

دانشگاه تبریز

دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات

سال سوم / شماره چهارم / ۱۳۹۲ (۳۳۴-۳۲۱)

شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با تجمع آهن در دانه جمعیت های پلوئیدهای مضاعف جو

شیوا قیطران پورسهریق^۱، سید ابوالقاسم محمدی^{۲*} و بهزاد صادقزاده^۴

۱ و ۲- به ترتیب فارغ التحصیل کارشناسی ارشد و استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز،
۳- قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، ۴- استادیار موسسه تحقیقات دیم کشور، مراغه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۷)

چکیده

آهن یکی از عناصر ضروری، کم مصرف برای اکثر گیاهان می‌باشد که نقش مهمی در تثبیت ازت و فعالیت برخی از آنزیم-ها مانند کاتالاز، پراکسیداز و سیتوکروم اکسیداز دارد. به منظور مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با میزان و غلظت آهن در دانه جو، ۱۴۸ لاین هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی رقم دو ردیفه استرالیایی Clipper و رقم شش ردیفه بومی الجزایر Sahara3771 در شرایط گلخانه‌ای ارزیابی و صفات عملکرد دانه تک بوته، وزن هزار دانه، غلظت و محتوای آهن دانه اندازه‌گیری شد. تجزیه QTL بر اساس نقشه پیوستگی جمعیت مشتمل بر ۲۶ نشانگر رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP، ۲۴۶ نشانگر SSR و EST-SSR، ۲۳۸ نشانگر RFLP و یک نشانگر مورفولوژیک با پوشش ۱۰۹۹/۰۹ سانتی‌مورگان از ژنوم جو و متوسط فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر ۲/۳۷ سانتی‌مورگان انجام شد. از نظر کلیه صفات، تفاوت معنی‌دار بین لاین‌ها مشاهده شد و وجود تفکیک متجاوز در کلیه صفات نشان‌دهنده وجود ترکیبات آلی مطلوب والدین در نتاج بود. در مجموع، ۵۱۱ نشانگر در هفت گروه پیوستگی قرار گرفتند. شش QTL برای عملکرد دانه تک بوته مکان‌یابی شد که فقط یکی از آن‌ها دارای اثر افزایشی منفی بود. از سه QTL وزن هزار دانه، QTL واقع در کروموزوم 2H با اثر افزایشی مثبت، ۷۰ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را تبیین کرد. برای غلظت و محتوای آهن، به ترتیب ۶ و ۴ QTL شناسایی شده که ۵ و ۲ QTL اثر افزایشی منفی داشتند. اثر افزایشی منفی اغلب QTL‌های شناسایی شده برای غلظت و محتوای آهن تک بوته نشان‌دهنده نقش ال‌های والد Sahara3771 در افزایش تجمع آهن در نتاج است. دو ناحیه ژنومی مشترک برای QTL‌های برخی از صفات مورد مطالعه شناسایی شد که ممکن است ناشی از پیوسته بودن QTL‌ها یا اثر پلیوتروپیک آن‌ها باشد. با توجه به پیوستگی قوی نشانگر-های پیوسته با QTL‌های مکان‌یابی شده، این نشانگرها می‌توانند در برنامه‌های اصلاح به کمک نشانگر استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: جو، غلظت آهن، مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، نشانگرهای رتروترانسپوزونی

مقدمه

جو از قدیمی‌ترین گیاهان کشت شده در جهان است که به علت تحمل شرایط نامساعد محیطی، نیاز آبی کم و تطابق به محیط‌های مختلف، در اغلب نقاط جهان کشت شده و در محدوده وسیع‌تری از شرایط آب‌وهوایی و محیطی رشد می‌کند (Sharma et al., 2003). این گیاه رتبه پنجم تولید ماده خشک را پس از ذرت، گندم، برنج و سویا دارد. بر اساس آمارهای سازمان خواربار و کشاورزی جهانی (فائو)، طی سال‌های ۲۰۱۱-۱۹۹۵، متوسط سطح زیر کشت گیاه جو در جهان ۵۷/۸ میلیون هکتار با عملکردی بالغ بر ۱۴۱/۸ میلیون تن و متوسط ۲/۴۹ تن در هکتار و در ایران متوسط سطح زیر کشت ۱/۵۵ میلیون هکتار با عملکردی ۲/۷ میلیون تن در سال و متوسط ۱/۷۴ تن در هکتار بود (FAO, 2012).

آهن از عناصر ضروری کم مصرف برای اکثر گیاهان می‌باشد که نقش مهمی در تثبیت نیتروژن و فعالیت برخی آنزیم‌ها نظیر کاتالاز، پراکسیداز و سیتوکروم اکسیداز دارد (Welch et al., 1991; Blakrishnan, 2000). آهن در ایجاد رشد رویشی مناسب از طریق افزایش تعداد و سطح برگ، مشارکت در فتوسنتز، افزایش ارتفاع بوته و ماده خشک نقش دارد و بدین وسیله زمینه تشکیل و توسعه اجزای عملکرد دانه و در نتیجه افزایش عملکرد دانه را سبب می‌شود. اگرچه آهن در ساختمان کلروفیل شرکت ندارد، ولی کمبود آن سبب کاهش میزان کلروفیل شده و رنگ سبز برگ‌ها به زردی متمایل می‌شود که این پدیده کلروز نام دارد (Pinto et al., 2005).

در خاک‌های ایران کمبود آهن یکی از کمبودهای شایع می‌باشد که منجر به بروز زرد برگی، کاهش فتوسنتز و غلظت کلروفیل، کاهش وزن خشک بخش هوایی و ریشه، تغییر غلظت و محتوای سایر عناصر فلزی در بافت‌های گیاهی می‌شود که این تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی اغلب عملکرد گیاه را کاهش می‌دهند (Chen et al., 2004; Mahmoudi et al., 2005).

در دنیا نیز بیش از سه بیلیون نفر از سوءتغذیه ناشی از عناصر کم‌مصرف رنج می‌برند که نتیجه آن آسیب به سلامتی افراد و افزایش مرگ و میر است (Pfeifer and McClafferty, 2007). بنابراین، شناسایی و تولید ژنوتیپ‌هایی با کارایی جذب و تجمع بالای عناصر کم

مصرف از جمله آهن یکی از اهداف اصلاحی اغلب گیاهان از جمله غلات است (Zimmerman and Hurrel, 2002). لازمه این کار، شناسایی نواحی ژنومی دخیل در جذب و تجمع عناصر کم مصرف می‌باشد. در رابطه با مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده تجمع آهن در جو گزارشی ارائه نشده است ولی گزارش‌های محدودی در سایر گیاهان وجود دارد. نورتن و همکاران (Norton et al., 2010) با استفاده از جمعیت متشکل از ۷۹ لاین اینبرد نو ترکیب، حاصل از تلاقی ارقام برنج Bala (رقم هندی) و Azucena (رقم ژاپنی) و نقشه پیوستگی مشتمل بر ۱۶۴ نشانگر، QTL‌هایی را برای ۱۷ عنصر در برگ و دانه شناسایی کردند. آن‌ها در مجموع، ۳۶ QTL در برگ و ۴۱ QTL در دانه مکان‌یابی کردند که برخی از QTL‌ها در برگ و دانه مشترک بود. در مطالعه آن‌ها، برای غلظت آهن دانه چهار QTL با تبیین فنوتیپی ۱۶/۲، ۲۱/۴، ۹/۷ و ۱۵/۵ درصد شناسایی شد. استانگولیس و همکاران (Stangoulis et al., 2007) QTL‌هایی برای میزان IPG (فیتات)، Zn، P و Fe دانه در جمعیت لاین‌های هاپلوئید مضاعف برنج حاصل از تلاقی ارقام IP64 و Azucena گزارش کردند. برای غلظت Fe، سه QTL روی کروموزوم‌های ۲، ۸ و ۱۲ شناسایی شد که به ترتیب ۱۷، ۱۸ و ۱۴ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را تبیین می‌کردند. آن‌ها گزارش کردند که QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۱۲ برای غلظت Fe و Zn مشترک بود. لو و همکاران (Lu et al., 2008) در جمعیت متشکل از ۲۴۱ لاین اینبرد نو ترکیب حاصل از تلاقی ارقام هندی Minghui63 و Zhenshan، دو QTL روی کروموزوم‌های ۱ و ۹ به ترتیب با درجه تبیین فنوتیپی ۲۵/۱۸ و ۱۱/۱۱ برای محتوای Fe مکان‌یابی کردند.

تیواری و همکاران (Tiwari et al., 2009) در تلاقی بین *Triticum monococum* × *T. boeoticum*، دو QTL برای غلظت آهن در کروموزوم ۲A و ۷A به ترتیب با تبیین فنوتیپی ۱۲/۶ و ۱۱/۷ درصد گزارش کردند. جنک و همکاران (Genc et al., 2009) با استفاده از جمعیت هاپلوئید مضاعف گندم حاصل از تلاقی ارقام Cascades و RAC8752، یک QTL برای هر کدام از صفات غلظت آهن در بخش هوایی و دانه و وزن دانه در کروموزوم ۳D گزارش کردند. سینگ و همکاران (Singh et al., 2010)، در جمعیت لاین‌های اینبرد نو ترکیب

به همراه $\text{NH}_4\text{NO}_3=93$ ، $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}=0/2$ (میلی گرم در کیلوگرم) به خاک اضافه شد. ازت مورد نیاز گیاهان نیز هر دو هفته یکبار به همراه آبیاری تأمین شد. بعد از جوانه زنی کامل در مرحله دو برگگی، تعداد بوته‌ها در هر گلدان به هفت بوته تقلیل یافت. به منظور کاهش تأثیر میکروکلیمای داخل گلخانه، محل گلدان‌ها هر روز به صورت تصادفی تغییر داده شد. آبیاری هر روز تا سقف ۹۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای انجام و نیاز آبی با وزن کردن گلدان‌ها با آب دیونیزه تأمین شد. آزمایش در شرایط کمبود آهن انجام شد.

اندازه‌گیری غلظت Fe دانه در روی سه بوته صورت گرفت. بدین ترتیب که سنبله‌ها بعد از وزن کردن به کمک آسیاب پودر شدند. سپس ۰/۵ گرم از هر نمونه در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد در کوره به مدت ۱۴ ساعت به خاکستر تبدیل شد. خاکستر حاصل از هر لاین در ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک (۷/۳۰٪) به مدت ۳۰ دقیقه حل شد. محلول حاصل بعد از ته‌نشینی مواد ریز معلق (بعد از یک روز) توسط دستگاه ICP-MS برای تعیین میزان آهن قرائت شد. محتوای آهن در بذر با ضرب مقدار غلظت آهن در وزن بذر برای هر لاین محاسبه شد (Sadeghzadeh, 2008). علاوه بر غلظت و محتوای آهن، عملکرد تک بوته و وزن هزاردانه نیز اندازه‌گیری شد. پس از آزمون مفروضات تجزیه واریانس شامل نرمال بودن و توزیع یکنواخت خطاهای آزمایشی، تجزیه داده‌ها بر اساس مدل آماری طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

تجزیه پیوستگی و QTL

برای تجزیه پیوستگی، ابتدا آزمون انحراف از نسبت مندلی ۱:۱ برای نشانگرها با استفاده از نرم‌افزار MapDisto 1.7 (Lorieux, 2012) انجام و ۶۹ نشانگر که دارای انحراف تفرق بودند از تجزیه حذف شدند. نقشه پیوستگی با نرم افزار JoinMap 4 (Van Ooijin, 2006) با فرض حداقل $\text{LOD} \geq 3$ تهیه و داده‌های حاصل جهت برای تجزیه QTL به برنامه QTL Charthographer (Wang et al., 2005) منتقل شد. تجزیه QTL بر اساس روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب انجام و برای QTL‌های شناسایی شده اثر افزایشی، درصد تبیین واریانس فنوتیپی صفت محاسبه شد.

حاصل از تلاقی گونه‌های $T. boeiticum \times T. monococum$ دو QTL برای غلظت آهن دانه در کروموزوم‌های 2A و 7A به ترتیب با تبیین فنوتیپی ۱۲/۶ و ۱۱/۷ درصد شناسایی کردند. زو و همکاران (Xu et al., 2012)، در جمعیت متشکل از ۱۸۲ لاین اینبرد-نو-ترکیب گندم حاصل از تلاقی ارقام Xiaoyan54 و Jing411، دو QTL کوچک اثر برای غلظت آهن دانه در کروموزوم‌های 5A1 و 5A2 (به ترتیب با تبیین فنوتیپی ۳/۴۳ و ۳/۲۷ درصد) مکان‌یابی کردند.

با توجه به اهمیت جو به عنوان یک گیاه زراعی مهم در تغذیه انسان، صنایع مالت‌سازی، و نیز تغذیه دام و طیور اهداف مطالعه حاضر عبارت بودند از:

- اشباع نقشه پیوستگی جمعیت با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی
- مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با غلظت و محتوای آهن در بخش هوایی جو طی مراحل رشد رویشی، رسیدگی کامل و دانه آن و تعیین اثر افزایشی و سهم هر QTL در تبیین تغییرات فنوتیپی
- معرفی نشانگرهای مناسب برای استفاده در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی

مواد گیاهی مورد استفاده شامل ۱۴۸ لاین هاپلوئید مضاعف جو، حاصل از تلاقی ارقام Clipper (بهاره، دو ردیفه و اصلاح شده در استرالیا) و Sahara3771 (بومی الجزایر، پائیزه و شش ردیفه و کاراً در جذب آهن) بود. این جمعیت در دانشگاه آدلاید تهیه و از دانشگاه استرالیایی غربی کشور استرالیا دریافت شد.

ارزیابی فنوتیپی تحت شرایط گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. لاین‌های هاپلوئید مضاعف به همراه والدین در گلدان‌هایی به ابعاد $70 \times 70 \times 200$ میلی‌متر و حاوی ۱/۵ کیلوگرم خاک شنی با $\text{pH} = 6/1$ و ۱/۲ درصد مواد آلی، ۳/۳ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم، ۰/۰۴ میلی‌گرم روی در کیلوگرم کشت شدند. تا رسیدگی کامل مواد غذایی لازم شامل $\text{K}_2\text{SO}_4=145$ ، $\text{KH}_2\text{PO}_4=9$ ، $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}=147$ ، $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}=21$ ، $\text{H}_3\text{BO}_3=0/7$ ، $\text{MnSO}_4.H_2\text{O}=15$ ، $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}=2$

نتایج و بحث

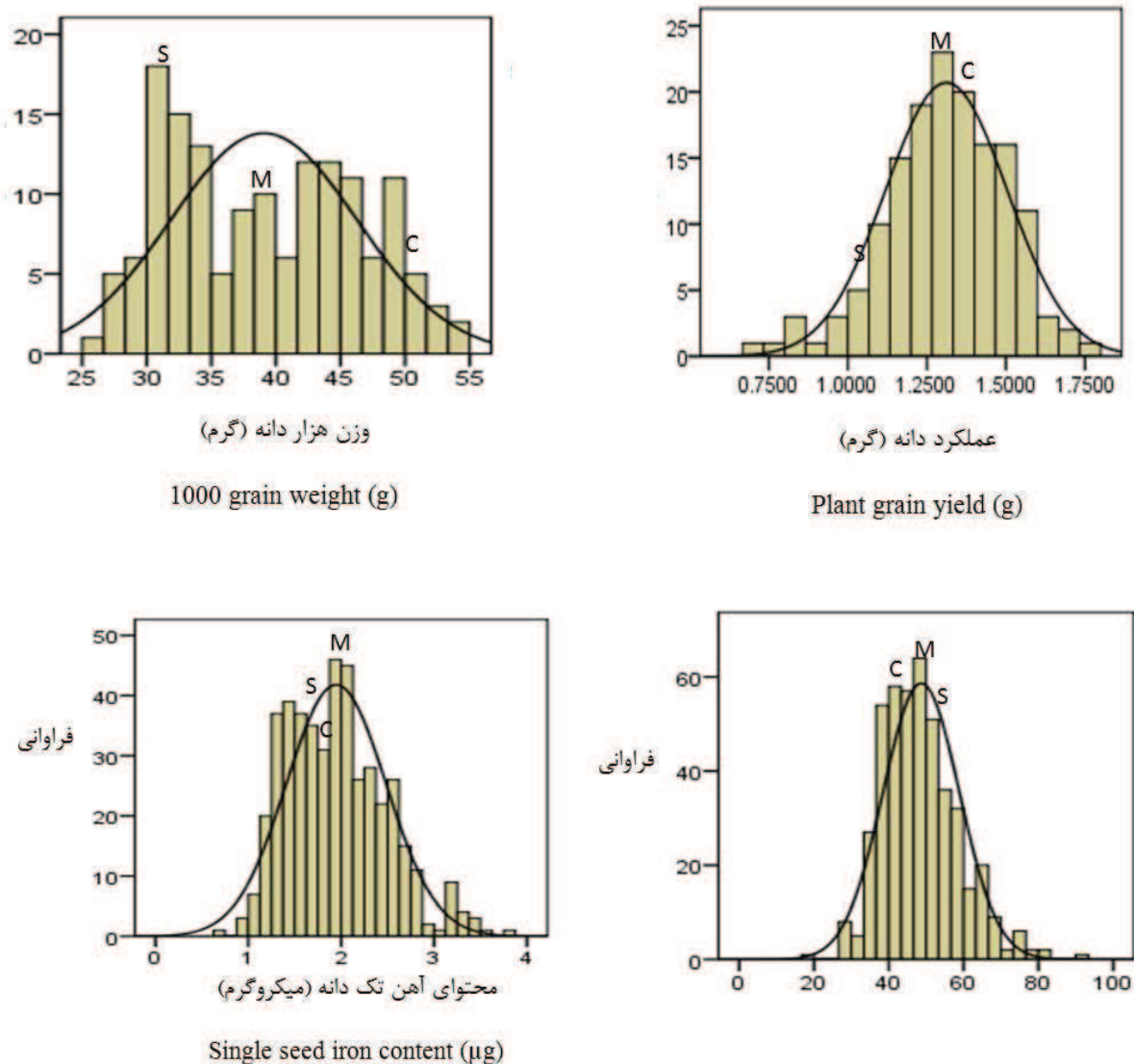
توزیع فنوتیپی صفات مورد مطالعه در جمعیت

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین لاین‌ها از نظر کلیه صفات مورد بررسی تفاوت معنی‌دار وجود داشت. توزیع فنوتیپی صفات مورد مطالعه در شکل ۱ آورده شده است. عملکرد دانه تک بوته در جمعیت دارای دامنه تغییرات ۰/۷۱ تا ۱/۷۴ گرم با میانگین ۱/۳۱ گرم بود که نشان‌دهنده تنوع بالای این صفت در جمعیت می‌باشد. ارقام Clipper و Sahara3771 به ترتیب دارای میانگین عملکرد دانه تک بوته، ۱/۳۷ و ۱/۱۳ گرم بودند ($LSD_{0.05} = 0.20$). کریگوی و همکاران (Kirigwi *et al.*, 2007) میانگین عملکرد دانه گندم را ۳/۰۸ گرم و دامنه تغییرات را بین ۱/۷۸-۴/۴۲ گرم بدست آوردند. در این جمعیت نیز تفکیک متجاوز دیده شد. وزن هزار دانه لاین‌ها در محدوده ۵۳/۹۴-۲۵/۴۹ گرم بود و تفاوت ۲۸/۴۵ گرم بین حداکثر و حداقل وزن هزاردانه وجود داشت که بیان‌گر وجود تنوع بالا از نظر این صفت در جمعیت لاین‌های هاپلوئید مضاعف است. میانگین وزن هزار دانه در جمعیت ۳۹/۰۵، برای رقم Clipper، ۵۰/۳۵ و رقم Sahara3771، ۳۱/۸۵ گرم بدست آمد و تفاوت والدین از نظر این صفت نیز معنی‌دار بود ($LSD_{0.05} = 2.92$). تغییرات غلظت آهن دانه در جمعیت، در محدوده ۳۱/۳۳ تا ۷۲ با میانگین ۴۸/۶۸ میلی‌گرم در کیلوگرم بود و والدین Clipper و Sahara3771 به ترتیب میانگین ۳۹/۶۶ و ۵۲/۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم داشتند ($LSD_{0.05} = 10.73$). تیواری و همکاران (Tiwari *et al.*, 2009) محدوده غلظت آهن دانه گندم را در لاین‌های اینبرد نوترکیب بین ۱۷/۸ تا ۶۹/۷ با میانگین ۳۱/۶ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش کردند. میانگین والد Tb5088 ۴۰/۱ و والد Tm14087 ۲۳/۸ میلی‌گرم در کیلوگرم بود که در این جمعیت برای صفت مورد نظر تفکیک متجاوز گزارش نشد. میانگین محتوای آهن دانه Clipper و Sahara3771 به ترتیب برابر ۱/۸۹ و ۱/۶۲ میکروگرم و محدوده این صفت در جمعیت بین ۰/۶۷ تا ۳/۸۳ میکروگرم با میانگین برابر با ۱/۹۵ میکروگرم بود. وجود لاین‌های خارج از حوزه والدین، نشانگر تفکیک متجاوز در جمعیت برای کلیه صفات مورد مطالعه بود.

تجزیه QTL

نقشه پیوستگی جمعیت مشتمل بر ۵۱۱ نشانگر SSR، EST-SSR، RFLP، IRAP، REMAP و یک نشانگر مورفولوژیک منطبق بر هفت کروموزوم جو، ۱۰۹۹/۰۹ سانتی‌مورگان از ژنوم جو را با متوسط فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر ۲/۳۷ سانتی‌مورگان پوشش داد طول نقشه کروموزوم‌ها بین ۱۵۷/۲۱ (کروموزوم ۲) تا ۲۸۰/۶۹ (کروموزوم ۷) سانتی‌مورگان متغیر بود (شکل ۲).

با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، شش QTL در کروموزوم‌های 1H، 2H، 4H، 5H و 6H برای عملکرد دانه تک بوته مکان‌یابی شد. QTL واقع بین نشانگرهای MGB391-Vrs1 در کروموزوم 2H، با ۲۹ درصد تبیین واریانس فنوتیپی، بزرگ‌ترین QTL بود. اثر افزایشی منفی این QTL نشان داد که نتاج دارای الل Sahara3771 در این جایگاه میانگین عملکرد بیشتری در مقایسه با نتاج دارای الل والد Clipper بودند ولی برای پنج جایگاه دیگر، اثر افزایشی مثبت بود که بیانگر توارث الل مطلوب در این جایگاه‌ها از والد Clipper به نتاج است. در مجموع، شش QTL مکان‌یابی شده ۷۶ درصد از تغییرات فنوتیپی عملکرد دانه تک بوته را در جمعیت لاین‌های هاپلوئید مورد مطالعه تبیین کردند (جدول ۱). سال و همکاران (Saal *et al.*, 2011) با استفاده از جمعیت BC₂F₉ حاصل از تلاقی ارقام جو Scarlett و JSR42، ۳، ۵، ۳ و ۲ QTL به ترتیب در کروموزوم‌های 1H، 2H، 5H و 6H گزارش کردند. QTL پیوسته با نشانگر GBM1052 در کروموزوم 2H با ۲۵ درصد بیشترین مقدار تبیین فنوتیپی صفت را داشت. کواستا-مارکوس و همکاران (Cuuesta-Marcos *et al.*, 2009) در جمعیت لاین هاپلوئیدهای مضاعف جو حاصل از تلاقی ارقام Beka و Mogador با استفاده از ۲۱۵ نشانگر، ۱، ۳ و ۱ QTL به ترتیب در کروموزوم‌های 3H، 5H و 7H با تبیین فنوتیپی ۴۰ درصد برای عملکرد دانه گزارش کردند. بائور و همکاران (Bauer *et al.*, 2005) در یک جمعیت متشکل از ۳۰۱ لاین BC₂DH جو حاصل از تلاقی ارقام Scarlett و JSR42-8، یازده QTL روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 3H، 5H و 7H برای عملکرد دانه مکان‌یابی کردند.

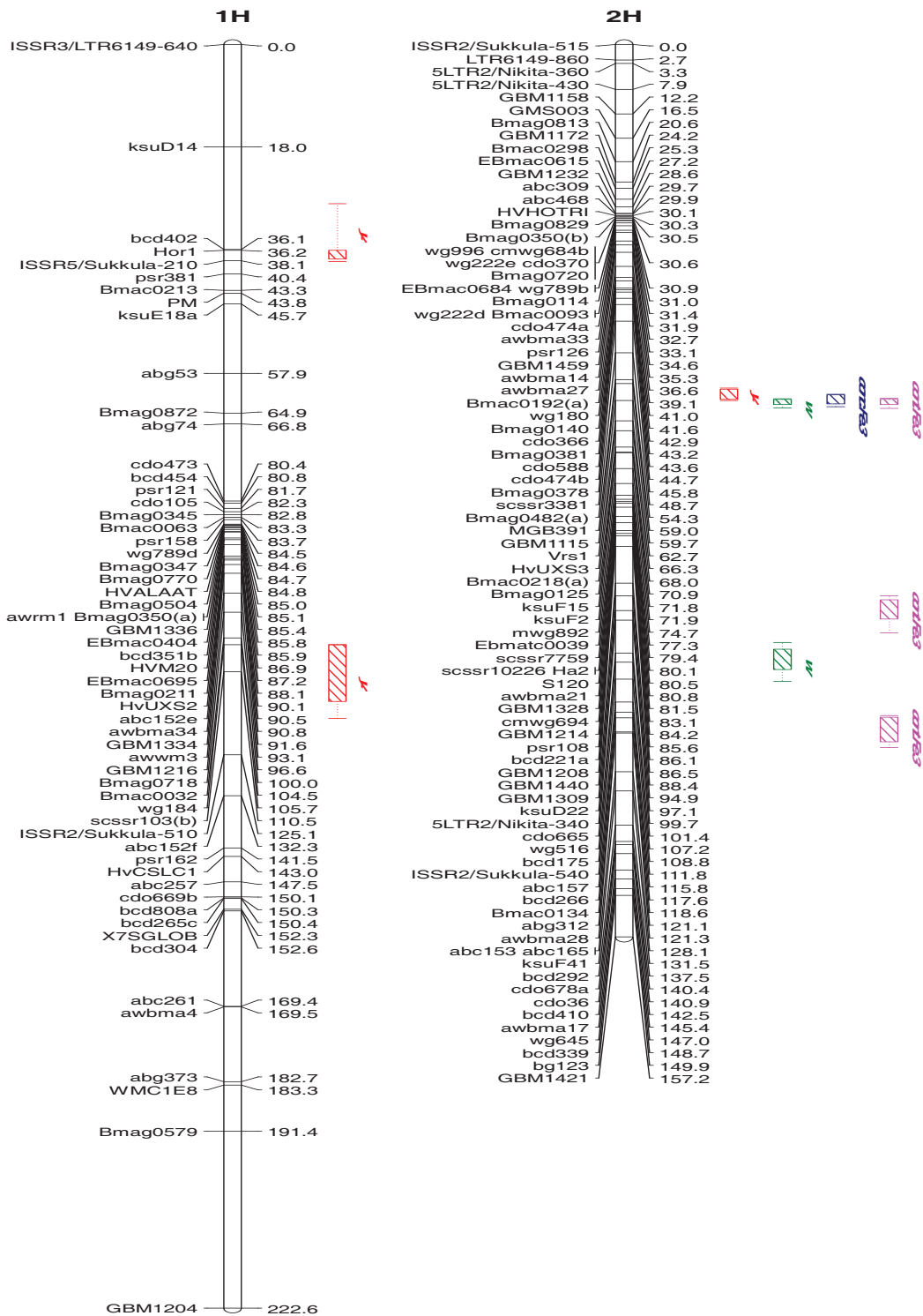


شکل ۱- توزیع فنوتیپی صفات گیاهی در لاین‌های هاپلوئید مضاعف جو حاصل از تلاقی ارقام Clipper و Sahara3771 M: میانگین جمعیت، S: میانگین Sahara3771 و C: میانگین Clipper.

Figure 1. Phenotypic distribution of plant characteristics in barley doubled haploid lines derived from the Clipper and Sahara3771 M: population mean, S: Sahara3771 and C: Clipper means.

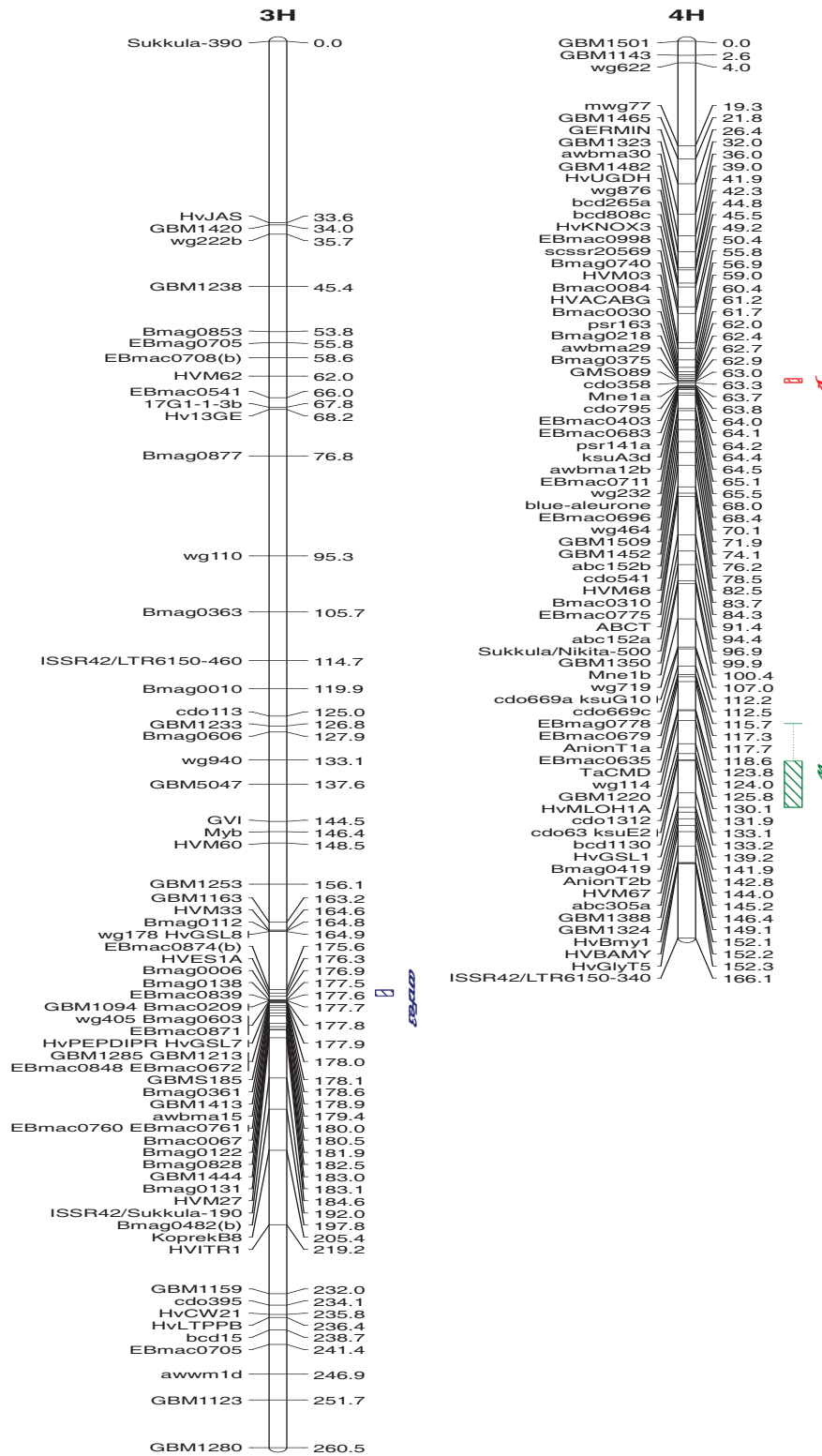
رقم جو بهاره Kym و Bleheim، چهار QTL برای وزن هزار دانه روی کروموزوم‌های 2H، 3H، 4H و 5H شناسایی کردند. لی و همکاران (Li *et al.*, 2006) با استفاده از جمعیت BC3 حاصل از تلاقی ارقام Brenda و HS584، ۲ و ۱ QTL به ترتیب در کروموزوم‌های 2H و 6H با تبیین فنوتیپی ۵/۷۳، ۱۱/۰۶ و ۱۳/۸۹ درصد مکان‌یابی کردند. لی (Li, 2004) تنها یک QTL برای وزن هزاردانه در کروموزوم 2H در جمعیت BC₃DH، متشکل از ۱۸۱ لاین حاصل از تلاقی Brenda و HS213 گزارش کردند.

برای وزن هزار دانه، سه QTL شناسایی شد که ۲ و ۱ QTL به ترتیب در کروموزوم‌های 2H و 4H قرار داشتند. QTL واقع بین نشانگرهای GBM1115-HvUXS3 در کروموزوم 2H، به عنوان یک QTL بزرگ اثر، ۷۰ درصد از واریانس فنوتیپی وزن هزار دانه را تبیین نمود. این QTL دارای اثر افزایشی مثبت بود که نشان دهنده نقش الل والد Clipper در افزایش وزن هزار دانه نتاج است. دو QTL مکان‌یابی شده دیگر به ترتیب دارای تبیین فنوتیپی ۵ و ۳ درصد بودند (جدول ۱). بی ژانت و همکاران (Bezant *et al.*, 1997) با استفاده از ۹۹ نشانگر RFLP در جمعیت هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی و



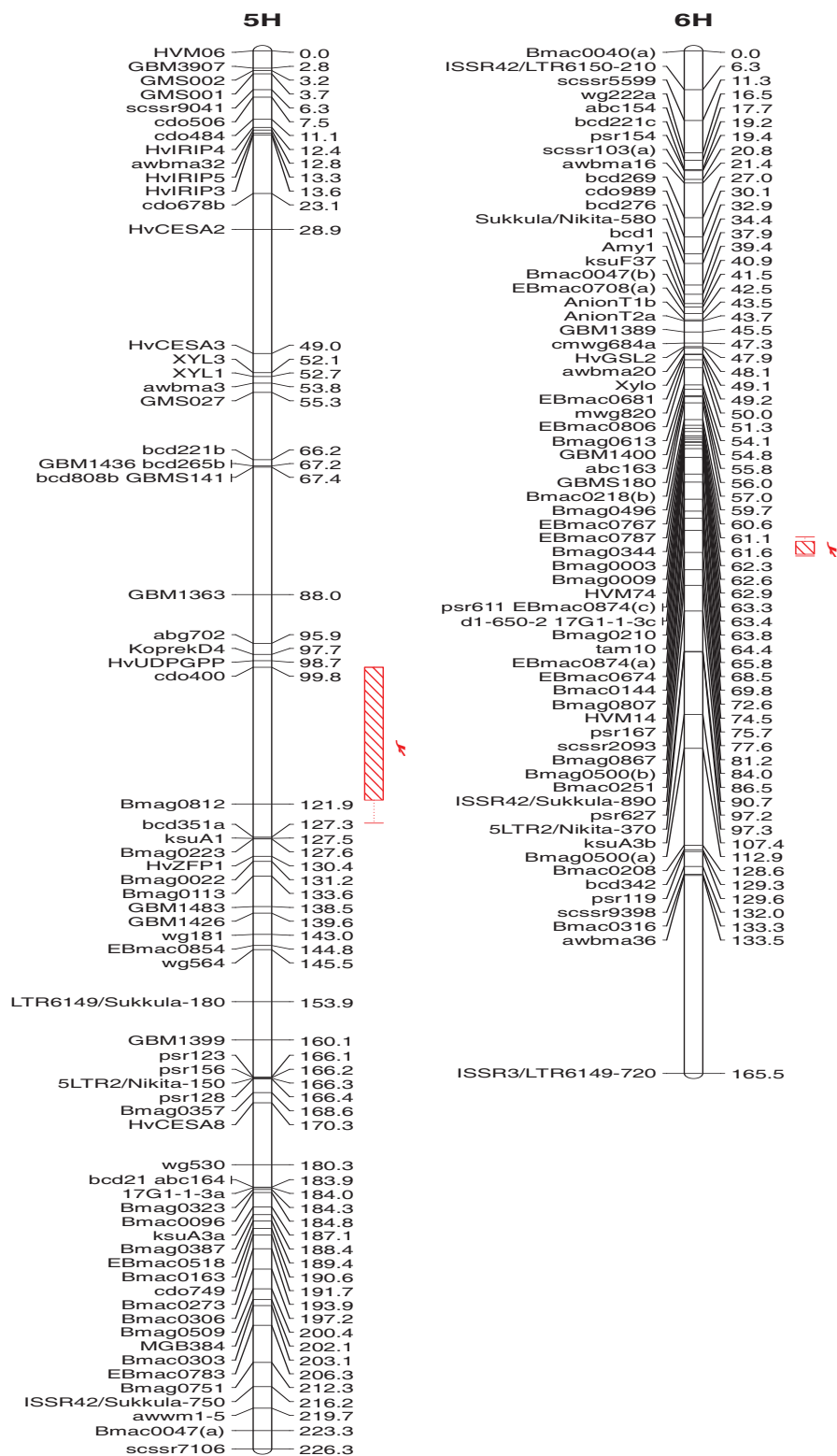
شکل ۲- مکان کروموزومی QTLهای شناسایی شده برای صفات گیاهی در جمعیت لاین‌های هاپلوئید مضاعف جو حاصل از تلاقی ارقام Sahara3771 و Clipper.

Figure 2. Chromosomal location of the QTLs identified for plant characteristics in barley doubled haploid lines population from a cross between Clipper and Sahara3771 cultivars.



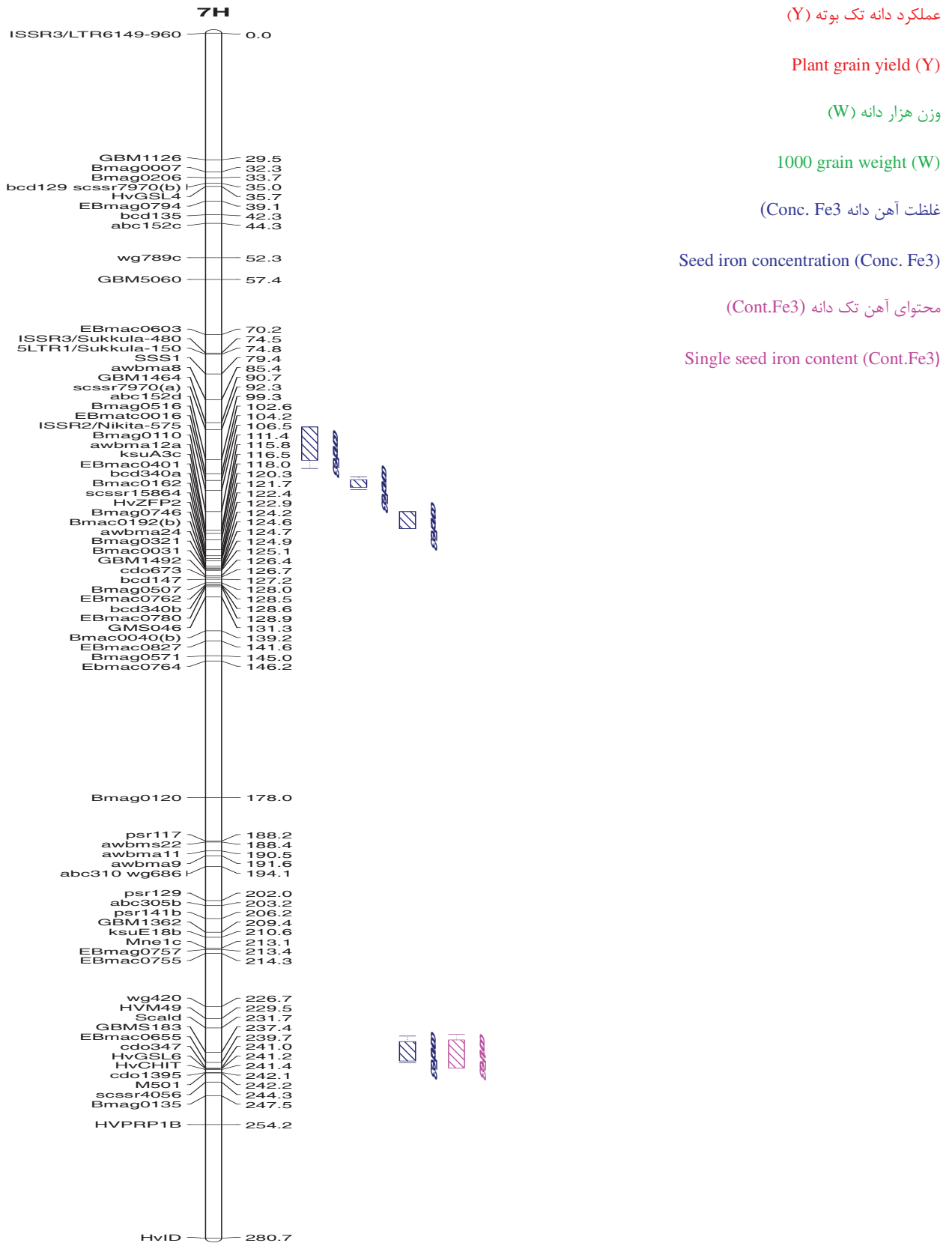
ادامه شکل ۲

Figure 2. Continued



ادامه شکل ۲

Figure 2. Continued



ادامه شکل ۲

Figure 2. Continued

جدول ۱- جایگاه، فاصله از نشانگر نزدیک، کروموزوم، LOD، اثر افزایشی و درصد تبیین واریانس فنوتیپی QTLهای مرتبط با صفات گیاهی جمعیت لاین‌های هاپلوئید مضاعف جو
 Table 1. Locus, distance from the near marker, chromosome, LOD, additive effect and percentage of phenotypic variance determination of QTLs related to plant characteristics in barley double haploid lines population

صفت Trait	نشانگرهای مجاور Flanking markers	فاصله از نشانگر نزدیک (cM) Distance from the nearest marker (cM)	کروموزوم Chromosome	LOD	اثر افزایشی Additive effect	اثر QTL (%) QTL effect (%)
عملکرد دانه Plant grain yield	<u>bcd402-<u>ISSR5/sukkkula*</u></u>	3.34	1	3.34	0.06	10
	<u>Bmac0032-scscr103(b)</u>	3.69	1	3.69	0.05	7
	<u>MGB391-Vrs1</u>	9.84	2	9.84	-0.11	29
	<u>Bmag0375-cdo358</u>	4.24	4	4.24	0.06	8
	<u>HvUDPGP-Bmag0812</u>	3.77	5	3.77	0.06	9
	<u>Psr167-Bmag0867</u>	6.84	6	6.84	0.07	13
وزن هزار دانه 1000 grain weight	<u>GMB1115-HvUXS3</u>	3.04	2	42.55	6.17	70
	<u>Wg516-ISSR2/Sukku</u>	1.64	2	6.11	-1.73	5
	<u>Bcd1130-Bmag0419</u>	6.02	4	3.97	-1.37	3
	<u>GBM1115-HvUXS3</u>	3.03	2	15.63	4.80	29
غلظت آهن دانه Seed iron concentration	<u>EBmac0874(b)-Bmag0006</u>	0.61	3	3.12	-1.19	4
	<u>GBM1464-abc152d</u>	1.63	7	3.94	-2.19	6
	<u>Bmag0516-ISSR2/Nikitta</u>	1.58	7	4.15	-2.27	6
	<u>ISSR2/Nikita-awbma12a</u>	4.90	7	3.27	-2.19	6
	<u>Scald-EBmac0655</u>	5.71	7	11.59	-3.97	20
	<u>GBM1115-HvUXS3</u>	3.03	2	23.02	0.33	39
محتوای آهن تک دانه Single seed iron content	<u>GBM1309-5LTR2/Nikita</u>	2.14	2	3.11	0.11	4
	<u>abg3112-abc153</u>	0.15	2	4.51	-0.109	4
	<u>Scald-EBmac0655</u>	5/71	7	7.36	-0.145	8

* نشانگرهایی که زیرشان خط کشیده شده است، نزدیکترین نشانگرها به QTL هستند.

* Underlined markers are the nearest markers to QTL.

QTL های مشترک برای صفات مورد مطالعه

در مجموع، ۱۹ QTL برای صفات مورد مطالعه شناسایی شد که مکان کروموزومی برخی از این QTL ها مشترک بود. این امر احتمالاً به دلیل پیوستگی ژنتیکی و یا اثر پلیوتروپیک ژنی است. ناحیه بین نشانگرهای GBM1115-HvUXS3 که در کروموزوم 2H قرار دارد و QTL های وزن هزار دانه، غلظت آهن دانه و محتوای آهن دانه را شامل می‌شود. ناحیه بین نشانگرهای Scald-EBmac0655 واقع در کروموزوم 7H، QTL های غلظت و محتوای آهن دانه مکان‌یابی شدند.

نتیجه‌گیری

وجود تفکیک متجاوز برای کلیه صفات مورد مطالعه نشان‌دهنده ترکیب آلل‌های مطلوب والدین در نتاج بود که می‌تواند برای اهداف اصلاحی بعدی و یا گزینش ژنوتیپ‌های جو استفاده شود. شناسایی QTL های با اثرات افزایشی مثبت و منفی، بیانگر انتقال آلل‌های مطلوب در این جایگاه از هر دو والد به نتاج بود که والدین حاضر می‌توانند در برنامه‌های اصلاح جو ایران جهت افزایش کارایی جذب آهن استفاده شوند. برخی از QTL های شناسایی شده با تبیین درصد بالاتری از تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه به عنوان QTL بزرگ اثر شناخته شدند که نشانگرهای پیوسته با این QTL ها می‌توانند در برنامه‌های اصلاح به کمک نشانگر جهت گزینش لاین‌های برتر و انتقال آلل‌های مطلوب از والدین مورد مطالعه استفاده شوند.

سپاسگزاری

از قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز برای تأمین اعتبار پروژه و دانشگاه استرالیای غربی برای تهیه مواد ژنتیکی سپاسگزاری می‌شود.

از شش QTL مکان‌یابی شده برای غلظت آهن دانه ۱، ۴ و QTL به ترتیب در کروموزوم‌های 2H، 3H و 7H قرار گرفتند. QTL واقع در کروموزوم 2H، بین نشانگرهای GBM1115-HvUXS3 با ۲۹ درصد تبیین واریانس فنوتیپی صفت تنها QTL با اثر افزایشی مثبت بود که بیانگر توارث آلل مطلوب از والد Clipper به نتاج می‌باشد. اثر افزایشی منفی سایر QTL ها نشان‌دهنده نقش مؤثر Sahara3771 در جذب آهن می‌باشد. شش QTL مکان‌یابی شده در مجموع ۷۱ درصد از واریانس فنوتیپی غلظت آهن دانه را تبیین کردند (جدول ۱). زو و همکاران (Xu et al., 2012) برای غلظت آهن دانه در گندم دو QTL کوچک اثر شناسایی کردند که روی کروموزوم‌های 5A1 و 5A2 قرار داشتند و به ترتیب پیوسته به نشانگرهای Xgwm154-Xbarc186 و Xbarc223.1-Xswes157 بودند. پلگ و همکاران (Peleg et al., 2009) با استفاده از ۱۵۲ لاین اینبرد نو ترکیب گندم یک QTL برای غلظت آهن دانه شناسایی کردند که پیوسته به نشانگر Xgwm154 بود. برای محتوای آهن دانه، ۳ و ۱ QTL به ترتیب در کروموزوم 2H و 7H شناسایی شد. در کروموزوم 2H، QTL مکان‌یابی شده در حد فاصل نشانگرهای GBM1115-HvUXS3، با ۳۹ درصد تبیین واریانس فنوتیپی صفت دارای اثر افزایشی مثبت بود. بنابراین، در این جایگاه آلل والد Clipper در مقایسه با الل Sahara3771 سبب افزایش محتوای آهن نتاج شده است. در مجموع، این چهار QTL ۵۵ درصد از واریانس فنوتیپی محتوای آهن دانه را تبیین کردند. (جدول ۱). گارسیا الیویرا و همکاران (Carcioliveria et al., 2009) با استفاده از لاین اینترگرسیون برای محتوای آهن دانه در برنج، دو QTL شناسایی کردند که در کروموزوم‌های ۲ و ۹ واقع بوده و پیوسته به نشانگرهای RM6641 و RM296 بودند.

References

- Bauer, M. A., Hoti, F., Vonkorff, M., Pillen, K., Leon, J. and Sillanpaa, M. J. 2009. Advanced backcross-QTL analysis in spring barley (*Hordeum vulgare ssp. spontaneum*) comparing a REML versus a bayesian model in multi environmental field traits. **Theoretical and Applied Genetics** 119: 105-123.
- Bezant, J., Laurie, D., Pratchett, N., Chojecki, J. and Kearsley, M. 1997. Mapping QTL controlling yield and yield components in a spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross using marker regression. **Molecular Breeding** 3: 29-38.

- Blakrishnan, K. 2000.** Peroxidase activity as an indicator of the iron deficiency in banana. **Journal of Plant Physiology** 5: 389-391.
- Chen, Y., Shi, J., Tin, G., Zheng, S. and Li, Q. 2004.** Fe deficiency induces Cu uptake and accumulation in *Commelia communis*. **Plant Science** 166: 1371-1377.
- Cuuesta-Marcos, A., Casas, A. M., Hayes, P. M., Gracia, M. P., Lasa, J. M., Ciudad, F., Codesal, P., Molina, J. L. and Iगतua, E. 2009.** Yield QTL affected by heading date in Mediterranean grown barley. **Plant Breeding** 128: 46-53.
- FAO. 2012.** FAOSTAT. www.faostat.fao.org.
- Garciaoliveria, A. L., Tan, L., Yongcai, F. M. and Sun, C. H. 2009.** Genetic identification of quantitative trait loci for contents of mineral nutrients in rice grain. **Journal of Integrative Plant Biology** 51: 84-92.
- Genc, Y., Verbyla, A. P., Torun, A. A., Cakmak, I., Willsmore, K., Wallwork, H. and McDonald, G. K. 2009.** Quantitative trait loci analysis of zinc efficiency and grain zinc concentration in wheat using whole genome average interval mapping. **Plant and Soil** 314: 49-66.
- Kirigwi, F. M., Van Ginkel, M. and Brown-Guedira, G. 2007.** Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. **Molecular Breeding** 20: 401-413.
- Li, J. 2004.** Mapping of new microsatellite markers identification of quantitative trait locus (QTL) for agronomically important traits in barley. M. Sc. Dissertation, Martin Luther University, Halle-Wittenberg, China.
- Li, J. Z., Huang, X. Q., Heinrichs, F., Ganal, M. W. and Roder, M. S. 2006.** Analysis of QTLs for yield components, agronomic traits, and disease resistance in an advanced backcross population of spring barley. **Genome** 49: 454-466.
- Lorieux, M. 2012.** MapDisto: Fast and efficiency computation of genetic linkage map. **Molecular Breeding** 30: 1231-1235.
- Lu, K., Li, L., Zheng, X., Zheng, Z., Mou, T. and Hu, Z. 2008.** Quantitative trait loci controlling Cu, Ca, Zn, Mn and Fe content in rice grain. **Journal of Genetics** 87: 305-310.
- Mahmoudi, H., Ksouri, R., Gharsalli, M. and Lachala, M. 2005.** Difference in responses to iron deficiency between legumes: Lentil (*Lens culinaris*) and chickpea (*Cicer arietinum*). **Journal of Plant Physiology** 162: 1237-1245.
- Norton, G. J., deacan, C. M., Xiong, L., Huang, S., Meharg, A. A. and Price, A. H. 2010.** Genetic mapping of rice genome in leaves and grain: Identification of QTLs 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. **Plant and Soil** 329: 139-153.
- Peleg, Z., Cakmak, I., Ozturk, L., Yazici, A., Jun, Y., Budak, H., Korol, A. B., Fahima, T. and Saranga, Y. 2009.** Quantitative trait loci conferring grain mineral nutrient concentrations in durum wheat × wild emmer wheat RIL population. **Theoretical and Applied Genetics** 119: 353-369.
- Pfeifer, W. H. and McClafferty, B. 2007.** Harvest plus: Breeding crops for better nutrition. **Crop Science** 47: S88-S105.
- Pinto, A., Mota, M. and Varennes, A. 2005.** Influence of organic matter on the uptake of zinc, copper and iron by sorghum plants. **Science and Total Environment** 326: 239-247.
- Saal, B., Von Korff, M., Leon, J. and Pillen, K. 2011.** Advanced-backcross QTL analysis in spring barley: IV. Localization of QTL × nitrogen interaction effects for yield-related traits. **Euphytica** 177: 223-239.
- Sadeghzadeh, B. 2008.** Mapping of chromosome regions associated with seed Zn accumulation in barley. Ph. D. Dissertation, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, The University of Western Australia, Perth, Australia.
- Sharma, S. N., Sain, R. S. and Sharma, R. K. 2003.** The genetic control of the flag leaf length in normal and late sown durum wheat. **Journal of Agriculture and Science** 141: 323-331.
- Singh, K., Chhuneja, P., Tiwari, V. K., Rowat, N., Neelam, K., Aggarwal, R., Malik, S., Keller, B. and Dhaliwal, H. S. 2010.** Mapping of QTL for grain iron and zinc content in diploid A genome wheat and validation of these loci in U and S genome. Proceeding of XVIII Plant and Animal Genome Conference. San Diego, California, USA.
- Stangoulis, J. C. R., Huynh, B. L., Choi, E. Y. and Graham, R. D. 2007.** Quantitative trait loci for phytate in rice grain and their relationship with grain micronutrient content. **Euphytica** 154: 289-294.

- Tiwari, V. K., Rawat, N., Chuneja, P., Neelam, K., Aggarwal, R., Randhawa, G. S., Dhaliwal, H. S., Keller, B. and Sindh, K. 2009.** Mapping of quantitative trait loci for grain iron and zinc concentration in diploid A genome wheat. **Journal of Heredity** 100: 771-776.
- Van Ooijen, J. W. 2006.** JoinMap ver. 4: Software for the calculation of genetic linkage map in experimental population. Kyazma B. V., Wageningen, The Netherlands.
- Wang, S., Basten, C. J. and Zeng, Z. B. 2005.** Windows QTL Cartographer ver. 2.5 011. Raleigh, NC: Department of Statistics, North Carolina State University, USA.
- Welch, R. M., Allaway, W. H., House, W. A. and Kubota, I. 1991.** Geographic distribution of trace element problems. In: Movdaredt, J. J., Lox, F. R., Shuman, L. M. and Welch, R. M. (Eds.), *Micronutrients in agriculture* (2nd ed.). SSSA Book Series, No. 4, Madison, WI USA, pp: 31-57.
- Xu, Y., An, D., Liu, D., Zhang, A., Xu, H. and Li, B. 2012.** Molecular mapping of QTLs for grain zinc, iron and protein concentration of wheat across two environments. **Field Crops Research** 138: 57-62.
- Zimmerman, M. and Hurrell, R. 2002.** Improving iron, zinc and vitamin A nutrition through plant biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology** 13: 142-145.

Identification of genomic regions associated with iron accumulation at seed of barley doubled haploid population

Shiva Gheitaran Poorsahrigh¹, Seyed Abolghasem Mohammadi^{2,3*} and Behzad Sadeghzadeh⁴

1 and 2. Former Graduate Student and Prof., respectively, Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, 3. Center of Excellence in Cereal Molecular Breeding, Faculty of Agriculture, Tabriz University, 4. Dryland Agricultural Research Institute, Maragheh

(Received: November 10, 2013- Accepted: January 27, 2014)

Abstract

Iron is one of the essential micronutrient, which has an important role in nitrogen fixation and activity of some enzymes such as catalase, peroxidase and cytochrome oxidase. To map QTLs for the traits associated with iron accumulation in barley, 148 doubled haploid lines derived from a cross between Clipper an Australian two rowed cultivar and Sahara3771 Algerian six rowed landrace were evaluated under greenhouse condition and single plant grain yield, 1000 kernel weight, single plant iron concentration and content at grain were measured. To saturate linkage map of the population, 26 retrotransposone markers, IRAP and REMAP markers, 246 SSR and EST-SSR, 238 RFLP and one morphological marker were used and covered 1099.09 cM of barley genome with an average distance of 2.37 cM between two adjacent markers. Transgressive segregation was observed for all traits indicating the presence of desirable parental allele combinations in the progenies. In total, 511 polymorphic markers were mapped in 7 linkage groups. For single plant grain yield, six QTLs were mapped with positive additive effects except one. Three QTLs were identified for seed weight which QTL on 2H with positive additive effect explained 70% of the phenotypic variation. For single plant iron concentration and content at grain six and four QTLs were detected, respectively that five and two QTLs had negative additive effects. QTLs had negative additive effects indicating the role of Sahara3771 alleles in increasing iron accumulation in offspring. Two common genomics regions for the QTLs of some traits were identified which could be due to linkage between the QTLs or their pleiotropic effect. Given the strong linkage markers associated with QTL positioning, these markers can be used in marker-assisted breeding programs.

Keywords: Barley, Composite interval mapping, Iron concentration, Retrotransposone markers

*Corresponding author: mohammadi@tabrizu.ac.ir