Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵
صفحه ۳۴۷ - ۳۳۷

مکان‌یابی QTLهای مؤثر در جذب و تجمع کلسیم در اندام‌های هوایی جو

Mapping of QTLs for calcium accumulation in barley shoot biomass

زهرا پریخانی *[۱]، بهزاد صادق‌زاده [۲]، سید ابوالقاسم محمدی [۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، ایران

۲- استادیار، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

Parikhani Z*[1], Sadeghzadeh B[2], Mohammadi SA[3]

1- Former MSc Student, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran
2- Assistant Professor, Dryland Agricultural Research Institute (DARI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran
3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: z.parikhani@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۸)

چکیده

برای مکان‌یابی QTLهای کنترل‌کننده تجمع ماکروالمنت کلسیم (Ca) در جو زراعی، تعداد ۱۴۸ دابل‌هاپلوئید (DH) برای صفات غلظت و محتوای کلسیم در اندام هوایی در مرحله خوشه‌دهی در آزمایش گلدانی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار مطالعه شدند. جمعیت دابل‌هاپلوئید حاصل تلاقی بین Clipper (با کارایی پایین تجمع کلسیم) و Sahara3771 (با کارایی بالای تجمع کلسیم) بود. در این تحقیق ۳۰ نشانگر جدید ISSR به ۴۶۶ جایگاه قبلی روی نقشه پیوستگی جمعیت اضافه شد. نشانگرها در مجموع ۱۴۶۰ سانتی‌مورگان از ژنوم جو را پوشش دادند و متوسط فاصله دو نشانگر مجاور سه سانتی‌مورگان بود. تجزیه QTL منجر به شناسایی پنج و دو عدد QTL به‌ترتیب برای صفات غلظت و محتوای کلسیم بوته شد که این QTLها توانستند به ترتیب ۷۵ و ۲۳ درصد از کل تنوع فنوتیپی را تبیین کنند. QTL واقع بر کروموزوم 2H با ۵۲ درصد مؤثرترین (دارای بزرگ‌ترین اثر) QTL برای غلظت کلسیم بوته بود. شناسایی QTLهای بزرگ اثر در غلظت و محتوای کلسیم بوته، سودمندی استفاده از مارکرهای مولکولی در نقشه‌یابی ژنی برای کارایی کلسیم را نشان می‌دهد که از این پتانسیل می‌توان برای انتخاب به کمک نشانگر در آینده‌ای نزدیک در برنامه‌های اصلاح برای کارایی کلسیم در جو استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

تجمع کلسیم
جو زراعی
مکان‌های ژنی صفات کمی (QTL)
نشانگر ISSR
نشانگر SSR

Archive of SID

مقدمه

جو از نظر سطح زیر کشت جهانی بعد از گندم، برنج و ذرت در رتبه چهارم قرار دارد (FAO 2012). سطح زیر کشت جو در دنیا در سال ۲۰۱۰ حدود ٤٧/٥ میلیون هکتار و محصول آن حدود ۱۲۳/۵ میلیون تن بوده است. در ایران نیز سطح زیر کشت و تولید جو در سال ۲۰۱۱ به‌ترتیب ۱/٦ میلیون هکتار و ۲/۳ میلیون تن با متوسط عملکرد ۲ تن در هکتار بوده است (FAO 2013).

گیاهان زراعی جهت رشد و نمو مناسب نیاز به عناصر غذایی متعددی دارند و کمبود این عناصر در خاک باعث کاهش رشد و تولید گیاه می‌شود. عنصری نظیر کلسیم در مقادیر نسبتاً زیاد مورد نیاز گیاه می‌باشد و کمبود آن در مراحل اولیه رشد گیاه باعث محدودیت رشد و در نهایت کاهش عملکرد دانه گیاهان زراعی از جمله جو می‌شود. این عنصر به علت تأثیر بر فرآیندهای مختلف زیستی اغلب مد نظر محققین می‌باشد. کلسیم حدود ۰/۳ درصد از وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهد و از اجزای اصلی تشکیل دهنده ساختار دیواره سلولی است. گیاه بدون دسترسی به این عنصر قادر به ادامه حیات نخواهد بود، از طرف دیگر تجمع کلسیم در دانه غلات در کیفیت تغذیه‌ای آن‌ها برای انسان نیز نقش مهمی دارد (Salardyny 1991).

در سلول‌های گیاهی کلسیم نقش مهمی در شروع بسیاری از فرآیندهای انتقال سیگنال دارد. این عنصر در حفظ ساختمان غشای سلولی، تنظیم انتقال یون‌ها و کنترل تبادلات یونی نقش دارد و سبب تنظیم بسیاری از فرآیندهای متابولیسمی و حالت نیمه‌تراوایی غشای سلولی، نشت یونی و حرکت میکروتوبول‌ها می‌شود (White and Broadley 2003; Marschner 1995; Akinci and Simsek 2004). کمبود کلسیم در جو موجب از بین رفتن مریستم‌های ساقه شده و حضور آن در توسعه برگ، ساقه‌دهی و رشد رویشی نقش بسزایی دارد (Wallace 1961). دسترسی گیاه به کلسیم باعث کاهش سرعت پیری و رسیدگی، ایجاد تحمل به پاتوژن‌ها و کاهش حساسیت به سرمازدگی از طریق به تأخیر انداختن پیر شدن دیواره سلولی، نگهداری و ثبات غشا و طولانی کردن ظرفیت غشا در انتقال سیگنال‌های سلولی می‌شود. کمبود کلسیم اغلب در خاک‌های اسیدی با ظرفیت تبادل کاتیون کم و نیز به دلیل استفاده بیش از حد کودهای پتاسه رخ می‌دهد (Grundon 1987; Chapman 1966). در ایران بیش از ٦۰ درصد زمین‌های زیر کشت به نسبت‌های مختلف آهکی بوده و از نظر کلسیم غنی می‌باشند. کمبود این عنصر در خاک‌هایی که pHپایین‌تر از ۵/۵ دارند بخصوص در نوار شمالی کشور بیشتر قابل مشاهده است (Salardyny 1991).

در دسترس بودن مقادیر کافی مواد مغذی در رژیم غذایی انسان در درجه اول به ترکیب آن‌ها در محصولات غذایی اساسی مانند دانه غلات بستگی دارد. امروزه غلات در تغذیه انسان‌ها در سراسر جهان اهمیت ویژه‌ای داشته و حدود دو سوم انرژی مورد نیاز انسان‌ها از غلات و بخصوص برنج، گندم، ذرت و جو تامین می‌شود (Behnia 2005). افزایش کیفیت تغذیه‌ای دانه غلات می‌تواند با استفاده از به‌زراعی و به‌نژادی[1] میسر شود. در اکثر سیستم‌های کشاورزی کشورهای در حال توسعه، مواد مغذی حاصل از غلات برای رژیم غذایی متعادل انسان کافی نمی‌باشد. بنابراین بهبود حاصل‌خیزی خاک با استفاده از کودهای شیمیایی و تامین عناصر مورد نیاز گیاه از جنبه‌های مهم مدیریت زراعی جهت حصول حداکثر عملکرد و کیفیت مطلوب می‌باشد (Sands et al. 2009). اصلاح واریته‌هایی با کارآیی بالا در جذب و تجمع کلسیم در اندام‌های قابل تغذیه برای دام و انسان می‌تواند روش مناسبی در بررسی افزایش تولید و بهبود کیفیت جو باشد (Salardyny 1991). با توجه به وجود تنوع ژنتیکی برای کارایی جذب و تجمع کلسیم در گیاهان زراعی، امکان معرفی ارقامی با میزان جذب بیش‌تر و بهره‌وری بالای کلسیم در جو با استفاده از روش‌های به‌نژادی امکان‌پذیر می‌باشد. در واقع ژنوتیپ‌های جو با کارایی بالای کلسیم در مقایسه با ژنوتیپ‌های ناکارا، قادرند با حداقل میزان کلسیم در دسترس، محصولی اقتصادی با محتوای کلسیم بالا تولید نمایند. از این‌رو استفاده از روش‌های به‌نژادی و بیوتکنولوژی (نشانگرهای ملکولی) در زمینه معرفی ارقامی با کارآیی بالا در جذب و بهره‌وری کلسیم جهت تهیه و بهبود غذای هشت میلیارد انسان در سال ۲۰۲۵ بیش از پیش اهمیت می‌یابد (Jefferies et al. 1999).

از نشانگرهای ملکولی می‌توان در مکان‌یابی نواحی ژنومی مؤثر در افزایش کارایی جذب و تجمع کلسیم در گیاه استفاده کرد و در

[1] Biofortification

www.SID.ir

Archive of SID

نهایت به گزینش به کمک نشانگر رسید. اصلاح به کمک نشانگر فرصت مناسب و راهکاری بالقوه برای سرعت بخشیدن و گزینش دقیق در اصلاح برای افزایش کارایی کلسیم را فراهم خواهد کرد. لازمه اصلاح به کمک نشانگر تهیه نقشه‌های پیوستگی نشانگرهای مولکولی برای جمعیت‌های مختلف ژنتیکی است. امروزه در جو نشانگرهای مولکولی در سطح وسیع برای تهیه نقشه‌های پیوستگی با پوشش ژنومی بالا، مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و گزینش بر پایه نشانگر (MAS) استفاده می‌شوند (Thomas et al. 1995; Marquez-Cedillo et al. 2000; Hearnden et al. 2007).

تاکنون مطالعه‌ای بر روی مکان‌یابی نواحی ژنومی و ژن‌های مرتبط با کارایی جذب و تجمع کلسیم در جو انجام نشده‌است. البته مطالعاتی در سایر گیاهان نظیر براسیکا (*Brassica oleracea*) صورت گرفته است. به‌عنوان مثال QTLهای مرتبط با غلظت کلسیم در ساقه روی کروموزوم‌های C2، C6، C7، C8 و بخصوص C9، شناسایی شده که QTLهای شناسایی شده، ۱۴ تا ۵۵ درصد از کل واریانس ژنتیکی را توجیه کردند (Martin et al. 2008).

QTLهای مرتبط با غلظت هفت عنصر Ca، Cu، Zn، Fe، Mg، B، P در اندام هوایی لاین‌های دابل‌هاپلوئید کلزا تحت شرایط نرمال و در شرایط کشت هیدروپونیک مکان‌یابی شده‌است. در مجموع ۳۵ QTL برای غلظت عناصر در بخش هوایی در ۱۴ گروه پیوستگی شناسایی شد. برای غلظت عنصر Ca هشت QTL بر روی کروموزوم‌های 1C، 6A، 3A، 8C، 3C، 2A، 1A و 8C مشخص شد (Liu et al. 2009). علی‌رغم وجود این قبیل مطالعات، تاکنون مطالعه‌ای برای مکان‌یابی QTLهای موثر در کارایی جذب و تجمع کلسیم در جو صورت نگرفته است. از این‌رو شناسایی QTLهای مرتبط با جذب و تجمع کلسیم می‌تواند به انتخاب ژنوتیپ‌هایی با غلظت و محتوای کلسیم بالاتر در بوته و دانه جو منتهی شود. به‌علاوه تعیین نحوه توارث و محل ژن‌های کنترل کننده این صفات می‌تواند کمک شایانی به تولید ارقام با کارایی جذب بالای این عنصر حیاتی در جو نماید (Bezant et al. 1997). از این‌رو این تحقیق با هدف مکان‌یابی QTLهای کنترل کننده تجمع کلسیم در اندام هوایی جو برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی برای اولین بار انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده شامل ۱۴۸ لاین دابل‌هاپلوئید جو، حاصل از تلاقی ارقام Sahara 3771 و Clipper بود. رقم Clipper (والد مادری) دارای تیپ رشدی بهاره و دو ردیفه می‌باشد و به عنوان رقم تجاری در استرالیا از سال ۱۹۶۸ تا ۱۹۸۰ کشت می‌شد. ژنوتیپ Sahara-3771 بومی الجزایر، دارای تیپ رشد زمستانه و شش ردیفه است. جمعیت حاضر در دانشگاه آدلاید تهیه و توسط دانشگاه استرالیای غربی در اختیار قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز قرار داده شده‌است.

برای ارزیابی فنوتیپی، جمعیت دابل‌هاپلوئید به‌همراه والدین در گلدان‌هایی به ابعاد ۷۰×۷۰×۲۰۰ میلی‌متر و حاوی ۱/۵ کیلوگرم خاک شنی فقیر از لحاظ مواد غذایی با pH=۶/۱، ۱/۲ درصد مواد آلی، ۳/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر و ۰/۰۴ میلی گرم در کیلوگرم روی کشت شد. آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. مواد غذایی لازم شامل KH2PO4=۹، K2SO4=۱۴۵، ZnSO4.7H2O=۰/۸۰، MgSO4.7H2O=۲۱، CuSO4.5H2O=۲، MnSO4.H2O=۱۵، H3BO3=۰/۷، Na2MoO4.2H2O=۰/۲، NH4NO3=۹۳ و CaCl2.2H2O=147 (میلی‌گرم در کیلوگرم) به خاک اضافه شد. نیتروژن مورد نیاز گیاهان نیز هر دو هفته یک‌بار تامین شد. برای برخورداری از گیاهان یکنواخت، تعداد بوته‌ها به هفت بوته در هرگلدان در مرحله دو برگی تقلیل یافت و جهت کاهش تاثیر میکروکلیمای داخل گل‌خانه، محل گلدان‌ها هر روز به‌صورت تصادفی تغییر داده شد. آبیاری گلدان‌ها هر روز به کمک ترازو تا سقف ۹۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای با وزن کردن یک به یک گلدان‌ها با آب دو بار تقطیر انجام شد. برای جلوگیری از هرگونه آلودگی احتمالی، تمامی مراحل آزمایش در محیط‌های عاری از آلودگی به عنصر کلسیم انجام و تمامی ظروف مورد استفاده با اسید شستشو داده شدند.

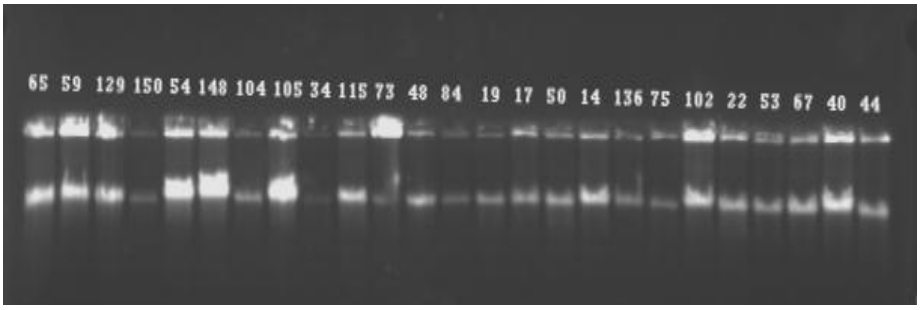
برای اندازه‌گیری غلظت کلسیم (قبل از ظهور سنبله)، تعداد چهار بوته از هر گلدان برداشت و پس از شستشو با آب دو بار تقطیر،

www.SID.ir

Archive of SID

در آون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک و بعد از وزن کردن نمونه‌ها، به کمک آسیاب پودر شدند. سپس ۰/۵ گرم از هر نمونه در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد در کوره به مدت ١٤ ساعت به خاکستر تبدیل شد. خاکستر حاصل از هر ژنوتیپ در ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک (v/v ۳۰ درصد) به مدت ۳۰ دقیقه حل شد. میزان کلسیم محلول حاصل بعد از ته‌نشینی مواد ریز معلق (بعد از یک روز) توسط دستگاه ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) (شرکت Perkin) قرائت شد.

جهت استخراج DNA از نمونه‌های برگی، از روش CTAB (Saghai et al. 1984) و برای تعیین کمیت و کیفیت نمونه-های DNA، از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد (شکل۱).



شکل۱- الگوی نواری DNA ژنومی استخراج شده تعدادی از افراد جمعیت در ژل آگارز ۰/۸ درصد (اعداد نشان دهنده شماره لاین دابل‌هاپلوئید می‌باشد).

جدول ۱- اسامی آغازگرهای چند شکل ISSR، توالی و دمای اتصال آن‌ها

نام آغازگر	دمای اتصال	توالی (′3-′5)
ISSR2	48	ACACACACACACACACAT
ISSR3	47	ACACACACACACACACTT
ISSR8	48	ATGATGATGATGATGATG
ISSR20	48	(AC)8CTG
ISSR21	51	(TC)8
ISSR23	48	(AGT)3(TC)7
ISSR33	51	AGAGAGAGAGAGAGAGAT
ISSR34	48	AGAGAGAGAGAGAGAGAA
ISSR35	49	(AG)8TA
ISSR37	51	TCT(GA) 7
ISSR38	51	GCT (GT) 7
ISSR39	49	ACGACGACGACGACGACG
ISSR40	46	CAT GGT GTT GGT CAT TGTTCC A
ISSR42	49	ACACACACACACACACCG

جدول ۲- مشخصات نشانگرهای SSR استفاده شده برای تهیه نقشه ژنتیکی

کد نشانگر	منبع نشانگر	منبع
Bmac, EBmac	DNA ژنومی (AC repeats)	(Ramsay et al, 2000)
EBmatc	DNA ژنومی (ATC repeats)	(Ramsay et al, 2000)
GMS	Genomic DNA libraries	(Struss and Plieske, 1998; Li et al, 2003)
GBMS	Genomic DNA libraries	(Li et al, 2003)
HVM	Genomic DNA and genes	(Liu et al, 1996; Saghai Maroof et al,1984, 1994)
GBM	جو ESTs	(Thiel et al,2003; Varshney et al, 2006)
scSSR	جو ESTs	(Rostoks et al, 2005; Ramsay et al, 2004)

www.SID.ir

Archive of SID

چندشکلی والدین با استفاده از نشانگرهای ISSR ، SSR و EST-SSR انتخاب شده از بخش‌های مختلف ژنوم جو (جدول ۲) بررسی و نشانگرهای چندشکل برای غربال افراد جمعیت استفاده شد. دمای اتصال آغازگرها و طول قطعه تکثیر شده در جدول ۱ ارایه شده‌است.

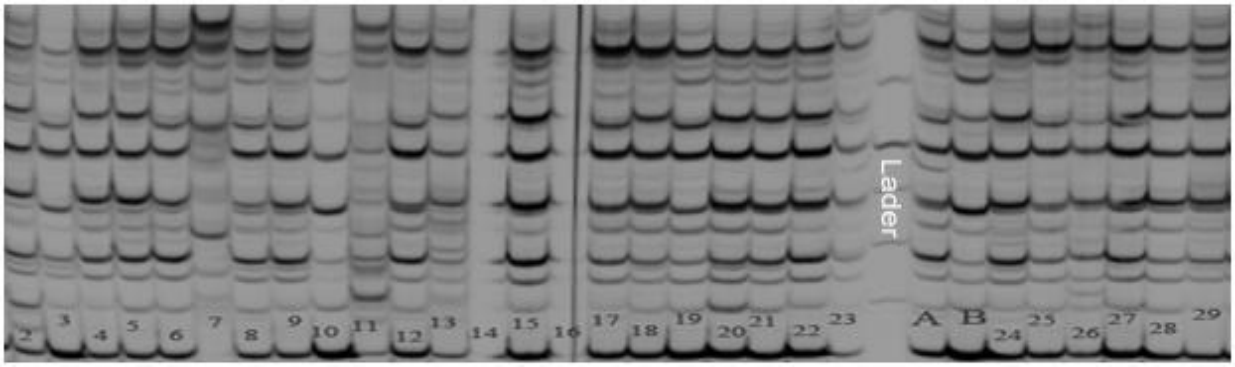
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد (جدول ۳). چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ºC ۹٤، ۳۵ چرخه با واسرشت-سازی در دمای ºC ۹٤ به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه در دمای اختصاصی آن‌ها و بسط در دمای ºC ۷۲ به مدت دو دقیقه و نهایتاً یک مرحله به مدت هفت دقیقه در دمای ºC ۷۲ بود. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید چهار درصد در دستگاه ژل اسکن ۳۰۰۰ (شرکت Corbett Robotics) صورت گرفت. الگوی نواری نشانگرهای چند شکل در جمعیت به‌صورت A برای افراد مشابه والد Clipper و B برای افراد مشابه والد Sahara3771 امتیازدهی شد (شکل ۲). مفروضات تجزیه واریانس شامل نرمال بودن توزیع خطاها، یکنواختی واریانس درون تیمارها و اثر افزایشی بلوک با تیمار به ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگراف-اسمیرنوف، بارتلت و توکی انجام شد. همگنی واریانس‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 و MSTAT-C انجام شد. قبل از تجزیه پیوستگی، برای نشانگرهای چند شکل، پس از بررسی تفرق مندلی، آزمون نسبت ۱:۱ برای هر جایگاه با نرم‌افزار MapDisto (Boston et al. 2006; Lorieux 2012) انجام شد. تهیه نقشه پیوستگی با استفاده از برنامه JoinMap 4 (Van Ooijen 2006) با فرض حداقل LOD=۳ و حداکثر فاصله ۵۰ سانتی-مورگان بین دو نشانگر مجاور رسم شد. داده‌های حاصل به برنامه QTL Cartographer (Wang et al. 2005 and 2012) بر اساس روش مکان‌یابی مرکب منتقل و برای QTLهای مکان‌یابی شده اثر افزایشی و سهم آن‌ها در تبیین واریانس فنوتیپی صفات تعیین شد.

جدول ۳- اجزای مورد استفاده در PCR برای تجزیه ریزماهواره‌ها

اجزای واکنش	مقادیر (میکرولیتر)
DNA ژنومی	۲
آغازگر پیشرو	۰/٦
آغازگر پسرو	۰/٦
Master mix*	٤
آب دیونیزه	۲/۸

* Mater mix (2x) حاوی اجزای زیر با غلظت‌های تعیین شده می‌باشد:

۷۵ میلی‌مولار Tris-Hcl با pH=۸/۵، ۲ میلی‌مولار نمک $(NH_4)_2\ SO_4$، ۳ میلی‌مولار نمک $MgCl_2$، ۰/۲ درصد Tween20، ۰/٤ میلی‌مولار از هر dNTP، ۰/۲ unit/µL Ampliqon *Taq* DNA Polymerase



شکل۲- نحوه امتیازدهی الگوی نواری آغازگرهای ریزماهواره ISSR در جمعیت لاین‌های دابل‌هاپلوئید حاصل از تلاقی ارقام جو Clipper و Sahara3771. A: وجود نوار در والد Clipper، B: وجود نوار در والد Sahara3771. چاهک A: Clipper، چاهک B: Sahara3771، چاهک‌های ۲۹-۲: لاین‌های دابل‌هاپلوئید

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

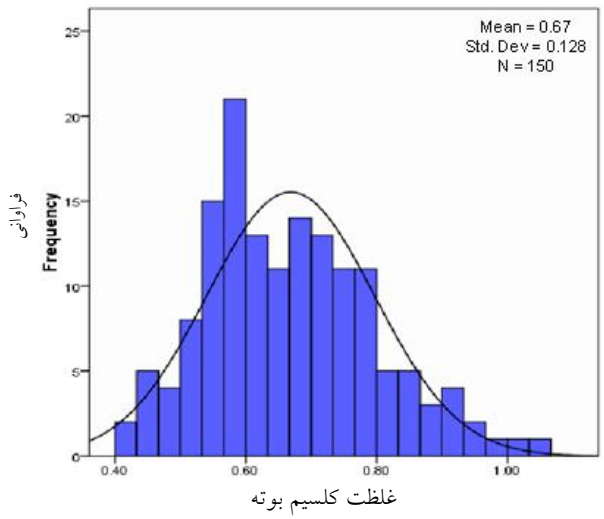
بر اساس نتایج تجزیه واریانس، از نظر غلظت و محتوای کلسیم اختلاف معنی‌داری بین لاین‌ها وجود داشت که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی برای این صفات است. دامنه غلظت کلسیم از ۰/۳۷ تا ۱/۲۷ درصد با میانگین ۰/٦۷ در جمعیت متغیر بود. مقادیر این صفت در Sahara 3771، ۰/۸۳ و در Clipper، ۰/٦۲ درصد بدست آمد. محدوده محتوای کلسیم در افراد جمعیت بین ٤/۹٦ تا ١٤ میکروگرم با میانگین ۸/٤ متغیر بود. مقادیر این صفت در Sahara 3771، ۷/۷ و در Clipper ۸/٤۱ میکروگرم بود. در صفات مورد بررسی وجود لاین‌های دابل‌هاپلوئید در خارج از محدوده دو والد نشانگر وجود تفکیک متجاوز در هر دو جهت است. وجود تفکیک متجاوز احتمال شناسایی QTLها برای صفات را افزایش داده و نشان می‌دهد که هر دو والد شامل آلل‌های مطلوب و نامطلوب در صفات مختلف هستند (شکل ۳ و جدول ٤).

با توجه به همبستگی مثبت و معنی‌دار غلظت و محتوای کلسیم در بوته، عموما ژنوتیپ‌هایی با غلظت کلسیم بیشتر، از محتوای کلسیم بالاتری نیز برخوردار بودند. چند شکلی والدین Clipper و Sahara3771 با ١٤ نوع آغازگر ISSR بررسی و ۳۰ نشانگر چند شکل برای غربال جمعیت به نقشه پیوستگی قبلی جمعیت اضافه شد (Sadeghzadeh et al. 2008). البته ۱۹ نشانگر به هیچ گروه پیوستگی منتسب نشدند. در مجموع ٤۹٦ نشانگر مشتمل بر ۲٤٦ نشانگر SSR و EST-SSR، ۲۳۸ نشانگر RFLP، یک نشانگر مورفولوژیک و ۱۱ نشانگر ISSR، ۱٤٦۰ سانتی‌مورگان از ژنوم جو را با متوسط فاصله دو نشانگر مجاور برابر سه سانتی مورگان تحت پوشش قرار دادند و کروموزوم دو با طول ۲۳۸ سانتی مورگان شامل ۸٤ نشانگر و کروموزوم یک با طول ۲۰٦ سانتی-مورگان و ۵۵ نشانگر به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد نشانگر را به خود اختصاص دادند (شکل ٤). برای غلظت کلسیم، پنج QTL روی کروموزوم‌های 2H، 3H، 4H، 5H و 7H مکان‌یابی شد (جدول ۵ و شکل ۵). مکان شناسایی شده در کروموزوم 2H بزرگ‌اثرترین QTL را به خود اختصاص داد. این QTL در فاصله بین نشانگرهای Vrs1 و Bmag0125 توانست ۵۲ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را تبیین کند.

جدول ٤ – تجزیه واریانس غلظت و محتوای کلسیم بوته در لاین‌های دابل-هاپلوئید جو حاصل از تلاقی ارقام Clipper و Sahara3771

منابع تغییر	میانگین مربعات		
	درجه آزادی	غلظت Ca	محتوای Ca
ژنوتیپ	١٤٩	۰/۰۵ **	۵/۰٦**
خطا	۳۰۰	۰/۰۰۵	۰/۷۰

**معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

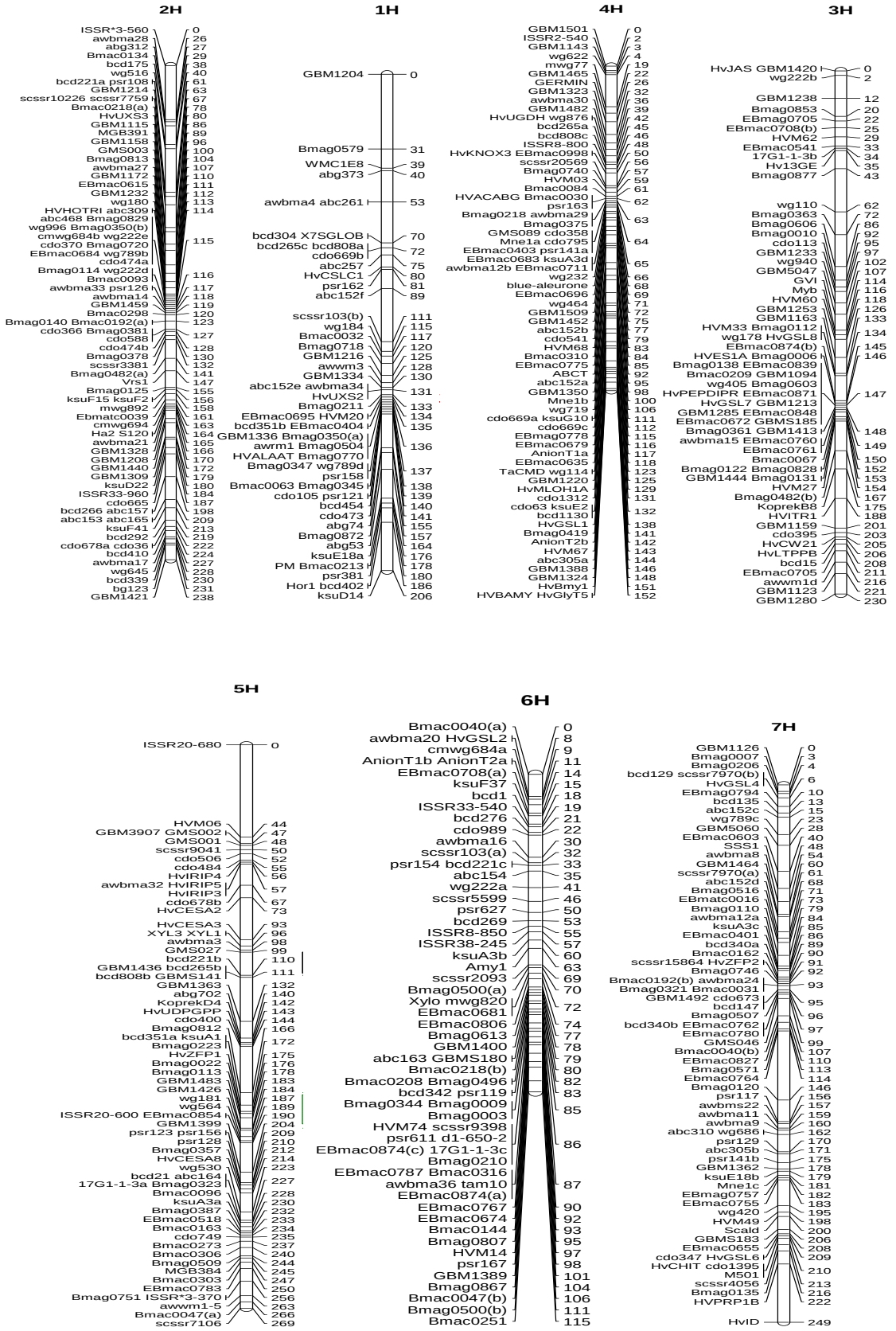


شکل ۳- توزیع فنوتیپی میانگین صفات غلظت و محتوای کلسیم در جمعیت دابل‌هاپلوئید جو حاصل از تلاقی ارقام Clipper و Sahara3771

QTL های شناسایی شده بر روی کروموزوم‌های 3H، 4H و 5H دارای اثر افزایشی مثبت بودند که نشان‌دهنده نقش آلل والد Clipper در افزایش میزان کلسیم بوته در نتاج است.

www.SID.ir

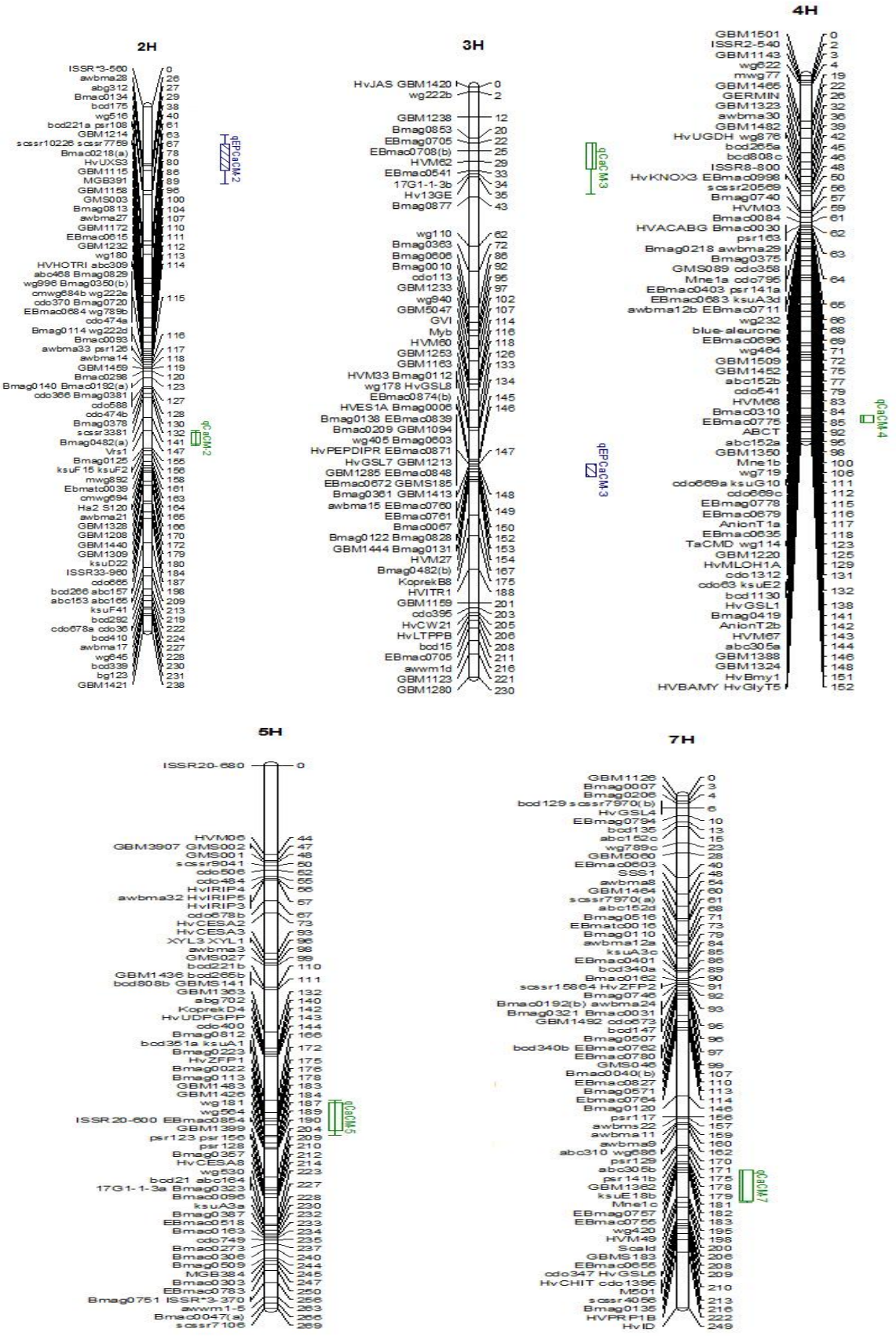
Archive of SID



شکل ٤- نقشه پیوستگی جمعیت دابل‌هاپلوئید جو حاصل از تلاقی ارقام Sahara3771 و Clipper

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- جایگاه کروموزومی QTLهای شناسایی شده برای صفات بررسی شده در جمعیت دابل‌هاپلوئید جو حاصل از تلاقی ارقام Sahara3771 و Clipper. نام‌گذاری QTLها بر اساس روش McCouch (2008)

www.SID.ir

Archive of SID

بیش‌ترین تعداد QTLهای بزرگ‌اثر برای وزن دانه و غلظت کلسیم بوته مشاهده شد که روی کروموزوم 2H قرار داشتند. در برخی مطالعات QTLهایی برای غلظت کلسیم در دیگر گیاهان گزارش شده‌است. به‌عنوان مثال مقدار جذب کلسیم به‌عنوان یکی از اجزای معدنی مهم برای کیفیت دانه در *Arabidopsis thaliana* مورد بررسی قرار گرفت و سه QTL شناسایی شده برای جذب کلسیم توانستند ۵۱/۸ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه کنند (Lexer et al. 2003). در سال‌های اخیر مطالعات متعددی در این زمینه در گیاهان مختلف صورت گرفته، اما مطالعات در خصوص تعیین نواحی ژنومی موثر در کارایی عناصر غذایی نظیر کلسیم در گیاه جو بسیار محدود بوده است. البته در مطالعاتی در جمعیت حاصل از تلاقی Clipper x Sahara3771 در جو، نواحی ژنومی مرتبط با کارایی عنصر روی تعیین شده‌است (Sadeghzadeh et al. 2008, 2014). QTLهای مربوط به غلظت و محتوای کلسیم در دانه گیاه سویا مورد بررسی قرار گرفته و از تلاقی SS-516 × Camp چهار QTL با عنوان Ca1، Ca2، Ca3 و Ca4، روی گروه‌های پیوستگی A2، I و M شناسایی شده‌است (Zhang et al. 2008). QTLهای غلظت عنصر کلسیم در ساقه گیاه *Brassica oleracea* مورد مطالعه قرار گرفته و جایگاه صفت کمی (QTL) کلسیم روی کروموزوم‌های C8، C7، C6، C2 و C9 شناسایی شده‌است. QTLهای شناسایی شده ۱۴ تا ۵۵ درصد از کل واریانس ژنتیکی را به خود اختصاص دادند (Martin et al. 2008).

دو QTL روی کروموزوم های 2H و 3H برای محتوای کلسیم بوته در مرحله رسیدگی شناسایی شد (جدول ٦ و شکل ٥). QTL واقع بر کروموزوم 2H، بین نشانگرهای awbma28 و abg312 با ۱۳ درصد تبیین واریانس فنوتیپی، تأثیر گذارترین QTL برای این صفت بود. اثر افزایشی ۰/٤۷- نشان دهنده توارث آلل مطلوب در این جایگاه از والد Sahara3771 به نتاج است. در تحقیق دیگری QTLهای مرتبط با محتوای هشت عنصر Fe، Zn، Mn، Cu، Ca، Mg، P و K در دانه برنج مکان‌یابی شدند که برای محتوای Ca هفت QTL روی کروموزوم‌های ۱، ٤، ٥، ۹، ۱۰، ۱۱، و ۱۲ با درجه تبیین ۱٤/٥ درصد شناسایی شد (Sun et al. 2009). در این زمینه، تنوع ژنتیکی بالایی برای محتوای عناصر کاتیون‌دار (Na، Fe، Mg، P، Ca، Mn، K، Zn) در دانه لاین اینبرد نوترکیب *Arabidopsis thaliana* گزارش شده و سه QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۳ و ٥ برای محتوای Ca مکان‌یابی شده‌است (Vreug denhil et al. 2004).

جدول ٥- جایگاه کروموزومی، اثر افزایشی و درصد تبیین واریانس فنوتیپی QTLهای مرتبط با غلظت کلسیم بوته در جمعیت دابل‌هاپلوئید حاصل از تلاقی ارقام Sahara3771 و Clipper

نشانگرهای مجاور	جایگاه QTL از ابتدای کروموزوم (cM)	کروموزوم	اثر افزایشی	LOD	تغییرات فنوتیپی تبیین شده (٪)
Vrs1-Bmag0125	149	2H	-0.093	28	52
EBmac0708(b)-HVM62	28	3H	0.033	5	6
AnionT2b-HVM67	142	4H	0.025	3	4
Bmag0113-GBM1483	178	5H	0.027	3	4
wg420-HVM49	195	7H	-0.039	7	9

جدول ٦- جایگاه کروموزومی، اثر افزایشی و درصد تبیین واریانس فنوتیپی QTLهای مرتبط با محتوای کلسیم بوته در جمعیت دابل‌هاپلوئید حاصل از تلاقی ارقام Sahara3771 و Clipper

نشانگرهای مجاور	جایگاه QTL از ابتدای کروموزوم (cM)	کروموزوم	اثر افزایشی	LOD	تغییرات فنوتیپی تبیین شده (٪)
awbma28-abg312	27	2H	-0.47	5	13
EBmac0761-Bmac0067	149	3H	-0.41	4	10

www.SID.ir

Archive of SID

به‌طور خلاصه نتایج این تحقیق وجود تنوع ژنتیکی زیادی در بین ژنوتیپ‌های جو برای صفات غلظت و میزان کلسیم در بوته را نشان داد. به‌علت وجود همبستگی مثبت بین غلظت و محتوای کلسیم بوته، با انتخاب ژنوتیپ‌هایی با غلظت کلسیم بیش‌تر می‌توان به گیاهی با محتوای کلسیم بیش‌تر دست یافت. در کوتاه مدت، در نواحی با کمبود شدید کلسیم، استفاده از کود کلسیم، روشی سریع و کارا در تأمین نیازهای گیاه خواهد بود. البته جهت دستیابی به یک راه حل اساسی و پایدار برای تصحیح کمبود کلسیم، استفاده از ژنوتیپ‌های کارا در جذب و استفاده از کلسیم می‌تواند به‌عنوان تکمیل کننده کاربرد کود کلسیم در نظر گرفته شود. با توجه به شناسایی نواحی ژنومی بزرگ‌اثر بر روی کروموزوم‌ها برای افزایش کارایی کلسیم، می‌توان از این نشانگرها در انتخاب ژنوتیپ‌های کارا در برنامه‌های به‌نژادی جو برای کارایی کلسیم استفاده کرد.

منابع

Akinci IE, Simsek M (2004) Amelorative effects of potassium and calcium on the salinity stress in emberyo culture of cucumber (Cucummis sativus L.). Biological Science. 4: 361-365.

Behnia M. R (1991) Cold cereals: wheat, barley, oat, rye. Tehran University Press.

Bezant J, Laurie D, Pratchett N, Chojecki J, and Kearsey, M (1997) Mapping QTL controlling yield and yield components in a spring barley (Hordeum vulgare L.) cross using marker regression. Molecular Breeding, 3: 29-38.

Boston MA (2006) MapDisto. 2 Raleigh Department of Statistics, North Carolina State University,USA. breeding Prospects and challenges. Curr. Sci. 5: 607-619.

Chapman HD (1966) Calcium. In: HD Chapman (ed.), Diagnostic Criteria for Plants and Soils. Division of Agricultural Sciences, Uni. California: Berkley, USA. p 65-92

FAO (2012) FAOSTAT. FAO. RomeT, www. Fao.org.

FAO (2013) FAOSTAT. http: faostat.fao.org/site/567.htm.

Grundon NJ (1987) Hungry Crops: A guide to nutrient deficiencies in field crops, Grundon NJ (ed.) p 7.31. Department of Primary Industries, Qld Government.

Hearnden PR, Eckermann PJ, McMichael GL, Hayden MJ, Eglinton JK, and Chalmers KJ (2007) A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. Theor. Appl. Genet. 115: 383-391.

Islam A.K.M.R, Shepherd KW (1981) Production of disomic wheat-barley chromosome addition lines using Hordeum bulbosum crosses. Genet. Res. 37: 215-219.

Jefferies SP, Bar AR, Karakousis A, Krestschmer JM, Manning S, Chalmers KJ, Nelson JC, Islam A.K.M.R, and Longridge P (1999) Mapping of choromosome regions conferring boron toxicity tolerance in barley (Hordeum vulgare L.). Theoretical and Applied Genetics, 98: 1293-1303.

Lexer C, Welch ME, Durphy JL, and Rieseberg LH (2003) Natural selection for salt tolerance quantitative trait loci (QTLs) in wild sunflower hybrids: impliCations for the origin of helianthus paradoxus, a diploid hybrid species. Mol Ecol. 12:1225-1235.

Li JZ, Sjakste TG, Roder MS, and Ganal MW (2003) Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. Theoretical and Applied Genetics, 107: 1021-1027.

Liu J, Yang J, Li R, Shi L, Zhang Ch, Long Y, Xu F, and Meng J (2009) Analysis of genetic factors that control shoot mineral concentration in rapeseed (Brassica napus) in different boron environments.Plant and Soil. 320: 255-266.

Liu ZW, Biyashev RM, and Saghai Maroof MA (1996) Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. Theoretical and Applied Genetics, 93: 869-876.

Lorieux M (2012) MapDisto: fast and efficiency computation of genetic linkage map Mol. Breed. 30: 1231-1235. quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The

Marquez-Cedillo LA, Hayes PM, Jones BL, Kleinhofs A, Legge G, Rossnagel BG, Sato K, Ullrich SE, and Wesenberg DM (2000) QTL analysis of malting quality in barley based on the doubled haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. Theor. Appl. Genet. 101: 173-184.

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. London: Academic Press.

Martin RB, John PH, Graham JK, Dave A, Helen CB, Mark CM, Andrew M, David A.C.P, Graham RT, Rory MH, William PS, and Philip JW (2008) Shoot calcium and magnesium concentrations differ between subtaxa, are highly heritable, and associate with potentially pleiotropic loci in brassica oleracea. Plant Physiology 146: 1707-1720.

McCouch SR (2008) Gene Nomenclature System for Rice. Rice. 1: 72-84.

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

Ramsay L, Russell J, Macaulay M, Booth A, Thomas W.T.B, and Waugh R (2004) Variation shown by molecular markers in barley: Genomic and genetic constraints. Aspects of Applied Biology, 72: 147-154.

www.SID.ir

Archive of SID

Rostoks N, Mudie S, Cardle L, Russell J, Ramsay L, Booth A, Svensson JT, Wanamaker S.I, Walia H, Rodriguez EM, Hedley PE, Liu H, Morris J, CloseTJ, Marshall DF, and Waugh R (2005) Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. Molecular Genetics and Genomics, 274: 515-527.

Sadeghzadeh B (2008) Mapping of chromosome regions associated with seed Zn accumulation in barley. PhD Thesis, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, The University of Western Australia, Perth, Australia.

Saghai M, Maroof A, Soliman K, Tprgensen RA, and Allard RW (1984) Ribosomal DNA Spacer Lenth polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal loCation and population dynamics. Proc .Natl. ACad. Sci. USA. 81:8014-8018.

Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, and Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci, USA. 91: 5466-5470.

Saghai Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, and Allard RW (1984) Ribosimal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, choromosomal location, and population dynamics. Proceeding of the National Academy of Sciences of America, 81: 8014-8018.

Salardyny A (2005) Soil fertility, Tehran University Press.

Sands DC, Morrise CE, and Dratz EA (2009) Elevating optimal human nutrition to a centrl goal of plant breeding and production of plant base foods. plant Sci. 177:377-389.

Struss P, and Plieske J (1998) The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. Theoretical and Applied Genetics, 97: 308-315.

Sun C, Fu Y, Tan L, Luisa A, and Garcia-Oliveira (2009) Genetic identification of quantitative trait loci for contents of mineral nutrients in rice grain. Plant Biology. 51: 84-92.

Thiel T, Michalek W, Varshney RK, and Graner A (2003) Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (Hordeum vulgare L.). Theoretical and Applied Genetics. 106: 411-422.

Thomas W.T.B, Powell W, Waugh R, Chalmers K.J, Barua UM, Jack P, Lea V, Forster BP, Swanston JS, Ellis RP, Hanson PR, and Lance R.C.M (1995) Detection of quantitative trait loci for agronomic, yield, grain and disease characters in spring barley (Hordeum vulgare L.). Theor. Appl. Genet. 91: 1037-1047.

Van Ooijen JW (2006) JoinMap4, Software for the calculation of genetic linkage map in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands.

Vreug denhil D, Aarts M.G.M, Koornneef M, Nelissen H, and Ernst W (2004) Natural variation and QTL analysis for Cationic mineral content in seeds of Arabidopsis thaliana. Plant Cell Environ. 27:828-839.

Wallace T (1961) The diagnosis of mineral deficiencies in plants by visual symptoms. A colour atlas and guide. Her Majesty.s Stationary Office, London.

Wang S, Basten CJ, and Zeng ZB (2005) Windows QTL Cartographer 2.5 Raleigh Department of Statistics, North Carolina State Universitiy , USA.

Wang S, Basten CJ, and Zeng Z-B (2012) Windows QTL Cartographer V2.5-011. Raleigh, NC: Department of Statistics, North Carolina State University.

White PJ, and Broadley M.R (2003) Calcium in plants. Annals of Botany. 92: 487-511.

Zhang B, Chen P, Wang D, Shi A, Hou A, and Ishibashi T (2008). Putative quantitative trait loci associated with calcium content in soybean seed. The American Genetic Association. 100:263-269.

www.SID.ir

Archive of SID

Modern Genetics Journal
Vol 11, Number 3, Autumn 2016, Quaternary

Mapping of QTLs for calcium accumulation in barley shoot biomass

Parikhani Z[*1], Sadeghzadeh B[2], Mohammadi SA[3]

1. Former MSc Student, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran
2. Assistant Professor at Dryland Agricultural Research Institute (DARI), Maragheh, Iran
3. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
* Corresponding Author, Email: z.parikhani@yahoo.com

ABSTRACT

To map QTLs for traits associated with accumulation of Calcium (Ca), 148 doubled-haploid (DH) population derived from a cross between Clipper (low Ca accumulator) and Sahara3771 (high Ca accumulator) was screened for the concentration and content of Ca at the maturity stage, under controlled condition. The experiment was conducted in CRD with 3 replications. The new 30 ISSR marker loci were added to a backbone of 466 loci on the Clipper x Sahara DH linkage map. The map spanned 1460 centimorgans (cM) and had a mean density of 2 loci per 3 cM. The QTL analysis led to identification of 5 and 2 QTLs for shoot Ca concentration and content, respectively; which explained 75 and 23 percent of the total phenotypic variation, respectively. The QTL on chromosome 2H, with 52 % had the largest effect for concentration of Ca. The identifications of QTLs with large effects on shoot and grain Ca concentration and contents illustrate the usefulness of molecular markers in gene mapping and suggest that marker-assisted selection will be feasible in the near future in Ca efficiency breeding programs.

Key Words

barley *(Hordeum vulgare L.)*, Calcium accumulation, quantitative traits loci (QTL), ISSR and SSR markers

www.SID.ir