

شناسایی نشانگرهای ملکولی پیوسته با نواحی کروموزومی کنترل کننده محتوی روی بذر در جو (*Hordeum vulgare* L.)

Identification of molecular markers linked to chromosomal regions involving in seed Zn content in barley (*Hordeum vulgare* L.)

بابک عبدالهی مندولکانی^{۱*}، میرحسن رسولی صدقیانی^۱، بهزاد صادق‌زاده^۲، ابراهیم سپهر^۱، مراد جعفری^۱

۱- دانشجویان، دانشگاه ارومیه

۲- استادیار، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، مراغه

Abdollahi Mandoulakani B^{*1}, Rasouli-Sadaghiani MH¹, Sadeghzadeh B², Sepehr E¹, Jafari M¹

1. Associate Professors, Urmia University

2. Assistant professor, Dryland Agricultural Research Institute, Maragheh

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: b.abdollahi@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۹)

چکیده

کمبود عنصر روی (Zn) در گیاهان از شایع‌ترین کمبودهای مربوط به ریزمغذی‌ها می‌باشد که علاوه بر عملکرد، ارزش غذایی محصولات را نیز کاهش می‌دهد. در دهه اخیر تنوع ژنتیکی قابل توجهی برای تحمل به کمبود Zn در غلات گزارش شده و تلاش‌های زیادی برای استفاده از چنین تنوعی در برنامه‌های اصلاحی در حال انجام است. امروزه می‌توان گزینش برای صفات کمی در ژرم پلاسماهای گیاهی را با استفاده از نشانگرهای مولکولی و روش تجزیه QTL با سودمندی بیشتری انجام داد. در این راستا نقشه‌های ژنتیکی با تراکم نشانگری بالا نقش بسزایی در کاربرد موثر گزینش به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی ایفا می‌کند. در این تحقیق جهت اشباع نقشه ژنتیکی جو در ۱۵۰ فرد هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی دو والد Clipper و Sahara و شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در محتوی Zn بذر، از نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP و نشانگرهای ISSR استفاده شد. از چارچوب نقشه ژنتیکی این جمعیت به عنوان نقشه پایه در تجزیه و تحلیل‌های بعدی استفاده شد. در کل ۱۸ نشانگر چندشکل در جمعیت تفرق نشان دادند که از این تعداد ۱۲ نشانگر به هفت گروه لینکاژی جو منتسب شدند. دو نشانگر انحراف معنی‌داری از نسبت مندلی ۱:۱ نشان دادند ($P \leq 0.05$). به منظور مکان‌یابی QTL‌های مربوط به محتوی Zn بذر، ۱۰۰ فرد از جمعیت فوق ارزیابی شد و ۴ QTL روی گروه‌های لینکاژی ۲، ۳ و ۵ شناسایی شد. QTL‌های واقع بر گروه‌های لینکاژی ۲ و ۳ به ترتیب ۰/۰۹ و ۰/۱۱ و دو QTL واقع بر گروه لینکاژی ۵ به ترتیب ۰/۱۳ و ۰/۱۲ درصد تنوع فنوتیپی مربوط به این صفت را توجیه کردند. در کل نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای رتروترانسپوزونی ابزاری کارآمد در اشباع نواحی با تراکم نشانگری کم در نقشه‌های ژنتیکی پایه جو هستند. همچنین نتایج این تحقیق می‌تواند نقطه شروعی برای استفاده از گزینش به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی جو برای تولید واریته‌هایی با محتوی Zn بالای دانه و همسانه‌سازی ژن‌های دخیل در این صفت باشد.

واژه‌های کلیدی

جو

محتوی Zn بذر

نقشه ژنتیکی

DNA

QTL

مقدمه

جو با نام علمی *Hordeum vulgare* L. یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی می‌باشد که توسط انسان اهلی شده‌است. خصوصیات که موجب شده جو از لحاظ کشاورزی و اقتصادی اهمیت ویژه‌ای داشته باشد عبارتند از سازگاری اکولوژیکی بالا و قابلیت کشت در عرض‌های جغرافیایی مختلف، استفاده در تغذیه انسان و دام و ارزش بالای مالت آن (Abdmishaniand and Shahnejat- Bushehri 1378). حدود ۸۵ درصد از تولید جو در جهان برای تغذیه دام و طیور استفاده می‌شود در نتیجه جو در تغذیه انسان به طور غیر مستقیم مرتبط می‌باشد (Fischbeck 2002). این گیاه نسبت به گندم در برابر خشکی مقاوم‌تر بوده از این‌رو جو در آب و هوایی که سبب محدودیت تولید سایر غلات می‌شود، می‌تواند بیشترین محصول را تولید کند (Banisadr 1995). بنا به اهمیت و مصارف جو و میزان سطح زیرکشت این غله، به نژادی آن در دستور کار اصلاح‌گران قرار گرفت و در راستای انجام اهداف به- نژادی جو مکان‌یابی ژن‌ها، مطالعه نحوه توارث آن‌ها و اشباع نقشه ژنتیکی آن ضرورت یافت. تعیین نحوه توارث و محل ژن- های کنترل کننده این صفات از چالش‌های اصلی برنامه‌های اصلاح جو می‌باشد (Li et al. 2005; Hassan et al. 2010). بیش از ۳ میلیارد نفر در سراسر جهان تحت تاثیر سوء تغذیه به ریزمغذی‌ها می‌باشند که یکی از عوامل مهم در به خطر افتادن سلامت و میزان مرگ و میر بالا در جهان به شمار می‌آید (Cakmak 2002; Pfeiffer and McClafferty 2007). ریزمغذی‌ها سوخت و ساز مواد غذایی را در بدن تنظیم می‌کنند و کمبود آنها سلامت جوامع را به خطر می‌اندازد. همچنین، ریزمغذی‌ها از عناصر ضروری مورد نیاز گیاهان می‌باشد که در فرایندهای مختلف مربوط به فتوسنتز و رشد و نمو گیاه مشارکت می‌کنند و کمبود آنها تاثیر بسزایی در کاهش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی دارد (Cole et al. 2010). در این میان، عنصر روی (Zn) جایگاه ویژه‌ای داشته و کمبود آن در کنار برخی دیگر از ریزمغذی‌ها مانند آهن در مقیاس جهانی قابل مشاهده‌است (Malakoti and Tehrani 1386). کمبود عنصر Zn در گیاهان از شایع‌ترین کمبودهای مربوط به ریزمغذی‌ها می‌باشد که علاوه بر عملکرد، ارزش غذایی محصولات را نیز کاهش می‌دهد. کمبود

Zn در مواردی که ناشی از محدودیت‌های خاک زیرین، خشکی خاک‌های سطحی و بیماری‌ها باشد را نمی‌توان از طریق استفاده کودی به طور کامل رفع کرد. بنابراین اصلاح و استفاده از ژنوتیپ‌های کارآمد برای جذب Zn می‌تواند راه‌حلی موثر و پایدار برای تولید بیشتر محصولات زراعی در شرایط کمبود Zn باشد (Sadeghzadeh 2013). شناسایی ژنوتیپ‌هایی با کارایی جذب و مصرف بالای Zn و تجمع آن در بخش قابل استفاده مانند دانه از اهداف برنامه‌های اصلاحی اغلب گیاهان زراعی است (Zimmerman and Hurrel 2002). تنوع ژنتیکی برای تجمع Zn در دانه برای محصولات مهمی مانند گندم، جو، برنج، ذرت و لوبیا گزارش شده‌است (Raboy et al. 1984; Moraghan and Grafton 1999; Graham et al. 1999; Gregorio et al. 2000; Mantovi et al. 2003; Uauy et al. 2006; Sadeghzadeh et al. 2008). اطلاعات کمی درباره کنترل ژنتیکی و مکانیسم‌های مولکولی، فیزیولوژیکی و یا ساختاری برای تجمع بیشتر Zn در ژنوتیپ‌های کارای Zn وجود دارد و مکانیسم‌های دقیق درگیر در کارآمدی تجمع Zn مشخص نشده‌است (Ghandilyan et al. 2006). به‌طورکلی ژنوتیپ‌های کارآمد در جذب Zn، قابلیت‌هایی مانند افزایش در کارایی جذب Zn به وسیله ریشه‌ها، توانایی تحویل Zn از ریشه‌ها به اندام هوایی، عملکرد دانه بیشتر، باز انتقالی بیشتر Zn به دانه و یا کارایی بیشتر در استفاده از Zn داخل سلول را دارا هستند (Cakmak 2002). تا به‌حال گزینش بذور دارای مقادیر بالایی از ریزمغذی‌ها عمدتاً مبتنی بر روش‌های کلاسیک اصلاحی بود که فرایند پردردسر و زمان‌بری می‌باشد (Ghandilyan et al. 2006; Bouis 2007). استفاده از نشانگرهای ملکولی می‌تواند در توسعه و گزینش واریته‌های دارای مقادیر بالای ریزمغذی‌های مانند Zn بسیار مفید باشد (Zimmerman and Hurrel 2002). از نشانگرهای ملکولی برای شناسایی نواحی کروموزومی و ژنتیکی دخیل در محتوی Zn بذر در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس (Vreugdenhil et al. 2004; Filatoy et al. 2007) و لوبیا (Guzman-Maldonado et al. 2003) نیز استفاده شده است. امروزه در جو نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده‌ای برای تهیه نقشه‌های پیوستگی با پوشش ژنومی بالا، مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی، گزینش به کمک نشانگر و همسانه- سازی ژن‌ها براساس نقشه استفاده می‌شوند (Thumas et al.

منظور استفاده از آنها در برنامه‌های اصلاحی گزینش ارقام جو دارای محتوی بالای Zn دانه بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ۱۴۹ لاین هاپلوئید مضاعف جو، حاصل از تلاقی ارقام Clipper (والد مادری) و Sahara (والد پدری) بود. رقم Clipper دارای تیپ رشد بهاره و ناکارآمد در جذب Zn و دو ردیفه می‌باشد که به عنوان یک رقم زراعی در استرالیا کشت می‌شود. Sahara رقم بومی الجزایر دارای تیپ رشد زمستانه، کارآمد در جذب Zn و شش ردیفه می‌باشد (Sadeghzadeh et al. 2010). این جمعیت به روش *H. bulbosum* (Islam and Shepherd 1981) در دانشگاه ادلاید استرالیا تهیه شده و توسط دکتر صادق‌زاده از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور تهیه شد. تحقیق در آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه انجام گرفت. به منظور مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با محتوی Zn دانه در جو، ۱۰۰ لاین از جمعیت فوق به همراه والدین آنها تحت شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار اجرا شد. ابتدا بذور لاین‌ها و والدین برای داشتن اندازه یکنواخت با دست غربال شد، سپس سطح بذور استریل شده و از پتری‌دیش جهت جوانه‌زنی اولیه استفاده شد. خاک مناسب برای اجرای آزمایش در هوای آزاد خشک شده، به صورت خیلی یکنواخت مخلوط شده و در گلدان‌های موردنظر ریخته شد. ضمناً داخل گلدان‌ها به منظور جلوگیری از خروج مواد غذایی کیسه پلاستیکی قرار داده شد. به علاوه مواد غذایی لازم با توجه به نتایج آزمایش تجزیه خاک به گلدان‌ها اضافه شد (Sadeghzadeh et al. 2008). تعداد ۱۲ بذر جوانه زده در داخل گلدان‌ها کشت شده و به منظور داشتن یکنواختی بین بوته‌ها، در مرحله دو برگگی به ۹ بوته تنک شدند. به منظور آبیاری، گلدان‌ها هر روز وزن شده و آبیاری تا ۹۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای با آب دوبار تقطیر (جهت جلوگیری از آلودگی Zn از طریق آب آبیاری) انجام می‌شد. نمونه‌های گیاهی در مراحل سه برگگی، قبل از شروع ظهور خوشه و در مرحله رسیدگی برداشت شده، غلظت و مقدار Zn در نمونه‌های گیاهی به وسیله اندازه‌گیری قیاسی طیف‌سنجی (Plasmamass ICP-) به

با استفاده از نشانگرهای RFLP یک مکان^۱ دخیل در غلظت و محتوی زیاد Zn در اندام‌های هوایی در جو روی بازوی بلند کروموزوم 4H شناسایی شد که می‌تواند در برنامه‌های افزایش محتوی Zn در جو استفاده شود (Lonergan et al. 2001). Sadeghzadeh et al. (2010) در شناسایی QTL‌های مربوط به صفت میزان و غلظت Zn در دانه در یک جمعیت دابل هاپلوئید جو حاصل از تلاقی Clipper×Sahara با استفاده از نشانگرهای MFLP^۲، یک مکان روی بازوی کوتاه کروموزوم 2H مرتبط با تجمع Zn در دانه شناسایی کرده و نشانگر اختصاصی و مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز SZnR1 را برای استفاده از این مکان در بهبود کیفیت تغذیه‌ای جو در برنامه‌های اصلاحی از طریق انتخاب به کمک نشانگرها معرفی کردند (Lonergan et al. 2009). پنج مکان ژنتیکی را روی بازوی کوتاه و بلند 1H و 2H و بازوی بلند 5H در جو شناسایی کردند که با غلظت و محتوی Zn در بذر مرتبط هستند. در این مطالعه تلاقی دو لاین دابل هاپلوئید جو، دارای سه تا از مهمترین آلل‌های مطلوب دخیل در افزایش محتوی Zn بذر به طور میانگین باعث افزایش محتوی Zn بذر از ۵۳ درصد به ۷۵ درصد شد. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از گزینش به کمک نشانگر برای افزایش محتوی Zn بذر در محصولات استراتژیک مانند جو بسیار مفید خواهد بود. (2008) Shi et al. با استفاده از یک جمعیت دابل هاپلوئید گندم حاصل از تلاقی Hanxuan10 و Lumai14، ۴ QTL برای غلظت Zn در دانه (روی کروموزوم‌های 4A، 4D، 5A و 7A) و ۷ QTL برای محتوی Zn دانه (روی کروموزوم‌های 1A، 2D، 3A، 4A، 4D، 5A و 7A) شناسایی کردند و گزارش کردند که ۴ QTL مرتبط با غلظت Zn با QTL‌های محتوی Zn دانه در ناحیه کروموزومی مشابه قرار دارند که این امکان اصلاح همزمان دو صفت را فراهم می‌سازد. هدف از پژوهش حاضر اشباع نقشه ژنتیکی جو با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی و شناسایی نشانگرهای ملکولی پیوسته با مکان‌های ژنتیکی دخیل در محتوی Zn بذر به

^۱ Quantitative trait loci

^۲ Microsatellite-anchored fragment length polymorphism

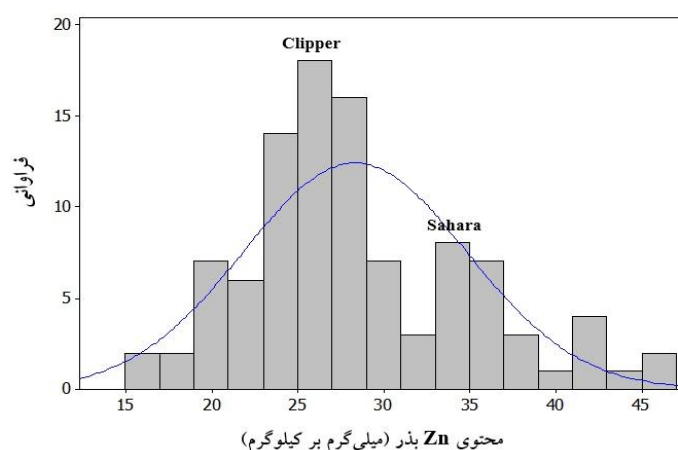
الگوی نواری نشانگرهای چند شکل در جمعیت به صورت A برای افراد مشابه والد Clipper و B برای افراد مشابه Sahara امتیازدهی شد و داده‌های گمشده با علامت - مشخص شد. به منظور بررسی تبعیت نشانگرها از نسبت ۱:۱ مندلی، آزمون χ^2 با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. نشانگرهایی که از نسبت ۱:۱ انحراف نشان دادند (۲ نشانگر) در مرحله تهیه نقشه استفاده نشدند. تعیین گروه‌های لینکاژی با در نظر گرفتن میزان LOD برابر ۳ و لحاظ کردن حداکثر فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر ۵۰ سانتی‌مورگان، توسط نرم‌افزار JoinMap انجام گرفت و با استفاده از نرم‌افزار MapChart گروه‌های لینکاژی رسم شد و به چارچوب نقشه پایه حاصل از نشانگرهای RFLP اضافه شدند. برای شناسایی QTL‌های مربوط به محتوای Zn بذر، ۱۰۰ فرد از جمعیت انتخاب و از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب در نرم‌افزار QTL Cartographer مدل ۲/۵ استفاده شد. برای رسم گروه‌های پیوستگی و نشان دادن موقعیت QTL‌های مربوط به صفت محتوای Zn بذر در گروه‌های پیوستگی از نرم‌افزار MapChart استفاده شد.

نتایج و بحث

از بین ۱۲۰ آغازگر مورد استفاده، ۵ نشانگر ISSR، ۱۲ نشانگر IRAP و ۹ نشانگر REMAP در بین والدین چندشکل بودند که از این بین ۱۸ نشانگر در جمعیت تفرق نشان دادند (شکل ۲ و ۳). بعد از تجزیه و تحلیل داده‌ها، ۱۲ نشانگر به گروه‌های لینکاژی منتسب شدند (جدول ۱). در این بررسی ۳۴ آغازگر IRAP مورد استفاده قرار گرفتند. از این میان ۴ آغازگر منفرد و ۷ ترکیب آغازگری IRAP برای بررسی چندشکلی ۱۴۹ فرد از جمعیت دابل‌هپلوئیدی حاصل از تلاقی دو والد Clipper × Sahara استفاده شدند.

بعد از گروه‌بندی داده‌ها از بین ۱۱ نشانگر IRAP، ۹ نشانگر به گروه‌های لینکاژی جمعیت مورد بررسی منتسب شدند. از ۶۹ آغازگر REMAP مورد استفاده، ۶۰ آغازگر باند واضح تولید کردند که تعدادی از آن‌ها بین والدین چند شکل بودند ولی در

اندازه گیری شد. محتوای Zn در دانه به وسیله حاصل ضرب وزن خشک دانه در غلظت Zn دانه محاسبه شد (Sadeghzadeh et al. 2009) که مقدار آن در والدین Clipper و Sahara و مقدار متوسط آن در جمعیت به ترتیب ۲۶/۸، ۳۴/۳ و ۲۸/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. شکل ۱ توزیع این صفت در جمعیت را نشان می‌دهد.



شکل ۱- توزیع صفت محتوای Zn بذر در جمعیت هاپلوئید مضاعف جو حاصل از تلاقی Clipper × Sahara

بذور ارقام والدینی و افراد جمعیت به تعداد ۴ بذر در گلدان‌های پلاستیکی کشت شدند و در مرحله دو برگگی از هر گلدان به میزان ۰/۲ گرم برگ جوان انتخاب و جدا شدند. استخراج DNA به روش CTAB انجام شد. کمیت و کیفیت DNA ژنومی با روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل ۰/۸ درصد آگارز تعیین شد و نمونه‌ها به غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق و در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شدند. واکنش‌های PCR و چرخه دمایی آن، الکتروفورز و رنگ‌آمیزی محصولات PCR برای هر سه نشانگر بر طبق روش (Abdollahi Mandoulakani 2012) et al. انجام گرفت. در این مطالعه در کل ۱۲۰ آغازگر شامل ۲۱ آغازگر ISSR^۱ (Zietkiewicz et al. 1994)، ۶۵ آغازگر REMAP^۲ و ۳۴ آغازگر IRAP^۳ (Kalendar et al. 1999) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر Bio-RAD (شرکت BioRAD، آمریکا) انجام شد.

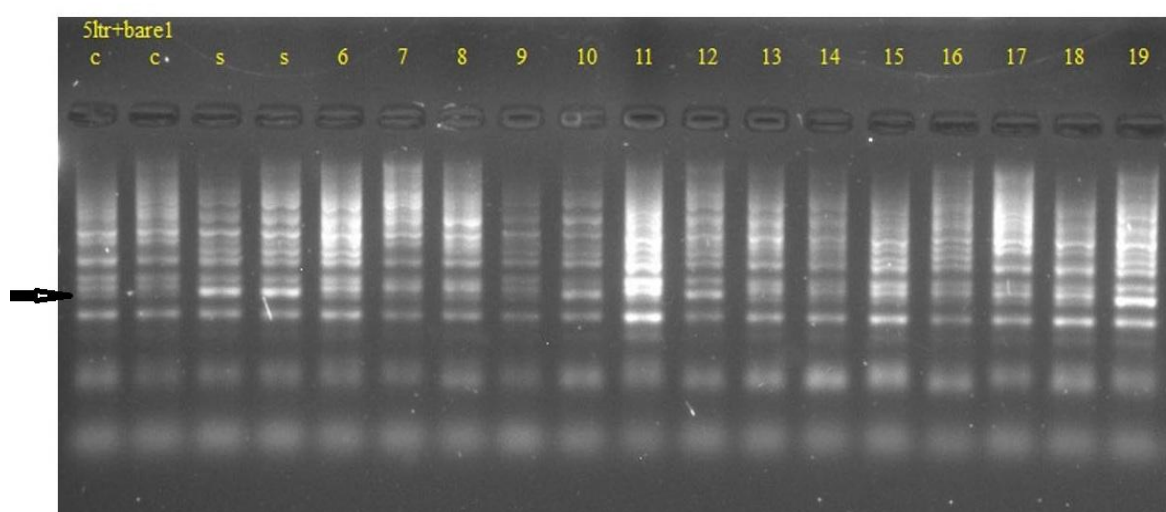
^۱ Inter simple sequence repeat

^۲ Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism

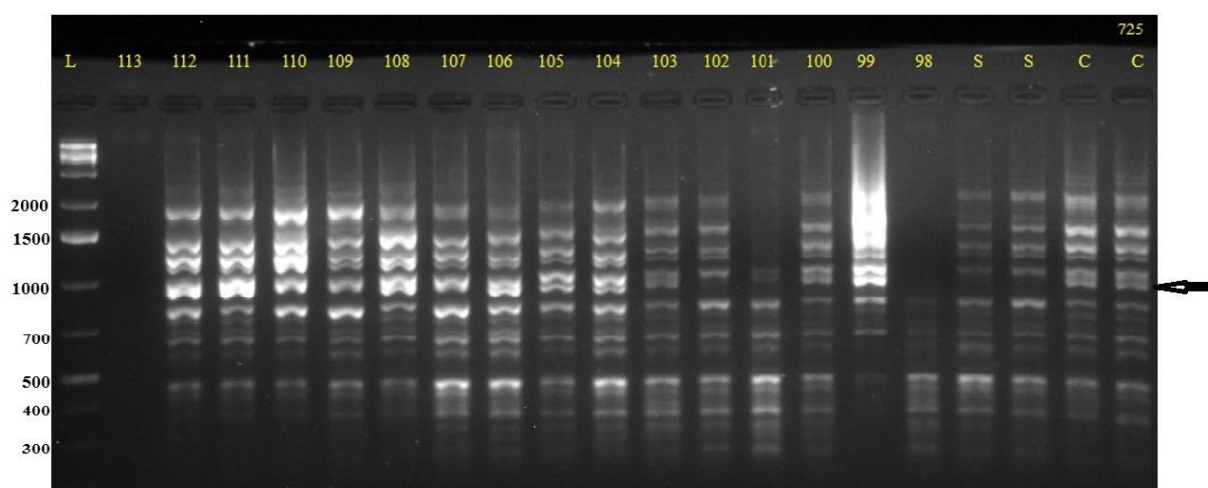
^۳ Inter-retrotransposon amplified polymorphism

جدول ۱- تعداد آغازگرهای مورد استفاده و چند شکلی حاصل از آنها در جمعیت هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی Clipper×Sahara

سیستم نشانگری	تعداد آغازگر مورد استفاده	تعداد مکان‌های چندشکل بین والدین	تعداد مکان چند شکل در جمعیت	تعداد نشانگرهایی که انحراف از تفرق مندلی نشان دادند
ISSR	۲۳	۵	۳	۱
IRAP	۲۸	۱۲	۱۱	۰
REMAP	۶۹	۹	۴	۱
کل	۱۲۰	۲۶	۱۸	۲



شکل ۲- الگوی باندی ترکیب آغازگری Bare1-5LTR روی والدین و برخی افراد جمعیت هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی Clipper×Sahara (C Clipper (S Sahara (S: Sahara (S تا ۱۹) لاین‌های هاپلوئید مضاعف. علامت فلش باند تفرق یافته در جمعیت که با صفت محتوی Zn دانه پیوسته می‌باشد را نشان می‌دهد.



شکل ۳- الگوی باندی آغازگر LTR-725 روی والدین و برخی افراد جمعیت هاپلوئید مضاعف جو حاصل از تلاقی Clipper×Sahara (C Clipper (S Sahara (S: Sahara (S تا ۹۸) لاین‌های هاپلوئید مضاعف؛ L) نشانگر اندازه. علامت فلش باند تفرق یافته در جمعیت که با صفت محتوی Zn دانه پیوسته می‌باشد را نشان می‌دهد.

جدول ۲- مشخصات QTL های مکان یابی شده برای صفت محتوی Zn بذر در جمعیت دابل هاپلوئید جو حاصل از تلاقی Clipper × Sahara

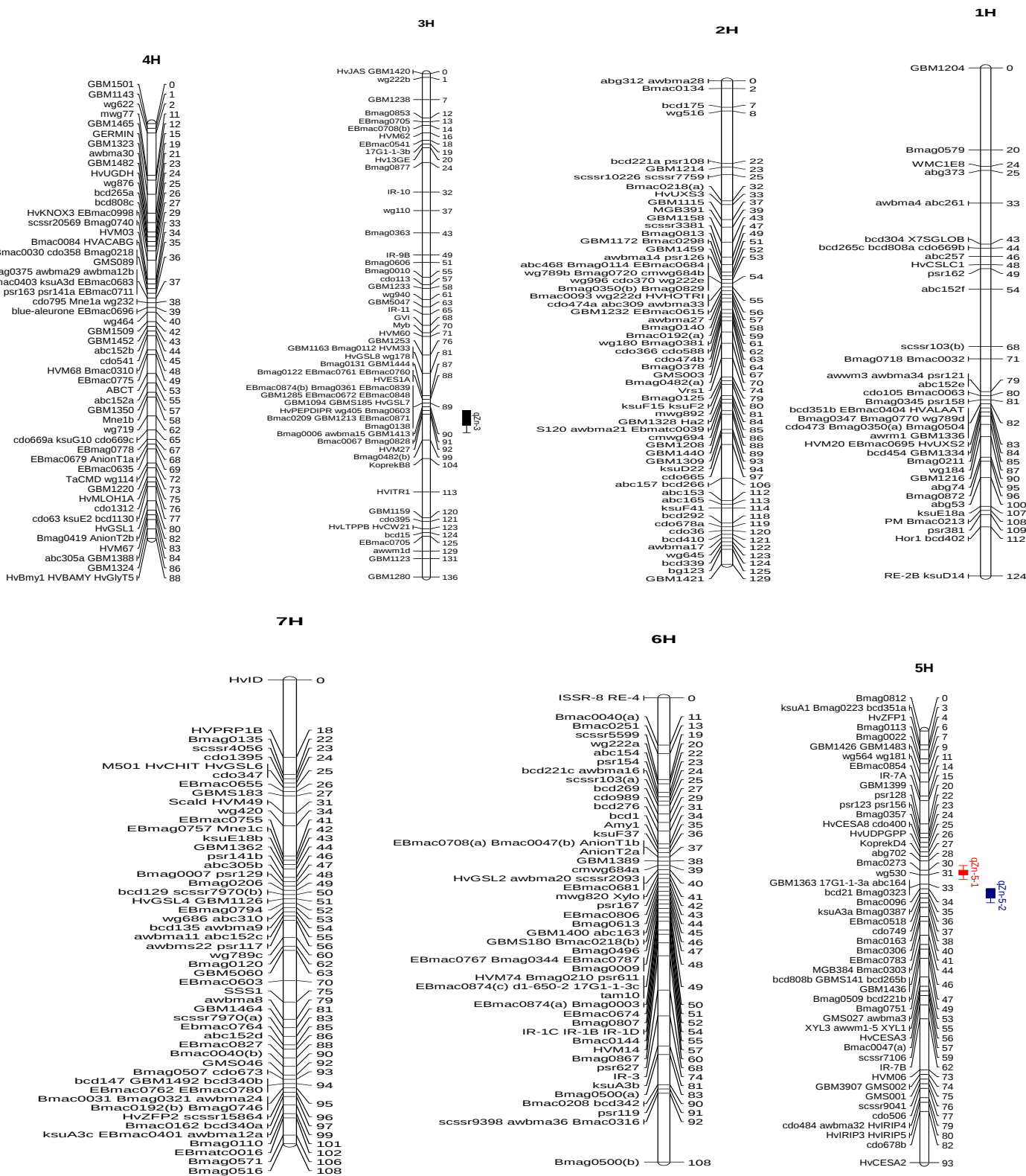
QTL	گروه لینکازی	نشانگرهای مجاور	موقعیت*	LOD	اثر افزایشی**	ضریب تبیین
qZn.2.1	۲	Abg312-Bmac0134	۰/۰۰۵۱	۳/۷۱	-۲/۰۷	۰/۰۹۲
qZn.3.1	۳	Bmac0067-AVM27	۰/۹۱۴۱	۴/۴۲	-۲/۲۳	۰/۱۱۳
qZn.5.1	۵	Bmac0273-Wg530	۰/۳۰۱۱	۴/۶۶	-۲/۴۱	۰/۱۲۷
qZn.5.2	۵	KSuA3a-Bmag0387	۰/۳۴۶۱	۴/۷۴	-۲/۳۶	۰/۱۲

(* موقعیت QTL ها فاصله آنها از نشانگر سمت چپ را نشان می دهند؛ **) اثر افزایشی منفی مربوط به والد Clipper می باشد.

است (Kammholz et al. 2001). بعد از اشباع نقشه پایه، مکان-یابی QTL ها انجام گرفت که خصوصیات QTL ها و موقعیت آن-ها بر روی نقشه پیوستگی در جدول ۲ خلاصه شده است. در مجموع ۴ QTL مرتبط با صفت محتوی Zn بذر شناسایی شد که دو QTL روی گروه های پیوستگی دو و سه و دو QTL دیگر روی گروه لینکاژی ۵ قرار گرفتند (شکل ۴).

به طور کلی نشانگرهای نزدیک به QTL های کنترل کننده صفت روی یک نقشه با چگالی بالا ابزار قدرتمندی برای گزینش به کمک نشانگرهای مولکولی می باشد. تهیه نقشه های ژنتیکی با تراکم بالای نشانگر و توزیع مناسب در مناطق با سطح نوترکیبی بالا به راحتی امکان پذیر است ولی در مناطقی که نوترکیبی کاهش می یابد، استفاده از جمعیت بزرگتر برای افزایش دقت نقشه ژنتیکی ضروری می باشد (Tanksley et al. 1989). بنابراین لازم است در نقشه های ژنتیکی، نواحی با تراکم کم نشانگر توسط نشانگرهای چندشکل تا حد امکان پوشش داده شود تا مکان یابی ژن ها با سهولت و دقت بیشتری صورت پذیرد. در این تحقیق به وسیله نشانگرهای رتروترنسپوزونی و ISSR تا حدودی فضاهای خالی گروه های لینکاژی ۲، ۳، ۵ و ۷ پوشش داده شدند. با توجه به اینکه جو گیاهی خودگشن است و میزان دگرگشتی کمی دارد و نظر به این که جمعیت مورد استفاده در این تحقیق جمعیت هاپلوئید مضاعف با هموزیگوسیتی بالا می باشد، از این رو امکان مطالعات تکراردار و بررسی اثر متقابل محیط و مکان های کنترل کننده صفات کمی با این جمعیت امکان پذیر می باشد. QTL ها عوامل ژنتیکی هستند که مسئول بخشی از تنوع فنوتیپی مشاهده شده در صفات کمی هستند.

جمعیت باند مونومرف تکثیر کردند و تفرق نشان ندادند. تنها ۴ ترکیب آغازگری REMAP باند چندشکل در جمعیت ایجاد کرد. بعد از انجام تجزیه آماری، دو نشانگر REMAP به گروه های لینکاژی منتسب شدند. از کل آغازگرهای ISSR به کار رفته در این تحقیق تنها دو آغازگر باند چندشکل در جمعیت ایجاد کردند. با ترسیم گروه های لینکاژی از بین سه نشانگر ISSR تنها یک نشانگر روی گروه لینکاژی قرار گرفت. در مجموع دو نشانگر از نسبت ۱:۱ مندلی انحراف نشان دادند (جدول ۱). از بین ۱۸ نشانگر چندشکل به دست آمده، ۱۲ نشانگر IRAP، REMAP و ISSR به ۳۹۳ نشانگر RFLP نقشه پیوستگی این جمعیت اضافه شدند. نشانگرها در چهار گروه لینکاژی ۲، ۳، ۵ و ۷ توزیع شدند و بیشترین نشانگرهای چندشکل روی گروه لینکاژی دو قرار گرفتند. در این مطالعه نشانگرهای رتروترنسپوزونی به ویژه نشانگرهای IRAP چندشکلی قابل ملاحظه ای بین والدین و در جمعیت نشان دادند که نشان دهنده فعالیت بالای خانواده های رتروترنسپوزونی مورد استفاده در ژنوم جو می باشد. (Kalendar et al. 2010) نشانگرهای IRAP مبتنی بر خانواده رتروترنسپوزونی Bare1 را در گونه های مختلف جو، تریتیکوم و آریلوپس استفاده کردند و نشان دادند که این خانواده رتروترنسپوزونی در این گونه ها چندشکل و فعال می باشند. از بین نشانگرهای چندشکل و پیوسته با صفت محتوی Zn بذر در این مطالعه، یک نشانگر از هر کدام از نشانگرهای REMAP و ISSR، یعنی ۱۱ درصد از نشانگرها از نسبت ۱:۱ مندلی انحراف نشان دادند ($p \leq 0.05$). چنین انحرافی در جمعیت های هاپلوئید مضاعف در دامنه های متفاوت در تحقیقات قبلی نیز گزارش شده-



شکل ۴- نقشه لینکاژی و QTLهای مربوط به صفت محتوی Zn بذر در جو در جمعیت هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی Clipper × Sahara

میزان Zn دانه را توجیه می‌کردند. علاوه بر این، در آزمایش گلخانه‌ای دو QTL اضافی بر روی کروموزوم‌های 3HL و 4HS شناسایی شد که ۱۳ درصد واریانس فنوتیپی غلظت Zn دانه را توجیه می‌کرد (Sadeghzadeh et al. 2008). در نتیجه تحقیق حاضر ۱۸ نشانگر چندشکل در جمعیت نقشه‌یابی تفرق نشان داد که از این تعداد ۱۲ نشانگر به گروه‌های لینکاژی جو منتسب شدند. در نتیجه این تحقیق نیز مشابه نتایج تحقیقات قبلی یک QTL موثر در میزان Zn دانه روی کروموزوم 2H مشاهده شد. علاوه بر آن یک QTL دیگر روی کروموزوم 3H و دو QTL نیز روی گروه لینکاژی 5H شناسایی شد که این می‌تواند به علت افزایش تعداد نشانگرها در نقشه پایه بوده باشد. لازم به توضیح است با توجه به اینکه خانواده‌های مختلف رتروترنسپوزونی در نواحی مختلف ژنوم شامل نواحی کروماتینی و هتروکروماتینی مشاهده می‌شوند (Grandbastien 1992; Abdollahi et al. 2012)، بنابراین توصیه می‌شود از خانواده‌های متفاوتی به عنوان نشانگرهای مولکولی در جو جهت اشباع نقشه استفاده شود. پیشنهاد می‌شود نسبت به مکان‌یابی دقیق QTL‌های شناسایی شده در این تحقیق در جمعیت‌های بزرگتر اقدام شود تا نشانگرهای کارا برای گزینش به کمک نشانگر این صفت معرفی شود. همچنین پایداری این QTL‌ها در محیط‌های مختلف بررسی شود و از نشانگرهای مولکولی دیگر به ویژه از نشانگرهای SNP مبتنی بر ژن‌های دخیل در محتوی Zn دانه و سایر عناصر ریز مغذی برای اشباع این نقشه استفاده شود.

منابع

- Abdmishani S, Shahnajat boshehri AA (1376) Supplementary plant breeding. Volume1. Tehran University Press (In Farsi).
 Abdollahi Mandoulakani B, Piri Y, Darvishzadeh R, Bernoosi I, Jafari M (2012) Retroelement insertional polymorphism and genetic diversity in *Medicago sativa* populations revealed by IRAP and REMAP markers. Plant Molecular Biology Reporter 30:286-296.
 Banisadr N (1995) Study of heat and cold tolerance in some barley cultivar. Seed and Plant Journal 99: 43-46.
 Bouis HE (2007) Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man

در مجموع در این تحقیق ۴ QTL، qZn.2.1، qZn.3.1، qZn.5.1 و qZn.5.2 روی گروه‌های لینکاژی ۲، ۳ و ۵ شناسایی شدند که به میزان ۱۱/۵۰ درصد نوع فنوتیپی این صفت را تبیین می‌کردند. میزان کم تنوع تبیین شده به وسیله QTL‌های شناسایی شده احتمالاً بیانگر توارث کمی و پلی‌ژنیک این صفت باشد. ۴ QTL مکان‌یابی شده دارای اثر افزایشی منفی بودند که در آن‌ها آلل مطلوب از والد Sahara به نتاج منتقل شده بود و این موضوع اهمیت والد Sahara را در افزایش غلظت Zn دانه نشان می‌دهد. (Lonergan (2001) برای اولین بار خاصیت چندژنی بودن غلظت Zn دانه را در جو گزارش کرد و یک ناحیه روی بازوی بلند کروموزوم 5H مجاور نشانگر Xwg181 مرتبط با انتقال Zn به دانه را مکان‌یابی کرد. در جمعیت دابل هاپلوئید حاصل از تلاقی Clipper و Sahara که در محیط مزرعه و گلخانه کشت داده شده بود، (Lonergan et al. (2009) یک ناحیه روی بازوی بلند کروموزوم 4H شناسایی کردند که مربوط به میزان و غلظت Zn اندام هوایی بود. در این مطالعه، یک QTL دیگر روی بازوی کوتاه کروموزوم 2H شناسایی شد که در افزایش محتوی Zn دانه نقش داشت. در تحقیق دیگری در جمعیت ۱۵۰ فردی هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی Clipper و Sahara که در محیط مزرعه و گلخانه کشت داده شده بود، دو ناحیه واقع در کروموزوم‌های 2HS و 2HL شناسایی شد که با میزان و غلظت Zn دانه گیاهان مزرعه ارتباط داشت. این دو ناحیه ۴۵ درصد تنوع در غلظت Zn دانه و ۵۹ درصد تنوع میزان Zn دانه را توجیه می‌کردند. در همین مطالعه در آزمایش گلخانه‌ای، دو ناحیه روی کروموزوم‌های 2HS و 2HL قرار داشت که به ترتیب ۳۷ و ۵۵ درصد تنوع غلظت و

at low cost? Proceeding of the Nutrition Society 62:403-411.

Cakmak I (2002) Plant nutrition research: priorities to meet human needs for food in sustainable ways. Plant Soil 247:3-24.

Cole CR, Grant FK, Swaby-Ellis ED, Smith JL, Jacques, A (2010) Zinc and iron deficiency and their interrelations in low income African American and Hispanic children in Atlanta. American Journal of Clinical Nutrition 91:1027-1034.

Filatoy V, Dowdle J, Smirnoff N, Ford-Lloyd B, Newbury HJ, Macnair MR (2007) A quantitative trait

- loci analysis of zinc hyper accumulation in *Arabidopsis halleri*. New Phytologist 174:580-590.
- Fischbeck G (2002) Contribution of barley to agriculture: a brief overview. In: Slafer, G.A., Molina-Cano, JL, Savin R, Araus JL, Romagosa I (Eds.). Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality. Food Products Press, an Imprint of The Haworth Press, Inc., pp: 1-14.
- Ghandilyan A, Vreugdenhil D, Aarts MGM (2006) Progress in the genetic understanding of plant iron and zinc nutrition. Physiologia Plantarum 126:407-417.
- Graham RD, Senadhira D, Beebe S, Iglesias C, Monesterio I (1999) Breeding for micronutrient density in edible portions of staple food crops: conventional approaches. Field Crops Research 60:57-80.
- Grandbastien MA (1992) Retroelements in higher plants. Trends in Genetics 8:103-108.
- Gregorio GB, Senadhira D, Htut T, Graham RD (2000) Breeding for trace mineral density in rice. Food and Nutrition Bulletin 21:382-386.
- Guzman-Maldonado SH, Martinez O, Acosta-Gallegos JA, Guevara-Lara F, Paredes-Lopez O (2003) Putative quantitative trait loci for physical and chemical components of common bean. Crop Science 43:1029-1035.
- Hassan M, Oldach K, Baumann U, Langridge P, Sutton T (2010) Genes mapping to boron tolerance QTL in barley identified by suppression subtractive hybridization. Plant Cell Physiology 33:118-198.
- Hearnden PR, Eckermann PJ, McMichael GL, Hayden MJ, Eglinton JK, Chalmer KJ (2007) A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. Theoretical and Applied Genetics 115:383-391.
- Islam AKMR, Shepherd KW (1981) Wheat-barley addition lines: their use in genetic and evolutionary studies of barley. In: Asher MJC, Ellis RP, Hayter AM, Whitehouse RNH (eds) Barley genetics IV. (Proc 4th Int Barley Genet Symp). Edinburgh University Press, Edinburgh, pp 729-739.
- Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A (1999) IRAP and REMAP: two retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theoretical and Applied Genetics 98:704-711.
- Kalendar R, Antonius K, Smykal P, Schulman AH (2010) iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. Theoretical and Applied Genetics 121:1419-1430.
- Kammholz SJ, Campbell AW, Sutherland MW, Hollamby GJ, Artin PJ, Estwood RF, Barclay I, Wilson RE, Brennan PS, Sheppard JA (2001) Establishment and characterization of wheat genetic mapping populations. Australian Journal of Agricultural Research 52:1079-1088.
- Li JZ, Huang XQ, Heinrichs F, Ganai M, Roder MS (2005) Analysis of QTLs for yield, yield components, and malting quality in a BC3-DH population of spring barley. Theoretical and Applied Genetics 110:356-363.
- Loneragan PF, Pallotta MA, Lorimer M, Paull JG, Barker SJ, Graham RD (2009) Multiple genetic loci for zinc uptake and distribution in barley (*Hordeum vulgare*). New Phytologist 184:168-79.
- Loneragan PF (2001) Genetic characterizations and mapping of zinc nutrition in barley (*Hordeum vulgare*). Ph.D thesis, Faculty of Agriculture and Natural Resource Sciences, The University of Western Australia, Perth, Australia.
- Malakoti MJ, Tehrani MM (1386) Micronutrients role in enhancing the performance and improve the quality of agricultural products (micro elements with macro effect). Tarbiyat Modarres University Press, Tehran, Iran. (In Farsi).
- Mantovi P, Bonazzi G, Maestri E, Marmiroli N (2003) Accumulation of copper and zinc from liquid manure in agricultural soils and crop plants. Plant Soil 250:249-257.
- Marquez-Cedillo, LA, Hayes PM, Jones BL, Kleinhofs A, Legge G, Rosnagel BG, Sato K, Ullrich SE, 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. Theoretical and Applied Genetics 101:173-184.
- Moraghan JT, Grafton K (1999) Seed-zinc concentration and the zinc-efficiency trait in navy bean. Soil Science Society of America Journal 63:918-922.
- Pfeiffer WH, McClafferty B (2007) Harvest Plus: breeding crops for better nutrition. Crop Science 47:88-105.
- Raboy V, Dickinson DB, Below FE (1984) Variation in seed total phosphorus, phytic acid, zinc, calcium, magnesium and protein among lines of *Glycine max* and *G. soja*. Crop Science 24:431-434.
- Sadeghzadeh B, Rengel Z, Li CD (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.
- Sadeghzadeh B (2013) A review of zinc nutrition and plant breeding. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 13:905-927.
- Sadeghzadeh B, Rengel Z, Li C, Yang H (2010) Molecular marker linked to a chromosome region regulating seed zinc accumulation in barley. Molecular Breeding 25:167-177.
- Shi R, Li H, Tong Y, Jing R, Zhang F, Zou C (2008) Identification of quantitative trait locus of zinc and

phosphorus density in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain. Plant Soil 306:95-104.

Tanksley SD, Young ND, Patterson AH, Bonierbale MW (1989) RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. Biotechnology 7:257-63.

Thomas WTB, Powell W, Waugh R, Chalmers KJ, Barua UM, Jack P, Lea V, Forster BP, Swanston JS, Ellis RP, Hanson PR, Lance RCM (1995) Detection of quantitative trait loci for agronomic, yield, grain and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgar* L.). Theoretical and Applied Genetics 91:1037-1047.

Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J (2006) A NAC gene regulating senescence, improves

grain protein, zinc, and iron content in wheat. Science 314:1298-1301.

Vreugdenhil D, Aarts MGM, Koornneef M, Nelissen H, Ernst WHO (2004) Natural variation and QTL analysis for cationic mineral content in seeds of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell and Environment 2004: 27:828-839.

Zietkiewicz E, Rajalski A, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176-183.

Zimmerman M, Hurrel R (2002) Improving iron, zinc and vitamin A nutrition through plant biotechnology. Current Opinion in Biotechnology 13:142-145.