی توانستند مجموعاً ۵۵/۷ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه نمایند. اولین ناحیه ژنومی (Qdm-2) بر روی کروموزوم 2H و در فاصله ۶۷ تا ۷۰ سانتی‌مورگان از ابتدای گروه پیوستگی و پیوسته با نشانگر Ebmac640 شناسایی شد. این QTL بزرگ اثر توانست به تنهایی ۲۸/۸ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه نماید. مقدار LOD بیشتر از ۶ بیانگر قابل اطمینان بودن این مکان ژنی است. آلل زودرسی از والد Spontaneum I موجب شد که این QTL اثر افزایشی به اندازه ۱۰/۷- داشته باشد. زودرسی در مناطق خشک که معمولاً در مواقع آخر فصل زراعی دچار مشکل کاهش نزولات جوی هستند، می‌تواند یک خصوصیت مثبت تلقی شود. گیاهان زودرس پیش از شروع مرحله خشکی بخش عمده‌ای از رشد رویشی و زایشی خود را انجام داده‌اند و تنش رطوبتی پایان فصل آسیب کمتری به آن‌ها می‌رساند. در نتیجه این ناحیه ژنومی برای اصلاح گیاهان مناسب کشت در مناطق خشک بسیار با اهمیت است. مکان ژنی دیگر (Qdm-5) بر روی کروموزوم 5H و پیوسته با نشانگر Bmag337 شناسایی شد. والد بخشنده این QTL که ۱۱/۴ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه کرد و اثر افزایشی به اندازه ۳/۴ و در جهت افزایش تعداد روز تا رسیدگی داشت، رقم زراعی Azhul بود. سومین مکان‌ژنی (Qdm-6) در فاصله ۱۱۳ تا ۱۱۷ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم 6H و پیوسته با نشانگر Bmag0001 شناسایی شد. این QTL، ۱۵/۵ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه کرد و آلل دیررسی از والد Azhul باعث شد که این مکان‌ژنی اثر افزایشی به مقدار ۴/۱ داشته باشد. Rahimi *et al.*, (2013) با مطالعه یک جمعیت $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی دو رقم جوی Hiberna و Pfyner نتایج مشابهی را برای این مکان ژنی گزارش کردند. اگرچه این QTL در بررسی آن‌ها نسبت به تحقیق حاضر توانست درصد کمتری از واریانس فنوتیپی را توجیه کند، لیکن به‌عنوان یک ناحیه افزایش‌دهنده زمان رسیدگی معرفی شد. گزارش نتایج مشابه برای این ناحیه ژنومی مسلماً بر اعتبار آن می‌افزاید.

جدول ۱- مقادیر پارامترهای ژنتیکی QTLهای شناسایی‌شده صفات زراعی در جمعیت BC_3 حاصل از تلاقی Azhul × Spontaneum I تحت شرایط تنش خشکی

QTL نام	والد بخشنده	کروموزوم	نزدیک‌ترین نشانگر	موقعیت (cM)	LOD	اثرات افزایشی	R^2	منابع گزارش شده
روز تا رسیدگی								
Qdm-2	Spontaneum I	2H	EBmac640	67-70	6.2	-10.7	28.8	-
Qdm-5	Azhul	5H	Bmag0337	36-39	3.02	3.4	11.4	-
Qdm-6	Azhul	6H	Bmag0001	113-117	4.6	4.1	15.5	Rahimi *et al.*, (2013)
تعداد پنجه								
Qnt-1	Spontaneum I	1H	Bmag0718	107-113	3.2	-0.45	11.2	Li *et al.*, (2006), Rahimi *et al.*, (2013)
Qnt-4	Azhul	4H	Bmag0490 EBmac658	61-68	4.2	0.35	8.1	-
Qnt-7	Spontaneum I	7H	EBmac827	90-93	7.3	-1.51	25.5	-
وزن هزار دانه								
Qtw-7	Azhul	7H	Bmag0516 Bmac282b	63-67	9.5	4.4	20.8	Eshghi *et al.*, (2013)
ارتفاع بوته								
Qph-1	Spontaneum I	1H	Bmag344c Bmag0347	76-84	5.7	4.4	16.1	-
Qph-3	Azhul	3H	HVM62	124-129	3.1	-5.7	20.6	Hori *et al.*,(2003), Rahimi *et al.*, (2013)
Qph-4	Azhul	4H	GBM1220 GBM1048	88-93	3.4	-2.2	8.3	-
طول ریشک								
Qal-3	Spontaneum I	3H	EBmac0565b	18-23	3.2	0.19	6.5	-
Qal-7	Spontaneum I	7H	Bmag0516 Bmac0282b	57-70	4.6	0.17	5.7	-
طول برگ پرچم								
Qfl-3	Spontaneum I	3H	Bmag0603	31-35	9.2	1.59	34.8	-
عرض برگ پرچم								
Qfw-2	Azhul	2H	Bmac0576	72-73	4.9	0.05	6.5	-
Qfw-7	Spontaneum I	7H	Bmac0035	147-149	3.0	-0.07	7.9	-
تعداد دانه در خوشه								
Qgs-2	Azhul	2H	HVM54 GBM1437	103-108	8.8	7.10	22.7	Eshghi *et al*., (2013)
Qgs-6	Azhul	6H	GBM1355	44-46	6.2	6.01	19.5	Eshghi *et al*., (2013)
Qgs-7	Azhul	7H	Bmag0120 EBmag757	134-139	3.7	4.14	13.2	Eshghi *et al*., (2011), Eshghi *et al*., (2013)
محتوای کلروفیل								
Qcc-1	Spontaneum I	1H	Bmag0105	42-47	12.4	2.52	31.2	Eshghi *et al*., (2013)
Qcc-2	Spontaneum I	2H	Bmag0518 EBmac737	25-31	4.8	0.69	9.5	Xue *et al*., (2008), Eshghi *et al*., (2013)
Qcc-5	Azhul	5H	HVM30	62-70	5.2	0.81-	13.7	Eshghi *et al*., (2013)
Qcc-6	Spontaneum I	6H	EBmac0674	101-106	3.0	0.70	10.5	Eshghi *et al*., (2013)
عملکرد دانه در بوته								
Qyp-2	Azhul	2H	HVM54	100-108	5.6	0.39	7.9	-
Qyp-5a	Azhul	5H	GBM5028	10-12	4.4	0.30	6.4	Eshghi *et al*., (2013)
Qyp-5b	Azhul	5H	HVM30	61-65	3.2	0.26	5.7	Eshghi *et al*., (2013)
Qyp-6	Azhul	6H	EBmac0674	100-104	3.0	0.32	6.8	Eshghi *et al*., (2013)
Qyp-7	Spontaneum I	7H	EBmac0603	40-42	5.1	-0.37	7.5	Xue *et al*., (2010), Eshghi *et al*., (2013)

در این تحقیق مهمترین ناحیه ژنومی برای صفت تعداد پنجه بر روی کروموزوم 7H و نزدیک به نشانگر EBmac827 ردیابی شد. مقدار LOD بیشتر از ۷ بیانگر قابل اطمینان‌بودن این مکان‌ژنی است. والد بخشنده این

QTL که در فاصله ۹۰ تا ۹۳ سانتی‌مورگان از ابتدای گروه پیوستگی قرار داشت، نمونه وحشی Spontaneum I بود. این ناحیه ژنومی بزرگ اثر که توانست بیش از ۲۵ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه کند، با اثر افزایشی ۱/۵۱- باعث کاهش تعداد پنجه در جمعیت مورد مطالعه شد. کاهش تعداد پنجه در شرایط تنش خشکی می‌تواند در اغلب موارد باعث بهبود راندمان عملکرد شود. در نتیجه کشف و انتقال این جایگاه‌ژنی از جامعه ژنی جوی وحشی به جوی زراعی می‌تواند گامی در جهت اصلاح گیاهان مناسب مناطق خشک باشد. دو مکان‌ژنی دیگر یعنی Qnt-1 و Qnt-4 به ترتیب توانستند ۱۱/۲ و ۸/۱ درصد از تنوع مشاهده شده برای این صفت را توجیه نمایند. مکان‌ژنی Qnt-1 در فاصله ۱۰۷ تا ۱۱۳ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم 1H و پیوسته با نشانگر Bmag718 قرار داشت. والد بخشنده این ناحیه ژنومی Spontaneum I بود. این QTL کاهش‌دهنده تعداد پنجه در مطالعات قبلی توسط Li *et al.* (2006) و Rahimi *et al.* (2013) نیز گزارش شده است. در آزمایشات Li *et al.* (2006)، یکی از والدین *H. spontaneum* و در مطالعه Rahimi *et al.* (2013)، هر دو والد *H. vulgare* بودند. با مقایسه نتایج این دو مطالعه و تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که این ناحیه ژنومی ظاهراً در هر دو جمعیت جوهای زراعی و وحشی *H. spontaneum* وجود دارد و در هر دو جمعیت باعث کاهش تعداد پنجه می‌شود. مکان ژنومی Qnt-4 بین نشانگرهای Bmag0490 و EBmac658 و در فاصله ۶۱ تا ۶۸ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم 4H قرار گرفته بود. والد این QTL با اثر افزایشی ۰/۳۵، رقم زراعی Azhul بود.

برای صفت وزن هزاردانه یک QTL (Qtw-7) بزرگ اثر با LOD معادل ۹/۵ شناسایی شد که توانست بیش از ۲۰ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را در جمعیت مورد بررسی توجیه نماید (جدول ۱). این مکان ژنی بین نشانگرهای Bmag516 و Bmac282b و در فاصله ۶۳ تا ۶۷ سانتی‌مورگان از ابتدای گروه پیوستگی و تقریباً ۱ سانتی مورگان از نشانگر Bmac282b بر روی کروموزوم 7H قرار داشت. این ناحیه ژنومی با اثر افزایشی ۴/۴ گرم از والد زراعی به جمعیت مورد بررسی منتقل شده بود. Eshghi *et al.* (2013) با هدف شناسایی QTLهای کنترل‌کننده عملکرد و اجزاء آن در شرایط بدون تنش رطوبتی جمعیت مورد مطالعه در تحقیق حاضر را مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها برای صفت وزن هزار دانه توانستند سه مکان ژنی را شناسایی کنند که یکی از آن‌ها خصوصیات مشابهی با QTL تعیین شده در این آزمایش داشت. اگرچه این ناحیه ژنومی در شرایط غیر تنش توانسته بود تنها ۶/۲ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه نماید، شناسایی این QTL در هر دو شرایط نشان‌دهنده پایداری این مکان‌ژنی می‌باشد.

سه ناحیه ژنومی بر روی کروموزوم‌های 1H، 3H و 4H توانستند ۴۵ درصد از تغییرات ژنتیکی صفت ارتفاع بوته را در جمعیت مورد بررسی توجیه نمایند. مهمترین QTL بر روی کروموزوم 3H قرار داشت که ۲۰/۶ درصد از تنوع این صفت را توجیه نمود. این ناحیه ژنومی که در فاصله ۱۲۴ تا ۱۲۹ سانتی‌مورگان از ابتدای گروه پیوستگی و نزدیک به نشانگر HVM62 قرار داشت، آلل‌های پاکوتاهی را از رقم زراعی دریافت کرده بود. این مکان‌ژنی حداقل در دو مطالعه دیگر نیز گزارش شده است (Hori *et al.*, 2003; Rahimi *et al.*, 2013). نواحی ژنومی دیگر (Qph-1 و Qph-4) توانستند به‌ترتیب ۱۶/۱ و ۸/۳ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه کنند. Qph-1 بین دو نشانگر Bmag344c و Bmag347 قرار داشت که آلل افزایش ارتفاع به مقدار ۴/۴ سانتی‌متر از والد وحشی به آن منتقل شده بود. این در حالی است که اثر افزایشی مکان‌ژنی Qph-4 که در بین نشانگرهای GBM1220 و GBM1048 قرار گرفته و آلل کاهش ارتفاع را از والد زراعی دریافت کرده بود، به مقدار ۲/۲- سانتی‌متر بود.

در این جمعیت برای صفت طول ریشک دو QTL کوچک اثر شناسایی شد (Qal-3 و Qal-7). نزدیکترین نشانگر به مکان‌ژنی Qal-3، EBmac0565b بود. این ناحیه ژنومی در فاصله ۱۸ تا ۲۳ سانتی‌مورگان از ابتدای گروه پیوستگی 3H قرار داشت. QTL دیگر بین نشانگرهای Bmag0516 و Bmac0282b و در فاصله ۵۷ تا ۷۰ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم 7H ردیابی شد. هر دو مکان‌ژنی با LOD قابل اطمینان از والد وحشی منتقل شده بودند، اما متأسفانه اثر افزایشی آن‌ها کم بود و هیچ یک نتوانستند درصد قابل توجهی از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه نمایند (جدول ۱). یک دلیل برای این مسئله می‌تواند وراثت‌پذیری کم این صفت در جمعیت مورد بررسی باشد. به عبارت دیگر ممکن است بخش بزرگی از تغییرات این صفت تحت تأثیر اثرات محیطی بوده و عوامل ژنتیکی سهم چندانی در شکل‌گیری واریانس آن نداشته‌اند. دلیل دیگر را نیز می‌توان در نقصان نقشه ژنتیکی جستجو کرد. البته در این مطالعه سعی شد که نقشه ژنتیکی جامعی تهیه گردد، اما احتمالاً با یک نقشه اشباع‌تر بتوان نواحی ژنومی بیشتری را شناسایی کرد. این موضوع برای صفات بیوماس، تعداد روز تا

خوشه‌دهی، طول پدانکل و طول خوشه که هیچ مکان‌ژنی برای آن‌ها شناسایی نشد نیز صادق است.

برای صفت طول برگ پرچم یک QTL بزرگ اثر شناسایی شد که توانست به تنهایی بیش از ۳۴ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه نماید (جدول ۱). این مکان ژنی پیوسته با نشانگر Bmag0603 در فاصله ۳۱ تا ۳۵ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم 3H قرار داشت. والد بخشنده آن Spontaneum I بود که اثر افزایشی به مقدار ۱/۵۹ سانتی‌متر در جهت افزایش طول برگ پرچم داشت. Li *et al.* (2006) با تلاقی رقم جوی بهاره Brenda و جوی وحشی HS584 و انجام سه نسل تلاقی برگشتی با والد زراعی، ناحیه ژنومی مشابهی را با همین خصوصیات در فاصله حدود ۱۳ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم 3H گزارش کرده اند. براساس مطالعات آن‌ها این QTL منتقل شده از والد وحشی علاوه بر افزایش طول برگ پرچم باعث افزایش کل محیط برگ نیز شده بود. هیچ گزارشی از این QTL در مطالعاتی که بر روی جمعیت‌های جوی زراعی انجام شده منتشر نشده است. براساس این شواهد می‌توان گفت که این ناحیه ژنومی با اهمیت احتمالاً تنها مختص به جمعیت‌های جوی وحشی *H. spontaneum* است.

دو مکان‌ژنی Qfw-2 و Qfw-7 به‌ترتیب توانستند ۶/۵ و ۷/۹ درصد از تنوع مشاهده شده برای صفت عرض برگ پرچم را کنترل نمایند. برای Qfw-2 که بر روی کروموزوم 2H قرار داشت والد زراعی باعث افزایش و برای Qfw-7 که در فاصله ۱۴۷ تا ۱۴۹ سانتی‌مورگان از ابتدای گروه پیوستگی 7H قرار گرفته بود والد وحشی باعث کاهش عرض برگ شد. نزدیکترین نشانگرها به این مکان‌های ژنی به‌ترتیب نشانگرهای Bmac0576 و Bmac0035 بودند.

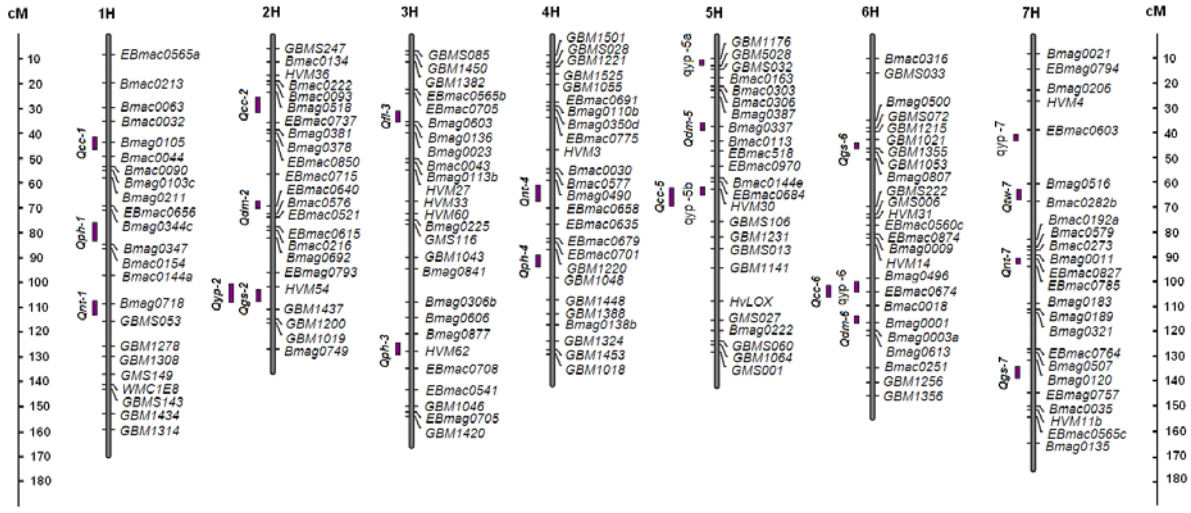
مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب توانست برای صفت تعداد دانه در خوشه سه QTL شناسایی کند. این نواحی ژنومی توانستند مجموعاً ۵۵/۴ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه نمایند. اولین QTL (Qgs-2) بین نشانگرهای HVM54 و GBM1437 (در فاصله ۱/۲ سانتی‌مورگان از HVM54) و بر روی کروموزوم 2H قرار داشت. این QTL بزرگ‌اثر توانست به تنهایی ۲۲/۷ درصد از تغییرات این صفت را توجیه کند. والد دهنده این جایگاه ژنی Azhul و مقدار اثر افزایشی آن ۷/۱ و در جهت افزایش تعداد دانه در خوشه بود. Eshghi *et al.* (2013) در شرایط بدون تنش نیز این ناحیه ژنومی را در بروز این صفت با اهمیت ارزیابی کردند. در مطالعه حاضر این ناحیه ژنومی علاوه بر تأثیر روی صفت تعداد دانه در خوشه قسمتی از تنوع مشاهده شده برای صفت عملکرد دانه را نیز توجیه نمود. این مسئله یا به آن دلیل است که ژن و یا ژن‌های کنترل‌کننده این صفات در این ناحیه با هم پیوسته‌اند و یا اینکه این ناحیه ژنومی در جمعیت در حال تفرق مورد بررسی یک اثر پلیوتروپی بر بروز هر دو صفت داشته است. برای این صفت دو مکان‌ژنی دیگر هم شناسایی شد. مکان‌ژنی Qgs-6 بر روی کروموزوم 6H و در فاصله ۴۴ تا ۴۶ سانتی‌مورگان از ابتدای گروه پیوستگی و پیوسته با نشانگر GBM1355 ردیابی شد. این QTL، ۱۹/۵ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه نمود. مقدار LOD بیشتر از ۶ بیانگر قابل اطمینان‌بودن این مکان‌ژنی است. آلل افزایش‌دهنده تعداد دانه در خوشه از والد Azhul سبب شد که این QTL اثر افزایشی به اندازه ۶/۰۱ داشته باشد. سومین QTL (Qgs-7) نیز توانست بیش از ۱۳ درصد از تغییرات این صفت را توجیه نماید. این آلل که در فاصله ۱۳۴ تا ۱۳۹ سانتی‌مورگان از ابتدای گروه پیوستگی 7H (بین نشانگرهای Bmag120 و EBmag757) قرار داشت، اثر افزایشی (به مقدار ۴/۱۴) خود را از والد زراعی دریافت کرده بود. نتایج مشابهی مبنی بر ارتباط این ناحیه ژنومی با صفت تعداد دانه در خوشه گزارش شده است (Eshghi *et al.*, 2011; Eshghi *et al.*, 2013).

برای صفت محتوای کلروفیل برگ چهار مکان‌ژنی بر روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 5H و 6H شناسایی شد که این نواحی ژنومی توانستند در مجموع نزدیک به ۷۰ درصد از واریانس این صفت را توجیه نمایند. همگی این QTLها در شرایط نرمال رطوبتی نیز در این جمعیت ردیابی شده بودند که نشانگر پایداری این نواحی ژنومی است (Eshghi *et al.*, 2013). والد وحشی Spontaneum I در سه مکان‌ژنی باعث افزایش محتوای کلروفیل شد. در مهمترین جایگاه (Qcc-1) که توانست بیش از ۳۱ درصد از تغییرات این صفت را کنترل کند، والد وحشی به مقدار ۲/۵۲ باعث افزایش سطح کلروفیل برگ شد. این آلل پیوسته با نشانگر Bmag0105، در فاصله ۴۲ تا ۴۷ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم 1H قرار گرفته بود. سه مکان‌ژنی Qcc-2، Qcc-5 و Qcc-6 به ترتیب توانستند ۹/۵، ۱۳/۷ و ۱۰/۵ درصد از تنوع مشاهده شده برای این صفت را توجیه کنند. نزدیکترین نشانگرها به مکان‌های ژنی Qcc-5 و Qcc-6 به‌ترتیب نشانگرهای HVM30 و EBmac674 و برای Qcc-2 نشانگرهای Bmag518 و EBmac737 بود. نواحی ژنومی Qcc-2 و Qcc-6 حامل آلل‌های والد وحشی بودند که توانستند به مقدار ۰/۶۹ و ۰/۷ محتوای کلروفیل را افزایش دهند. Xue *et al.* (2008) نیز نتایج مشابهی را برای ناحیه ژنومی

Qcc-2 گزارش کردند. نواحی ژنومی Qcc-5 و Qcc-6 علاوه بر کنترل این صفت، بخشی از تنوع صفت عملکرد بوته را نیز مدیریت کردند.

مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب توانست پنج ناحیه ژنومی را برای کنترل صفت عملکرد دانه در بوته بر روی کروموزوم‌های 2H، 5H، 6H و 7H شناسایی کند (جدول۱). این مکان‌های ژنی توانستند از ۵/۷ تا ۷/۹ درصد از تغییرات این صفت را توجیه کنند. نشانگرهای پیوسته به این QTLها نشانگرهای HVM54، GBM5028، HVM30، EBmac0674 و EBmac0603 بودند (شکل ۱). همگی نواحی شناسایی‌شده در این مطالعه بجز Qyp-2، در بررسی این جمعیت در شرایط نرمال رطوبتی نیز ردیابی شده بودند (Eshghi *et al.*, 2013). Xue *et al.* (2010) برای مکان‌ژنی Qyp-7 نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند. اگرچه جایگاه‌های ژنی شناسایی‌شده توانستند در مجموع بیش از ۳۴ درصد از واریانس محیطی عملکرد را توجیه کنند، هر یک از این نواحی سهم بسیار اندکی در اداره این صفت داشتند. به‌عبارت دیگر احتمالاً صفت عملکرد در این جمعیت توسط تعداد زیادی ژن کوچک‌اثر کنترل می‌شود. درصورتی که این فرضیه درست باشد گزینش‌های فنوتیپی و یا گزینش به‌کمک نشانگر به‌طور مستقیم برای اصلاح این صفت ثمربخش نخواهد بود.

همان‌گونه که مشاهده شد در این تحقیق چهار QTL بزرگ‌اثر Qdm-2، Qnt-7، Qfl-3 و Qcc-1 توانستند بخش بزرگی از واریانس صفات روز تا رسیدگی، تعداد پنجه، طول برگ پرچم و محتوای کلروفیل برگ را توجیه کنند که می‌توان از این مکان‌های ژنی برای اصلاح غیرمستقیم عملکرد و در نهایت تولید ارقام جوی بدون‌پوشینه متحمل به خشکی استفاده کرد.



شکل ۱- نقشه ژنتیکی استفاده‌شده جهت مکان‌یابی QTLهای مرتبط با صفات زراعی در جمعیت حاصل از تلاقی Azhul × Spontaneum I تحت شرایط تنش خشکی

REFERENCES

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA minipreparation. Version II. Plant Mol. Biol. Rep., 1: 19-21.

Eshghi R, Ojaghi J, Baraty M, Rahimi M, Salayeva S (2011) QTL mapping for yield and its components in barley (*Hordeum vulgare* L.). The 7th National Biotechnology Congress of I.R. Iran. Tehran, Iran (in farsi).

Eshghi R, Ojaghi J, Rahimi M, Salayeva S (2010). Genetic characteristics of grain yield and its components in barley (*Hordeum vulgare* L.) under normal and drought conditions. American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 9: 519-528.

Eshghi R, Salayeva S, Ebrahimpour F, Rahimi M, Baraty M, Ojaghi J (2013). Advanced-backcross QTL analysis in hulless barley: I. Detection of exotic alleles for yield and yield components introgressed from *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. Int. J. Agric. crop sci. 5: 95-100.

Hori K, Kobayashi T, Shimizu A, Sato K, Takeda K, Kawasaki S (2003) Efficient construction of high density linkage map

and its application to QTL analysis in barley. Theor. Appl. Genet. 107: 806-813.

Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Somasundaram R, Panneerselvam R (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. Int. J. Agric. Biol. 11: 100-105.

Li JZ, Huang XQ, Heinrichs F, Ganal MW, Roder MS (2006) Analysis of QTLs for yield components, agronomic traits, and disease resistance in an advanced backcross population of spring barley. Genome. 49: 454-466.

Mahajan S, Tuteja N (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. Biochem. Biophys. 444: 139-158.

Nevo E, Chen G (2010). Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. Plant Cell Environ. 33: 670-685.

Newman CW, Newman RK (2006). A brief history of barley foods. Cereal Foods World. 51: 4-7

Rahimi M, Abrahimpour F, Eshghi R (2013). Inheritance and QTL mapping of agronomical traits in barley. Crop Biotech. 2: 35-48. (in farsi).

Ramsay L, Macaulay M, degli Ivanissevich S, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuvesson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmiroli N, Sjakste T, Ganal M, Powell W, Waugh R (2000) A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics. 156: 1997-2005.

Saal B, Korff M, Leon J, Pillen K (2011) Advanced-backcross QTL analysis in spring barley: IV. ocalization of QTL 3 nitrogen interaction effects for yieldrelated traits. Euphytica. 177: 223-239.

Salamini F, Özkan H, Brandolini A, Schäfer-Pregl R, Martin W (2002) Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. Nat. Rev. Genet. 3: 429-441

Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Roder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Niks RE, Graner A (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. Theor. Appl. Genet. 114: 1091-1103.

Xue D, Chen M, Zhou M, Chen S, Mao Y, Zhang G (2008). QTL analysis of flag leaf in barley (*Hordeum vulgare* L.) for morphological traits and chlorophyll content. J. Zhejiang Univ. Sci. 9: 938-943.

Xue D, Zhou M, Zhang X, Chen S, Wei K, Zeng F, Mao Y, Wu F, Zhang G (2010) Identification of QTLs for yield and yield components of barley under different growth conditions. J. Zhejiang Univ. Sci. 11: 169-176.

Zohary D, Hopf M (2000). Domestication of Plants in the Old World. Oxford Univ. Press, New York.