

شناسایی نواحی ژنومی کنترل کننده صفات اگرومورفولوژیک گیاه جو در شرایط نرمال و تنش کم آبی

ساناز غفاری مقدم^۱، حسین صبوری^{۲*}، عبداللطیف قلیزاده^۳، حسینعلی فلاحی^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

۲. دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

۳. استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

۴. استادیار، بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۲۹

چکیده

به منظور مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده مرتبط با صفات اگرومورفولوژیک در گیاه جو در مرحله رویشی و زایشی تحت شرایط نرمال و تنش خشکی، ۱۰۰ خانواده F3 حاصل از تلاقی دو رقم بادیا × کومینو در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار ارزیابی شدند. این تحقیق در سال‌های زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه گنبد کاووس انجام شد. از صفات برجسته والد بادیا می‌توان عملکرد بالاتر و حساس به ورس و تنش و والد کومینو عملکرد پایین‌تر و تحمل به ورس و تنش اشاره کرد. نقشه پیوستگی با استفاده از ۴۹ آلل SSR، ۴ آلل ISSR و ۱۹ آلل iPBS تهیه شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تمامی صفات ارزیابی‌شده در مرحله رویشی و زایشی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار داشتند. از این رو می‌توان خاطر نشان کرد، تنوع ژنتیکی مطلوبی در بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد. بررسی مقایسه میانگین صفات در نتاج تلاقی بادیا × کومینو نشان داد برای کلیه صفات مورد ارزیابی در مرحله رویشی و زایشی ارزش‌های بیشتر از والد دارای حداکثر مقدار صفت و کمتر از والد دارای حداقل صفت دیده شد که مبین تفکیک متجاوز برای صفات مورد مطالعه بود. در این پژوهش فواصل نشانگری 1-IPBS2074 - 4-IPBS2077 - 5-IPBS2274 - 1-IPBS2231 - 1-IPBS2231 که بر روی کروموزوم‌های شماره ۵ و ۷ قرار داشتند، به دلیل دارا بودن بیشترین تعداد QTL‌های کنترل‌کننده صفات مورد بررسی در مرحله رویشی و زایشی به‌عنوان مهم‌ترین نواحی ژنومی شناسایی شدند و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی پس از تعیین اعتبار در مکان‌ها و جمعیت‌های مختلف به‌عنوان مناطق مهم، پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، مرحله رشد رویشی، مکان‌یابی ژن، نشانگرهای پیوسته

مقدمه

مهم‌ترین عامل محدودکننده رشد و عملکرد گیاهان زراعی تنش خشکی است. گیاهان در مقابل خشکی از طریق تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیکی در تمام اندام‌های خود پاسخ می‌دهند (Cellier et al., 1998). جو یکی از عمده محصولات کشت‌شده در مناطق دیم است که متوسط عملکرد آن پایین است بنابراین، انجام پژوهش‌هایی برای

تولیدات جهانی غلات در سال ۲۰۱۶ به رقم ۲۵۲۱ میلیون تن رسید که تنها ۰/۲ درصد پایین‌تر از تولید سال گذشته محاسبه شد و سومین رکورد بالای جهانی در این خصوص به شمار می‌رود (FAO, 2016). جو در مقایسه با سایر گیاهان زراعی، دارای سازگاری اکولوژیکی متمایزی بوده و در شرایط متنوع آب و هوایی قابل کشت است (Samarah, 2005).

ضروری است. هدف از پژوهش حاضر، تهیه نقشه پیوستگی نشانگرهای SSR، iPBS و ISSR، ارزیابی تحمل ژنوتیپ‌های موردبررسی به تنش خشکی، شناسایی صفات مرتبط با تحمل به خشکی و مکان‌یابی و تعیین نشانگرهای مولکولی پیوسته به QTL‌های کنترل‌کننده صفات اگرومورفولوژیک گیاه جو، تحت تنش خشکی در مرحله رشدی رویشی و زایشی در جمعیت F3 حاصل از تلاقی رقم‌های بادیا × کومینو بود.

مواد و روش‌ها

به‌منظور مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده مرتبط با صفات مورفولوژیک در گیاه جو در مرحله رویشی و زایشی تحت شرایط نرمال و تنش خشکی از ۱۰۰ خانواده F3 حاصل از تلاقی دو رقم بادیا × کومینو در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال‌های زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه گنبدکاووس مورد ارزیابی قرار گرفتند. از صفات برجسته والد بادیا می‌توان عملکرد بالاتر و حساس به ورس و تنش و والد کومینو عملکرد پایین‌تر و تحمل به ورس و تنش اشاره کرد به دلیل اینکه آزمایش در سطح گلدان انجام شد و امکان فراهم نمودن شرایط به‌صورت یکنواخت فراهم بود طرح به‌صورت بلوک‌های کامل تصادفی، عمود بر شعاع تابش خورشید اجرا شد. نظر به اینکه منبع بلوک معنی‌دار نشد و همچنین کارایی آن نسبت به طرح کاملاً تصادفی پایین‌تر بود داده‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی تجزیه شد. با توجه به اینکه بسیاری از محققین سعی دارند شرایطی را فراهم نمایند که در اعمال یک تنش، گیاه در معرض تنش‌های دیگر قرار نگیرد تا اثر آن تنش را به‌طور ویژه بررسی کنند، به این منظور در تحقیق حاضر آزمایش در شرایط گلخانه و گلدان انجام شد. قبل از انجام آزمایش، به‌منظور تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، از صفر تا ۳۰ سانتی‌متری خاک مورد استفاده در آزمایش نمونه‌برداری انجام گرفت که خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. بعضی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن از جمله بافت خاک به روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1962)، pH و EC در عصاره اشباع (Haluschak, 2006)، CEC خاک به روش باور (Page, 1982)، درصد کربن آلی به روش والکی بلک (Walkley and Black, 1934)، درصد آهک به روش حجم‌سنجی (Gupta et al., 2002)، فسفر قابل‌استخراج با بیکربنات سدیم ۰/۵ مولار به روش اولسن (Sparks et al., 1996)، واکنش خاک (pH) در عصاره اشباع

گزینش ارقام یا ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در جهت بالا بردن عملکرد جو دیم با توجه به سطح زیر کشت آن و گسترش روزافزون خشکی جهانی ضرورت دارد (Cattivelli et al., 2008).

استفاده از نشانگرها سبب تسهیل در شناسایی ارقام مقاوم به خشکی می‌گردد. پیش از شناسایی نشانگرهای مولکولی، اغلب محققین برای تعیین تنوع ژنتیکی از صفات مورفولوژیکی استفاده می‌کردند که به دلیل محدود بودن این نشانگرها و همچنین تأثیرپذیری از عوامل محیطی، نشانگرهای مولکولی جایگزین نشانگرهای مورفولوژیک گردیدند (Macharo et al., 2004). دغاغله و همکاران (Daghagheleh et al., 2016) با استفاده از خانواده‌های F3 و F4 حاصل از تلاقی بیچر و کویر در جو با استفاده از نشانگرهای SSR و ISSR تعداد ۱۵ QTL را برای صفات مرتبط با عملکرد مکان‌یابی نمودند که در نسل F4 به ترتیب QTL‌های بزرگ‌اثر با ضریب تبیین ۱۲/۲ و ۱۵ شناسایی شدند. بررسی رابطه بین صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی دارای کاربردهای متعددی از جمله شناسایی آل‌های صفات مطلوب در مجموعه ژرم‌پلاس، کمک به مکان‌یابی دقیق QTL‌ها و غیره است. (Gebhardt et al., 2004). پیغمبری و همکاران (Peighambari et al., 2005) در مطالعه ۷۲ لاین هاپلوئید دوبله جو حاصل از تلاقی استپتو و مورکس در دو سال متفاوت و در شرایط تنش خشکی برای صفات فنولوژیک ۹ جایگاه واجد QTL نقشه‌یابی نمودند. کاسترو و همکاران (Castro et al., 2008) در تجزیه QTL صفات فنولوژیک جمعیت حاصل از تلاقی ارقام BCD47 و Baronesse جو ۱۸ مکان واجد QTL نقشه‌یابی نمودند. هندلی و همکاران (Handly et al., 1994) طی تحقیقی پی بردند که QTL‌هایی در بازوی بلند کروموزوم چهارم جو، بازدهی مصرف آب و سازگاری با محیط‌های خشک را کنترل می‌کنند. التینکو و همکاران (Altinku et al., 2003) با استفاده از نتایج F2 حاصل از تلاقی دو والد حساس و متحمل به خشکی Tokak × ST5819، بین یک نشانگر AFLP و مقاومت در مقابل علف‌کش پاراکوات و مقدار نسبی آب برگ به‌عنوان معیارهای تحمل به خشکی پیوستگی، مشاهده کردند.

با توجه به کاربرد وسیع و نیاز روزافزون به غلات و تنش خشکی به‌عنوان مهم‌ترین عامل محدودکننده در عملکرد غلات، گزینش ارقام متحمل به کمک نشانگرها جهت به‌نژادی

نحوه‌ی اعمال تنش به شکلی بود که به توانیم حداکثر تنوع ژنتیکی را در خانواده حاصل از تلاقی دو والد ذکر شده داشته باشیم. در پایان برداشت، از گلدان‌ها نمونه‌ی خاک تهیه و رطوبت وزنی آن تعیین شد که برابر با چهار درصد بود. با توجه به اینکه بافت خاک مورد استفاده لوم رسی سیلتی (Si - C - L) بود، پتانسیل ماتریک در زمان برداشت گیاه حدوداً ۱۸- بار اندازه‌گیری شد. خاک گلدان‌های نرمال همیشه در حالت ظرفیت مزرعه نگهداری شدند.

به‌وسیله الکتروود شیشه‌ای (Thomas et al., 1996) تعیین گردید (جدول ۱).

در هر تکرار با احتساب ۱۰۰ خانواده و ۲ والد به تعداد ۳۰۶ گلدان در نظر گرفته شد. گلدان‌ها با خاک مزرعه پر شدند. در هر گلدان تعداد ۱۰ بذر کاشته شد. گلدان در هر آزمایش (نرمال و تنش خشکی) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در گلخانه چیده شدند و تا مرحله ۴ برگی آبیاری گلدان‌ها به‌طور یکنواخت در هر آزمایش انجام گرفت. بعد از مرحله ۴ برگی در آزمایش تنش خشکی آب دادن گلدان‌ها قطع گردید.

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

Table 1. Physical and chemical properties of used soil

درصد اشباع	هدایت الکتریکی (EC)	pH	آهک lime	آهن Fe	منگنز Mn	روی Zn	مس Cu
	ds/m		%		-----ppm-----		
48.5	0.96	7.6	10.8	2.8	16	0.6	1.6
بافت خاک texture	نیتروژن (N)	فسفات P	پتاسیم K	رس clay	سیلت silt	شن sand	کربن آلی (O.C)
	%	-----ppm-----			-----%		
لوم رسی سیلتی (Silt-Clay-Loam)	0.08	13	340	31	56	13	0.78

توسعه‌یافته) تمامی تیمارهای آزمایشی انجام و نمونه‌ها بلافاصله درون یخ قرار گرفته و در آزمایشگاه وزن تر آن‌ها با ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد (برگ‌های سالم و بدون شکستگی و پارگی)، سپس تمامی نمونه‌ها در آب مقطر (درون لوله‌آزمایش) و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت وزن اشباع برگ‌ها اندازه‌گیری شد، سپس برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند و وزن خشک هرکدام اندازه‌گیری شد. با قرار دادن وزن تر، وزن اشباع و وزن خشک در رابطه ۱ محتوای آب نسبی برگ محاسبه شد.

$$RWC = (FW - DW) / (SW - DW) \times 100 \quad [1]$$

که در آن FW: وزن تر برگ بلافاصله بعد از نمونه‌برداری، DW: وزن خشک برگ بعد از قرار گرفتن در آون، و SW: وزن اشباع برگ بعد از قرار گرفتن در آب مقطر هستند.

جهت اندازه‌گیری صفات مربوط به ریشه، در پایان دوره رشد و برداشت، گیاهچه‌ها از گلدان پلاستیکی خارج و تمامی ریشه‌ها به‌طور کامل با رعایت حداقل آسیب‌دیدگی با استفاده

به‌منظور مقایسه گیاهچه‌ها از لحاظ مقاومت به تنش، نمره‌دهی گیاهچه‌ها با استفاده از روش لورستو و چانگ (Loresto and Chang, 1981) بعد از اعمال تنش صورت گرفت. اندازه‌گیری‌ها برای ۷ بوته انجام شد. ارتفاع گیاهچه، طول ساقه، طول سنبله (با در نظر گرفتن ریشک)، طول پدانکل (فاصله‌ی بین انتهای سنبله تا اولین گره)، طول، عرض برگ پرچم و طول ریشه با خط‌کش اندازه‌گیری شد (میلی‌متر). قطر ساقه، طول دانه، قطر دانه، قطر ریشه (توسط کولیس)، تعداد بوته، تعداد سنبله، حجم ریشه (برحسب سانتی‌متر مکعب)، وزن تر و خشک گیاهچه وزن تر و خشک سنبله، وزن کل برگ‌های بوته، وزن تر و خشک برگ پرچم و وزن تر و خشک سنبله و وزن تر و خشک ریشه (برحسب گرم با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۰۱) اندازه‌گیری شدند. همچنین محتوای کلروفیل برگ‌ها با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر (SPAD502) محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری صفت محتوای آب نسبی برگ (RWC) از روش ریچی و نگوین (Ritchie and Nguyen, 1990) استفاده شد. ابتدا نمونه‌برداری از برگ رفرنس (آخرین برگ

با غلظت نهایی 1×10^{-5} MgCl₂، با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، dNTPs، با غلظت ۱۰ میلی‌مولار و DNA رقیق‌شده با غلظت ۰/۷۵-۰/۵ (نانوگرم)، آغازگر مستقیم و معکوس هرکدام با غلظت ۶۰ نانوگرم اضافه شد. سپس مخلوط واکنش سانتی‌فیوژ شد و در تیوپ‌های PCR حاوی DNA تقسیم شد. در نهایت ۴ میکرولیتر روغن معدنی جهت جلوگیری از تبخیر مواد در درون هر تیوپ اضافه شد. تیوپ‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل iCycler (BIORAD) ساخت کشور آمریکا) قرار داده شدند. چرخه‌های حرارتی برای نشانگرهای SSR، شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه در دمای اختصاصی آن‌ها و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و نهایتاً مرحله تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. چرخه‌های حرارتی برای نشانگرهای SSR و iPBS شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۱۰ چرخه اتصال آغازگرها در دمای ۶۴-۵۲ به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۲۵ چرخه اتصال آغازگرها در دمای اختصاصی آن‌ها به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتاً یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید واسرشته‌ساز شش درصد تفکیک و نمایان‌سازی باندها با روش موسوم به روش سریع رنگ‌آمیزی نقره (Caetano Anolles and Gresshoff, 1994) انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس صفات مختلف در ژنوتیپ‌ها، تحت وضعیت تنش خشکی و وضعیت نرمال با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت، سپس میانگین صفات در والدین مقایسه شد تا علاوه بر بررسی آثار تنش خشکی بر صفات مختلف، والد متحمل و حساس نیز تعیین شود. برای تهیه نقشه ژنتیکی در جمعیت F3 از نرم‌افزار Map Manager QTX استفاده شد. فواصل نشانگری در این نقشه نیز بر اساس تابع کوزامبی محاسبه گردید (Kosambi, 1994). برای پیدا کردن QTLها از (QGENE) استفاده شد (Nelson, 1997). برای

از آب جاری شسته شدند. بدین منظور خاک هر گلدان درون تشتک آبی جداگانه‌ای خیسانده شد و با استفاده از محلول هگزا متا فسفات سدیم ذرات خاک چسبیده به ریشه‌ها از آن‌ها جدا شدند. حجم ریشه از طریق اختلاف حجم ایجادشده پس از قرار دادن ریشه در حجم مشخصی از آب محاسبه شد. سطح ریشه از روش اتکینسون (Alizadeh, 2005) با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد.

$$[۲] \quad \text{سطح ریشه} = (\text{طول ریشه} \times \pi \times \text{حجم ریشه})^{1/5}$$

با داشتن وزن تر ریشه (RFW) و وزن خشک ریشه (RDW) و سایر صفات ریشه‌ای از قبیل نسبت وزن خشک ریشه به حجم ریشه چگالی ریشه (RDW/RV) و چگالی سطح ریشه (RSD) از رابطه (۳) محاسبه شدند (Ganjali et al., 2003; Hajbassbi, 2001).

$$[۳] \quad \pi \times (\text{قطر ریشه} \times \text{طول ریشه}) = \text{چگالی سطح ریشه}$$

ارزیابی ژنوتیپی

ارزیابی‌های ژنوتیپی در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه گنبدکاووس انجام گرفت. استخراج DNA به روش CTAB (Saghi Maroof, 1994) انجام گرفت. DNAهای استخراجی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از ۲۸ آل چند شکل SSR (از بین ۸۳ نشانگر SSR)، 4 آل چند شکل ISSR و ۱۹ آل چند شکل iPBS جهت اشباع نقشه پیوستگی استفاده شد (Kaviani et al., 2017). مبنای انتخاب نشانگرهای تصادفی میزان چندشکلی آن‌ها در مطالعات قبل بود. نشانگرهای SSR نیز به صورت تصادفی روی هر کروموزوم به صورت جداگانه انتخاب شدند با توجه به نظر لندر و بوتیستین (Lander and Botstein., 1989) چون میانگین فاصله بین دو نشانگر در تحقیق حاضر کمتر از ۲۰ سانتی مورگان بود این تعداد نشانگر برای نقشه‌یابی مناسب تشخیص داده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۱۰ میکرولیتر برای هر نمونه DNA انجام پذیرفت. جهت انجام PCR ابتدا به میزان ۲ میکرولیتر DNA ژنومی رقیق‌شده، در هر تیوپ PCR تقسیم شد، سپس ۸ میکرولیتر از محلول PCR (غیر از DNA ژنومی) به هر تیوپ اضافه و به آرامی تکان داده شد. قابل توجه است که برای تهیه مخلوط واکنش در یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری به ترتیب آب دو بار تقطیر، محلول مادری (با ترکیب Taq DNA Polymerase با غلظت ۰/۰۴ واحد بر میکرولیتر، بافر PCR

خشک گیاهچه با (۰/۹۰) درصد تعلق گرفت. در اثر اعمال تنش گرمایی، گیاه با سرعت بیشتری دوره‌ی رشد خود را کامل می‌کند و وارد مرحله‌ی زایشی می‌شود، بنابراین دوره‌ی کوتاه‌تری را برای افزایش طول سنبله و تولید سنبلچه دارد، لذا طول سنبله کاهش می‌یابد (Inamullah et al., 2007). در نتیجه دوره‌ی رشدی، ارتفاع بوته، طول ساق گل، طول سنبله‌ی اصلی، عملکرد کاه و حتی طول ریشک کاهش می‌یابد. موسوی شبستری (Mosavi Shabestari, 2007) با بررسی عملکرد و اجزای عملکرد ۲۱ لاین گندم مناطق سردسیر، بیشترین و کمترین ضریب تغییرات را به ترتیب برای وزن سنبله (۱۴/۲۸ درصد) و تعداد روز تا آبیستی و تعداد روز تا گلدهی (هر کدام ۰/۳۸ درصد) به دست آوردند. توزیع فنوتیپی صفات نرمال بود. مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در دو والد بادیا و کومینو با استفاده روش آزمون t طبق جدول (۳) بود. توزیع فنوتیپی صفات ارزیابی شده در شکل ۱ ارائه شده است. برای اکثر صفات مورد ارزیابی در مرحله رشد رویشی و زایشی مشاهده ارزش‌های بیشتر و کمتر از والدین مبین تفکیک متجاوز برای صفات مورد مطالعه بود. وجود تفکیک متجاوز احتمال شناسایی QTLها برای صفات را افزایش داده و نشان می‌دهد که هر دو والد شامل آل‌های مطلوب و نامطلوب در صفات مختلف هستند. تیان و همکاران (Tian et al., 2005) در پژوهشی در برنج برای تمامی صفات مورد مطالعه‌شان تفکیک متجاوز مشاهده کردند، اظهار داشتند این پدیده می‌تواند به دلیل نوترکیبی QTLهای کوچک اثر، اپیستازی، اثر متقابل ژنوتیپ با محیط و جهش در طول فرآیند کشت بافت برای تولید جمعیت هاپلوئید مضاعف شده باشد.

شناسایی QTLها

الف. شرایط نرمال

برای صفات ارزیابی شده تحت شرایط نرمال ۱۲ فاصله واجد QTL شناسایی شدند که کنترل ۱۲ صفت را بر عهده داشتند (جدول ۴). یک جایگاه واجد QTL برای صفت طول گیاهچه بر روی کروموزوم ۵ شناسایی شد که مقدار ۱۲/۲ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه نمود. اثر افزایشی برای این QTL برابر با ۲/۵۳- میلی‌متر بود که جهت منفی آن نشان می‌دهد که آل کاهش‌دهنده از والد بادیا به نتاج منتقل شد. بائوم و محمدی (Baom and Mohammadi., 2008) چهار QTL برای این صفت بر روی کروموزوم‌های ۲، ۴، ۶ و

تعیین QTLها و برآورد اندازه اثرات آن‌ها، از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب CIM استفاده گردید و نقطه‌ای که واجد بالاترین مقدار LOD بود به‌عنوان ناحیه با بیشترین احتمال وجود QTL شناسایی شد. در کلیه موارد از پرمیوتیشن و Resampling ۱۰۰۰ استفاده شد و برای هر پایش ۰/۵ سانتی مورگان در نظر گرفته شد و بر اساس آن لود ۲/۵ به‌عنوان حد بحرانی در نظر گرفته شد. نظر به اینکه برخی از صفات دارای توزیع نرمال نبودند. از تبدیل داده‌ها و همچنین روش حداکثر درست‌نمایی برای جلوگیری از آریبی نتایج استفاده شد (Haley and Knott., 1992). جهت تهیه نقشه ژنتیکی از اسکورهای ۱ (برای وجود باند) و ۲ (برای عدم وجود باند) در نشانگرهای ریزماهواره استفاده شد. در مورد نشانگرهای iPBS از اسکورهای ۱ (برای وجود باند) و ۳ (برای عدم وجود باند) در مواقعی که باند در والد اول تکثیر یافته بود، استفاده شد. همچنین در مورد نشانگرهای iPBS از نمره‌های ۲ (برای وجود باند) و ۴ (برای عدم وجود باند) در مواقعی که باند در والد دوم تکثیر یافته بود استفاده شد. خاطر نشان می‌شود که برجسب زدن نشانگرهای تصادفی به نشانگرهای ریزماهواره برای کروموزوم‌ها جداگانه انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی مورفولوژیکی صفات در والدین و خانواده‌های F3

قبل از انجام هرگونه تجزیه، نتایج حاصل از آزمون بارتلت حاکی از یکنواخت بودن واریانس خطای آزمایش‌ها بود. با توجه به نرمال بودن خطای آزمایش‌ها، نتایج تجزیه واریانس صفات در تنش خشکی و نرمال در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که در همه‌ی صفات ارزیابی شده در مرحله رویشی و زایشی، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد بین دو وضعیت آزمایش وجود داشت. اختلاف آماری معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها بیانگر وجود تنوع بالا بین مواد گیاهی مورد ارزیابی و احتمالاً مکانیسم‌های متفاوت بین آن‌ها در واکنش به تنش خشکی است که می‌توانند در انتخاب ژنوتیپ مناسب مورد استفاده قرار گیرند. بیشترین و کمترین ضریب تغییرات در شرایط نرمال به ترتیب به صفت چگالی سطح ریشه با (۱۷/۹۲) درصد و صفت وزن خشک گیاهچه با (۰/۰۵) درصد تعلق گرفت. همچنین بیشترین و کمترین ضریب تغییرات در شرایط تحت تنش خشکی به ترتیب به صفت وزن خشک سنبله با (۳۶/۵۳) درصد و صفت وزن

اثر افزایشی این دو QTL به ترتیب برابر با ۲/۲۹۳ و ۱/۹۴ میلی‌متر بود و آل‌های والد کومینو باعث افزایش طول ساقه شدند. خلیلی و همکاران (Khalili et al., 2017) برای صفت طول ساقه سه QTL بر روی کروموزوم‌های 4B، 2D و 2D مکان‌یابی کردند که QTL شناسایی‌شده روی کروموزوم 2D این تحقیق با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.

۷ و پیغمبری و همکاران (Peighambari, 2005) سه QTL کنترل‌کننده صفت مذکور را روی کروموزوم ۴ شناسایی نمودند که با پژوهش حاضر مطابقت نداشت دو جایگاه واجد QTL برای طول ساقه بر روی کروموزوم شماره ۲ و برای توجیه تغییرات طول ساقه یافت گردید که در مجموع ۱۸/۲ درصد از تنوع کل این صفت را تبیین نمودند.

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در مرحله رویشی تحت شرایط نرمال و تنش خشکی.

Table 2. Analysis of variance of studied traits at vegetative stage conditions under normal and drought stress.

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	وزن تر گیاهچه		وزن خشک		قطر		طول برگ
			تعداد بوته	طول گیاهچه	گیاهچه	طول ساقه	ساقه	پرچم	
			Number of plant	Seedling length	Seedling weight	Seedling dry weight	Stem length	Stem diameter	Flag leaf length
			نرمال						
Genotype	ژنوتیپ	101	34.40**	73.77**	11.89**	8.30**	41.51**	1.40**	16.95**
Error	خطا	202	0.69	12.50	0.002	0.001	2.31	0.01	0.87
CV (%)	ضریب تغییرات		8.63	9.27	0.32	0.05	11.92	4.98	14.18
CVG	ضریب تغییرات ژنوتیپی		11.00	0.015	3.884	2.712	12.80	0.45	5.25
CVP	ضریب تغییرات فنوتیپی		11.68	12.26	3.886	2.711	15.06	0.46	6.107
			تنش						
Genotype	ژنوتیپ	101	6.92**	154.67**	2.03**	0.38**	49.71**	0.94**	18.54**
Error	خطا	202	0.59	21.75	0.002	0.002	3.53	0.05	2.53
CV (%)	ضریب تغییرات		17.01	16.57	0.91	0.90	21.51	16.24	20.70
CVG	ضریب تغییرات ژنوتیپی		2.06	43.43	0.664	0.370	15.08	0.28	5.22
CVP	ضریب تغییرات فنوتیپی		2.64	64.75	0.666	0.372	18.55	0.33	7.71

Table 2. Continued

جدول ۲. ادامه.

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	عرض برگ	تعداد کل برگ‌ها	وزن کل برگ‌ها	وزن تر برگ	وزن خشک برگ	محتوای نسبی آب برگ	تعداد سنبله
									پرچم
			نرمال						
Genotype	ژنوتیپ	101	0.01**	590.94**	2.72**	0.01**	0.01**	51.86**	37.57**
Error	خطا	202	0.0004	4.56	0.001	0.009	0.001	1.64	0.59
CV (%)	ضریب تغییرات		8.70	5.62	0.62	2.21	3.31	13.92	10.45
CVG	ضریب تغییرات ژنوتیپی		0.0031	191.62	2.65	0.29	0.002	16.41	12.07
CVP	ضریب تغییرات فنوتیپی		0.0035	196.09	2.66	0.038	0.003	18.01	12.65
			تنش						
Genotype	ژنوتیپ	101	0.03**	354.66**	0.69**	0.04**	0.02**	23.54**	4.26**
Error	خطا	202	0.001	5.69	0.0005	0.004	0.008	1.93	0.18
CV (%)	ضریب تغییرات		19.92	8.77	2.72	4.65	7.08	16.75	45.07
CVG	ضریب تغییرات ژنوتیپی		0.008	114.03	0.21	0.011	0.011	7.05	1.33
CVP	ضریب تغییرات فنوتیپی		0.010	119.61	0.22	0.015	0.019	8.95	1.50

Significant at the 1% level of probability

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ۲. ادامه. Table 2. Continued

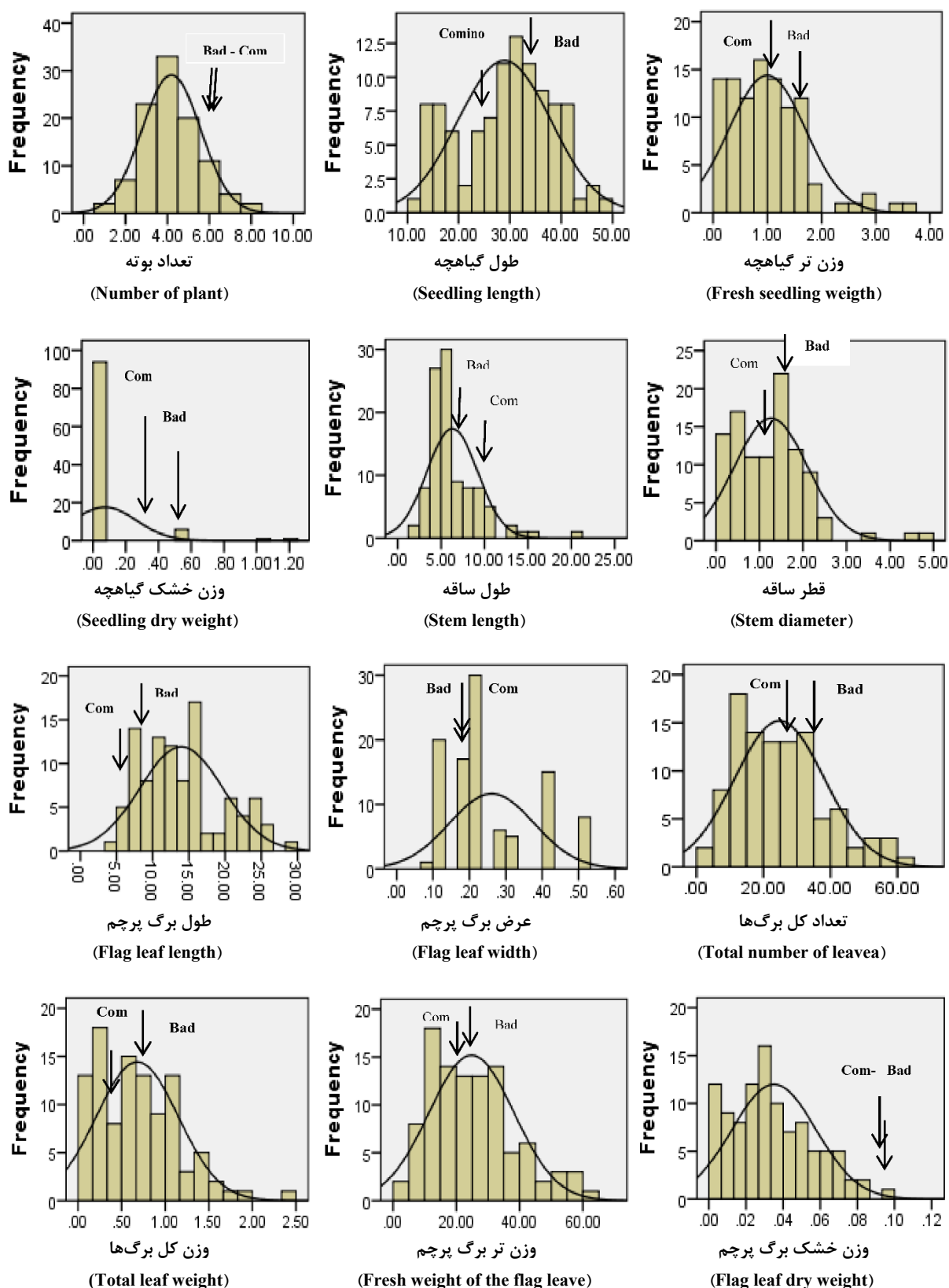
S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	طول	وزن تر	وزن خشک	طول	طول	قطر
			سنبله Spike length	سنبله Fresh spike weight	سنبله Spike dry weight	پدانکل Pedancle length	ریشه Root length	ریشه Root diameter
			Normal			نرمال		
Genotype	ژنوتیپ	101	8.18**	0.02**	0.08**	3.93**	24.18**	4.26**
Error	خطا	202	0.02	0.001	0.008	0.01	0.83	0.14
CV (%)	ضریب تغییرات		1.57	7.46	8.44	14.44	11.10	5.26
CVG	ضریب تغییرات ژنوتیپی		2.66	0.005	0.023	0.24	7.62	2.80
CVP	ضریب تغییرات فنوتیپی		2.68	0.006	0.031	0.25	8.44	2.94
			Stress			تنش		
Genotype	ژنوتیپ	101	69.16**	0.08**	0.01**	1.33**	31.45**	10.71**
Error	خطا	202	0.26	0.009	0.002	0.0006	0.34	0.07
CV (%)	ضریب تغییرات		13.21	24.88	36.53	24.83	10.80	4.88
CVG	ضریب تغییرات ژنوتیپی		22.50	0.022	0.001	0.43	10.16	3.47
CVP	ضریب تغییرات فنوتیپی		22.77	0.031	0.003	0.43	10.50	3.54

جدول ۲. ادامه. Table 2. Continued

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	حجم	وزن تر	وزن خشک	سطح	چگالی سطح	چگالی	محتوای
			ریشه Root volume	ریشه Root fresh weight	ریشه Root dry weight	ریشه Root level	ریشه Root surface density	ریشه Root Density	کلروفیل Chlorophyll
			Normal			نرمال			
Genotype	ژنوتیپ	101	27.13**	30.53**	0.02**	320.74**	34702.29**	0.001**	0.26**
Error	خطا	202	0.96	1.05	0.006	11.09	1248.62	0.0002	0.011
CV (%)	ضریب تغییرات		11.65	11.10	5.82	11.28	17.92	10.60	3.04
CVG	ضریب تغییرات ژنوتیپی		8.54	9.62	0.003	101.18	10932.56	0.0007	0.081
CVP	ضریب تغییرات فنوتیپی		9.49	10.66	0.009	112.06	12156.66	0.0009	0.092
			Stress			تنش			
Genotype	ژنوتیپ	101	42.54**	39.70**	0.007**	437.21**	30596.46**	0.00006**	0.65**
Error	خطا	202	0.80	0.42	0.002	4.58	447.87	0.0000004	0.04
CV (%)	ضریب تغییرات		15.82	10.74	6.36	11.10	18.62	11.68	2.45
CVG	ضریب تغییرات ژنوتیپی		13.63	12.83	0.0009	141.38	9852.48	0	0.019
CVP	ضریب تغییرات فنوتیپی		14.42	13.24	0.002	145.87	10291.56	0.00001	0.023

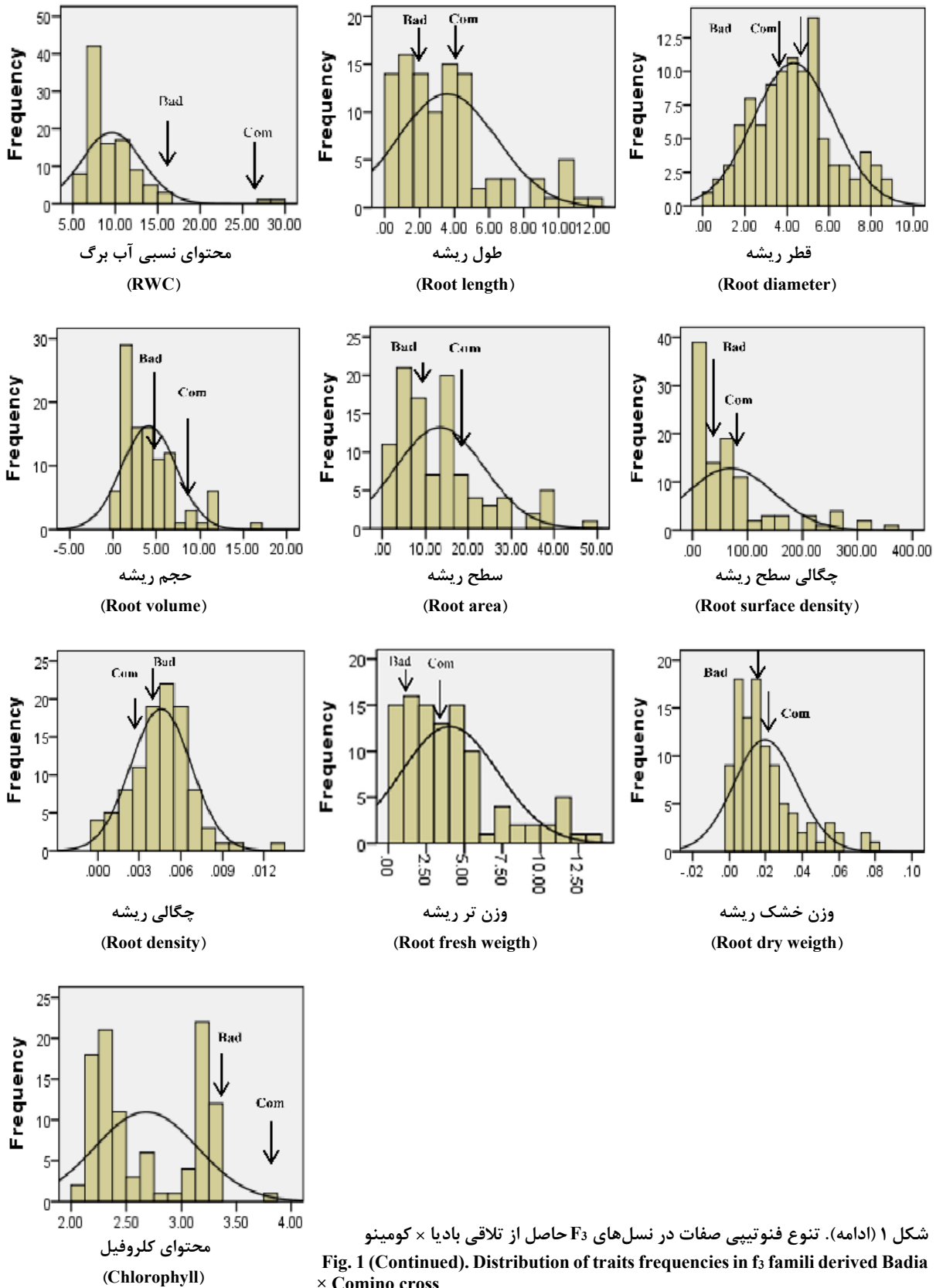
** معنی دار در سطح احتمال ۱٪

Significant at the 1% level of probability



شکل ۱. تنوع فنوتیپی صفات در نسل‌های F_3 حاصل از تلاقی بادیا \times کومینو

Fig. 1. Distribution of traits frequencies in F_3 famili derived Badia \times Comino cross



شکل ۱ (ادامه). تنوع فنوتیپی صفات در نسل‌های F₃ حاصل از تلاقی بادیا × کومینو
 Fig. 1 (Continued). Distribution of traits frequencies in f₃ famili derived Badia × Comino cross

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات (آزمون t) مورد مطالعه در دو والد بادیا و کومینو

Table 3 Comparison of the mean (t test) of studied traits in badia and comino parents

Traits	صفات	Normal نرمال			Stress تنش		
		بادیا Badia	کومینو Comino		بادیا Badia	کومینو Comino	
Number of plants	تعداد بوته	6	12	**	6	6	ns
Seedling length	طول گیاهچه	46	47	ns	33.6	32	*
Fresh seedling weight	وزن تر گیاهچه	5.42	6.993	*	1.413	1.313	*
Seedling dry weight	وزن خشک گیاهچه	3.012	3.572	*	0.043	0.03	*
Stem length	طول ساقه	6.70	15.2	**	6.1	9.5	**
Stem diameter	قطر ساقه	1.56	3.50	**	1.59	1.34	*
Flag leaf length	طول برگ پرچم	11.2	8.7	**	9.1	7.2	**
Flag leaf width	عرض برگ پرچم	0.2	0.4	**	0.2	0.2	ns
Total number of leaves	تعداد کل برگ ها	38	38	ns	30	28	*
Total leaf weight	وزن کل برگ ها	2.143	3.273	**	0.653	0.383	**
Fresh weight of the flag leaves	وزن تر برگ پرچم	0.033	0.063	**	0.026	0.022	ns
Dry weight of the flag leaves	وزن خشک برگ پرچم	0.002	0.004	*	0.001	0.001	ns
RWC	محتوای نسبی آب برگ	12.831	23.826	**	15.925	28.848	**
Spike number	تعداد سنبله	3	9	**	-	-	-
Spike length	طول سنبله	11.2	12.5	*	-	-	-

Table 3 Continued

جدول ۳. ادامه

Traits	صفات	Normal نرمال			Stress تنش		
		بادیا Badia	کومینو Comino		بادیا Badia	کومینو Comino	
Fresh Spike weight	وزن تر سنبله	0.20	0.573	**	-	-	-
Dry Spike weight	وزن خشک سنبله	0	0.21	**	-	-	-
Peduncle length	طول پدانکل	0	0.8	**	-	-	-
Root length	طول ریشه	7.2	8.1	*	1.9	3.6	**
Root diameter	قطر ریشه	6.85	7.26	*	3.57	4.84	*
Root volume	حجم ریشه	7	8.5	*	4	6.25	**
Root fresh weight	وزن تر ریشه	8.2	9.203	*	2.23	4.12	**
Root dry weight	وزن خشک ریشه	0.032	0.045	*	0.017	0.02	ns
Root level	سطح ریشه	25.33	29.568	*	9.987	16.862	**
Root surface density	چگالی سطح ریشه	157.013	186.767	**	22.269	56.373	**
Root density	چگالی ریشه	0.005	0.005	ns	0.004	0.003	ns
Chlorophyll content	محتوا کلروفیل	3.615	4.180	*	3.343	3.763	ns
Damage 4 days after seress	میزان خسارت ۴ روز بعد از اعمال تنش	-	-	-	2	2	-
Damage 8 days after seress	میزان خسارت ۸ روز بعد از اعمال تنش	-	-	-	4	2	-
Damage 12 days after seress	میزان خسارت ۱۲ روز بعد از اعمال تنش	-	-	-	5	6	-

ns, *, **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪، غیر معنی دار

ns, *, **: Non significant and significant at the 5 and 1% level of probability respectively

کارایی انتخاب بستگی به مقدار وراثت پذیری و پیشرفت ژنتیکی مورد انتظار دارد. صفاتی که دارای وراثت پذیری و پیشرفت ژنتیکی بالایی هستند ممکن است تحت کنترل اثرات افزایشی ژن‌ها باشند. علاوه بر این، برآورد بالای وراثت‌پذیری و بازده ژنتیکی ممکن است به دلیل واریانس محیطی پایین صفات باشد (Panse, 1957). صفاتی که به‌طور هم‌زمان توارث‌پذیری و پیشرفت ژنتیکی بالایی ندارند، احتمالاً تحت کنترل اثرات ژنی غیر افزایشی باشند.

جدول ۴. QTL‌های کنترل کننده صفات در جمعیت حاصل از تلاقی Badia × comino تحت شرایط نرمال و تنش خشکی.

Table 4. QTLs detected for the traits in the derived from badia × comino stage conditions under normal and drought stress.

trait صفت	QTL	شماره کروموزومی Chromosome number	موقعیت Location	نشانه‌های مجاور Adjacent markers	LOD	فاصله QTL تا نزدیک‌ترین نشانه‌گر QTL interval to the nearest marker	اثر		جهت آلل	For the allele
							افزایشی Incremental effect	ضریب تبیین R ²		
Normal										
Seedling length طول گیاهچه	qSLn-5	5	82	iPBS2077-4 - iPBS2074-1	2.816	0.7	-2.53	12.2	بادیا	بادیا Badia
Stem length طول ساقه	qSLn-2a	2	14	iPBS2240-7 - iPBS2077-5	2.019	0.3	2.293	9.2	کومینو	کومینو Comino
	qSLn-2b	2	16	iPBS2077-5 - EBmao624	2.051	1.7	1.94	9	کومینو	کومینو Comino
Flag leaf length طول برگ پرچم	qFLLn-6	6	0	iPBS2241-4 - iPBS2077-1	2.293	0	-580918	10	کومینو	کومینو Comino
Flag leaf dry weight وزن خشک برگ پرچم	qFLDWn-1	1	30	iPBS2232-5- ISSR16-1	2.267	0.8	0.001	9.9	کومینو	کومینو Comino
RWC محتوای نسبی آب برگ	qRWCn-5	5	70	iPBS2221-1 - GMS001	2.48	0.3	-1.681	10.8	بادیا	بادیا Badia
Root length طول ریشه	qRLn-7	7	4	iPBS2231-1 - iPBS2274-5	2.069	0.2	1.88	9.1	کومینو	کومینو Comino
Root fresh weight وزن تر ریشه	qRFWn-7	7	4	iPBS2231-1 - iPBS2274-5	2.069	0.2	2.112	9.1	کومینو	کومینو Comino
Root dry weight وزن خشک ریشه	qRDWn-4	4	120	iPBS2241-1 - iPBS2241-6	2.539	1.7	0.035	11	کومینو	کومینو Comino
Root surface density چگالی سطح ریشه	qRSDn-7	7	4	iPBS2231-1 - iPBS2274-5	2.095	0.3	71.611	9.2	کومینو	کومینو Comino
Root Density چگالی ریشه	qRDn-4	4	120	iPBS2241-1 - iPBS2241-6	2.369	1.7	0.002	10.3	کومینو	کومینو Comino
Chlorophyll کلروفیل	qChn-3	3	0	iPBS2077-8 - iPBS2077-3	2.046	0	-0.174	9	بادیا	بادیا Badia

Table 4. Continued.

جدول ۴. ادامه.

trait صفت	QTL	شماره کروموزوم Chromosome number	موقعیت Location	نشانه‌های مجاور Adjacent markers	فاصله QTL تا نزدیکترین نشانهگر QTL interval to the nearest marker	اثر افزایشی Incremental effect	ضریب تیبیین R2	جهت آلل For the allele	
									LOD
Drought stress									
Stem diameter قطر ساقه	qSD-2	2	58	iPBS2076-1 - iPBS2083-5	2.556	0.1	55.281	11.1	بادیا Badia
Flag leaf length طول برگ پرچم	qFLL-5	5	82	iPBS2077-4 - iPBS2074-1	2.979	0.7	-3.042	12.8	کومینو Comino
Flag leaf width عرض برگ پرچم	qFLW-5	5	82	iPBS2077-4 - iPBS2074-1	2.666	0.7	-0.06	11.6	بادیا Badia
Total number of leaves تعداد کل برگ‌ها	qTNL-7	7	46	iPBS2074-2 - HVM49	2.206	0.6	-7.08	9.7	کومینو Comino
Damage 4 days after stress خسارت ۴ روز بعد از اعمال تنش	qS2-1a	1	22	HVM20- iPBS2239-5	2.383	2.4	2.452	10.4	بادیا Badia
	qS2-1b	1	24	HVM20- iPBS2239-5	2.393	0.4	12.202	10.4	بادیا Badia
Damage 8 days after stress خسارت ۸ روز بعد از اعمال تنش	qS3-1a	1	44	iPBS2239-1 - ISSR16-3	2.26	1.3	2/84	9.9	کومینو Comino
	qS3-1b	1	46	ISSR16-3- Bmag0718	2.277	0.7	14.158	10	کومینو Comino

یک QTL برای صفت طول ریشه روی کروموزوم ۷ (qRL-7a) شناسایی شد. ضریب تبیین این QTL برابر با ۹/۱ بود. اثر افزایشی این QTL برابر ۱/۸۸ میلی‌متر بود که جهت مثبت آن نشان می‌دهد که آلل‌های افزایش‌دهنده از والد کومینو به نتاج منتقل شد. خلیلی و همکاران (Khalili et al., 2017) برای طول ریشه سه QTL بر روی کروموزوم‌های 2A، 3B و 2D مکان‌یابی کردند که این سه QTL در مجموع ۴۸/۸ درصد از تغییرات فنوتیپی طول ریشه-زا توجیه نمودند با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نداشت.

یک QTL برای صفت وزن تر ریشه روی کروموزوم ۷ (در فاصله ۵-2274-iPBS2231-1) شناسایی شد که ۹/۱ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه نمود. یک QTL برای صفت وزن خشک ریشه بر روی کروموزوم ۴ (qRDW-4) شناسایی شد. ضریب تبیین این QTL برابر با ۱۱ بود. اثر افزایشی این QTL نیز ۰/۳۵ شد که جهت مثبت آن نشان می‌دهد آلل‌های افزایش‌دهنده از والد کومینو به نتاج منتقل شده است. تعدادی از گزارش‌ها نشان می‌دهد وزن خشک ریشه صفت مهمی است که با راندمان مصرف آب

برای صفت طول برگ پرچم، فقط یک QTL روی کروموزوم ۶ (qFLL-6a) در فاصله ۴-2241-iPBS2077-1 مکان‌یابی شد که ۱۰ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه کرد. رحیمی و همکاران (Rahimi et al., 2013) برای صفت طول برگ پرچم یک QTL بزرگ اثر شناسایی کردند که توانست به‌تنهایی بیش از ۳۴ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه نماید؛ بنابراین نتایج این تحقیق با پژوهش حاضر مطابقت نداشت. برای صفت وزن خشک برگ پرچم، یک QTL مکان‌یابی شد که بر روی کروموزوم ۱ در فاصله نشانه‌گری ۵-2232-iPBS2232-5 – ISSR16-1 قرار داشت. در این QTL آلل‌های والد کومینو باعث افزایش این صفت شد. این QTL تنها ۹/۹ درصد از واریانس فنوتیپی صفت وزن خشک برگ پرچم را توجیه نمود.

برای صفت محتوای نسبی آب برگ (RWC) یک جایگاه واجد QTL بر روی کروموزوم ۵ در مجاورت نشانه‌های ۱-2221-iPBS2221-1 – GMS001 نقشه‌یابی گردید که ۱۰/۸ درصد از تنوع کل این صفت را توجیه نمود.

کل تنوع فنوتیپی را توجیه نمود. برای صفت چگالی ریشه، تنها یک QTL بر روی کروموزوم شماره ۴ و جایگاه ۱۲۰ سانتی مورگان شناسایی شد. این QTL در مجاورت نشانگرهای iPBS2241-1 – iPBS2241-6 قرار داشت و ضریب تبیین این QTL ۱۰/۳ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه نمود.

ارتباط دارد. محمدی و همکاران (Mohammad et al., 2011) هفت QTL برای این صفت در جو شناسایی کردند. لی و همکاران (Li et al., 2005) سه QTL با اثرات افزایشی برای این صفت در برنج شناسایی کردند. یک QTL مرتبط با چگالی سطح ریشه روی کروموزوم ۷ (qRSD-7) مکان‌یابی گردید که در فاصله نشانگری iPBS2231-1 – iPBS2274-5 قرار داشت و ۹/۲ درصد از

جدول ۵. QTLهای مشترک برای صفات مورد مطالعه در مرحله رویشی و زایشی

Table 5. QTL of Common Trait in Vegetative and Reproductive Stage

نشانه‌گر مجاور Adjacent markers	شماره کروموزومی Chromosome number	نرمال Normal	رویشی و زایشی تنش Stress
iPBS2239-3 – HVM20	1		اسکوردهی (Score)
iPBS2077-5 – EBMac624	2	طول ساقه (Stem length)	
iPBS2241-1 – iPBS2241-5	4	وزن خشک ریشه-چگالی ریشه (Root dry weight)	
iPBS2077-4 – iPBS2074-1	5	طول گیاهچه – RWC – اسکوردهی (Score-RWC-Seedling length)	طول برگ پرچم – عرض برگ پرچم (Flag leaf width-Flag leaf length)
iPBS2231-1 – iPBS2274-5	7	وزن تر ریشه – طول ریشه – چگالی سطح ریشه (Root surface density-Root length-Root fresh)	

شناسایی شد. این QTL مقدار ۱۱/۱ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه کرد.

برای صفت طول برگ پرچم (qFLL-5) یک QTL با LOD برابر با ۲/۹۷۹ روی کروموزوم شماره ۵ واقع در فاصله iPBS2074-1 – iPBS2077-4 شناسایی شد. ضریب تبیین این QTL برابر با ۱۲/۸ بود. اثر افزایشی این صفت منفی و آل‌های والد کومینو باعث کاهش طول برگ پرچم شدند. یک QTL برای صفت عرض برگ پرچم (qFLW-5d) بر روی کروموزوم ۵ در فاصله نشانگری - iPBS2077-4 iPBS2074-1 مکان‌یابی شد. ضریب تبیین برای این صفت ۱۱/۶ درصد بود. رحیمی و همکاران (Rahimi et al., 2013) دو مکان ژنی qFW-2 و qFW-7 برای صفت عرض برگ پرچم شناسایی کردند که به ترتیب ۶/۵ و ۷/۹ درصد از تنوع کل را برای این صفت توجیه کردند. نتایج به‌دست‌آمده از این صفت با تحقیق حاضر مطابقت نداشت.

از مهم‌ترین دلایل مطابقت نداشتن نتایج تحقیقات دیگر با تحقیق حاضر می‌توان به تفاوت ژنوتیپ‌ها، تفاوت در شرایط آزمایش و تغییر در شرایط محیطی اشاره کرد.

برای صفت محتوای کلروفیل برگ یک QTL بر روی کروموزوم شماره ۳ با فاصله نشانگری - iPBS2077-8 iPBS2077-3 قرار داشت. این QTL دارای اثر افزایشی ۹/۱۷۴- به سمت والد بادیا بود. ضریب تبیین این QTL ۹ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه کرد. رحیمی و همکاران (Rahimi et al., 2013) برای صفت محتوای کلروفیل برگ چهار مکان ژنی بر روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 5H و 6H شناسایی کردند که این نواحی ژنومی توانستند در مجموع نزدیک به ۷۰ درصد از واریانس این صفت را توجیه نمایند.

ب. تنش خشکی

برای صفات ارزیابی شده تحت تنش خشکی هشت فاصله واجد QTL شناسایی شدند که شش صفت را کنترل کردند (جدول ۷).

برای توجیه تغییرات صفت قطر ساقه (qSD-2g) یک جایگاه واجد QTL روی کروموزوم ۲ و ۵۸ سانتی مورگان در مجاورت نشانگرهای iPBS2083-5 - iPBS2076-1

جایگاه کروموزومی QTL‌های مکان‌یابی شده برای صفات مورد مطالعه در جدول ۵ ارائه شده است. مقایسه جایگاه کروموزومی QTL‌های شناسایی شده در مرحله رویشی نشان داد، برخی دارای مکان کروموزومی مشترک بودند. این موضوع احتمالاً به دلیل پیوستگی ژنتیکی است. شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات مورد بررسی در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه بر روی کروموزوم‌های 2A، 2D و 4B همسو با نتایج مطالعه ایونا و همکاران (Hona et al., 2014) است. خلیلی و محمدی (Khalili and Mohammadi., 2015) ۱۱ QTL در شرایط نرمال، کم‌آبی و مجموع دو شرایط مکان‌یابی کردند که QTL‌های مستقر بر روی کروموزوم‌های 4B و 2A به صورت خوشه‌ای صفات مرتبط با مراحل جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای را کنترل می‌کردند که همسو با نتایج مطالعه حاضر است. از دلایل عدم پایداری QTL‌های شناسایی شده می‌توان تفرق صفات و شرایط محیطی (آب‌وهوا) را ذکر نمود که روی رشد و نمو خانواده‌ها تأثیرگذار بودند. همچنین حضور یک QTL در شرایط مختلف بیانگر ثبات ژن است و این که بین QTL و شرایط مختلف محیطی اثر آنتاگونیستی وجود نداشته است، بنابراین به نظر می‌رسد که بتوان این QTL‌ها را در زمره QTL‌های پایدار و اصلی کنترل‌کننده صفات مورد بررسی محسوب کرد و با اطمینان بیشتری از آن‌ها در برنامه‌گزينش به کمک نشانگر به‌عنوان مکمل روش‌های اصلاح کلاسیک استفاده کرد. هرچند در بین سایر QTL‌های کنترل‌کننده همین صفات یا سایر صفات، QTL‌های پراثری شناسایی شده که به یک محیط اختصاص داشته‌اند و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی منطقه‌ای مؤثر خواهد بود. پیشنهاد می‌شود از نتایج مطالعه حاضر پس از تعیین اعتبار در مکان‌ها و جمعیت‌های مختلف و تأیید نشانگرهای پیوسته در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر استفاده شود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف بین افراد جمعیت مورد ارزیابی برای صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. از این رو می‌توان خاطر نشان کرد تنوع مطلوبی در بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد. بررسی مقایسه میانگین صفات در والدین بادیا × کومینو نشان داد والد کومینو در اکثر صفات در مقایسه با والد بادیا دارای ارزش بالاتری بود. همان‌گونه که مشاهده شد در این تحقیق دو QTL بزرگ اثر qSLn-5 (در وضعیت نرمال) و qFLL-5 (در شرایط تنش)

یک QTL برای صفت تعداد کل برگ بر روی کروموزوم ۷ قرار داشت. qTNL-7a، ۹/۷ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه کرد. اثر افزایشی کاهشی و از والد کومینو گرفته شد. دو QTL برای میزان خسارت (۸ روز بعد از اعمال تنش) بر روی کروموزوم ۱ مکان‌یابی شد. اثر افزایشی آن‌ها به ترتیب ۲/۸۴ و ۱۴/۱۵۸ بود. ضریب تبیین برای دو QTL نیز به ترتیب ۹/۹ و ۱۰ بود.

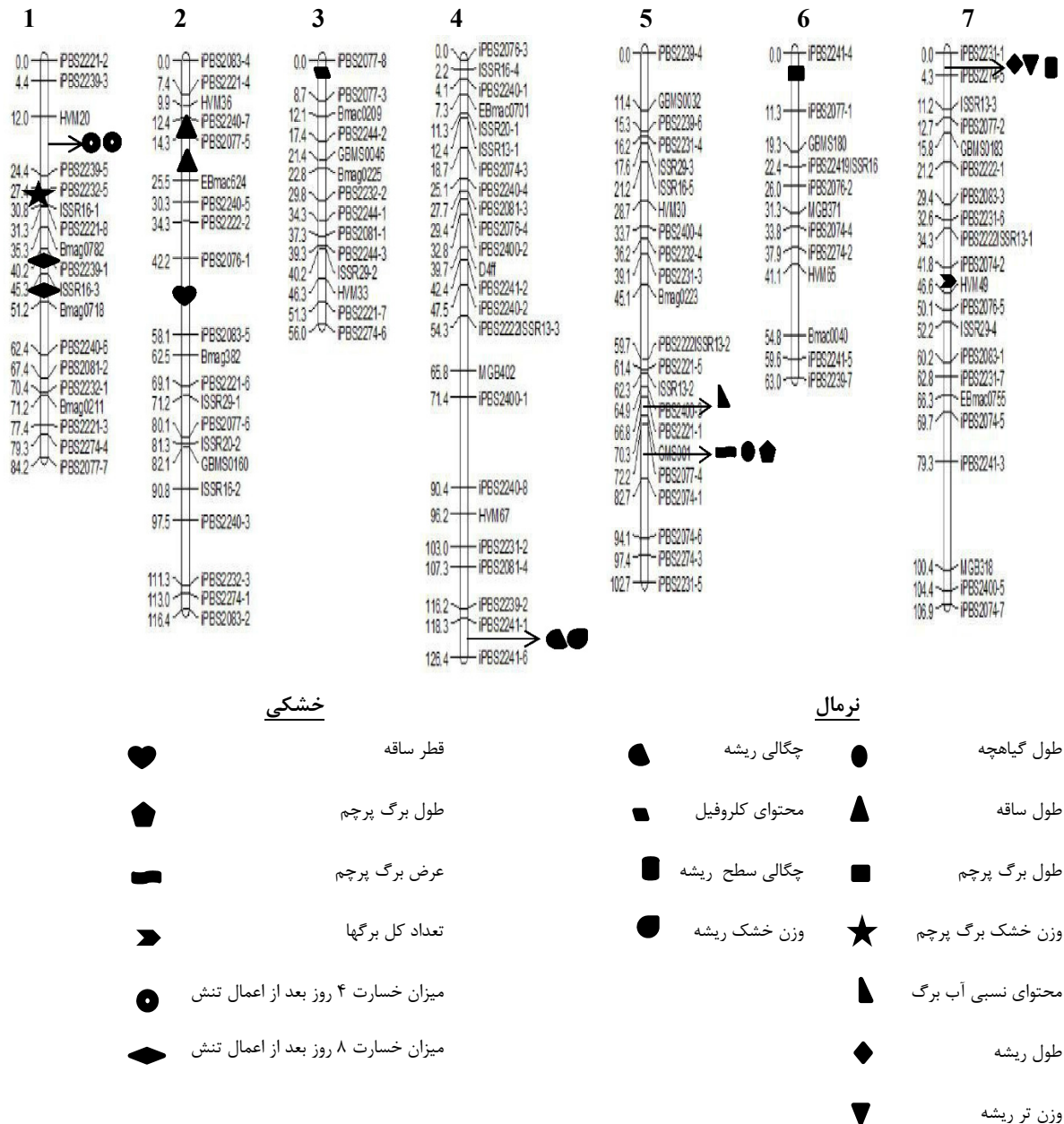
دو QTL برای میزان خسارت (۴ روز بعد از اعمال تنش خشکی) بر روی کروموزوم ۱ مکان‌یابی شد. qS2-1d در فاصله HVM20-iPBS2239-5، قرار داشت که مقدار ۱۰/۴ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه نمود. qS2-1e در فاصله نشانگری HVM20-iPBS2239-5 شناسایی شد و ضریب تبیین برای این QTL ۱۰/۴ بود. اثر افزایشی در دو مکان شناسایی شده مثبت و از والد بادیا به نتاج منتقل شد. مطالب فوق‌گویی این است که QTL‌های مربوط به صفات طول گیاهچه (qSL-5) و وزن خشک دانه (qRDW-4) به ترتیب با توجیه تغییرات فنوتیپی به میزان ۱۲/۲ و ۱۱ مهم‌ترین مکان‌های شناسایی شده در شرایط نرمال می‌باشند.

در شرایط تنش خشکی نیز سه QTL که مربوط به صفات قطر ساقه (qSD-2)، طول برگ پرچم (qFLL-5) و عرض برگ پرچم (qFLW-5) بود به‌عنوان مهم‌ترین QTL‌ها با بالاترین درصد توجیه تغییرات فنوتیپی شناسایی شدند که در فاصله نشانگری به ترتیب -iPBS2083 - iPBS2076-1، 5، -iPBS2074-1 - iPBS2077-4 و -iPBS2074-1 - iPBS2077-4 قرار داشتند، ضریب تبیین برای این مکان‌ها به ترتیب برابر با ۱۱/۱، ۱۲/۸ و ۱۱/۶ بود. با توجه به مطالب ذکر شده و مشاهده جدول شماره ۸ کروموزوم‌های شماره (۱، ۴ و ۵) و مکان‌های ژنی (-iPBS2241-1 - iPBS2241-1، 6، -iPBS2239-5 - HVM20 و -iPBS2077-4 - Ipbs2074-1) به‌عنوان مهم‌ترین و کاربردی‌ترین کروموزوم‌ها و مکان‌های ژنی به دلیل قرار گرفتن بیشترین QTL‌ها با ضریب تبیین بالا بر روی آن‌ها تعیین کرد. در این بررسی برای صفات مورد بررسی تعداد زیادی QTL ردیابی شد اما با توجه به تست جایگشت‌ها (۱۰۰۰ مورد)، بسیاری از QTL دارای LOD پایین‌تر از حد بحرانی بودند و در این مقاله گزارش نشدند.

QTL‌های مکان‌یابی شده‌ی مشترک و غیرمشترک

برتر برای اصلاح ارقام و درنهایت تولید ارقام متحمل به خشکی استفاده کرد. همچنین استفاده از QTL های هم مکان در شرایط مختلف محیطی پس از اعتبارسنجی در نسل های پیشرفته می تواند موجب افزایش کارایی انتخاب به کمک نشانگر و پیشبرد برنامه های به نژادی گیاه جو شود.

که در سطح احتمال یک درصد معنی دار بودند، بخش زیادی از تغییرات صفات طول گیاهچه و طول برگ پرچم را توجیه کردند که شکل ۲ نمای گرافیکی این دو QTL را نمایش می دهد. از این مکان های ژنی به دلیل توجیه میزان زیادی از واریانس فنوتیپی این صفات می توان جهت گزینش لاین های



شکل ۲. نقشه پیوستگی حاصل از نشانگرهای SSR، ISSR و IPBS در جمعیت F₃ جو حاصل از تلاقی Badia × Comino

Fig. 2. Link Map Derived from the SSR, ISSR and iPBS Markers in the F₃ Population of Barley from the Badia × Comino Crossing

منابع

- Altinkut, A., Kazan, K., Gozukirmize, N., 2003. AFLP marker linked to water stress tolerant bulks in barley. *Genetic and Molecular Biology*. 26, 77–82.
- Alizadeh, 2005. *Soli, Water and Plant Relationships*. Fourth Edition. Emam Reza Press. 470p. [In Persian].
- Bezant, J., Lauri, D., Pratchett, N., Chojecki, J., Kearsey, M., 1997. Mapping QTL controlling yield and yield components in aspring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross using marker regression. *Molecular Breeding*. 29, 29–38.
- Bouyoucos, G.J., 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal*. 54, 464–465.
- Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M., 1994. Staining nucleic acids with silver: An alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes Magazine*. 45, 13–21.
- Castro, A.J., Hayes, P., Viega, L., Vales, I., 2008. Transgressive segregation for phenological traits in barley explained by two major QTL alleles with additivity. *Plant Breeding*. 127, 561–568.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Francia, E., Mar' e.C., Tondelli, A., Stanca, A.M., 2008. Drought tolerance improvement in crop plant: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*. 115, 1–14.
- Cellier, F., Conejero, G., Breitler, J., Casse, F., 1998. Molecular and physiological response to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. *Plant Physiology*. 116, 319–328.
- Daghagheleh, R., Sabouri, H., Hosseini Moghaddam, H., Jorjani, E., Fallahi, H.A., 2017. Mapping of spike and grain using f3 and f4 families in Becher × Kavir cross in barley. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 8(4), 35–56. [In Persian with English Summary].
- FAO. 2016. FAO statistical database. <http://faostat.Fao.Org/faostat/collections?Subset=agriculture>.
- Fakheri, B.A., Mehravaran, L., 2013. QTLs mapping controlling phenological traits of barley under normal and drought stress conditions. *Iranian Journal of Field Crop Research*. 13(2), 256–268. [In Persian with English summary].
- Ganjali, A., Kafi, M., Bagheri, A.R., ShahriariAhmadi, F., 2003. Allometric relationship for root and shoot characteristics of chickpea seedlings (*Cicer arietinum*). *Journal of Agricultural Science and Technology*. 1, 67–80.
- Gebhardt, C., Ballvora, A., Walkemeier, B., Oberhagemann, P., Schuler, K., 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plant by marker – trait association: A case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Molecular Breeding*. 13, 93–102.
- Gupta, M.L., Prasad, A., Ram, M., Kumar, S., 2002. Effects of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technol.* 81, 77–9.
- Hajabbasi, M.A., 2001. Tillage effects on soil compactness and wheat root morphology. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 3, 67–77.
- Haley, C.S., Knott, S.A., 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*. 69, 315–24.
- Haluschak, P., 2006. *Laboratory Methods of Soil Analysis*. Canada–Manitoba Soil Survey. 133p.
- Handly, L.L., Nevo, E., Raven, J.A., Martinez, R., Scrimgeour, C.M., Pakniyat, H., 1994. Chromosome 4 controls potential water use efficiency in barley. *Journal of Experimental Botany*. 45, 1661–1663.
- Czyczyło-Mysza, I., Marcińska, I., Skrzypek, E., Cyganek, K., Juzoń, K., Karbarz, M., 2014. QTL Mapping for Germination of seeds obtained from previous wheat generation under drought. *Central European Journal of Biology*. 9, 374–382.
- Inamullah, N.H., Shah, Z.H., Fu, K., 2017. Analysis of the planting dates effect yield and yield attributes of spring wheat. *Sarhad Journal of Agriculture*. 23, 269–275.
- Kavianicharati, A., Sabouri, H., Falahi, H.A., Jorjani, E., 2016. QTL Mapping of Spike Characteristics in Barley using F3 and F4 Families Derived from Badia × Komino Cross. *Plant Genetic Research Journal*. 3, 1.

- Kosambi, D.D., 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*. 12, 172–175.
- Khalili, M., JavaheriKhashani, F., Ebrahimi. M.A., 2017. Evaluation of genetic diversity and identification of QTL Controlling seed germination and seedling establishment traits in wheat. *Iranian Agriculture Drought Journal*. 1, 121–145. [In Persian with English summary].
- Khalili, M., Mohammadi, S.A., 2015. Identification of Wheat Germination Associated in Normal Conditions and Drought Stress. *Scientific Journal of Biotechnology and Plant*. 4, 1–14.
- Lander, E.S., Botstein, D., 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. 121, 185–99.
- Loresto, G.C., Chang, T.T., 1981. Decimal scoring system for drought reactions and recovery ability in screening nurseries of rice. *Int. Rice Research Newsletter*. 6, 9–10.
- Li, Z., Mu, P., Li, C., Zhang, H., Li, Z., Gao, Y., Wang, X., 2005. QTL mapping of root traits in a doubled haploid population from a cross between upland and lowland japonica rice in three environments. *Theoretical and Applied Genetics*. 110, 1244–1252.
- Macharo, M., Labonte, D.R., Oard, J.H., Kays, S.J., McLaurin, W.J., 2004. Linking quantitative traits with AFLP markers in sweet potatoes using discriminate analysis. *Acta Horticulturae*. 637, 285–293.
- Manly, K.F., Olson, J.M., 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to map manager QTL. *Mammalian Genom.* 10, 327–334.
- McCouch, S.R., Cho, Y.G., Yano, M., Paul, E., Blinstrub, M., Morishima, H., Kinoshita, T., 1997. Report on QTL nomenclature. *Rice Genetics Newsletter*. 14, 11–13.
- Mohammadi, M., Baom, M., 2008. QTL analysis for morphological traits in the Population of double Haploide barley. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*. 45, 111–120. [In Persian with English Summary].
- Mohammed, A.S., 2011. QTL Analysis for Drought Tolerance Related to Root and Shoot Traits in Barley (*Hordeum vulgare* L.). Ph.D. Dissertation, Bonn University, Germany.
- MosaviShabestari, M., 2007. Evaluation of yield and yield components in 21 cold-weather wheat lines. MSc dissertation, Faculty of Agriculture. Tabriz Branch Islamic Azad University Gilan, Iran. [In Persian with English Summary].
- Nelson, J., 1997. QGENE: Software for marker-based analysis and breeding. *Molecular Breeding*. 3, 239–245.
- Page, A.L., 1982. *Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties.* American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- Panse, V.G., 1957. Genetics of quantitative characters in relation to plant breeding. *Indian Journal of Genetic*. 17, 317–398.
- Peighambari, S.A., YazdiSamadi, B., Nabipour, A., Charmet, G., Sarrafi, A., 2005. QTL analysis for agronomic trait in barley doubled haploids population grown in Iran. *Plant Science*. 169, 1008–1013.
- Rahimi, M., Abraham Pour, F., Eshghi, R., 2013. Inheritance and QTL Mapping of Agronomical Traits in barley. *Crop Biotechnology*. 2, 35–48. [In Persian with English Summary].
- Ritchie, S.W., Nguyen, H.T., 1990. Leaf Water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*. 30, 105–111.
- Samarah, N.H., 2005. Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Agronomy for Sustainable Development*. 25, 145–149.
- SaghiMaroof, M.A., Biyaoshev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q., Allard, R.W., 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barley species diversity, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91, 5466–5570.
- Sparks, D.L., Page, A., Helmke, P., Loeppert, R., Soltanpour, P., Tabatabai, M., Johnston, C.T., Sumner, M.E., 1996. *Methods of Soil Analysis. Part 3: Chemical Methods.* Soil Science Society of America Inc.
- Tian, R., Jiang, G.H., Shen, L.H., Wang, L.Q., He, Y.Q., 2005. Mapping quantitative loci underlying the Cooking and Eating quality of Rice using a DH Population. *Molecular Breeding*. 15, 117–124.
- Thomas, G., Sparks, D.L., Page, A., Helmke, P., Loeppert, R., Soltanpour, P., Johnston, C.T., Sumner, M.E., 1996. Soil pH and soil acidity.

- Methods of soil analysis. Part 3: chemical methods. 475–490.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37, 29–38.