



تحقیقات غلات

دوره نهم / شماره دوم / تابستان ۱۳۹۸ (۱۹۲-۱۷۹)

شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با مقاومت گیاهچه‌ای به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو با استفاده از روش تجزیه ارتباطی

محمدامین مزینانی^۱، سعید نواب‌پور^{۲*}، رضا اقنوم^۳، خلیل زینلی‌نژاد^۴ و محمدعلی دهقان^۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۴

چکیده

بیماری لکه قهوه‌ای معمولی با عامل قارچی *Cochliobolus sativus* یکی از بیماری‌های مهم برگی جو است. به‌منظور شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با مقاومت گیاهچه‌ای به این بیماری در یک جمعیت جو بهاره دو ردیفه اروپایی شامل ۱۴۲ رقم تجاری، از داده‌های ژنوتیپی ۴۰۷ نشانگر AFLP و SSR و داده‌های فنوتیپی حاصل از واکنش این ارقام نسبت به چهار جدایه عامل بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو (جدایه‌های Csh-1 و Csh-16 از جو و Cst-42 و Cst-151 از گندم) استفاده شد. این جدایه‌ها از استان‌های مازندران، گلستان و خراسان رضوی جمع‌آوری شدند. نتایج نشان داد که بیش‌تر ارقام مورد مطالعه در مرحله گیاهچه‌ای نسبت به جدایه‌های Csh-16 و Cst-42 مقاوم بودند، اما بیش‌ترین تعداد واکنش حساسیت نسبت به جدایه‌های Csh-1 و Cst-151 مشاهده شد. بررسی ساختار جمعیت، لاین‌های مورد مطالعه را به دو زیرجمعیت احتمالی (K=2) تقسیم کرد. تجزیه ارتباطی با استفاده از مدل خطی عمومی (GLM) به ترتیب شش و دوازده مکان ژنی و با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) به ترتیب سه و چهار مکان ژنی مرتبط با مقاومت به جدایه‌های حاصل از برگ جو و گندم در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$) شناسایی شد. این مکان‌های ژنی روی کروموزوم‌های 2H، 3H، 5H، 6H و 7H نقشه‌یابی شدند. تمامی مکان‌های ژنی شناسایی شده اختصاصی هر جدایه بودند و فقط نشانگر Bmag0225-161 با مقاومت به دو جدایه Cst-151 و Csh-1 مرتبط بود. نشانگرهای شناسایی شده پس از تأیید و اعتبارسنجی می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی برای تولید ارقام مقاوم به بیماری مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: نقشه‌یابی ارتباطی، AFLP، *Cochliobolus sativus*، SSR

۱- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۴- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۵- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

* نویسنده مسئول: navabpour@gau.ac.ir

مقدمه

بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو با عامل قارچی *Cochliobolus sativus* یکی از بیماری‌های مهم برگی جو در مناطق گرم و مرطوب جهان می‌باشد. این بیماری در مناطق مهم کشت جو در ایران نیز اهمیت ویژه‌ای دارد. بر اساس گزارش ارشاد (Ershad, 2009)، بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو از آذربایجان شرقی (کلپیر، گرمی و مشکین شهر)، گرگان و خوزستان گزارش شده است و در استان‌های شمالی کشور و مناطق گرم و مرطوب جنوب کشور نیز از اهمیت خاصی برخوردار است. هر چند بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو را می‌توان از طریق چندین نوبت استفاده از قارچ‌کش‌ها کنترل کرد، اما استفاده از ارقام مقاوم به بیماری از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی به‌عنوان بهترین روش کنترل این بیماری معرفی شده است (Fetch and Steffenson, 1994). بر اساس گزارش شارما و همکاران (Sharma et al., 2007) اصلاح ارقام جو برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی، پیشرفت بسیار محدودی داشته است و توسعه ژنوتیپ‌های مقاوم به این بیماری چالشی جدی برای متخصصین اصلاح جو به‌شمار می‌رود.

وجود اطلاعات دقیق در مورد نحوه توارث مقاومت به بیماری و در دسترس بودن نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های مقاومت برای طراحی راهکارهای مناسب جهت افزایش مقاومت ارقام جو مورد نیاز است. هر چند مطالعات بسیاری در مورد توارث بیماری لکه قهوه‌ای انجام شده است، اما ماهیت توارث هنوز به‌درستی درک نشده است. برخی از محققین توارث این بیماری را تک‌ژنی (Arney, 1951; Wilcoxson et al., 1990) و برخی چندژنی (Steffenson et al., 1996; Steffenson et al., 1996) گزارش کرده‌اند. استفنسن و همکاران (Steffenson et al., 1996) گزارش دادند که ژن‌های مختلفی مقاومت به بیماری را در مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل جو کنترل می‌کنند. تا کنون، حداقل ده مکان ژنی *Rcs1-Rcs6*، دو ژن بی‌نام و دو مکان مرتبط با ژن‌های *gsh2* و *vrs3* برای مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای در جو شناسایی شده‌اند. *Rcs3*، *Rcs2*، *Rcs1*، *Rcs5* و *Rcs6* به‌ترتیب روی کروموزوم‌های 2(2H)، 5(1H)، 7(5H)، 1(7H) و 5(1H) قرار دارند، اما ژن‌های دیگر نقشه‌یابی نشده‌اند (Leng et al., 2018). لنگ و همکاران (Leng et al., 2018) گزارش کردند که ژن غالب *Scs6* باعث ایجاد حساسیت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی

در جو می‌شود و روی بازوی کوتاه کروموزوم 1H قرار دارد. علاوه بر این، تعدادی QTL برای مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو در مراحل گیاهچه‌ای و گیاه کامل گزارش شده است (Bilgic et al., 2005; Bovill et al., 2010; Wang et al., 2017). مکان‌ها یا QTL‌های گزارش شده باعث ایجاد مقاومت به یک جدایه مانند جدایه ND85F (*C. sativus*) می‌شود. به‌منظور طراحی برنامه‌های به‌نژادی برای تولید ارقام مقاوم، شناسایی منابع مقاومت و تجزیه ژنتیکی مقاومت به بیماری حائز اهمیت است. روش استاندارد، انجام تلاقی‌های دو والدی بین والدین حساس و مقاوم و سپس ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی (با نشانگرهای مولکولی) در جمعیت نتاج برای تعیین تعداد و مکان کروموزومی ژن‌های مقاومت است (Lander and Botstein 1986). یک روش جایگزین برای نقشه‌یابی مکان‌های مقاومت که نیازی به انجام تلاقی‌های دو والدی یا نسل‌های غربالگری نتاج ندارد، نقشه‌یابی ارتباطی (Association Mapping) یا نقشه‌یابی مبتنی بر نامتعادلی پیوستگی (Linkage Disequilibrium) است. به‌وسیله تجزیه ارتباط، ارزیابی‌های آماری برای ارتباط بین ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای مولکولی و فنوتیپ صفات مختلف در مجموعه‌های ژرم‌پلاسم انجام می‌شود (Buntjer et al., 2005). از نظر تئوری، این روش می‌تواند در هر مجموعه ژرم‌پلاسم طبیعی اعمال شود و QTL را برای بسیاری از صفات که تنوع نشان می‌دهند، شناسایی کند. از زمان اولین کاربرد نقشه‌یابی ارتباطی در گیاهان در سال ۲۰۰۱ (Thornsberry et al., 2001)، این روش به دلیل توسعه فن‌آوری‌های ارزیابی ژنوتیپی، علاقه به شناسایی آلل‌های جدید و بهبود روش‌های آماری، در بسیاری از گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گرفته و تا کنون چندین مطالعه نیز برای شناسایی مکان‌های ژنی مقاومت به بیماری‌های مختلف در جو توسط نشانگرهای مولکولی انجام شده است. از جمله می‌توان به مکان‌یابی صفات موفولوژیک، مقاومت به بیماری و سایر صفات زراعی در ارقام تجاری جو (Kraakman, et al., 2006)، شناسایی نشانگرهای پیوسته با QTL‌های کنترل‌کننده مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای در جو وحشی (Roy et al., 2010) و نیز تهیه نقشه پیوستگی برای مقاومت به سه جدایه *Cochliobolus sativus* در جوهای زراعی (Wang et al., 2017) اشاره کرد.

با توجه به توضیحات ارائه شده، هدف از پژوهش حاضر شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی در مرحله گیاهچه‌ای در یک جمعیت از ارقام پیشرفته تجاری جو دو ردیفه اروپایی و نیز شناسایی منابع مقاومت جدید به‌منظور استفاده از آن‌ها در برنامه‌های مختلف به‌نژادی جو به‌کمک نشانگرهای مولکولی مرتبط با مقاومت به این بیماری بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

منابع ژنتیکی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۱۴۲ رقم پیشرفته اروپایی (جو بهاره دو ردیفه) بود (جدول ۱). این ارقام ژرم‌پلاس‌های تجاری مورد استفاده در سراسر اروپای غربی طی سال‌های ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۶ میلادی بودند (Kraakman *et al.*, 2006)، که در حال حاضر نیز مورد کشت قرار می‌گیرند. بذره‌های این ارقام از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شد. ارقام مورد مطالعه در گلدان‌های مستطیلی در محیط پیت ماس با سه تکرار کشت شدند. در هر گلدان سه گیاهچه کشت شد و گیاهان تا مرحله دو برگگی در شرایط دمایی 25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت ۷۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

جدایه‌های عامل بیماری

جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق شامل دو جدایه جمع‌آوری شده از برگ‌های گندم و دو جدایه جمع‌آوری شده از برگ‌های جو بود. اطلاعات مربوط به جدایه‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. جدایه‌های *C. sativus* از برگ‌های جو در مرحله رشد کامل که دارای علائم لکه قهوه‌ای بودند، از مزارع ایستگاه‌های تحقیقات و آموزش کشاورزی طبرق (مشهد) و عراقی‌محله (گرگان) جمع‌آوری شد. جداسازی جدایه‌ها به روش‌های متعارف انجام و برای خالص‌سازی از روش تک‌اسپور کردن در محیط کشت آب-آگار استفاده شد (Nelson *et al.*, 1983). جدایه‌های Cst-151 و Cst-42 مورد استفاده در این تحقیق نیز از دانشگاه صنعتی اصفهان (دانشکده مهندسی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی) تهیه شدند.

ایجاد آلودگی و ارزیابی مقاومت به بیماری

قارچ عامل بیماری پس از خالص‌سازی به پتری‌های حاوی سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) منتقل و در

شرایط ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. کنیدی‌های قارچ عامل بیماری به‌وسیله افزودن چند میلی‌لیتر آب مقطر استریل و خراش دادن سطح محیط کشت به‌وسیله یک لام استریل جمع‌آوری شد. کنیدی‌ها از دو لایه پارچه ملامل عبور داده شدند و تعداد کنیدی در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون مایه تلقیح با لام هموسیتومتر شمارش و با افزودن آب مقطر استریل به تعداد ۸۰۰۰ کنیدی در هر میلی‌لیتر تنظیم شد. سپس به‌منظور توزیع یکنواخت و چسبندگی کنیدی‌ها به برگ‌های گیاهچه جو از Tween-20 به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر در لیتر استفاده شد (Roy *et al.*, 2010). مایه‌زنی گیاهچه‌ها به‌روش محلول‌پاشی و با استفاده از محلول‌پاش دستی ۱۴ روز پس از کاشت، هنگامی که گیاهچه‌ها در مرحله دو برگگی بودند، انجام شد. ارزیابی مقاومت نیز در سه تکرار انجام شد. گیاهچه‌های تلقیح‌شده به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت در شرایط تاریکی با دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت بالا (اشباع) نگهداری و سپس به اتاقک رشد با دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۵ درصد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. ارزیابی مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی بر اساس مقیاس نه عددی فتچ و استفنسن (Fetch and Steffenson, 1999) انجام شد.

ارزیابی ژنوتیپی

جمعیت مورد مطالعه قبلاً توسط کرکمن و همکاران (Kraakman *et al.*, 2004; Kraakman *et al.*, 2006) با استفاده از ۱۴ جفت آغازگر AFLP و ۱۱ جفت آغازگر SSR نقشه‌یابی شده است. اقنوم و همکاران (Aghnoum *et al.*, 2019) ۲۱ نشانگر مولکولی SSR جدید را به نقشه گزارش شده قبلی اضافه کردند. در مجموع و با در نظر گرفتن آلل‌های مختلف نشانگرهای AFLP و SSR، تعداد ۴۰۷ نشانگر چندشکل در جمعیت حاضر مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌های ژنوتیپی، نشانگرهایی با داده‌های گم‌شده بیش از ۱۰ درصد و فراوانی آلی (MAF=Minor Allele Frequency) کم‌تر از ۵ درصد حذف و مجموعه جدیدی از ۲۱۸ نشانگر برای ارزیابی ساختار جمعیت و تجزیه ارتباطی استفاده شد.

جدول ۱- ارقام تجاری جو دو ردیفه اروپایی مورد مطالعه در این تحقیق و درصد عضویت آن‌ها به زیرجمعیت‌ها
 Table 1. Modern European two-row spring barley cultivars studied in this research and their membership percentages to sub-populations

No	Cultivar	Q Value		No	Cultivar	Q Value	
		Q1	Q2			Q1	Q2
1	ABED4611	0.002	0.998	46	CULMA	0.356	0.644
2	ABED5193	0.037	0.963	47	DECANTER	0.998	0.002
3	ABELONE	0.997	0.003	48	DELIBES	0.998	0.002
4	ADELE	0.997	0.003	49	DERKADO	0.842	0.158
5	AKITA	0.003	0.997	50	DIALOG	0.998	0.002
6	ALABAMA	0.537	0.463	51	DIGGER	0.006	0.994
7	ALANIS	0.998	0.002	52	ENIGMA	0.998	0.002
8	ALBRIGHT	0.032	0.968	53	ESCORT	0.997	0.003
9	ALEXIS	0.096	0.904	54	ETNA	0.044	0.956
10	ALLIOT	0.013	0.987	55	EVELYN	0.301	0.699
11	ANNABELL	0.503	0.497	56	EXTRACT	0.064	0.936
12	ANNASOFI	0.491	0.509	57	FERMENT	0.005	0.995
13	APEX	0.002	0.998	58	FUSION	0.998	0.002
14	ARAVIS	0.039	0.961	59	GANT	0.078	0.922
15	ARDILA	0.45	0.55	60	GESINE	0.002	0.998
16	ARIEL	0.002	0.998	61	GIVE	0.011	0.989
17	ASPEN	0.163	0.837	62	GOLDIE	0.002	0.998
18	ASTORIA	0.996	0.004	63	HANKA	0.002	0.998
19	BARKE	0.994	0.006	64	HENNI	0.999	0.001
20	BELLA	0.567	0.433	65	HERON	0.983	0.017
21	BERETA	0.01	0.99	66	HYDROGEN	0.998	0.002
22	BLENHEIM	0.432	0.568	67	JACINTA	0.998	0.002
23	BOND	0.079	0.921	68	JAREK	0.043	0.957
24	BRENDA	0.002	0.998	69	JERSEY	0.027	0.973
25	BREWSTER	0.998	0.002	70	JILL	0.004	0.996
26	BRISE	0.675	0.325	71	KORINNA	0.441	0.559
27	BRITTA	0.007	0.993	72	KRONA	0.002	0.998
28	CADEAU	0.008	0.992	73	LAMBA	0.35	0.65
29	CAMANT	0.992	0.008	74	LENKA	0.003	0.997
30	CAMINANT	0.999	0.001	75	LIBELLE	0.416	0.584
31	CANUT	0.082	0.918	76	LIMBO	0.428	0.572
32	CARUSO	0.997	0.003	77	LINUS	0.443	0.557
33	CASKANT	0.024	0.976	78	LISBET	0.725	0.275
34	CECILIA	0.995	0.005	79	LOMA	0.057	0.943
35	CENTURY	0.802	0.198	80	LUX	0.003	0.997
36	CHALICE	0.013	0.987	81	LYSIMAX	0.429	0.571
37	CHAMANT	0.002	0.998	82	MADONNA	0.002	0.998
38	CHARIOT	0.006	0.994	83	MADRAS	0.009	0.991
39	CHARLOTT	0.997	0.003	84	MANDOLIN	0.005	0.995
40	CHARON	0.01	0.99	85	MARESI	0.003	0.997
41	CHRISTIA	0.118	0.882	86	MARINA	0.011	0.989
42	CICERO	0.993	0.007	87	MAUD	0.004	0.996
43	COLLIE	0.748	0.252	88	MELTAN	0.997	0.003
44	COOPER	0.998	0.002	89	MENTOR	0.002	0.998
45	CORK	0.073	0.927	90	MERETE	0.994	0.006

Table 1. Continued

جدول ۱- ادامه

No	Cultivar	Q Value		No	Cultivar	Q Value	
		Q1	Q2			Q1	Q2
91	MIE	0.004	0.996	117	RICARDA	0.514	0.486
92	MIRALIX	0.996	0.004	118	RIGA	0.002	0.998
93	NERUDA	0.675	0.325	119	ROXANA	0.972	0.028
94	NEVADA	0.993	0.007	120	SABEL	0.008	0.992
95	NIZZA	0.996	0.004	121	SALOON	0.006	0.994
96	ODIN	0.692	0.308	122	SCARLETT	0.003	0.997
97	OPTIC	0.667	0.333	123	SENIOR	0.51	0.49
98	OPTIMA	0.997	0.003	124	SHAMU	0.018	0.982
99	ORTHEGA	0.216	0.784	125	SJ5095	0.398	0.602
100	OTIRA	0.998	0.002	126	STATIC	0.01	0.99
101	PALOMA	0.983	0.017	127	STEFFI	0.059	0.941
102	PASADENA	0.006	0.994	128	SULTANE	0.997	0.003
103	PEEL	0.998	0.002	129	TEAL	0.004	0.996
104	PEGGY	0.976	0.024	130	TEXANE	0.996	0.004
105	PF11202.	0.999	0.001	131	THURINGI	0.011	0.989
106	POLYGENA	0.005	0.995	132	TIRUP	0.002	0.998
107	PONGO	0.002	0.998	133	TOFTA	0.006	0.994
108	POTTER	0.575	0.425	134	TREBON	0.002	0.998
109	PRESTIGE	0.032	0.968	135	TREMOIS	0.82	0.18
110	PRINCESS	0.998	0.002	136	TRIANON	0.223	0.777
111	PRISMA	0.882	0.118	137	UN.AE31	0.657	0.343
112	PROLOG	0.998	0.002	138	VADA	0.036	0.964
113	PROMINAN	0.559	0.441	139	VERONA	0.08	0.92
114	PUNTO	0.978	0.022	140	VINTAGE	0.003	0.997
115	RAGTIME	0.523	0.477	141	VISKOSA	0.033	0.967
116	REGGAE	0.007	0.993	142	WREN	0.331	0.669

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. Characteristics of the isolates used in this study

Isolate	Sample plant	Collection year	Location
Cst- 42	Wheat	2011	Kia-Kola, Mazandaran province, Iran
Cst- 151	Wheat	2010	Qezeljeh-ye Aq Emam, Golestan province, Iran
Csh -1	Barley	2017	Toroq, Khorasan-e-Razavi province, Iran
Csh -16	Barley	2018	Eraghi Mahale, Gorgan, Golestan province, Iran

تجزیه آماری

۱۰۰۰۰۰ و تعداد تکرار MCMC نیز ۱۰۰۰۰۰ در نظر گرفته شد تا نمودار حداکثر درست‌نمایی به دست آید. لازم به ذکر است که نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیرجمعیت‌ها) یک ماتریس به نام Qst محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر رقم در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. پس از شبیه‌سازی، تعداد بهینه تعداد زیرجمعیت‌ها (K)، به وسیله نرم‌افزار Harvester Structure تعیین شد

به منظور مکان‌یابی ارتباطی، ابتدا تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ارقام به زیرجمعیت‌های مناسب با روش Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.3 انجام گرفت (Pritchard *et al.*, 2000). مقادیر اولیه K (تعداد زیرجمعیت‌های فرضی اولیه) بین یک تا ده در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها پنج تکرار منظور شد. شبیه‌سازی یا طول دوره Burn in

واکنش متفاوت ارقام تجاری جو نسبت به جدایه‌های مختلف جمع‌آوری شده از مناطق متفاوت، می‌تواند دلیلی بر تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ از نظر بیماری‌زایی باشد. ارقام ALABAMA, ALANIS, APEX, ASTORIA, BREWSTER, BERETA, LIMBO, CADEAU, LUX, JILL JERSEY, LAMBA, PRESTIGE, HANKA, PRINCESS, LISBET, LYSIMAX, LYSIMAX, LISBET, PRINCESS, HANKA, TREBON, TOFTA, PEGGY, NERUDA, SULTANE, TEAL و RIGA نسبت به هر چهار جدایه بیماری مقاوم بودند. از این ارقام می‌توان به‌منظور تولید ارقام مقاوم به بیماری در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد. به‌نظر می‌رسد که جدایه‌های گندم تهیه شده از استان‌های مازندران و گلستان آلودگی بیش‌تری نسبت به جدایه‌های جو ایجاد کردند. طبق اطلاعات موجود، جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری از نظر قدرت تهاجم و بیماری‌زایی روی ارقام مختلف گندم و جو متفاوت هستند. بر اساس تحقیقات انجام شده، ژنتیک بیماری‌زایی آن پیچیده و چندژنی است و مکانیسم این تنوع هنوز به‌خوبی شناخته نشده است.

ساختار جمعیت

از ۴۰۷ نشانگر AFLP و SSR، ۱۸۹ نشانگر که دارای داده‌های گم‌شده بیش از ۱۰ درصد و MAF زیر پنج درصد بودند، حذف شدند. بنابراین، ۲۱۸ نشانگر برای این مطالعه در نظر گرفته شد. بررسی تعداد زیرجمعیت‌های احتمالی در ۱۴۲ رقم مورد مطالعه با استفاده از ۲۱۸ نشانگر بر اساس روش Bayesian با استفاده از نرم‌افزار Structure و Structure Harvester نشان داد که بیش‌ترین مقدار شاخص ΔK در $K=2$ می‌باشد که نشان‌دهنده وجود دو زیرجمعیت است (شکل ۲). بنابراین، $K=2$ به‌عنوان تعداد بهینه زیرجمعیت‌ها در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس سهم عضویت افراد در هر گروه (ماتریس Q) در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که از کل ارقام مورد مطالعه، با احتمال بیش‌تر از ۷۰ درصد عضویت ارقام، ۴۶ رقم (۳۲/۳۹ درصد) متعلق به زیرجمعیت اول (قرمز) و ۷۰ رقم (۴۹/۲۹ درصد) متعلق به زیرجمعیت دوم (سبز) بودند و ۲۶ رقم (۱۸/۳۰ درصد) نیز که سهم عضویت کم‌تر از ۰/۷ داشتند، به‌عنوان مخلوط در نظر گرفته شدند (شکل ۳). درصد عضویت ارقام مورد مطالعه به زیرجمعیت‌های شناسایی شده (ماتریس Q) در جدول ۱ ارایه شده است.

(Evanno *et al.*, 2005). شناسایی نشانگرهای پیوسته و دارای ارتباط معنی‌دار با مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو با مدل خطی عمومی (GLM=General Linear Model) وابسته به ماتریس Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت) و مدل خطی مخلوط (MLM=Mixed Linear Model) وابسته به ماتریس K+Q (ماتریس‌های ضرایب ساختار جمعیت + روابط خویشاوندی جهت جلوگیری از شناسایی روابط کاذب بین نشانگر-صفت) با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 3.0.174 انجام شد.

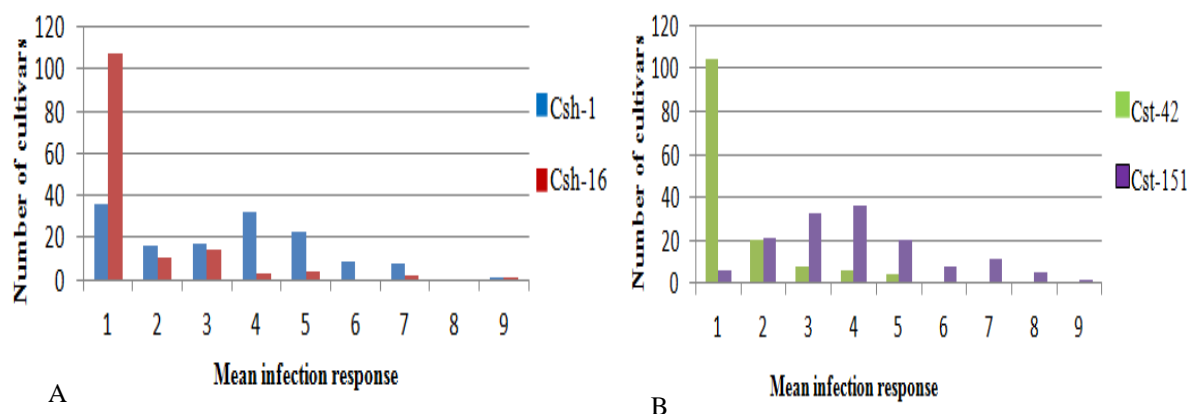
نتایج و بحث

قبل از انجام تجزیه ارتباطی، به‌منظور اطلاع از وجود تنوع کافی و معنی‌دار بین ارقام مورد استفاده با توجه به مقیاس اسمی داده‌ها در این مطالعه، از روش ناپارامتری کروکسکال والیس که معادل طرح کاملاً تصادفی است، استفاده شد. در واقع از این آزمون زمانی استفاده می‌شود که فرض‌های تجزیه واریانس یک‌طرفه، مانند یکنواختی واریانس‌ها یا نرمال بودن توزیع داده‌ها، رعایت نشده باشد. میانگین رتبه‌ای ایزوله‌های مورد بررسی در جدول ۳ ارایه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میانگین رتبه‌ای چهار ایزوله مورد بررسی به‌ترتیب ۳۵۱/۳۶، ۳۲۰/۲۸، ۳۱۱/۲۵ و ۱۵۵/۱۱ برآورد شده است. همچنین، مقدار آماره آزمون کروکسکال والیس (آماره کای‌اسکور) ۱۲۴/۰۸۳ محاسبه شد که در سطح اطمینان ۹۹ درصد (سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار بود. این امر حاکی از آن است که اختلاف معنی‌داری بین ایزوله‌های مورد بررسی از نظر شدت بیماری‌زایی وجود دارد. بر اساس نتایج، اغلب ارقام مورد مطالعه در مرحله گیاهچه‌ای نسبت به جدایه‌های حاصل از برگ جو، مقاوم تا نیمه‌مقاوم بودند. همچنین، اغلب ارقام نسبت به جدایه Csh-16 مقاومت داشتند، اما نسبت به جدایه Csh-1 حساسیت بیش‌تری نشان دادند. بررسی واکنش ارقام نسبت به جدایه‌های حاصل از برگ گندم نیز نشان داد که اغلب ارقام نسبت به جدایه Cst-42 واکنش مقاومت داشتند و فقط تعداد ده نمونه نسبت به این جدایه واکنش نیمه‌مقاوم را نشان دادند. بیش‌ترین تعداد واکنش حساسیت در بین ارقام جو نسبت به جدایه Csh-151 مشاهده شد، به‌طوری‌که ۲۶ نمونه دارای واکنش حساسیت، ۶۰ نمونه دارای واکنش مقاومت و ۵۶ نمونه نیز دارای واکنش نیمه‌مقاوم نسبت به این جدایه بودند (شکل ۱).

جدول ۳- نتایج آزمون کروسکال والیس

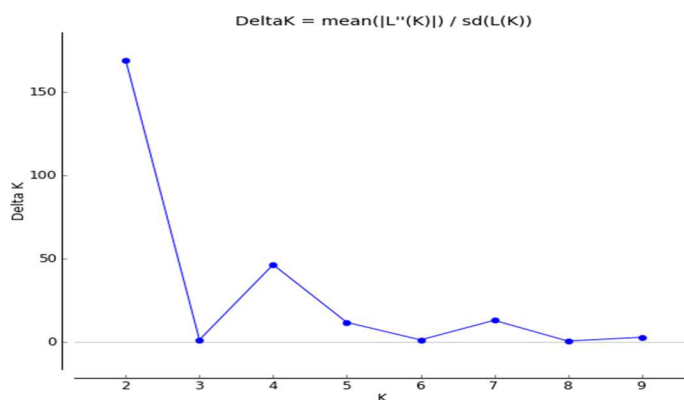
Table 3. Result of Kruskal-Wallis test

Isolate	Number	Rank mean	Chi-square	Significant level
Cst-42	142	320.28	124.083	0.000
Cst-151	142	311.25		
Csh-1	142	155.11		
Csh-16	142	351.36		



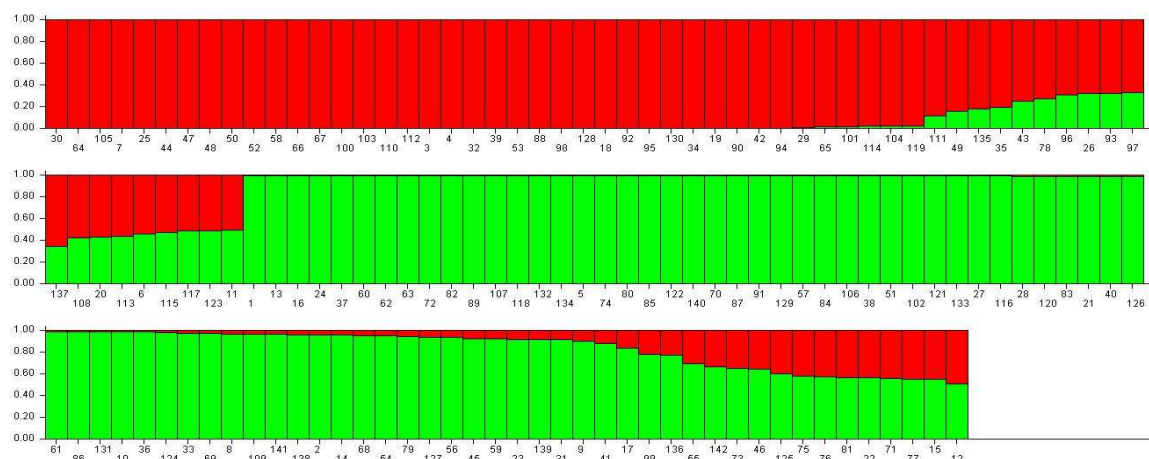
شکل ۱- توزیع فراوانی میانگین مقاومت گیاهچه‌ای ۱۴۲ رقم تجاری جو نسبت به جدایه‌های مورد مطالعه بیماری لکه قهوه‌ای معمولی. (A) جدایه‌های برگ جو، (B) جدایه‌های برگ گندم.

Figure 1. Frequency distribution of average seedling resistance of 142 commercial barley cultivars to the studied isolates of the common spot blotch disease. A) Isolates from barley leaves, B) isolates from wheat leaves.



شکل ۲- تعداد زیرجمعیت در ارقام مورد مطالعه بر اساس نشانگرهای SSR و AFLP با استفاده از STRUCTURE HARVESTER.

Figure 2. Estimation of sub-populations in the studied barley cultivars according to SSR and AFLP markers using STRUCTURE HARVESTER.



شکل ۳- بارپلات تجزیه ساختار ارقام جو مورد مطالعه بر اساس ۲۱۸ مکان ژنی حاصل از نشانگرهای SSR و AFLP با استفاده از روش Bayesian. هر رنگ یک زیرجمعیت یا گروه را نشان می‌دهد. اعداد محور افقی و عمودی به ترتیب شماره و ضریب تعلق هر رقم به هر زیرجمعیت را نشان می‌دهند.

Figure 3. Bar-plot of structure analysis of the studied barley cultivars according to 218 loci of SSR and AFLP markers using Bayesian method. Each color shows one sub-population or cluster. The numbers on horizontal and vertical axes shows numbers and membership percentages of each barley cultivar to each sub-population, respectively.

معمولی بودند، در حالی که در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$) تعداد ۱۲ نشانگر پیوسته با مقاومت به این جدایه‌ها شناسایی شدند. در سطح احتمال یک درصد، چهار نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به جدایه Csh-151 و هشت نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به جدایه Cst-42 معنی‌دار بودند (جدول ۵). در مجموع مکان‌های ژنومی شناسایی شده روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 3H، 5H، 6H و 7H نقشه‌یابی شدند. در تحقیقی که روی و همکاران (Roy *et al.*, 2010) با استفاده از نشانگرهای DArT و SNP در جمعیت‌های جو وحشی برای شناسایی جایگاه‌های ژنومی کنترل کننده مقاومت به قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای معمولی انجام دادند، با استفاده از مدل تجزیه ارتباطی GLM، تعداد سیزده QTL مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی را شناسایی و جایگاه ژنومی این QTLها را روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 3H و 5H گزارش کردند.

نقشه‌یابی ارتباطی

به منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با مقاومت به جدایه‌های بیماری لکه قهوه‌ای، تجزیه ارتباطی بر اساس مدل خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مخلوط (MLM) انجام شد. نتایج حاصل از روش GLM در مورد جدایه‌های برگ جو در جدول ۴ ارائه شده است. بر این اساس، تعداد ۲۰ نشانگر (مکان ژنی) ارتباط معنی‌داری با مقاومت به جدایه‌های حاصل از برگ جو حداقل در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) داشتند. در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$)، تعداد سه نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به جدایه Csh-1 و سه نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به جدایه Csh-16 بودند. همچنین در بین جدایه‌های تک‌اسپور شده از برگ گندم (جدول ۵) نیز در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) در کل ۱۴ نشانگر (مکان ژنی) دارای ارتباط معنی‌داری با مقاومت به جدایه‌های قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای

جدول ۴- نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی (جدا شده از برگ جو) بر اساس روش GLM

Table 4. Markers linked to spot blotch disease resistance genes to (isolated from barley leaves) using GLM

Isolate	Marker	Marker type	Chromosome [†]	P-value	R ²	Effect ^{††}
Csh-1	Bmag0223-173*	SSR	2H	0.031	0.042	1.305
Csh-1	E38M54-294**	AFLP	2H	0.009	0.059	-0.255
Csh-1	E39M61-181*	AFLP	2H	0.039	0.037	0.36
Csh-1	Bmag0225-161*	SSR	3H	0.045	0.044	0.71
Csh-1	Bmag0225-168*	SSR	3H	0.043	0.045	-0.445
Csh-1	Bmac0316-175*	SSR	6H	0.024	0.044	-0.99
Csh-1	E35M54-099*	AFLP	unmapped	0.036	0.037	1.835
Csh-1	E35M61-068**	AFLP	unmapped	0.008	0.06	-0.47
Csh-1	E37M33-260*	AFLP	unmapped	0.033	0.04	-0.25
Csh-1	E38M55-110*	AFLP	unmapped	0.024	0.049	0.38
Csh-1	E39M11-80*	AFLP	unmapped	0.039	0.037	-0.36
Csh-1	E45M55-139**	AFLP	unmapped	0.006	0.079	-0.305
Csh-16	Bmac0134-160*	SSR	2H	0.04	0.04	1.405
Csh-16	Scssr10559-214**	SSR	3H	0.01	0.073	0.41
Csh-16	Bmac0316-168*	SSR	6H	0.04	0.04	0.215
Csh-16	Bmag0500-194**	SSR	6H	0.01	0.07	0.875
Csh-16	EBmac0603-180*	SSR	7H	0.03	0.049	0.345
Csh-16	E35M48-251**	AFLP	unmapped	0.002	0.08	0.665
Csh-16	E38M50-334*	AFLP	unmapped	0.047	0.035	0.73
Csh-16	E45M55-080*	AFLP	unmapped	0.023	0.063	-0.295

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

[†] Unmapped markers are the markers whose genomic position has not been determined.^{††} The effect of each gene allele on the rate of disease. the positive numbers indicate that any allele causes an increase in disease (susceptibility) and negative numbers indicate that any allele causes an decrease in disease (resistance).

جدول ۵- نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی (جدا شده از برگ گندم) بر اساس روش GLM

Table 5. Markers linked to spot blotch disease resistance genes to (isolated from wheat leaves) using GLM

Isolate	Marker	Marker type	Chromosome [†]	P-value	R ²	Effect ^{††}
Cst-42	Bmag0222-153**	SSR	5H	0.01	0.07	0.225
Cst-42	Bmag0222-185**	SSR	5H	0.01	0.07	-0.225
Cst-42	Scssr07106-168**	SSR	5H	0.01	0.071	0.22
Cst-42	Scssr07106-172**	SSR	5H	0.01	0.071	-0.22
Cst-42	EBmac0603-153**	SSR	7H	0.01	0.08	0.405
Cst-42	E35M48-256*	AFLP	unmapped	0.021	0.044	0.25
Cst-42	E38M50-094**	AFLP	unmapped	0	0.11	0.3
Cst-42	E38M55-089**	AFLP	unmapped	0.001	0.1	0.61
Cst-42	E38M55-090**	AFLP	unmapped	0.001	0.1	-0.61
Cst-42	E42M32-378*	AFLP	unmapped	0.04	0.04	-0.21
Csh-151	Ebmac0560-223*	SSR	1H	0.04	0.05	-0.47
Csh-151	Bmac0134-173*	SSR	2H	0.043	0.035	0.5
Csh-151	Bmag0225-161*	SSR	3H	0.027	0.052	0.555
Csh-151	Scssr10559-213*	SSR	3H	0.02	0.057	0.45
Csh-151	E33M54-100*	AFLP	4H	0.037	0.037	-0.365
Csh-151	Bmag0223-160*	SSR	5H	0.027	0.044	-0.405
Csh-151	Bmag0223-170**	SSR	5H	0.004	0.075	0.48
Csh-151	E42M48-203*	AFLP	5H	0.041	0.037	0.41
Csh-151	EBmac0603-143**	SSR	7H	0.01	0.07	1.325
Csh-151	E35M48-380*	AFLP	unmapped	0.021	0.045	-0.685
Csh-151	E35M61-378*	AFLP	unmapped	0.05	0.04	0.33
Csh-151	E37M33-160**	AFLP	unmapped	0.01	0.057	1.68
Csh-151	E38M55-213*	AFLP	unmapped	0.013	0.059	0.185
Csh-151	E39M61-222*	AFLP	unmapped	0.033	0.038	1.275
Csh-151	E39M61-271**	AFLP	unmapped	0.01	0.052	1.04
Csh-151	E42M32-184*	AFLP	unmapped	0.018	0.049	0.36

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

[†] Unmapped markers are the markers whose genomic position has not been determined.^{††} The effect of each gene allele on the rate of disease. the positive numbers indicate that any allele causes an increase in disease (susceptibility) and negative numbers indicate that any allele causes an decrease in disease (resistance).

Bmag0225-161 با مکان‌های ژنی مرتبط با مقاومت به دو جدایه Csh-1 و Csh-151 پیوسته بود که روی کروموزوم 3H نقشه‌یابی شد. شناسایی نشانگرهای مشترک و غیراختصاصی (Non-specific isolate) اهمیت زیادی در به‌زادی گیاهان دارد، زیرا گزینش (اصلاح) همزمان مقاومت به چندین جدایه (صفت) را امکان‌پذیر می‌سازد (Hittalmani *et al.*, 2003). وجود نشانگرهای مشترک در میان جدایه‌های مورد مطالعه می‌تواند ناشی از آثار پلیوتروپی و یا پیوستگی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به این جدایه‌ها باشد. در مجموع، مکان‌های ژنومی شناسایی شده بین دو تا ده درصد از واریانس فنوتیپی صفت را تبیین کردند. مقدار کم R^2 برای بیش‌تر نشانگرها نشان‌دهنده توجیه درصد کم تنوع صفت توسط مکان‌های ژنی شناسایی شده و بنابراین شناسایی نشدن ژن‌های مقاومت دیگر و یا نقش بیش‌تر اثر محیط (نسبت به آثار ژنتیکی) روی تنوع این صفت بود. مقدار کم R^2 در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است، به‌طوری‌که روی و همکاران (Roy *et al.*, 2010) با بررسی ۳۱۸ نمونه جو وحشی به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با QTL‌های مقاومت به لکه قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای، مقدار R^2 را برای QTL‌های شناسایی شده بین ۲/۳ تا ۳/۹ درصد گزارش کردند.

بر استفاده از روش MLM (جدول ۶) که از اطلاعات بیش‌تری نسبت به روش GLM استفاده می‌کند و نتایج آن دارای اریبی کم‌تری است، در مجموع ۲۰ نشانگر حداقل در سطح احتمال پنج درصد ارتباط معنی‌داری با مقاومت به جدایه‌های قارچ لکه قهوه‌ای معمولی جدا شده از برگ جو نشان دادند. به تفکیک تعداد دو نشانگر مرتبط با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به جدایه Csh-1 و یک نشانگر مرتبط با جدایه Csh-16 در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. نتایج مدل ارتباطی MLM نسبت به جدایه‌های خالص شده از برگ گندم (جدول ۷) نیز نشان داد که ۲۱ نشانگر دارای ارتباط معنی‌داری با مقاومت به جدایه‌های قارچ لکه قهوه‌ای معمولی حداقل در سطح احتمال پنج درصد بودند. یک نشانگر مرتبط با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به جدایه Csh-151 و سه نشانگر مرتبط با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به جدایه Cst-42 شناسایی شدند.

مدل GLM در مقایسه با MLM نشانگرهای معنی‌دار بیش‌تری را شناسایی کرد که این نتایج با توجه به کاهش خطای نوع اول در MLM دور از انتظار نبود. تقریباً تمامی نشانگرهای معنی‌دار به‌طور اختصاصی (Specific isolate) با جدایه‌های عامل بیماری مرتبط بودند و فقط نشانگر

جدول ۶- نشانگرهای پیوسته با مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی (جدا شده از برگ جو) بر اساس روش MLM

Table 6. Markers linked to spot blotch disease resistance genes to (isolated from barley leaves) using MLM

Isolate	Marker	Marker type	Chromosome [†]	P-value	R ²	Effect ^{††}	Isolate
Csh-1	E38M54-294*	AFLP	2H	6.298	0.057	0.014	-0.255
Csh-1	E38M54-390*	AFLP	2H	4.186	0.040	0.043	0.535
Csh-1	E39M61-180*	AFLP	2H	4.443	0.039	0.037	-0.36
Csh-1	E39M61-181*	AFLP	2H	4.443	0.039	0.037	0.36
Csh-1	Bmag0225-161*	SSR	3H	4.006	0.040	0.048	0.71
Csh-1	Bmag0225-168*	SSR	3H	4.212	0.042	0.043	-0.445
Csh-1	Bmag0223-173*	SSR	5H	4.33	0.042	0.04	1.305
Csh-1	Bmac0316-175*	SSR	6H	5.069	0.043	0.026	-0.99
Csh-1	E35M61-068**	AFLP	unmapped	6.947	0.064	0.01	-0.47
Csh-1	E37M33-260*	AFLP	unmapped	4.638	0.040	0.033	-0.25
Csh-1	E38M55-110*	AFLP	unmapped	4.425	0.045	0.038	0.38
Csh-1	E45M49-255*	AFLP	unmapped	4.349	0.041	0.039	0.365
Csh-1	E45M55-139**	AFLP	unmapped	7.846	0.075	0.006	-0.305
Csh-16	Bmac0134-160*	SSR	2H	4.022	0.042	0.047	1.405
Csh-16	Scssr10559-214*	SSR	3H	6.313	0.094	0.014	0.41
Csh-16	Bmac0316-168*	SSR	6H	4.1	0.060	0.045	0.215
Csh-16	Bmag0500-194*	SSR	6H	4.508	0.064	0.037	0.875
Csh-16	E35M48-251**	AFLP	unmapped	8.425	0.071	0.004	0.665
Csh-16	E35M55-167*	AFLP	unmapped	4.633	0.044	0.034	-0.265
Csh-16	E38M50-334*	AFLP	unmapped	4.034	0.037	0.047	0.73

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

[†] Unmapped markers are the markers whose genomic position has not been determined.

^{††} The effect of each gene allele on the rate of disease. the positive numbers indicate that any allele causes an increase in disease (susceptibility) and negative numbers indicate that any allele causes an decrease in disease (resistance).

جدول ۷- نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی (جدا شده از برگ گندم) بر اساس روش MLM
 Table 7. Markers linked to spot blotch disease resistance genes to (isolated from wheat leaves) using MLM

Isolate	Marker	Marker type	Chromosome [†]	P-value	R ²	Effect ^{††}	Isolate
Cst-42	E42M32-378*	AFLP	2H	3.949	0.038	0.049	-0.21
Cst-42	HVM54-167*	SSR	2H	5.603	0.063	0.02	0.16
Cst-42	Bmag0222-153*	SSR	5H	4.237	0.153	0.043	0.225
Cst-42	Bmag0222-185*	SSR	5H	4.237	0.153	0.043	-0.225
Cst-42	Scssr07106-168*	SSR	5H	6.64	0.074	0.012	0.22
Cst-42	Scssr07106-172*	SSR	5H	6.64	0.074	0.012	-0.22
Cst-42	E35M48-256*	AFLP	unmapped	4.799	0.040	0.03	0.25
Cst-42	E35M61-137*	AFLP	unmapped	4.083	0.021	0.046	-0.095
Cst-42	E38M50-094**	AFLP	unmapped	10.856	0.070	0.001	0.3
Cst-42	E38M55-089**	AFLP	unmapped	6.065	0.052	0.01	0.61
Cst-42	E38M55-090**	AFLP	unmapped	6.065	0.052	0.01	-0.61
Csh-151	Bmag0225-161*	SSR	3H	4.79	0.051	0.031	0.555
Csh-151	Scssr10559-213*	SSR	3H	5.687	0.060	0.019	0.45
Csh-151	Bmag0223-170**	SSR	5H	6.69	0.063	0.01	0.48
Csh-151	Bmac0316-170*	SSR	6H	5.914	0.061	0.017	0.34
Csh-151	EBmac0603-143*	SSR	7H	6.807	0.078	0.011	1.325
Csh-151	E37M33-160*	AFLP	unmapped	7.13	0.062	0.009	1.68
Csh-151	E38M50-464*	AFLP	unmapped	4.128	0.041	0.045	1.185
Csh-151	E38M55-213*	AFLP	unmapped	5.748	0.052	0.018	0.185
Csh-151	E42M32-228*	AFLP	unmapped	5.07	0.050	0.026	-0.585
Csh-151	HVM040-152*	SSR	unmapped	4.162	0.149	0.044	-0.51

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

[†] Unmapped markers are the markers whose genomic position has not been determined.

^{††} The effect of each gene allele on the rate of disease. the positive numbers indicate that any allele causes an increase in disease (susceptibility) and negative numbers indicate that any allele causes an decrease in disease (resistance).

شده پس از اعتبارسنجی و تأیید می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی بسیار کاربردی باشند. ونگ و همکاران (Wang *et al.*, 2017) به‌منظور شناسایی مکان‌های مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی، سه جدایه قارچ *C. sativus* را در بین ۱۴۸۰ نمونه از ارقام جو مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که در میان ده QTL شناسایی شده، چهار QTL (QRcs-7H-2-P1، QRcs-3H-P1، QRCsh-1H-P1 و QRCsh-1H-P2) در مطالعات قبلی مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی نیز شناسایی شده بودند و شش QTL (QRcs-3H-P7، QRcs-2H-P7، QRCsh-1H-P7، QRcs-6H-P2، QRcs-6H-P7 و QRcs-7H-1-P1) جدید بودند. این محققین اظهار داشتند که نشانگرهای SNP مرتبط با QTL‌های شناسایی شده می‌توانند در برنامه اصلاح مقاومت چندگانه ارقام جو به چندین جدایه قارچ *C. sativus* مفید باشند.

روی و همکاران (Roy *et al.*, 2010) روش تجزیه ارتباطی را روشی موثر برای شناسایی و ترسیم نقشه مقاومت در برابر بیماری معرفی کردند و اظهار داشتند که نیمی از QTL‌های شناسایی شده روی کرموزوم‌ها برای مقاومت به لکه قهوه‌ای در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است که این حاکی از اعتبار روش تجزیه ارتباطی می‌باشد. روی و همکاران (Roy *et al.*, 2006) تجزیه ارتباط را برای ۱۴ صفت زراعی روی ۲۲ ژنوتیپ برگزیده با استفاده از ۵۱۹ نوار چندشکل حاصل از بیست نشانگر SSR، دو نشانگر SAMPLE و هشت نشانگر AFLP استفاده و گزارش کردند که به‌ترتیب ۱۳۱، ۴۳ و ۱۶۶ نشانگر SSR، SAMPLE و AFLP حداقل با یکی از ۱۴ صفت ارتباط معنی‌داری داشت. از بین این تعداد و با در نظر گرفتن هر دو روش GLM و MLM، تعداد ۵۱ نشانگر به‌عنوان نشانگرهای مثبت و آگاهی‌بخش شناسایی شدند. این محققین عنوان کردند که نشانگرهای معنی‌دار شناسایی

مطالعه را می‌توان به دو زیرجمعیت ($K=2$) تقسیم کرد. با استفاده از تجزیه ارتباطی نیز در مجموع ۱۸ و ۷ ناحیه ژنومی مرتبط با مقاومت به بیماری به ترتیب بر اساس دو روش GLM و MLM در سطح احتمال یک درصد شناسایی شد که بین ۳ تا ۱۱ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را تبیین کردند. تمامی نشانگرهای شناسایی شده در این تحقیق اختصاصی هر جدایه بودند، به جز نشانگر Bmag0225-161 که با مکان‌های ژنی مرتبط با مقاومت به دو جدایه Cst-151 و Csh-1 پیوسته بود. شناسایی نشانگرهای غیراختصاصی مانند Bmag0225-161 به دلیل اینکه امکان گزینش همزمان مقاومت به چند جدایه قارچی را فراهم می‌سازند، می‌توانند در پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی این محصول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشند.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی برای فراهم کردن امکانات لازم و در اختیار قرار دادن بذرهای ارقام جو پیشرفته اروپایی تشکر می‌شود. همچنین از مساعدت جناب آقای دکتر رحیم مهرابی دانشیار محترم گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان به خاطر فراهم کردن و در اختیار گذاشتن جدایه‌های بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو تشکر و قدردانی می‌شود.

در کل با توجه به محدودیت‌های روش نقشه‌یابی پیوستگی از قبیل در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق و زمان طولانی لازم جهت ایجاد آن‌ها، روش تجزیه ارتباطی با از بین بردن این محدودیت‌ها، اطلاعات نشانگری مناسبی را در اختیار محققان قرار می‌دهد که نتایج مطالعه حاضر نیز کارایی استفاده از روش مکان‌یابی ارتباطی در شناسایی نشانگرهای مرتبط با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای در ارقام جو مورد مطالعه را نشان داد. البته لازم است جهت اعتبارسنجی، نشانگرهای شناسایی شده و مرتبط با صفت مقاومت در جمعیت‌های بزرگ و با سطوح بالاتری از تنوع و نیز در محیط‌های مختلف (تکرار در سال‌ها و مکان‌های مختلف) مورد بررسی قرار گیرند تا از ارتباط آن‌ها اطمینان حاصل شود و به این ترتیب کارایی کاربرد این نشانگرها در برنامه‌های مختلف به‌نژادی مانند گزینش به‌کمک نشانگرها افزایش یابد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق وجود تنوع بالایی را در ارقام جو مورد مطالعه در پاسخ به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی نشان داد و ۲۴ رقم از ارقام مورد مطالعه نسبت به هر چهار جدایه عامل بیماری مقاوم بودند که می‌توانند به‌عنوان منابع ژنتیکی مقاومت در برنامه‌های به‌نژادی مورد استفاده قرار گیرند. بررسی ساختار جمعیت نشان داد که ارقام مورد

References

- Aghnoum, R., Bvindi, C., Menet, G., D'hoop, B., Maciel, J. L. N. and Niks, R. E. 2019. Host/nonhost status and genetics of resistance in barley against three pathotypes of *Magnaporthe* blast fungi. *Euphytica* 215: 116.
- Arney, D. C. 1951. Inheritance of resistance to spot blotch in barley seedling. *Journal of Phytopathology* 41: 691-698.
- Bilgic, H., Steffenson, B. J. and Hayes, P. M. 2005. Comprehensive genetic analyses reveal differential expression of spot blotch resistance in four populations of barley. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1238-1250.
- Bovill, J., Lehmensiek, A., Sutherland, M. W., Platz, G. J., Usher, T., Franckowiak, J. and Mace, E. 2010. Mapping spot blotch resistance genes in four barley populations. *Molecular Breeding* 26 (4): 653-666.
- Buntjer, J. B., Sorensen, A. P. and Peleman, J. D. 2005. Haplotype diversity: The link between statistical and biological association. *Trends in Plant Science* 10: 466-471.
- Ershad, J. 2009. Fungi of Iran. (3rd Ed.). Iranian Research Institute of Plant Protection. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). (In Persian).
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Fetch, T. G. and Steffenson, B. J. 1994. Identification of *Cochliobolus sativus* isolates expressing differential virulence on 2-row barley genotypes from North-Dakota. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 202-206.

- Fetch, T. G. and Steffenson, B. J. 1999.** Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. **Plant Disease** 83: 213-217.
- Griffie, F. 1925.** Correlated inheritance of botanical characters in barley and the manner of reaction to *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research** 30: 915-933.
- Hittalmani, S., Huang, N., Courtois, B., Venuprasad, R., Shashidhar, H. E., Zhuang, J. Y., Zheng, K. L., Liu, G. F., Wang, G. C., Sidhu, J. S., Srivantaneeyakul, S., Singh, V. P., Bagali, P. G., Prasanna, H. C., McLaren, G. and Khush, G. S. 2003.** Identification of QTL for growth and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. **Theoretical and Applied Genetics** 107: 679-690.
- Kraakman, A. T. W., Martínez, F., Mussiraliev, B., Eeuwijk, F. A. V. and Niks, R. E. 2006.** Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. **Molecular Breeding** 17: 41-58.
- Kraakman, A. T. W., Niks, P. E., Van den Berg, P. M. M. M., Stam, P. and Van Eeuwijk, F. A. 2004.** Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. **Genetics Society of America** 168: 435-446.
- Lander, E. S. and Botstein, D. 1986.** Strategies for studying heterogeneous genetic traits in humans by using a linkage map of restriction fragment length polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 83: 7353-7357.
- Leng, Y., Zhao, M., Wang, R., Steffenson, B. J., Bruggeman, R. S. and Zhong, Sh. 2018.** The gene conferring susceptibility to spot blotch caused by *Cochliobolus sativus* is located at the *Mla* locus in barley cultivar Bowman. **Theoretical and Applied Genetics** 131 (7): 1531-1539.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marassas, W. F. O. 1983.** *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, New York.
- Roy, J. K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H. S. and Gupta, P. K. 2006.** Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. **Current Science** 90: 5-10.
- Roy, J. K. Smith, K. P., Muehlbauer, G. J., Chao, S., Close, T. J. and Steffenson, B. J. 2010.** Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. **Molecular Breeding** 26: 243-256.
- Sharma, R. C., Duveiller, E. and Jacquemin, J. M. 2007.** Microsatellite markers associated with spot blotch resistance in spring wheat. **Journal of Phytopathology** 155: 316-319.
- Steffenson B. J., Hayes, P. M. and Kleinhofs, A. 1996.** Genetic of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley. **Theoretical and Applied Genetics** 92 (7): 552-558.
- Thornsberry, J. M., Goodman, M. M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D. and Buckler, E. S. 2001.** *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. **Nature Genetics** 28: 286-289.
- Wang, R., Leng, Y., Shaikat Ali, S., Wang, M. and Zhong, Sh. 2017.** Genome-wide association mapping of spot blotch resistance to three different pathotypes of *Cochliobolus sativus* in the USDA barley core collection. **Molecular Breeding** 37: 44.
- Wilcoxon, R. D., Rasmusson, D. C. and Miles, M. R. 1990.** Development of barley resistance to spot blotch and genetic of resistance. **Plant Disease** 74 (3): 207-210.



Identification of gene loci associated with seedling resistance to common spot blotch disease of barley using association analysis method

Mohammad Amin Mazinani¹, Saeid Navabpour^{2*}, Reza Aghnoum³, Khalil Zynalinezhad⁴ and Mohammad Ali Dehghan⁵

Received: May 4, 2019

Accepted: August 6, 2019

Abstract

Spot blotch caused by the fungal pathogen *Cochliobolus sativus* and is an important leaf disease of barley. To identify gene loci associated with seedling resistance to spot blotch in a population consisting of 142 modern European two-row spring barley cultivars, the genotypic data from 407 AFLP and SSR markers and phenotypic data derived from responses of barley cultivars to four isolates of spot blotch (Csh-1 and Csh-16 isolates from barley and Cst-42 and Cst-151 isolates from wheat) were used. These isolates were collected from Mazandaran, Golestan and Khorasan-e-Razavi provinces. The results showed that most of the studied cultivars at seedling stage were resistant to Csh-16 and Cst-42 isolates, but the highest number of susceptibility reactions to Csh-1 and Cst-151 isolates were observed. Population structure analysis subdivided the studied cultivars into two subpopulations (K=2). Association analysis using general linear model (GLM), six and twelve markers and using mixed linear model (MLM), three and four markers associated with resistance to isolates separated from barley and wheat leaves was identified, respectively, that were significantly to ($P \leq 0.01$). These QTLs were mapped on chromosomes 2H, 3H, 5H, 6H and 7H. All of the reported QTLs were specific for each isolate and only Bmag0225-161 marker was common between two isolates Csh-1 and Cst-151. The Identified markers can be used in breeding programs to develop disease resistant cultivars after validation.

Keywords: AFLP, Association mapping, *Cochliobolus sativus*, SSR

1. Ph. D. Student, Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Assoc. Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Research Assist. Prof., Dept. of Seed and Plant Improvement Research, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran
4. Assist. Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
5. Research Assist. Prof., Dept. of Seed and Plant Improvement Research, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran

* Corresponding author: navabpour@gau.ac.ir