



مکان یابی QTL های مرتبط با صفات فیزیولوژیکی مؤثر بر تحمل به سرب در جو (*Hordeum vulgare* L.)

آزاده رحمنی^۱، علی اصغری^{۲*}، حسین جعفری^۳، امید سفالیان^۲

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک بیومتری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۲. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۳. دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، زنجان

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۰۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۷/۱۰

چکیده

آلودگی خاکها به وسیله فلزات سنگین یک اتفاق شایع ناشی از نتایج فعالیت‌های انسانی، کشاورزی و صنعتی است. در میان فلزات سنگین، سرب پتانسیل تجمع سریع در خاک را داشته، به سادگی جذب گیاه شده و در اندام‌های مختلف آن تجمع پیدا می‌کند. این تحقیق به منظور شناسایی QTL های صفات مرتبط با تحمل به سمیت سرب در گیاه جو انجام شد. در این مطالعه از توده نقشه‌یابی 94 OWB لاین دابل‌هاپلوئید حاصل از تلاقی دو والد **Dom** و **Rec** (جو) استفاده شد. گیاهچه‌های ۱۲ روزه این توده نقشه‌یابی تحت تیمار با نیترات سرب با غلظت صفر (شاهد) و ۲۰۰۰ پی پی‌ام قرار گرفتند و صفات فیزیولوژیکی شامل مقدار فتوسنتز، میزان تعرق، هدایت روزنه‌ای، CO₂ زیرروزنه‌ای، دمای سطح برگ، میزان سبزی‌نگی در مرحله آغاز خوشه‌دهی اندازه‌گیری شد. با استفاده از نرم-افزارهای **Mapchart2.32** و **MapQtl5** مناطق کروموزومی مرتبط با صفات فیزیولوژیکی فوق روی ۷ کروموزوم جو شناسایی شد. برای صفات مورد مطالعه تحت شرایط نرمال هیچ QTL مشاهده نشد. در شرایط تنش با سرب، برای صفات CO₂ زیرروزنه‌ای دو QTL روی کروموزوم ۶، میزان تعرق دو QTL روی کروموزوم ۳، هدایت روزنه‌ای چهار QTL روی کروموزوم‌های ۱ و ۳، مقدار فتوسنتز چهار QTL روی کروموزوم‌های ۲ و ۳، میزان سبزی‌نگی ۲۴ روز بعد از اعمال تنش چهار QTL روی کروموزوم‌های ۱ و ۴ و ۵ شناسایی گردید. مقدار واریانس فنوتیپی توجیه شده توسط QTL های شناسایی شده برای صفات مورد ارزیابی از ۱۰/۵۰ تا ۱۹/۱۰ درصد متغیر بود.

واژه‌های کلیدی: حساسیت، صفات کمی، کروموزوم، مسمومیت با سرب، مقاومت

مقدمه

مناطق صنعتی به‌طور معنی‌داری حاوی سرب بالا است که باعث کاهش عملکرد محصول و ایجاد مشکل جدی برای کشاورزان می‌شود. کلروزه شدن، کاهش رشد، ممانعت از فتوسنتز، به‌هم زدن تعادل آب و مواد معدنی و تغییر وضعیت هورمون‌ها و اثر روی ساختار و نفوذپذیری غشا، از جمله اثرات سمی سرب روی گیاهان می‌باشند (Sharma and Dubey, 2005). در سال‌های اخیر، به علت افزایش آلودگی زمین بر اثر فلزات سنگین، بسیاری از گیاهان از بین رفته‌اند و این سبب شد تا محققین به فکر اصلاح خاک، تولید و استفاده از

گیاهان همواره در معرض تنش‌های محیطی متعددی قرار می‌گیرند که به‌طور نامناسبی بر متابولیسم، رشد و عملکرد آن‌ها تأثیر می‌گذارند. سمیت فلزات سنگین از تنش‌های مهم غیرزیستی برای گیاهان به‌شمار می‌آید. مفهوم تنش فلزات سنگین را حساسیت به غلظت‌های بالای این فلزات تعریف می‌کنند که باعث صدمه به گیاه و مرگ آن می‌شود. در میان فلزات سنگین، سرب یکی از مهم‌ترین آن‌هاست که از گذشته تاکنون به‌عنوان یک آلوده‌کننده محیطی بررسی شده است (Ikenaka et al., 2010). خاک‌های کشاورزی نزدیک به

انجام گردید، نشان داده شده که والدین توده‌های نقشه‌یابی OWB دارای واکنش‌های بسیار متفاوتی نسبت به غلظت‌های بالای کادمیوم هستند. به طوری که والد Rec مقاومت بیشتری داشت و والد دیگر در غلظت‌های ۵ میلی‌مولار کادمیوم به سرعت خشک شده و از بین رفت (Gharebaghi et al., 2012).

از آنجا که عنصر سرب می‌تواند در اندام‌های گیاهی به مقادیر زیادی که برای انسان و حیوان سمی باشد، تجمع یابد ولی در عین حال، علائم سمیت قابل ملاحظه‌ای در گیاه ظاهر نشود و از آنجا که جو توانایی زیادی در جذب فلزات سنگین از خاک و ذخیره‌سازی آن دارد (Rassico and Navari-Izzo, 2011) و از طرف دیگر جو محصولی است که اغلب به مصرف خوراک دام می‌رسد و تجمع سرب در زنجیره غذایی برای سلامت انسان مضر است، اصلاح ژنتیکی در جهت کاهش ذخیره‌سازی سرب در جو، گامی به سوی افزایش امنیت غذایی خواهد بود (Tiryakioglu et al., 2006). هدف از این مطالعه، بررسی تنوع موجود در توده‌های نقشه‌یابی OWB از نظر صفات فیزیولوژیکی در شرایط مسمومیت با دوزهای بالای سرب و مکان‌یابی QTL مرتبط با صفات فیزیولوژیکی مؤثر بر تحمل به سمیت با سرب بود.

مواد و روش‌ها

به منظور شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با تحمل به سرب، جمعیت دابلدها پلوئید OWB حاصل از تلاقی بین دو ژنوتیپ والدی Rec و Dom گیاه جو از گونه *Hordeum vulgare* L. با ۹۴ لاین (Costa et al., 2001; Henry, 2012) در دو شرایط بدون تنش و با تنش سرب به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در مرکز تحقیقات کشاورزی استان قزوین واقع در اقبالیه (جاده اسماعیل‌آباد) در سال‌های زراعی ۹۶ و ۹۷ بررسی شد (بذور این توده نقشه‌یابی توسط دکتر جعفری، یکی از نگارندگان مقاله حاضر، در سال ۱۳۸۸ از دکتر پاتریک هیس استاد دانشگاه اورگون آمریکا بر اساس مکاتبات شخصی تهیه و در ایران تکثیر شد). برای دستیابی به غلظت مناسب سرب برای ارزیابی افراد جمعیت، ابتدا آستانه تحمل والدین در غلظت‌های مختلف نترات سرب بررسی شد. در این مرحله اثر سمیت فلز سرب در چهار سطح (غلظت صفر (شاهد)، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام) روی دو والد جمعیت نقشه‌یابی جو (Dom و Rec)، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد

گیاهان مقاوم و هم‌چنین شناسایی مکانیسم‌ها و ژن‌های مرتبط با تحمل به فلزات سنگین باشند (Davari et al., 2010). مکانیسم تحمل به سرب در گیاهان هنوز به خوبی شناخته نشده است. اختلاف در جذب، انتقال و تجمع سرب را می‌توان یکی از دلایل اصلی برای تنوع گیاهان در تحمل به این عنصر دانست (Tiryakioglu et al., 2006). از آنجا که همه‌ی این فرایندها (جذب، انتقال، ذخیره و تحمل فلزات) توسط ژنوم رهبری می‌شود، بنابراین اطلاع از ژنتیک تحمل به سرب در گیاهان می‌تواند کاربردهای اصلاحی و گیاه‌پالایی داشته باشد و منجر به دستیابی به ارقام متحمل به سرب شود. بیشتر صفات مهم با ارزش اقتصادی در گیاهان و جانوران، صفات کمی می‌باشند (Yang et al., 2012). پیشرفت‌های چشمگیری که در سال‌های اخیر در زمینه نشانگرهای مولکولی ایجاد شده است و از طرف دیگر ابداع روش‌های آماری و زیست‌سنجی (بیومتریک) پیشرفته و تلفیق آن‌ها با اطلاعات حاصل از نشانگرهای مولکولی، امکان مطالعات دقیق‌تر و جزئی‌تر صفات کمی را فراهم نموده است (Lammerts van Bueren et al., 2010). جو یکی از محصولات زراعی مهم با ویژگی‌های منحصر به فرد است که می‌توان از آن به‌عنوان یک مدل در مطالعات ژنتیکی استفاده کرد. از جمله ویژگی‌های خوب جو می‌توان به دیپلوئید بودن و ژنوم نسبتاً ساده در مقایسه با سایر گرامینه‌ها، در اختیار بودن اطلاعات ژنتیکی فراوان درباره آن، در دسترس بودن چندین توده نقشه‌یابی از آن و نیز غنی بودن ژرم‌پلاسما جو و تعدد بسیار زیاد ارقام و ژنوتیپ‌های آن اشاره کرد (Vassilev, 2002). اسچنوربوش و همکاران (Schnurbusch et al., 2010) دو ژن مرتبط با تحمل Br، در گیاه جو شناسایی کردند. ژن Bot1 که در انتقال Br به خارج از سلول در جو فعالیت دارد و دیگری Hvnp2:7 که یک اکوپریون از نودلین ۲۶ مثل زیر خانواده اصلی پروتئین NIP است که به تازگی به‌عنوان انتقال‌دهنده سیلیس در جو و برنج شناسایی گردیده است. ژائو و همکاران (Zhao et al., 2016) دو ژن مرتبط با تحمل به سرب، در گیاه ذرت به نام‌های GRMZM2G132995 و GRMZM2G137161 روی کروموزوم ۶ و ۲ شناسایی کردند. کنزل و همکاران (Kunzel et al., 2000) در بررسی خود روی ژنتیک مقاومت به کادمیوم در گیاه جو نشان دادند که QTL‌های دخیل در مقاومت به کادمیوم (QTLRLDCdT) روی کروموزوم ۶ قرار گرفته است. در تحقیقی که اخیراً در روی والدین شش توده نقشه‌یابی جو

برای مکان‌یابی QTL ها، مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM1) انجام شد. برای کنترل تغییرات ناشی از زمینه ژنتیکی، کوفاکتورها با روش گام‌به‌گام با روش نزولی ۲ (Asins, 2002) و با کمک نرم‌افزار MAPQTL5، انتخاب گردید. نشانگرهای انتخاب‌شده به‌عنوان کوفاکتور جهت مکان-یابی QTL ها با استفاده از روش MQM1 مورد استفاده قرار گرفتند برای به دست آوردن آستانه معنی‌داری ۲، از آزمون جایگشت ۳ (et al., 1994 Churchill) در سطح احتمال ۵٪ با ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم‌افزار MAP QTL5 استفاده شد و نقشه گرافیکی کروموزوم‌ها با استفاده از نرم‌افزار Map chart2.33، تهیه‌شده از وب‌سایت دانشگاه واخنینگن هلند، ایجاد شد (www.wur.nl/en.htm).

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری بین دو والد جو از نظر ویژگی‌های مورد مطالعه نشان داد. هم-چنین، اثر متقابل ژنوتیپ با سطوح مختلف عنصر سرب روی صفات، دمای زیر برگ، مقدار تعرق، مقدار فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، CO₂ زیر روزنه‌ای، میزان سبزیگی ۱۲ و ۲۴ روز بعد از اعمال تنش با سرب، معنی‌دار بود (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین، دو والد جمعیت نقشه‌یابی در سطوح مختلف سرب، واکنش کاملاً متفاوتی را نسبت به سمیت با سرب نشان دادند (جدول ۲). والد Rec در شرایط بدون تنش در تمامی صفات مورد بررسی، میانگین بیشتری نسبت به والد Dom داشت که البته این اختلاف معنی‌دار نبود. تحت شرایط تنش، والد Dom در تمامی صفات با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. در صورتی‌که میانگین والد Rec در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام در تمام صفات مورد مطالعه نسبت به شاهد و دو غلظت دیگر (۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام) کاهش معنی‌داری را نشان داد و دو غلظت ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام در مقایسه با یکدیگر و شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۲). با توجه به جدول مقایسه میانگین (جدول ۲)، مشاهده می‌شود که بین دو والد Rec و Dom در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام در تمام صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد؛ بنابراین دو والد در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام از هم متمایز شدند، لذا جمعیت در این غلظت همراه با شاهد بررسی شد.

که در غلظت 2000ppm سرب، والدین از هم متمایز شدند. لذا، جمعیت در این غلظت (۲۰۰۰ پی‌پی‌ام) همراه با شاهد بررسی شد. بذور قبل از کشت در پتری‌دیش با آب مقطر خیسانده شد و بعد از جوانه‌زنی تعداد ۴ گیاهچه داخل گلدان-هایی به قطر بیست سانتی‌متر کشت گردید. خاک گلدان‌ها شامل پرلیت و ماسه به نسبت ۲ به ۱ بود. بوته‌ها به مدت ۲ هفته با محلول هوگلند تغذیه شدند. سپس، گیاهچه‌های ۲ تا ۳ برگی تحت تیمار با نیترات سرب با غلظت 2000ppm به-همراه شاهد (محلول هوگلند فاقد نیترات سرب) قرار گرفتند. صفات فیزیولوژیکی شامل مقدار فتوسنتز، میزان تعرق، هدایت روزنه‌ای، CO₂ زیر روزنه‌ای، دمای سطح برگ در سه مرحله توسط دستگاه LC2 ساخت کشور انگلستان بر اساس واحد مول CO₂ بر مترمربع بر ثانیه، ۱۵ روز بعد از اعمال تنش، در سه مرحله اندازه‌گیری شد. صفات میزان سبزیگی برگ ۱۲ و ۲۴ روز بعد از تغذیه با سرب توسط دستگاه کلروفیل سنج (SPAD) ساخت کشور ژاپن استفاده شد. واحد SPAD متر با میزان کلروفیل موجود در برگ مطابق است و بر اساس میزان نور عبوری از طریق برگ در دو طول موج محاسبه می‌شود (Nigam et al, 2007). این صفت روی پنج بوته از هر تکرار و در روی چهار قسمت از برگ میانی هر بوته اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری صفات فوق توسط هر دو دستگاه گیاهان به خارج از فضای گلخانه (در معرض نور خورشید) منتقل شدند. نوع توزیع داده‌های فنوتیپی در شرایط تنش با نیترات سرب و نرمال با استفاده از نرم‌افزار SPSS23 بررسی شد، سپس مکان‌یابی ژن‌های مرتبط با صفات فیزیولوژیک انجام گردید. در این مطالعه، نقشه پیوستگی جمعیت OWB با ۹۴ لاین دابل هاپلوئید که قبلاً با استفاده از حدود پانصد نشانگر AFLP تهیه‌شده (Qi et al., 1998) و متعاقباً در آزمایشگاه دکتر نیکس در دانشگاه واخنینگن هلند تعداد زیادی نشانگر مولکولی دیگر از نوع SSR و AFLP و به آن اضافه و تعداد کل نشانگرهای به‌کاررفته برای ساخت آن به ۷۹۷ (۵۹۴ نشانگر AFLP، 103 نشانگر RFLP، 79 نشانگر SSR، 14 نشانگر مورفولوژیک و ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها) رسیده است (Henry, 2012). این نقشه از وب‌سایت پروژه‌های جو امریکا تهیه و استفاده شد (این نقشه به صورت دسترسی آزاد در داخل سایت نامبرده موجود است). (Marcel et al., 2007; Szucs et al., 2008; Zarre and Jafary, 2013).

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) ویژگی‌های فیزیولوژیکی در دو والد توده نقشه‌یابی جو

Table 1. Analysis of variance (Mean squares) for morphological traits in two parents' of barley mapping population

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	سبزیگی ۲۴ روز بعد از اعمال تنش	سبزیگی ۱۲ روز بعد از اعمال تنش	مقدار فتوسنتز
			Plant greenness after 24 days under stress	Plant greenness after 12 days under stress	Photosynthesis rate
Lead	سرب	3	143.45**	94.22**	16.66**
Genotype	ژنوتیپ	1	172.23**	10.00	0.36
Lead× Genotype	سرب×ژنوتیپ	3	57.83**	84.74**	21.88**
Error	اشتباه آزمایشی	32	6.46	6.97	1.93
CV%	ضریب تغییرات		7.78	8.81	14.36

Table 1. Continued

جدول ۱. ادامه

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی Df	هدایت روزنه‌ای	میزان تعرق	زیر روزنه‌ای CO ₂	دمای سطح برگ
			Stomatal Conduction	Transpiration rate	Sub-stomatal CO ₂	Leaf surface Temperature
Lead	سرب	3	0.002**	0.94**	33714.06**	35.32**
Genotype	ژنوتیپ	1	0.001**	2.39**	71288.90**	42.02**
Lead× Genotype	سرب×ژنوتیپ	3	0.003**	2.24**	36550.03**	54.09**
Error	اشتباه آزمایشی	32	0.000004	0.09	792.07	6.14**
CV%	ضریب تغییرات		3	14.92	10.26	8.25

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

** and *, significant at 1% and 5% Probability levels, respectively

پدیده می‌تواند به دلیل نوترکیبی QTL های کوچک اثر، اپی ستازی، اثر متقابل ژنوتیپ با محیط، باشد. در این آزمایش برای صفات مورد مطالعه در شرایط بدون تنش هیچ QTL مشاهده نشد. در آزمایش قره‌باغی و همکاران، (Gharebaghi et al., 2012) روی جمعیت آزمایش حاضر (OWB) برای صفات فیزیولوژیک در شرایط بدون تنش با عنصر کادمیوم، هیچ QTL مشاهده نشد، در صورتی که در شرایط تنش با سرب برای صفت سرعت فتوسنتز دو QTL روی کروموزوم‌های ۶ و ۷ و برای صفت هدایت روزنه‌ای و تعرق هر کدام یک QTL روی کروموزوم ۶، بیوماس ریشه دو QTL روی کروموزوم‌های ۱ و ۶ و بیوماس اندام هوایی دو QTL روی کروموزوم‌های ۲ و ۷ شناسایی کردند.

در مطالعه ژائو و همکاران (Zhao et al., 2016)، به منظور مکان‌یابی QTL های مؤثر بر تحمل به سرب، در شرایط نرمال هیچ QTL مشاهده نشد در صورتی که در شرایط تنش با سرب دو QTL روی کروموزوم‌های ۲ و ۶ شناسایی

توزیع فراوانی صفات اندازه‌گیری شده در جمعیت دابلد هاپلوئید مورد مطالعه در دو شرایط نرمال و تنش با سرب مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که توزیع فراوانی برای همه صفات پیوسته و نرمال بود (شکل‌های ۱ و ۲)، با مقایسه میانگین صفات در دو شرایط نرمال و تنش (جدول ۳)، صفات CO₂ زیر روزنه‌ای، مقدار فتوسنتز، سبزیگی ۲۴ روز بعد از اعمال تنش، بیشتر از سایر صفات تحت تأثیر تنش با سرب قرار گرفتند. با توجه به شکل‌های (۱ و ۲) دو لاین والدینی تحت شرایط تنش با سرب برای همه صفات به‌طور واضحی از یکدیگر متمایز شدند. در این آزمایش، در هر دو شرایط نرمال و تنش برای اغلب صفات تفکیک متجاوز (تفرق برتر از والدین) مشاهده گردید، (جدول ۳) که نشان می‌دهد هر دو والد شامل آل‌های مطلوب و نامطلوب در صفات مختلف هستند، غفار مقدم و همکاران (Ghaffar Moghaddam et al., 2019) در پژوهشی در جو برای تمامی صفات مورد مطالعه تفکیک متجاوز مشاهده کردند، اظهار داشتند این

مثبت (۰/۹۷) و LOD برابر ۲/۹۳ در حدفاصل دو نشانگر Hvm60-Pub قرار داشت. (جدول ۴ و شکل ۴).
 برای صفت هدایت روزنه‌ای، چهار QTL شناسایی شد. افزایش روی کروموزوم ۱ با LOD برابر با ۳/۱۴ و اثر Ris44 افزایشی ۳/۶ در حدفاصل بین دو نشانگر LKS2 و QH1Sc قرار داشت، این QTL، ۱۱/۴ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه کرد. سه QTL شناسایی شده دیگر، QH3Sc1، QH3Sc2 و QH3Sc3 روی کروموزوم ۳ به ترتیب با LOD های برابر ۳/۲۱، ۳/۱۴ و ۳/۲۴ و اثرات افزایشی ۲/۷، ۲/۶ و ۲/۱۳- در حدفاصل نشانگرهای Alm-ABC325، Alm-ABC325 و Alm-MWG844B- قرار داشتند که در مجموع ۳۸/۳ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه کردند. (جدول ۴ و شکل ۴).

شد. این محققین بیان کردند که این QTL ها در حالت نرمال، خاموش بوده و در شرایط تنش با سرب فعال می‌شوند. در آزمایش حاضر تحت شرایط تنش برای صفات میزان تعرق، هدایت روزنه‌ای، CO₂ زیر روزنه‌ای، مقدار فتوسنتز و سبزینگی ۲۴ روز بعد از تنش شانزده QTL مکان‌یابی شد (جدول ۴). برای صفت میزان تعرق، دو QTL روی کروموزوم ۳ شناسایی شدند که در مجموع ۲۵/۶ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه می‌کردند. QH3Tr1 با اثر افزایشی (۱/۱۱-) و LOD برابر ۳/۰۲ در حدفاصل دو نشانگر Alm-ABC325 قرار داشت اثر افزایشی منفی این QTL نشان‌دهنده این است که QTL از والد حساس (رقم Rec) به نتاج انتقال یافته است. QTL دیگر، QH3Tr2 با اثر افزایشی

جدول ۲. مقایسه میانگین دو والد Rec و Dom در سطوح مختلف سرب

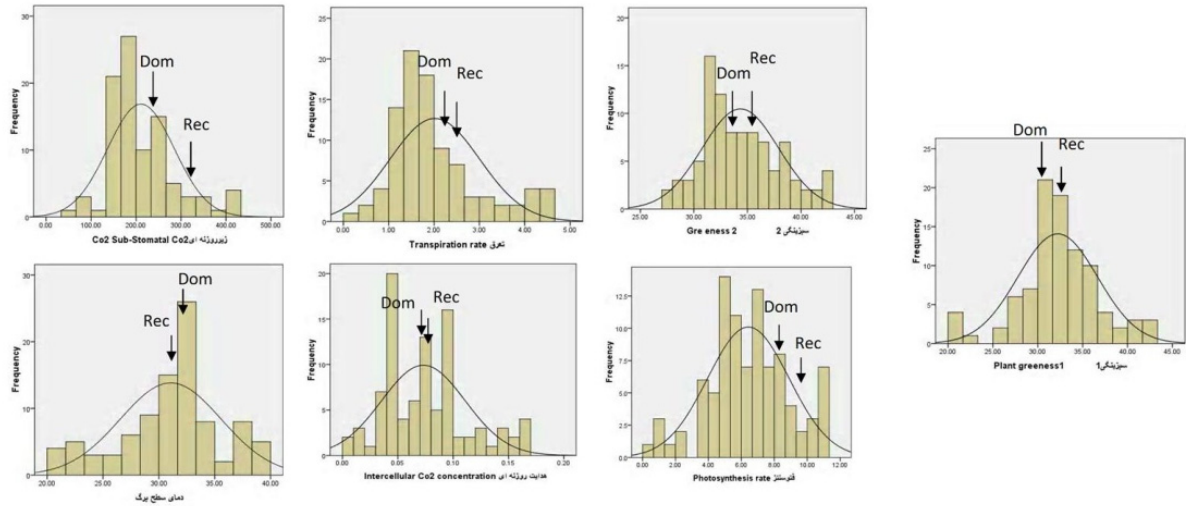
Table 2. Mean comparison of Rec and Dom parents in different lead levels

Parentes	غلظت سرب Lead Doses (ppm)	سبزینگی ۲ Plant greenness after 24 days under stress	سبزینگی ۱ Plant greenness after 12 days under stress	مقدار فتوسنتز Photosynthesis rate
REC	Control	35.6	31.6	9.18
	1000ppm	32.8	31	10.14
	1500ppm	34.2	30.34	9.38
	2000ppm	21.4	22.8	2.39
	Control	34	31.4	8.96
DOM	1000ppm	35.9	30.6	8.05
	1500ppm	34.8	30.14	8.51
	2000ppm	32.6	31.8	8.80
	LSD	3.27	3.40	1.79

Table 2. Continued

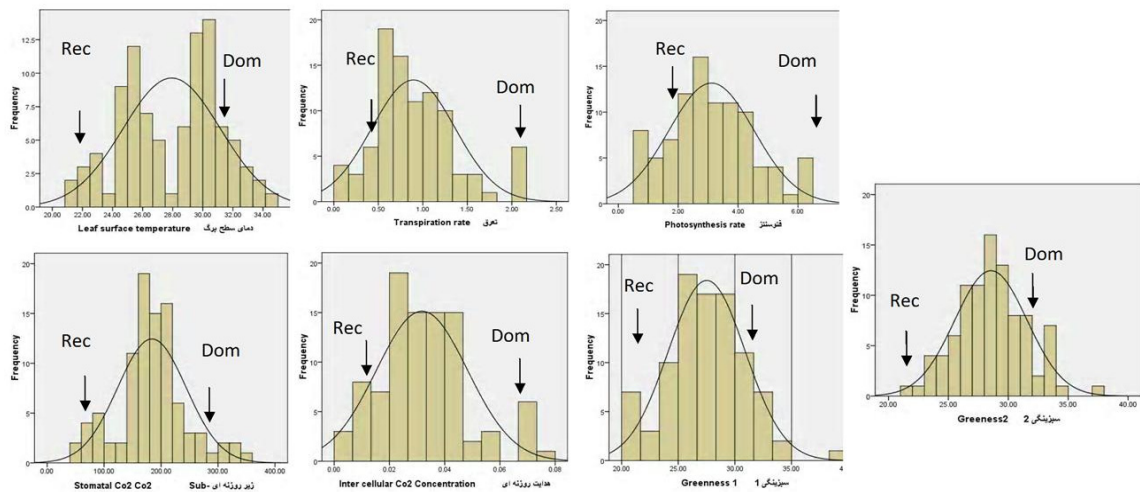
جدول ۲. ادامه

Parentes	غلظت سرب Lead Doses (ppm)	هدایت روزنه‌ای Stomatal Conduction	میزان تعرق Transpiration rate	زیر روزنه‌ای CO ₂ Sub-stomatal CO ₂	دمای سطح برگ Leaf surface Temperature
REC	Control	0.076	2.26	342.80	31.60
	1000ppm	0.074	2.16	302	31.40
	1500ppm	0.078	2.10	315.60	30.34
	2000ppm	0.016	0.59	84	22.80
	Control	0.074	2.24	292.40	31.40
DOM	1000ppm	0.080	2.14	285	30.60
	1500ppm	0.066	2.50	281.80	30.14
	2000ppm	0.068	2.10	290.60	31.80
	LSD	0.0025	0.38	36.31	3.19



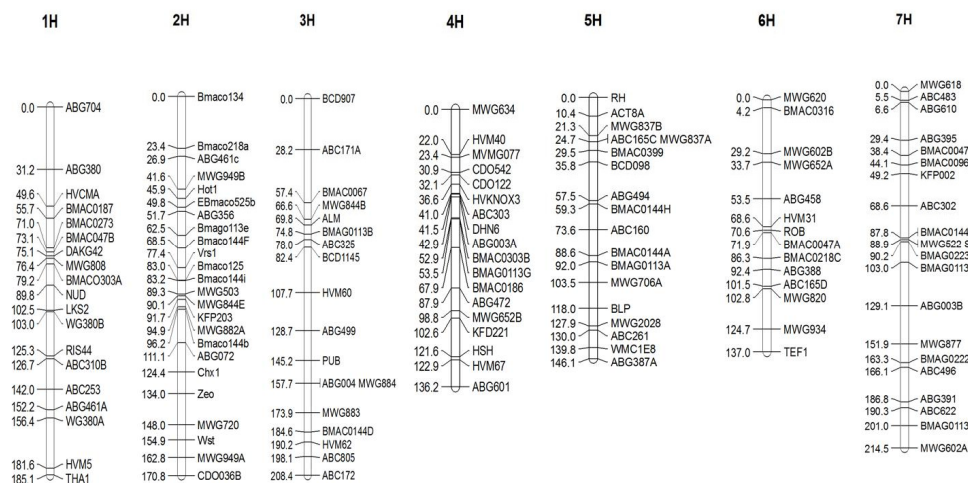
شکل ۱. توزیع فراوانی صفات مورد مطالعه تحت شرایط نرمال

Fig. 1. Frequency distributions of studied traits in normal condition



شکل ۲. توزیع فراوانی صفات مورد مطالعه تحت شرایط استرس

Fig. 2. Frequency distributions of studied traits in stress condition



شکل ۳. نقشه پیوستگی تهیه شده در جو (Marcel et al, 2007).

Fig. 3. The prepared linkage map in barley (Marcel et al, 2007)

جدول ۳. آماره‌های مربوط به صفات مورد مطالعه در شرایط نرمال و تنش

Table 3. Statistics of traits studied under normal and stress condition

	شرایط نرمال Normal condition					
	میانگین Mean	اشتباه معیار Std.deviation	کشیدگی Kurtosis	چولگی Skewness	کمترین Min	بیشترین Max
دمای سطح برگ Temperature Leaf surface(°C)	31.06	4.523	0.065	-0.518	20.70	39.02
CO ₂ زیرروانه‌ای Sub-stomatal CO ₂ (μmol/mol)	210.85	74.116	0.933	0.848	77	485
میزان تعرق Transpiration rate(mmol m ⁻² s ⁻¹)	2.02	0.987	0.238	0.732	0.29	4.48
هدایت روزنه‌ای Stomatal Conduction(mol m ⁻² s ⁻¹)	0.07	0.00018	-0.035	0.054	0.01	0.17
سرعت فتوسنتز خالص Photosynthesis rate (μmol m ⁻² s ⁻¹)	6.42	1.47	-0.156	-0.04	0.62	11.58
سبزی‌نگی گیاه ۱۲ روز بعد از تنش Greenness after 12 days stress(mol/cm ²)	32.23	4.44	0.983	-0.313	22.5	44.05
سبزی‌نگی گیاه ۲۴ روز بعد از تنش Greenness after 24 days stress (mol/cm ²)	34.35	3.58	-0.381	0.428	20.95	44.95

Table 3. Continued

جدول ۳. ادامه

	تنش با سرب Stress condition					
	میانگین Mean	اشتباه معیار Std.deviation	کشیدگی Kurtosis	چولگی Skewness	کمترین Min	بیشترین Max
دمای سطح برگ Temperature Leaf surface(°C)	27.93	3.24	-0.895	-0.228	21.50	34.20
CO ₂ زیرروانه‌ای Sub-stomatal CO ₂ (μmol/mol)	183.95	60.28	0.686	0.174	49.5	350
میزان تعرق Transpiration rate(mmol m ⁻² s ⁻¹)	0.89	0.467	0.084	0.056	0.15	2.06
هدایت روزنه‌ای Stomatal Conduction(mol m ⁻² s ⁻¹)	0.03	0.00001	0.053	0.012	0	0.08
سرعت فتوسنتز خالص Photosynthesis rate (μmol m ⁻² s ⁻¹)	3.11	0.12	-0.483	0.269	0.8	6.37
سبزی‌نگی گیاه ۱۲ روز بعد از تنش Greenness after 12 days stress(mol/cm ²)	27.52	3.39	0.748	0.121	20.80	39.30
سبزی‌نگی گیاه ۲۴ روز بعد از تنش Greenness after 24 days stress (mol/cm ²)	28.55	3.01	0.411	0.089	23.7	37.85

برای سبزی‌نگی گیاه ۲۴ روز بعد از تنش، چهار QTL شناسایی شد که در مجموع ۵۱/۵ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه کردند. دو QTL، QH1Pg1 و QH1Pg2 به ترتیب با LOD های برابر ۳/۰۱ و ۴/۷۷ و اثرات افزایشی، ۲/۱۵- و ۱/۷۸ روی کروموزوم ۱ در حدفاصل بین نشانگرهای HVCMA-Bmac0273 و Nud- WG380B قرار داشتند. QTL، QH4Pg با LOD برابر ۳/۵۳ و اثر افزایشی منفی (۳/۱۷-) روی کروموزوم ۴ در حدفاصل دو نشانگر

برای صفت CO₂ زیرروانه‌ای، دو QTL روی کروموزوم ۶ شناسایی شدند که در مجموع ۳۲/۵ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند. QH6Ss1 با LOD برابر با ۳/۷۲ و اثر افزایشی ۴/۳ در حدفاصل دو نشانگر Bmacoo47a-ABG388 و QH6Ss2 با LOD برابر با ۲/۸۴ و اثر افزایشی ۸/۹ در حدفاصل دو نشانگر MWG620-MWG602B قرار داشتند (جدول ۴ و شکل ۴).

، ۰/۹۱- و ۰/۹۵ روی کروموزوم ۳ در حدفاصل نشانگرهای MWG844B- Bmag113b، Alm-ABC325 و Hvm60-Pub قرار داشتند و QTL با QH2Ph، LOD برابر ۲/۹۳ و اثر افزایشی ۱/۰۳ در حدفاصل نشانگرهای ABG072-Zeo قرار داشت. (جدول ۴ و شکل ۴). پائین بودن میزان واریانس فنوتیپی توجیه شده برای بعضی از QTL ها نشان می‌دهد که احتمالاً QTL های انفرادی دیگری برای این صفات وجود دارند که با توجه به اثر کم شناسایی نشده‌اند (Rezaiead et al., 2011).

CD0542- HVKNOX3 قرار داشت و QTL دیگر شناسایی شده به نام QH5Pg روی کروموزوم ۵ با LOD برابر ۴/۲۱ و اثر افزایشی منفی (۲/۳۱-) در حدفاصل نشانگرهای Bmac0144a-MWG706A قرار داشت. (جدول ۴ و شکل ۴).
برای صفت مقدار فتوسنتز نیز چهار QTL شناسایی شد که در مجموع ۵۵ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه کردند. QH3Ph1، QH3Ph2 و QH3Ph3 به ترتیب با LOD های برابر ۳/۰۷، ۳/۸۵، ۲/۹۹ و اثرات افزایشی ۱/۱۷-

جدول ۴. مشخصات QTL های ردیابی شده به روش MQM برای صفات مورد بررسی در جمعیت OWB تحت تنش با سرب

Table 4. Parameters of QTLs identified by employing MQM method for the studied traits in the OWB population under lead stress

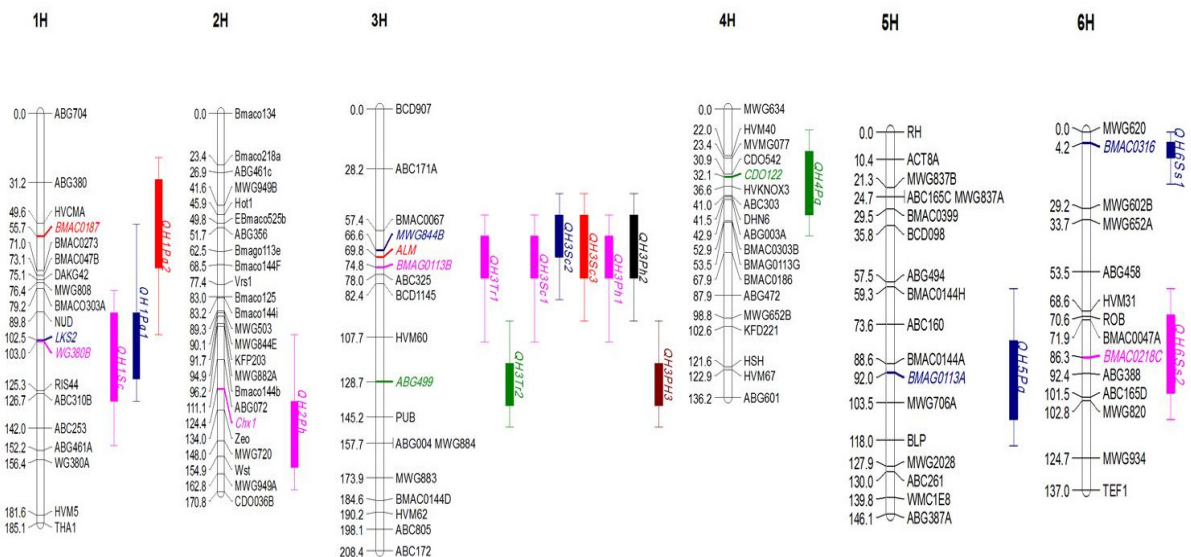
صفات	کروموزوم	موضع	مکان ژنی	نشانگرهای مجاور	درصد	اثر	معنی-	آستانه	آزمون
Traits	Chromosome	Position (CM)	QTL	Marker interval	Expl%	Add	LOD		Permutation test
میزان تعرق	3H	40-100	QH3Tr1	Alm-ABC325	12.5	-1.11	3.02		
Transpiration rate	3H	100-140	QH3Tr2	Hvm60-Pub	13.1	0.97	2.93		2.75
هدایت روزنه‌ای	1H	100-140	QH1Sc	Lks2-Ris44	11.4	3.6	3.14		
Stomatal conduction	3H	40-100	QH3Sc1	Alm-ABC325	13.1	-2.7	3.21		
	3H	10-100	QH3Sc2	Bmac0067-Alm	12.4	2.6	3.14		2.85
	3H	10-100	QH3Sc3	MWG844B-Bmag0113b	12.8	-2.13	3.24		
CO ₂ زیر روزنه‌ای	6H	0-10	QH6Ss1	Bmac0047a-ABG388	17.3	4.3	3.72		
Sub-stomatal CO ₂	6H	50-100	QH6Ss2	MWG620-MWG602B	15.2	8.9	2.84		2.02
سبزیگی گیاه ۲۴ روز بعد از تنش	1H	50-150	QH1Pg1	Nud- WG380B	11.3	-2.15	3.01		
Plant greenness after 24 under stress	1H	10-100	QH1Pg2	HVCMA-Bmac0273	14.5	1.78	4.77		
	5H	50-100	QH5Pg	Bmac0144a-MWG706A	13.4	-2.31	4.21		2.69
	4H	10-60	QH4Pg	CD0542-HVKNOX3	12.3	-3.17	3.53		
مقدار فتوسنتز	3H	40-100	QH3Ph1	Alm-ABC325	10.5	-1.17	3.07		
Photosynthesis rate	3H	40-100	QH3Ph2	MWG844B-Bmag113b	19.1	-0.91	3.85		2.67
	2H	50-150	QH2Ph	ABG072-Zeo	13.8	1.03	2.93		
	3H	100-150	QH3Ph3	Hvm60-Pub	11.6	0.95	2.99		

ریشه چهار QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۷ و چهار QTL برای صفت ارتفاع ساقه روی کروموزوم‌های ۲ و ۷ شناسایی کردند. در تحقیقی دیگر، داوری و همکاران (Davari et al., 2010) برای بررسی صفات مرتبط با تجمع و مقاومت به کادمیوم در مرحله جوانه‌زنی جو، ۲۲ QTL برای صفات ارتفاع جوانه، طول ریشه، وزن خشک جوانه، وزن خشک ریشه، وزن خشک کل و مقدار کلروفیل شناسایی کردند. سه QTL کنترل‌کننده غلظت فلز در جوانه و ریشه روی کروموزوم‌های

غفارمقدم و همکاران (Ghaffar Moghadam et al., 2019)، به منظور مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده مرتبط با صفات آگرومورفولوژیک در گیاه جو در مرحله رویشی و زایشی تحت شرایط نرمال ۱۲ QTL روی کروموزوم‌های ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و در شرایط تنش خشکی ۸ QTL روی کروموزوم‌های ۷، ۵، ۲، ۱ شناسایی کردند. همچنین زارع و جعفری (Zaare and Jafary, 2013) در آزمایش خود روی توده نقشه‌یابی OWB نسبت به تحمل به تنش شوری، برای صفت طول

نشانگر Alm-ABC325 و دو QTL، QH3Sc3 و QH3Ph2 برای صفات فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای در محدوده دو نشانگر MWG844B-Bmag0113b همپوشانی کامل دارند. همچنین روی کروموزوم ۱، دو QTL، QH1Sc، QH1Pg1 در ناحیه ۵۰-۱۵۰ سانتی مورگان در محدوده دو نشانگر Nud - Ris44 برای صفات هدایت روزنه‌ای و سبزیگی گیاه همپوشانی کامل دارند (شکل ۴). مشترک بودن QTL‌های شناسایی شده برای صفات، می‌تواند به دلیل پدیده پلیوتروپی یا پیوستگی قوی و نزدیک پلی ژن‌های مختلف باشد (Wang et al., 2013).

۶ و ۷ شناسایی گردید. ژائو و همکاران (Zhao et al., 2016) در آزمایش خود برای مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با تحمل به سمیت با سرب در گیاه ذرت، ۲۰ QTL با LOD بین ۳/۰۶ تا ۹/۷۷ برای صفات ارتفاع ساقه، طول ریشه، تعداد برگ روی کروموزوم‌های ۹، ۱۰، ۳، ۲، ۱ شناسایی کردند. با توجه به جدول ۴ مشاهده می‌شود که بیشترین تعداد QTL‌های شناسایی شده روی کروموزوم ۳ در ناحیه حدود ۱۵۰-۵۰ سانتی مورگان قرار گرفته‌اند که صفات مقدار فتوسنتز، مقدار تعرق و هدایت روزنه‌ای را کنترل می‌کنند، از بین آن‌ها، QH3Tr1، QH3Sc1، QH3Ph1 و QH3Ph2 مقدار فتوسنتز، مقدار تعرق و هدایت روزنه‌ای در محدوده دو



شکل ۴. QTL‌های مرتبط با تحمل به سرب برای صفات مورد مطالعه و موقعیت آن‌ها بر روی نقشه پیوستگی جو

Fig. 4. Lead-related QTLs for studied traits and their position in the barley linkage map

تأثیرگذار است. تعرق نیز عمل مهم گیاه است که در ارتباط با انتقال آب و مواد غذایی، تحمل به خشکی، تبادل CO₂ و فتوسنتز نقش دارد و همبستگی مثبت بین تعرق و سرعت فتوسنتز خالص وجود دارد که سمیت با فلزات سنگین باعث کاهش میزان تعرق می‌شود. ورنه و کالکائو (Verona and Calcagn, 1991) بیان داشتند که برای عملکرد مطلوب، یک گیاه باید روزنه‌ها را طی تنش باز نگه دارد تا آب و مواد غذایی را بهتر از خاک دریافت کند. هدایت روزنه نیز همانند کلروفیل از عوامل مؤثر در فتوسنتز است. رابطه مستقیم و غیرمستقیمی بین نمو و عمل روزنه در برابر فلزات

بر اساس جدول تجزیه همبستگی (جدول ۵)، رابطه مثبت و معنی‌داری بین مقدار تعرق، هدایت روزنه‌ای و مقدار فتوسنتز وجود دارد. بنابراین نتایج، قرار گرفتن QTL کنترل‌کننده این صفات روی کروموزوم H3 احتمالاً می‌تواند به دلیل وجود همبستگی مثبت و معنی‌داری بین صفات مذکور باشد که توسط مکان‌های ژنی مشابه کنترل می‌شوند. واسیلوو (Vassilev, 2002)، گزارش کرد، تنش با فلزات سنگین، تأثیرات تحریکی روی هدایت روزنه‌ای و کلروفیل و فتوسنتز دارند که باعث کاهش نرخ مبادله CO₂ و بسته شدن روزنه‌ها می‌شود از طرفی بسته شدن روزنه‌ها روی تعرق گیاه

سنگین وجود دارد کاهش حجم فضای بین سلولی مزوفیل انتشار آب را به روزنه کمتر می‌کند این پدیده در گیاهان مقاوم به فلزات سنگین صورت نمی‌گیرد. بسته شدن روزنه‌ها عموماً به‌عنوان عامل تعیین‌کننده برای کاهش فتوسنتز تحت

جدول ۵. ضرایب همبستگی فنوتیپی صفات مورد مطالعه در شرایط نرمال (اعداد پائین قطر) و در شرایط تنش سرب (اعداد بالای قطر) در ژنوتیپ‌های جو

Table 5. Phenotypic correlation coefficients under normal conditions (values on upper triangular Matrix) and under stress conditions (values on stress triangular Matrix) in barley Genotype

Traits	صفات	1	2	3	4	5	6	7
دمای سطح برگ	Leaf surface Temperature	1	-0.41**	0.21*	-0.14	-0.14	-0.1	-0.21*
زیر روزنه‌ای Co2	Sub-stomatal CO2	-0.56**	1	0.3**	0.29**	0.14	0.04	0.11
میزان تعرق	Transpiration rate	0.33**	0.26*	1	0.83**	0.79**	0.18	0.16
هدایت روزنه‌ای	Stomatal conduction	-0.32**	0.6**	0.65**	1	0.80**	0.19	0.23*
مقدار فتوسنتز	Photosynthesis rate	-0.19	0.16	0.61**	0.72**	1	0.22*	0.25*
سبزیگی ۱۲ روز بعد از تنش	Greenness after 12 days stress	0.01	-0.11	-0.07	-0.01	0.13	1	0.59**
سبزیگی ۲۴ روز بعد از تنش	Greenness after 24 days stress	0.12	-0.11	0.02	0.01	0.09	0.8**	1

** و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

** and *, significant at 1% and 5% Probability levels, respectively

مرتبط با صفات ارزیابی‌شده، شناسایی گردید. QTL‌های، QH3Ph1، H1 و QH1Sc، QH1Pg1 روی کروموزوم H1 و QH3Ph2، QH3Ph3 روی کروموزوم H3، برای صفات میزان تعرق، هدایت روزنه‌ای، سبزیگی گیاه و مقدار فتوسنتز همپوشانی دارند (شکل ۴)؛ بنابراین، این QTL‌ها اثر معنی‌داری در کنترل صفات مقدار تعریق، مقدار فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای در شرایط تنش داشته و توسط مکان‌های ژنی مشابه کنترل می‌شوند. برخی از QTL‌های شناسایی‌شده (QH3Ph2، QH6Ss1، QH6Ss2) با تبیین درصد بالاتری از تغییرات فنوتیپی برای صفات مورد مطالعه به‌عنوان QTL بزرگ اثر، شناخته شدند که نشانگرهای پیوسته با این QTL‌ها می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی به کمک نشانگر جهت گزینش لاین‌های برتر و انتقال آلل‌های مطلوب، مورد استفاده قرار گیرند. با وجود این، QTL‌های شناسایی‌شده در این بررسی باید در توده‌های در حال تفرق یا جمعیت‌های

نتیجه‌گیری نهایی

مکان‌یابی دقیق QTL‌های متحمل به سرب مهم‌ترین قدم برای پیدا کردن وظیفه ژن‌های دخیل در تحمل به سرب و کلون کردن آن‌ها است. برای شناسایی QTL‌های صفاتی مانند مقاومت به سرب لازم است QTL‌های صفات متأثر از سمیت سرب شناسایی شود که این مهم با در نظر گرفتن رویدادهایی که در مسمومیت با سرب رخ می‌دهد و علت‌یابی متحمل بودن بعضی گیاهان، امکان‌پذیر است. نتایج بررسی حاضر نشان داد که توده نقشه‌یابی OWB می‌تواند به‌عنوان توده نقشه‌یابی مناسب و به‌عنوان یک مدل برای مطالعه ژنتیک تحمل به سرب در گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه جهت بررسی ژنتیک مقاومت به سرب، QTL‌های مرتبط با مقاومت و تجمع سرب مورد بررسی قرار گرفت. بررسی فنوتیپی و آماری برای صفات مورد مطالعه حاکی از وجود تنوع کمی و پیوسته بود. در مجموع شانزده QTL

QTL در چند سال و مکان صورت گیرد تا اثرات QTL قوی‌تری به دست آید

نقشه‌یابی دیگر نیز مورد بررسی قرار گیرند تا اثر زمینه ژنتیکی در بیان QTL‌ها مشخص شود. هم‌چنین، با توجه به احتمال وجود اثر متقابل بین QTL و محیط، پیشنهاد می‌شود تجزیه

منابع

- Asins, M.Y., 2002. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding Journal*. 121, 281-291.
- Churchill, G.A., Doerge, R.W., 1994. Empirically threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*. 138, 963-971.
- Costa, J.M., Corey, A., Hayes, P.M., Jobet, C., Kleinhofs, A., Kopisch-Obusch, A., Karner, S.F., Kurna, D.L., Riera-Lizarazu, M.O., Sato, K., Szucs, P., Toojinda, T., Vales, M.I., Wolfe, R.I., 2001. Molecular mapping of the Oregon Wolfe barleys: A phenotypically polymorphic doubled-haploid population. *Theoretical Applied Genetics Journal*, 103, 415-424.
- Davari, M., Homayi, M., Khodaverdilo, H., 2010. Modeling Phytoremediation of Ni and Cd from contaminated soils using macroscopic transpiration reduction functions. *Journal of Soil and Water Sciences*. 52, 75-85 [In Persian with English summary].
- Ghaffar Moghadam, S., Sabouri, H., Gholizadeh, A., Fallahi, H.A., 2012. Identification of genomic regions controlling agro_morphological characteristics of barley plant in normal and drought stress conditions. *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 12, 631-648. [In Persian with English summary].
- Gharebaghi, N., Jafari, H., Saidnematpor, F., Taheri, M., Sohrabi, E., 2012. Locating related genes is an effective physiological indicator of tolerance to cadmium in the *Hordeum Vulgare*. National Conference on Environment and Plant Production. Isfahan University. [In Persian].
- Ikenaka, Y., Nakayama S.M.M., Muzandu, K., Choongo K., Teraoka, H., Mizuno, N., and Ishizauka, M., 2010. Heavy metal contamination of soil and sediment in Zambia. *African Journal Environmental Science and Technology*. 4, 729-739.
- Kunzel, G., Korzun, L., and Meister, L. 2000. Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics*. 154, 397-412.
- Lammerts Van Bueren, E., Backes, G., Vriend, H., Ostergard, H., 2010. The role of molecular markers and marker assisted selection in breeding for organic agriculture. *International Journal Plant Breeding*. 175, 51-64.
- Marcel, T.C., Varshney, P.K., Barbieri, M., Jafary, H., DeKock, M. J. D., Graner, A., Niks, R.E., 2007. A high-density consensus map of barley to compare the distribution of OTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* and of defec gene homologues. *Theoretical and Applied Genetics*. 114, 487-500.
- Nigam, S.N., 2007. Stability of soil plant analysis development (SPAD) and chlorophyll meter reading (SCMR) and specific leaf area (SLA) and their association across varying soil moisture stress conditions in Groundnut (*Arachis Hypogaea* L.). *Euphytica*. 160, 111-117.
- Qi, X., Stam, P., Lindhout, P., 1998. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high density-molecular map in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 96, 376-384.
- Rassico, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyper accumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*. 180, 169-181.
- Rezaiezhad, A., Mohammadi, V., Zali, A., Zeinali, H., Mardi, M., 2011. Mapping QTLs controlling yield and yield components of oilseed rape under normal irrigation and drought stress conditions. *Seed and Plant Improvement journal*. 27, 199-218 [In Persian with English summary].
- Schnurbusch, T., Hayes, Y., Hrmova, M., Baumann, U.A., Ramesh, S.D., Tyerman, S., Langridge, P., Sutton, T., 2010. Boron toxicity tolerance in barely through reduced expression of the multifunctional aquaporin HVNIP2:1. *Plant Physiology*. 153, 1706-1723

- Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Lead toxicity in plants. *Braz. Journal. Plant Physiology.* 17, 35-52.
- Szucs, P., Blake, V.C., Bhat, P.R., Chao, S., Close, T.J., Cuesta Marcos, A., Muehlbaure, G.J., Ramsay, L., Waugh, R., Hayes, P.M., 2008. An integrated resource for Barley linkage map and malting quality QTL alignment alliance of crop, soil and environmental science societies. *The Plant Genome.* 2, 134-140.
- Tiryakioglu, M., Eker, S., Ozkutlu, F., Husted, S., Cakmak, I., 2006. Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing cadmium tolerance. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 20, 181-189.
- Vassilev, A., 2002. Physiological and agro ecological aspects of cadmium interactions with barley plants. *Central European Agriculture.* 4, 66-68.
- Verona, C., Calcagn, F., 1991. Study of stomatal parameters for selection of drought resistant varieties in *Triticum durum*. *Euphytica.* 57, 275-283.
- Wang, X., Wang, H., Long, Y., Li, D., Yin, Y., Tin, L., Chen, L., Lin, W., Zhao, Y., Zhao, L. Yu, L., Li, M., 2013. Identification of Qtls associated with oil content in a high – oil Brassica napus cultivar and construction of a high density consensus map for Qtls comparison in B. napus. *Plos One.* 8, 150-169.
- Yang, Q., Zhang, D., Xu, M., 2012. A sequential quantitative trait locus fine – mapping strategy using recombinant – derived progeny. *Journal of Integrative Plant Biology.* 54, 228-237.
- Zaare, M., Jafary, H., 2013. Quantitative trait loci diversity for salt tolerance at the early growth stage of barley (*Hordeum Vulgare* L.). *Crop Breeding Journal.* 3, 69-77
- Zhao, X., Cao, Y., Li, Y., Hu, S., Pan, G., Lin, H., 2016. Identification of QTL and candidate genes for Pb accumulation in Maize at maturity stage. 2016. *Maydica. A Journal devoted to Maize and Allied Species.* 61, 1-9.