

نقشه‌یابی ارتباطی صفات ریشه در جو

رضا عطایی^۱، ولی‌اله محمدی^{۲*}، علیرضا طالعی^۳ و محمد رضا نقوی^۴
۱، دانشجوی دکتری، ۲، دانشیار، ۳ و ۴، استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲ - تاریخ تصویب: ۹۲/۴/۱۸)

چکیده

تنش خشکی و کمبود منابع آب و مواد غذایی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش عملکرد در گیاهان زراعی هستند. ریشه‌های سالم و توسعه یافته باعث افزایش راندمان جذب آب و مواد غذایی شده و از این طریق باعث افزایش عملکرد می‌شوند. نقشه‌یابی ارتباطی یکی از روش‌هایی است که اخیراً برای مطالعه ژنتیکی و تعیین تعداد مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی مورد استفاده قرار گرفته است. بدلیل اینکه اغلب صفات مهم ریشه به صورت کمی تغییر می‌کنند لذا به منظور شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با صفات ریشه جو از نقشه‌یابی ارتباطی در ۱۰۰ رقم جو استفاده گردید. ارقام در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار و در شرایط گلخانه کشت و صفات ریشه شامل وزن خشک ریشه، حجم ریشه، میانگین تعداد ریشه‌های موئین و میانگین قطر ریشه اندازه‌گیری شدند. ارزیابی ژنوتیپی با ۳۹۶۴ اس.ان.پی با فراوانی بیشتر از ده درصد صورت پذیرفت. به منظور حذف ساختار جمعیت، ژنوتیپ‌های مورد استفاده بر اساس مرفولوژی سنبله (دوردیفه یا شش‌ردیفه بودن) به دو زیرگروه تقسیم شدند. میانگین عدم تعادل نشان داد بیشترین تاثیر لینکاژ بر روی عدم تعادل در فاصله ۴ سانتی‌مورگانی است. با استفاده از مدل خطی مخلوط تعداد ۱۵ کیو.تی.ال برای صفات مورد ارزیابی شناسایی شد. بیشترین مقدار لگاریتم احتمال مربوط به نشانگر SNP_2981 بود و با میانگین تعداد ریشه‌های موئین ارتباط داشت. بررسی مقایسه‌ای نتایج این آزمایش با کیو.تی.ال‌های مربوط به صفات زراعی در مطالعات قبلی نشان داد اغلب کیو.تی.ال‌های مربوط به صفات ریشه با صفات زراعی مانند عملکرد، تعداد دانه در سنبله، تعداد روز تا گلدهی، ورس و ارتفاع گیاه ارتباط دارند.

واژه‌های کلیدی: نقشه‌یابی ارتباطی، ریشه، جو، کیو.تی.ال

مقدمه

2009. امروزه جو از نظر اهمیت بعد از گندم، برنج و ذرت در مقام چهارم دنیا قرار گرفته است. علاوه بر اهمیت اقتصادی، ژنوم جو مدل مهمی برای مطالعات ژنتیکی به شمار می‌رود زیرا جو گیاهی است خودگشن، دیپلوئید با تعداد کروموزوم کم ($2n=2x=14$) و نسبتاً بزرگ (۸-۶ میکرومتر) و همچنین دورگ‌گیری نیز در

جو (*Hordeum vulgare L.*) یکی از قدیمی‌ترین و مهم‌ترین گیاهان هلال حاصلخیز^۱ است که در حدود ۱۰۰۰۰ سال پیش اهلی شده است (Kilian et al.,)

1. Fertile Crescent

که از مزیت استفاده از جمعیت‌های طبیعی برخوردار است، روش نقشه‌یابی ارتباطی است^۳. در این روش مجموعه بزرگی از افراد یک جمعیت به طور تصادفی جمع‌آوری می‌شوند و بر اساس عدم تعادل لینکاژی^۴ نقشه‌یابی انجام می‌شود. نقشه‌یابی ارتباطی در مقایسه با نقشه‌یابی لینکاژی به مراتب دقیق‌تر است زیرا به دلیل نوترکیبی‌های زیاد نقشه ژنتیکی وضوح بالایی دارد و به راحتی می‌توان از آن در فرآیند انتخاب به کمک نشانگر^۵ استفاده کرد (Moose & Mumm, 2008). این روش برای اولین بار در ژنتیک انسانی و برای صفاتی کیفی (مانند بیماری‌های ژنتیکی) مورد استفاده قرار گرفت اما امروزه در جمعیت‌های گیاهی و جانوری نیز به کار می‌رود (Reich et al. 2001). مکان‌یابی کیوتی‌ال‌های وزن خشک ریشه در جو نشان داد این صفت توسط دو کیوتی‌ال کنترل می‌شود. نشانگرهای ریزماهواره Bmag337 در فاصله ۴۰ سانتی‌مورگانی بر روی گروه پیوستگی^۶ شماره ۵ و Bmag13 در ۱۲ سانتی‌مورگانی گروه پیوستگی شماره ۳ با وزن خشک ریشه ارتباط داشتند (Ellis et al., 2008). بررسی اندازه سیستم ریشه^۷ در جمعیتی متشکل از ۱۲ ژنوتیپ و ۱۵۷ رگه - هاپلوئید مضاعف جو، نشان داد این صفت با ۴ کیوتی‌ال کنترل می‌شود. مقایسه کیوتی‌ال‌های ریشه با کیوتی‌ال‌هایی که قبلاً برای صفات زراعی شناسایی شده بودند، نشان داد اندازه سیستم ریشه با صفاتی مانند ارتفاع، عملکرد، وزن گیاه، تعداد پنجه و شاخص برداشت همبستگی دارد (Chloupek et al., 2006). در مطالعه‌ای که بر روی صفات ریشه گندم صورت گرفت ۳۲ کیوتی‌ال برای صفات ریشه تحت شرایط نرمال و خشکی شناسایی شد. نتایج این پژوهش نشان داد کیوتی‌ال‌های نزدیک ناحیه سانترومری 2A در هر دو شرایط نرمال و خشکی باعث افزایش طول ریشه، سطح ریشه و تعداد انشعابات ریشه می‌شوند (Leon et al., 2012). نقشه‌یابی ارتباطی ۴۸ ژنوتیپ برنج برای صفات مرتبط با تنش خشکی نشان داد ۸۲ نشانگر اس.اس.آر

آن آسان است (Sreenivasulu et al., 2008). در ایران جو با ۱/۶ میلیون هکتار در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ بیشترین سطح زیرکشت را بعد از گندم به خود اختصاص داده است (وزارت جهاد کشاورزی ۱۳۹۰).

تنش خشکی یکی از مهمترین عوامل کاهش عملکرد در گیاهان زراعی است (Cattivelli et al., 2008). سیستم ریشه گیاه و صفات مرتبط با آن در سازگاری به مناطقی که محدودیت منابع آب و مواد غذایی وجود دارد از اهمیت بالایی برخوردار است. مطالعات متعدد نشان می‌دهند که خصوصیات ریشه مانند عمق ریشه، حجم ریشه، قطر آوندهای چوبی و وزن خشک ریشه از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند و به راحتی به گزینش پاسخ می‌دهند (Gregory, 1994; Hoad et al., 2001; Manske & Vlek, 2002; Manschadi et al., 2006). علی‌رغم نقش ضروری سیستم ریشه در رشد و سازگاری گیاه و تنوع بالای آن، بدلیل اینکه تکنیک‌های ارزیابی ریشه مشکل، زمان‌بر و در شرایط مزرعه با خطای زیادی همراه هستند نسبت به اندام‌های هوایی توجه کمتری به آن شده است (Manschadi et al., 2006). اغلب صفات مهم ریشه به صورت کمی هستند (Zhou et al., 2011). بدلیل پلی‌ژنیک بودن و تاثیرپذیری زیاد اینگونه صفات از عوامل محیطی، تجزیه صفات کمی همواره با چالش روبرو بوده است (Van Eeuwijk et al., 2004).

نقشه‌یابی لینکاژی^۱ یکی از روش‌هایی است که در دهه اخیر برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش هدف شناسایی نشانگرهای پیوسته با یک صفت کمی در یک جمعیت خواهر-برادری است. محدودیت‌های اساسی این روش برای مکان‌یابی کیوتی‌ال‌ها، تعداد محدود کراسینگ‌اور و در نتیجه وضوح پایین نقشه ژنتیکی (۲۰-۱۰ سانتی-مورگان)، و هزینه بالای تکثیر رگه‌ها برای رسیدن به تعداد کافی کراسینگ‌اور است. ضمن اینکه ایجاد چنین جمعیت‌هایی بسیار زمان‌بر بوده و جمعیت ایجاد شده فقط برای صفات و مطالعات محدودی کارایی دارد (Gupta et al., 2005; Holland, 2007). روشی جایگزین

³ - Association mapping

⁴ - Linkage disequilibrium

⁵ - Marker-assisted selection

⁶ - Linkage group

⁷ - Root system size (RSS)

¹ - Linkage mapping

² - Quantitative Trait Loci (QTLs)

ریشه‌های مویین، میانگین قطر ریشه (میلی‌متر) و وزن خشک ریشه (گرم) با استفاده از نرم‌افزار WinRHIZO Pro V 2008a اندازه‌گیری گردید.

ارزیابی ژنوتیپی

استخراج دی.ان.ا با استفاده از کیت Tepnel Nucleoplex Plant DNA صورت پذیرفت. هر رقم با مجموعه‌ای از ۷۸۶۴ اس.ان.پی به وسیله Single Illumine™ Iselect Assay با همکاری موسسه IPK-Gatersleben در آلمان ارزیابی گردید. سپس نشانگرهایی با داده گمشده بیشتر از ده درصد و MAF^3 کمتر از ده درصد حذف گردید (Burke et al., 2013) و مجموعه جدیدی متشکل از ۳۹۶۴ اس.ان.پی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت و نقشه‌یابی ارتباطی مورد استفاده قرار گرفت. نقشه ژنتیکی نشانگرها در جمعیت هاپلوئید مضاعف Morex x Barke توسط Stein و همکاران (داده‌های چاپ نشده) در اختیار این طرح قرار گرفت.

تجربه ارتباطی

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت ابتدا تجزیه PCO^4 با استفاده از نرم‌افزار PAST 2.14 انجام پذیرفت (Hammer et al., 2001). تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA)، تخمین میزان تمایز جمعیت توسط آماره F_{st} و با نرم‌افزار Arlequin3.5 صورت پذیرفت. محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرها⁵ (PIC) با استفاده از رابطه $1 - \sum p_i^2$ محاسبه گردید (Chen et al., 2011).

در این رابطه P_i فراوانی آمین آل اس.ان.پی است. در نهایت عدم تعادل لینکاژی مربوط به هر جفت نشانگر و آماره r^2 برای هر گروه پیوستگی به طور جداگانه و با نرم‌افزار Haploview 4.01 (Barrett et al., 2005) محاسبه گردید و نحوه کاهش عدم تعادل لینکاژی با برآزش رگرسیون به روش LOWESS⁶ (Jacoby 2000) بررسی گردید. وجود زیرجمعیت‌ها با روش بیس⁷ و نرم‌افزار Structure 2.3 با ۳ تکرار و ۳۰۰۰۰ جایگشت

با صفات ریشه مانند طول ریشه، قطر ریشه و وزن خشک ریشه همبستگی بالایی دارند. نتایج این بررسی نشان داد در شرایط تنش نشانگرهای RM29، RM3843، RM318، RM5720، RM170 و RM585، RM540 هم با عملکرد و هم با صفات ریشه پیوسته هستند (Deshmukh, 2012). در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۱۰۰ رقم جو پاییزه با استفاده از نشانگرهای اس.ان.پی¹ بررسی و برای نخستین بار از طریق نقشه‌یابی ارتباطی تعداد و جایگاه ژنومی کیوتی.ال‌های مرتبط با برخی صفات ریشه مانند وزن خشک ریشه، حجم ریشه، تعداد ریشه‌های مویین و قطر ریشه شناسایی گردید. به منظور مطالعه پویایی عدم تعادل لینکاژی، الگوی کاهش عدم تعادل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در نهایت ارتباط کیوتی.ال‌های شناسایی شده با کیوتی.ال‌های صفات زراعی که در مطالعات قبلی گزارش شده‌اند بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی

در این آزمایش ۱۰۰ رقم جو پاییزه مورد استفاده قرار گرفت. ارقام انتخاب شده نمایانگر تنوع ژنتیکی موجود در ارقام اصلاح شده جو از سال ۱۹۳۷ تا سال در اروپا ۲۰۰۶ می باشند. این مجموعه شامل ۵۰ رقم جو دو ردیفه و ۵۰ رقم جو شش‌ردیفه بود. آزمایش در مرکز تحقیقات ژنومیکس ایتالیا² در سال ۱۳۹۱ و با همکاری دانشگاه میلان انجام گرفت. بذور مورد استفاده با قارچ-کش ضدعفونی شده و به منظور جوانه‌زنی در اتاقک رشد و در دمای ۲۵ درجه نگهداری گردید. بعد از جوانه زنی، ارقام در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در گلدانهایی با عمق ۸۰ سانتیمتر و عرض ۳۰ سانتیمتر و در شرایط گلخانه کشت گردید. خاک مورد استفاده ترکیبی از ماسه (۵۰ درصد)، خاک (۲۰ درصد)، کوکوپیت و پرلیت (۳۰ درصد) بود. تمامی گیاهان در یک مرحله فنولوژیکی مشخص (اوایل ساقه رفتن) مورد ارزیابی قرار گرفتند. صفات حجم ریشه (سانتی‌متر مکعب)، تعداد

3. Minor Allele Frequency

4. Principal Coordinates Analysis

5. Polymorphism Information Content

6. Locally weighted scatterplot smoothing

7. Bayesian Method

1. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

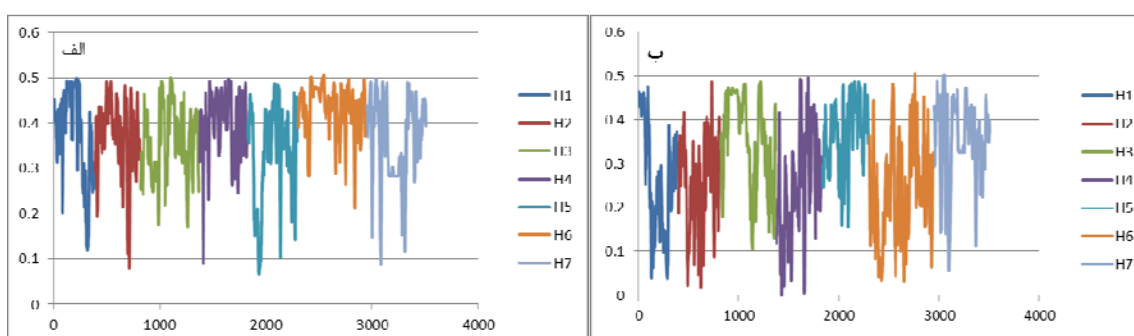
2. Genomics Research Centre

نتایج و بحث

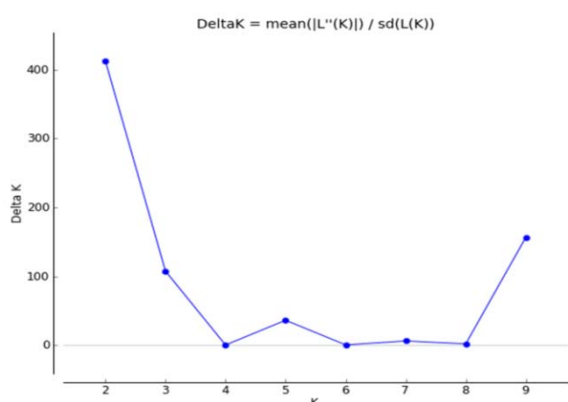
دامنه شاخص PIC در کل جمعیت از ۰/۱۹ تا ۰/۵ با میانگین ۰/۳۹ بود. مقدار این شاخص برای اغلب نشانگرها (۳۳۵۲ نشانگر) بیشتر از ۰/۲۵ بود. این نتایج نشان می‌دهد که نشانگرهای مورد استفاده از پلی مورفیسم بالایی برخوردار بودند. برخی از گزارشات حاکی از آنست که ساختار جمعیت ارقام جو با مورفولوژی سنبله (دوردیفه یا شش‌ردیفه بودن) ارتباط دارد (Zhang et al., 2009). لذا شاخص PIC در داخل گروه‌های متشکل از ژنوتیپ‌های دوردیفه و شش‌ردیفه محاسبه گردید. میانگین آماره فوق در داخل ژنوتیپ‌های شش‌ردیفه (۰/۳۷) بیشتر از ژنوتیپ‌های دوردیفه (۰/۳۰) بود که نشان می‌دهد تنوع ژنتیکی جوهای شش‌ردیفه بیشتر از جوهای دوردیفه است (شکل - ۱).

بررسی گردید. تعداد کلاسترهایی (K) که ساختار جمعیت را بهتر نشان می‌دادند بوسیله نرم‌افزار Structure Harvester تعیین گردید (Evanno et al., 2005). بررسی ارتباط نشانگر- صفت با استفاده از نرم افزار Tassel 3.0.119 و روش مدل خطی مخلوط^۱ (MLM) همراه با ماتریس‌های Q و K انجام گرفت (Bradbury et al., 2007).

برای تجزیه ارتباطی فقط نشانگرهایی با فراوانی بیش از ده درصد مورد استفاده قرار گرفت و آماره P با ۱۰۰۰ جایگشت برآورد گردید. ترسیم نقشه ژنتیکی جمعیت Morex x Barke بر اساس مکان اس.ان.پی‌ها به کمک نرم‌افزار JoinMap 3.0 صورت پذیرفت و مکان احتمالی کیوتی.ال‌ها با سطح اطمینان $-\text{Log}P \geq 3$ بر روی گروه‌های پیوستگی مشخص گردید.

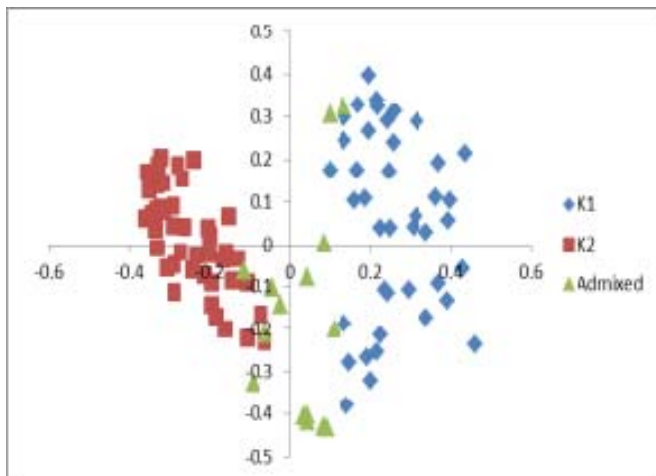


شکل ۱- محتوای اطلاعات چند شکلی نشانگرها (PIC). الف) ژنوتیپ‌های دوردیفه ب) ژنوتیپ‌های شش‌ردیفه. محور عمودی نشان- دهنده محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرها و محور افقی ترتیب نشانگرها را نشان می‌دهد.



شکل ۲- تعیین زیرگروه‌ها با استفاده از Structure Harvester و روش Evanno و همکاران (۲۰۰۵). محور عمودی مقدار آماره ΔK و محور افقی تعداد زیر جمعیت‌ها را نشان می‌دهد.

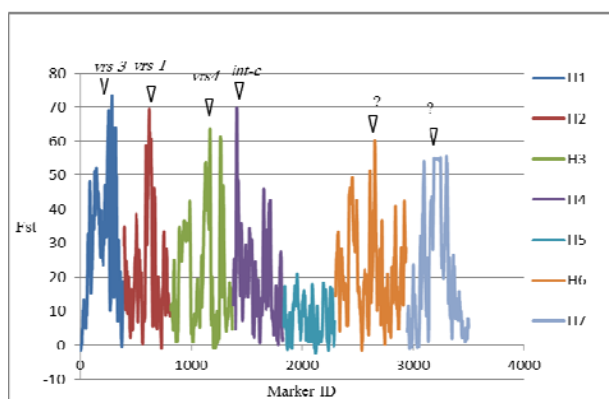
علی‌رغم مزیت‌هایی که نقشه‌یابی ارتباطی دارد معیشت این روش به دلیل وجود ساختار در جمعیت باعث ایجاد ارتباط کاذب نشانگر- صفت می‌شود. تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از ۳۹۶۴ اس.ان.پی و نرم‌افزارهای Structure Harvester و Structure نشان داد که شاخص ΔK بیشترین مقدار را در $K=2$ دارد که نشان‌دهنده وجود دو زیر جمعیت است. در مقدار $K=2$ جمعیت به دو زیر گروه ژنوتیپ‌های دوردیفه و شش‌ردیفه (با تعداد کمی ژنوتیپ حدواسط) تقسیم می‌شوند (شکل- ۲).



شکل ۳- نتایج تجزیه PCO. تجزیه جمعیت به دو زیرجمعیت جو K1 (ژنوتیپهای دوردیفه) و K2 (ژنوتیپهای شش‌ردیفه).

تجزیه PCO با نرم‌افزار PAST نشان داد سه مولفه اول ۲۸/۲ درصد کل تنوع جمعیت را توجیه می‌کنند. نتایج حاصل از این تجزیه جمعیت را بر اساس مورفولوژی سنبله به دو زیرجمعیت (ارقام دوردیفه و شش‌ردیفه بودن) تقسیم کرد که با نتایج حاصل از Structure مطابقت خوبی داشت (شکل ۳). تجزیه واریانس مولکولی و شاخص Fst نواحی از ژنوم را که باعث تمایز دو زیرجمعیت شده‌اند را نشان می‌دهد (شکل ۴). این مناطق ژنومی بر روی گروه‌های پیوستگی شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب با ژنهای *vrsl*، *vr3*، *vr1* و *int-c* هم مکان بودند که این ژن‌ها مسئول دو-ردیفه یا شش‌ردیفه بودن در جمعیت‌های جو هستند (Ramsay et al., 2011). بر روی گروه پیوستگی شماره ۵ مناطق تمایز یافته‌ای مشاهده نشد که نشان می‌دهد جمعیت مورد مطالعه فاقد فرم آلی *vr2* می‌باشد. گروه‌های پیوستگی شماره ۶ و ۷ مقدار Fst را در حد بالایی نشان می‌دهند که ممکن است حاوی فرم‌های آلی جدید برای ژن *vr3* باشند که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (شکل ۴).

تجزیه واریانس مولکولی و شاخص Fst نواحی از ژنوم را که باعث تمایز دو زیرجمعیت شده‌اند را نشان می‌دهد (شکل ۴). این مناطق ژنومی بر روی گروه‌های پیوستگی شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب با ژنهای *vrsl*، *vr3*، *vr1* و *int-c* هم مکان بودند که این ژن‌ها مسئول دو-ردیفه یا شش‌ردیفه بودن در جمعیت‌های جو هستند (Ramsay et al., 2011). بر روی گروه پیوستگی شماره ۵ مناطق تمایز یافته‌ای مشاهده نشد که نشان می‌دهد جمعیت مورد مطالعه فاقد فرم آلی *vr2* می‌باشد. گروه‌های پیوستگی شماره ۶ و ۷ مقدار Fst را در حد بالایی نشان می‌دهند که ممکن است حاوی فرم‌های آلی جدید برای ژن *vr3* باشند که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (شکل ۴).



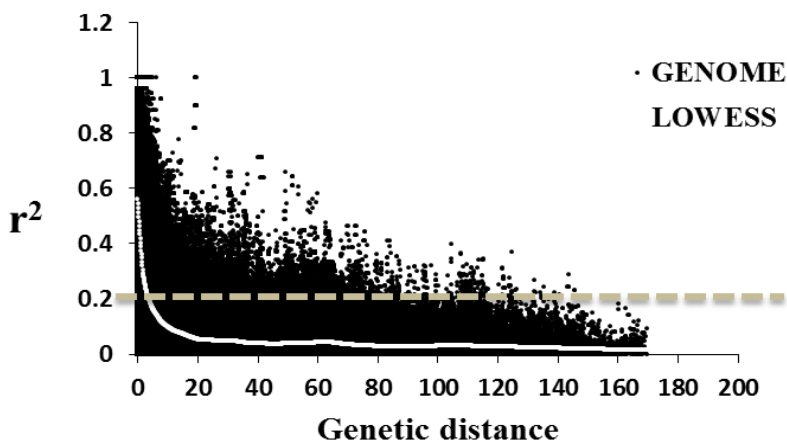
شکل ۴- تجزیه واریانس مولکولی و شاخص Fst جو. محور عمودی صد برابر مقدار واقعی نشان داده شده است.

نقشه‌یابی ارتباطی روشی است که در آن مکان‌یابی کیوتی‌ال‌ها بر اساس عدم تعادل لینکاژی صورت می‌گیرد (Gupta et al., 2005). بررسی شاخص عدم تعادل (r^2) نشان داد با افزایش فاصله ژنتیکی، عدم تعادل لینکاژی کاهش می‌یابد (شکل ۵). مقدار بحرانی

شاخص عدم تعادل (با احتمال ۹۰ درصد) مقدار ۰/۲ در نظر گرفته شد و فرض بر این است که مقادیر بیشتر از حد بحرانی بوسیله لینکاژ ژنتیکی ایجاد می‌شوند. نقطه برخورد منحنی رگرسیون LOWESS با مقدار بحرانی عدم تعادل به عنوان نقطه کاهش میانگین عدم تعادل در

سانتی مورگان، معنی دار بود (-۰/۳۹) و ۵۴ درصد این نشانگرها بالاتر از حد بحرانی r^2 (۰/۲) قرار داشتند.

جمعیت تعریف شد که در جمعیت مورد مطالعه برابر با ۴ سانتی مورگان بود (شکل ۵). همبستگی بین r^2 و فاصله ژنتیکی بین نشانگرهایی با فاصله کمتر از ۴



شکل ۵- کاهش عدم تعادل جفت نشانگرها با افزایش فاصله ژنتیکی (سانتی مورگان). در جوهای مورد مطالعه خط افقی (بریده شده) نشاندهنده مقدار بحرانی عدم تعادل با احتمال ۹۰ درصد. رگرسیون LOWESS (منحنی سفید رنگ) نشاندهنده چگونگی کاهش عدم تعادل نشانگرها است.

مربوط به نشانگرهایی با فاصله کمتر از ۵ سانتی مورگان بود که نشان می‌دهد لینکاژ یکی از موثرترین نیروهایی است که باعث عدم تعادل در جمعیت شده است (جدول ۱). با این وجود با افزایش فاصله بین نشانگرها عدم تعادل از بین نمی‌رود این امر بدلیل وجود عوامل موثر دیگر مانند ساختار جمعیت، رانش ژنتیکی، مهاجرت، انتخاب و جهش بر روی عدم تعادل لینکاژی است.

طول نقشه ژنتیکی مورد استفاده برابر ۹۹۰/۱۲ سانتی مورگان با ۳۵۱۴ نشانگر بر روی ۷ گروه پیوسته با میانگین فاصله ۰/۲۸ سانتی مورگان بود (جدول ۱). نشانگرها بر روی گروه‌های پیوستگی به صورت یکنواخت توزیع نشده بودند. کمترین نشانگر بر روی گروه پیوستگی شماره ۱ و بیشترین آن بر روی گروه پیوستگی شماره ۶ قرار داشت. بیشترین عدم تعادل

جدول ۱- توزیع نشانگرها بر روی گروه‌های پیوستگی جو و میانگین شاخص عدم تعادل در فواصل ژنتیکی مختلف در جوهای مورد مطالعه

گروه‌های پیوستگی	تعداد نشانگر	طول نقشه (CM)	میانگین شاخص عدم تعادل لینکاژی (r^2) بین جفت نشانگرها		
			D < 5 CM	D = 5-10 CM	D > 10 CM
1H	۳۹۳	۱۳۳/۱۴	۰/۳۵۴	۰/۱۵۴	۰/۲۰۵
2H	۴۲۶	۱۴۹/۵	۰/۲۳۷	۰/۰۹۶	۰/۱۲۴
3H	۵۵۷	۱۵۵/۰۹	۰/۳۷۴	۰/۱۸۲	۰/۱۶۲
4H	۴۵۸	۱۱۵/۲۳	۰/۲۵۹	۰/۱۰۰	۰/۱۷۳
5H	۴۷۰	۱۶۹/۶۶	۰/۲۷۴	۰/۱۱۷	۰/۱۱۶
6H	۶۴۳	۱۲۶/۶۳	۰/۲۴۹	۰/۱۱۶	۰/۱۴۶
7H	۵۶۷	۱۴۰/۹	۰/۵۰۷	۰/۱۲۵	۰/۱۴۱
مجموع	۳۵۱۴	۹۹۰/۱۲	-	-	-

* و ** به ترتیب سانتی مورگان و فاصله ژنتیکی

قرار داشتند. گروه پیوستگی شماره ۱ تنها گروهی بود که هیچ کیوتی‌الی بر روی آن شناسایی نشد. برای صفت وزن خشک ریشه ۴ کیوتی‌الی بر روی گروه‌های پیوستگی شماره ۳، ۵، ۶، و ۷ مشخص شدند (جدول

با استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی تعداد ۱۵ کیوتی‌الی برای صفات وزن خشک ریشه، حجم ریشه، میانگین قطر ریشه و میانگین تعداد ریشه‌های مویین شناسایی شد که اکثر آنها بر روی گروه‌های پیوستگی شماره ۲، ۳، ۵ و ۶

های موپین از صفاتی هستند که در شرایط بهینه (از لحاظ آب و مواد غذایی) از اهمیت بالایی برخوردار است. در شرایط بهینه، گیاه با افزایش حجم و تعداد ریشه در لایه سطحی خاک بدنبال جذب آب و مواد غذایی است در حالیکه در شرایط تنش طول ریشه و نسبت طول ریشه به اندامهای هوایی اهمیت بیشتری می‌یابد (Kanbar et al., 2009). در آزمایشی که توسط لئون و همکاران (۲۰۱۲) صورت گرفت تعداد ۱۰ کیو.تی.ال برای این دو صفت در گندم گزارش شد. ۵ کیو.تی.ال بر روی گروه‌های پیوستگی شماره ۲، ۳، ۴، ۵ و ۷ تعیین کننده میانگین قطر ریشه بودند. در نقشه-یابی جمعیت گندم بهاره تنها یک کیو.تی.ال برای این صفت گزارش شده است (Leon et al., 2012).

۲) تعدادی از گزارشات نشان می‌دهد وزن خشک ریشه صفت مهمی است که با راندمان مصرف آب ارتباط دارد (Songsri et al., 2009). محمد و همکاران (۲۰۰۱) هفت کیو.تی.ال برای این صفت در جو شناسایی کردند. لی و همکاران (۲۰۰۵) سه کیو.تی.ال با اثرات افزایشی برای این صفت در برنج شناسایی کردند. حجم ریشه به احتمال زیاد با ۴ کیو.تی.ال کنترل می‌شود که ۳ کیو.تی.ال بر روی گروه‌های پیوستگی شماره ۳، ۵ و ۶ قرار دارند و یک کیو.تی.ال با نشانگرهایی که جایگاه ژنومی آنها مشخص نیست ارتباط دارد. همچنین این آزمایش نشان داد میانگین تعداد ریشه‌های موپین با کیو.تی.ال‌هایی بر روی گروه‌های پیوستگی شماره ۲ و ۷ کنترل می‌شوند (شکل ۶). حجم ریشه و تعداد ریشه

جدول ۲- نتایج نقشه‌یابی ارتباطی و کیو.تی.ال‌های شناسایی شده برای صفات ریشه جو

صفت	نشانگر	گروه پیوستگی	مکان (CM)	-Log (P)	شاخص عدم تعادل (R ²)
وزن خشک ریشه	SNP_1337	3H	۱۴۵/۳۳	۳/۱۶	۰/۴۴۳
	SNP_2277	5H	۱۶۳/۶۸	۳/۲	۰/۴۵۵
	SNP_2889	6H	۱۱۳/۲۴	۳/۱۷	۰/۵۴۸
	SNP_3390	7H	۹۸/۱۶	۳/۱۱	۰/۵۸۲
حجم ریشه	SNP_836	3H	۷/۰۱	۳/۱۳	۰/۶۰۶
	SNP_2300	5H	۱۶۸/۰۹	۳/۲۱	۰/۵۵۶
	SNP_2860	6H	۱۱۰/۸۵	۳/۰۱	۰/۳۹۲
	SNP_3941	Unmapped	-	۳/۱۹	۰/۵۶۰
میانگین قطر ریشه	SNP_606	2H	۷۰/۸۲	۳/۰۲	۰/۶۰۷
	SNP_1272	3H	۱۱۵/۹۳	۳/۰۴	۰/۶۰۹
	SNP_1736	4H	۷۸/۶۸	۳/۲۵	۰/۶۳۴
	SNP_2105	5H	۱۲۰/۲۱	۳/۱۲	۰/۶۰۶
	SNP_2976	7H	۱۱/۰۵	۳/۱۸	۰/۶۹۸
میانگین تعداد ریشه‌های موپین	SNP_498	2H	۳۸/۲	۳/۲	۰/۵۳۹
	SNP_2981	7H	۱۲/۷۵	۳/۴۳	۰/۷۲۷

* سانتی‌مورگان

است. مقایسه کیو.تی.ال‌های شناسایی شده در این آزمایش با کیو.تی.ال‌هایی که در مطالعات قبلی شناسایی شده نشان داد کیو.تی.ال مربوط به میانگین تعداد ریشه‌های موپین بر روی گروه پیوستگی شماره ۲ با کیو.تی.ال QYld.BIKy-2H.1 مربوط به عملکرد (Bezant et al., 1997) هم‌مکان بود که نشان‌دهنده اثرات پلیوتروپی این کیو.تی.ال بر روی صفات عملکرد و تعداد ریشه‌های موپین می‌باشد. دو کیو.تی.ال بزرگ‌اثر QLg.HaTR-2H و QHt.HaMo-2H.2 به ترتیب مربوط به ورس و ارتفاع در فاصله ۶۷/۲۲ تا ۸۶/۸۷ سانتی‌مورگان (Tinker et al. 1995; Marquez et al., 2001) با SNP_606 مربوط به میانگین قطر ریشه هم‌مکان بود. برای جلوگیری از ورس وجود گیاهانی

کیو.تی.ال‌های مرتبط با وزن خشک ریشه و حجم ریشه بر روی گروه‌های پیوستگی ۵ و ۶ با فاصله کمتر از ۵ سانتی‌مورگان از یکدیگر قرار گرفته‌اند و به احتمال زیاد با یکدیگر تفرق می‌یابند. در بررسی انجام شده توسط (Nahief et al., 2008) نشان داده شد که دو صفت فوق دارای ضریب همبستگی فنوتیپی ۰/۸۲ بوده و در سطح یک درصد معنی دار است. همچنین Zhou et al. (2011) گزارش کردند که حجم ریشه و وزن ریشه در سویا دارای ضریب همبستگی فنوتیپی ۰/۹۶ می‌باشند. کیو.تی.ال‌های مربوط به میانگین قطر ریشه و میانگین تعداد ریشه‌های موپین بر روی گروه پیوستگی شماره ۷ با فاصله ۱/۷ سانتی‌مورگان از یکدیگر قرار دارند که نشان دهنده تفرق همزمان این دو جایگاه ژنومی

وجود افزایش بیش از اندازه این دو صفت باعث اتلاف انرژی و در نتیجه کاهش عملکرد خواهد شد.

هورمون‌های گیاهی در پرشدن دانه و نمو بذر نقش قابل توجهی ایفا می‌کنند. هورمون‌های سیتوکینین و آبسزیک اسید به طور عمده در ریشه گیاه تولید می‌شود و به اندام‌های هوایی منتقل می‌شوند. مطالعاتی بر روی گندم و برنج وجود دارد که نشان می‌دهد افزایش سرعت پر شدن دانه با افزایش اسید آبسزیک در ریشه همبستگی دارد و هنگام پر شدن دانه بین میزان سیتوکینین و اسید آبسزیک ریشه با دانه همبستگی خطی و معنی داری وجود دارد (Zhang et al., 2012).

مویین

ساختار درونی ریشه‌های مویین مانند شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری، دستگاه گلژی، واکوئل، ریبوزوم و پلاسما آ.ت.پ. آ.ز نقش مهمی در عملکرد ریشه ایفا می‌کنند. رگه‌های برنج با قدرت پنجه‌زنی زیاد در مقایسه با رگه‌هایی با پنجه‌دهی ضعیف تعداد بیشتری واکوئل و گلژی در ریشه‌های مویین دارند. بررسی‌های اولیه در برنج نشان می‌دهد تعداد میتوکندری، گلژی و آمیلوپلاست ریشه‌های مویین با صفاتی مانند زیست‌توده ریشه، بیوماس اندام‌های هوایی و فعالیت اکسیدازی ریشه رابطه معنی داری دارد همچنین تعداد این اندامک‌ها با تعداد پنجه، تعداد سنبلیچه و تعداد سلول‌های آندوسپرم بذر همبستگی معنی‌داری دارند (Yang, 2011). اگر چه این نتایج نشان می‌دهد صفات مرتبط با ریشه تا حد زیادی در افزایش عملکرد موثر است اما برای بررسی مکانیسم‌های اثر متقابل ریشه-اندام‌های هوایی، ریشه-خاک و همچنین بررسی مسیر هورمون‌های ریشه و نقش آنها در رشد، نمو و افزایش عملکرد مطالعات زیادی مورد نیاز است.

در این تحقیق تعداد ۱۵ کیو.تی.ال با میزان احتمال بالا ($-\text{LogP} \geq 3$) برای صفات مورد بررسی شناسایی شد و نتایج مقایسه‌ای نشان داد که صفات مرتبط با ریشه به طور قابل ملاحظه‌ای با صفات زراعی گیاهان در ارتباط است با این وجود به دلیل اینکه مطالعات چندانی بر روی مکان‌یابی کیو.تی.ال‌های صفات ریشه جو صورت نگرفته است لذا استفاده از این نشانگرها در برنامه‌های بهنژادی نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. با توجه به

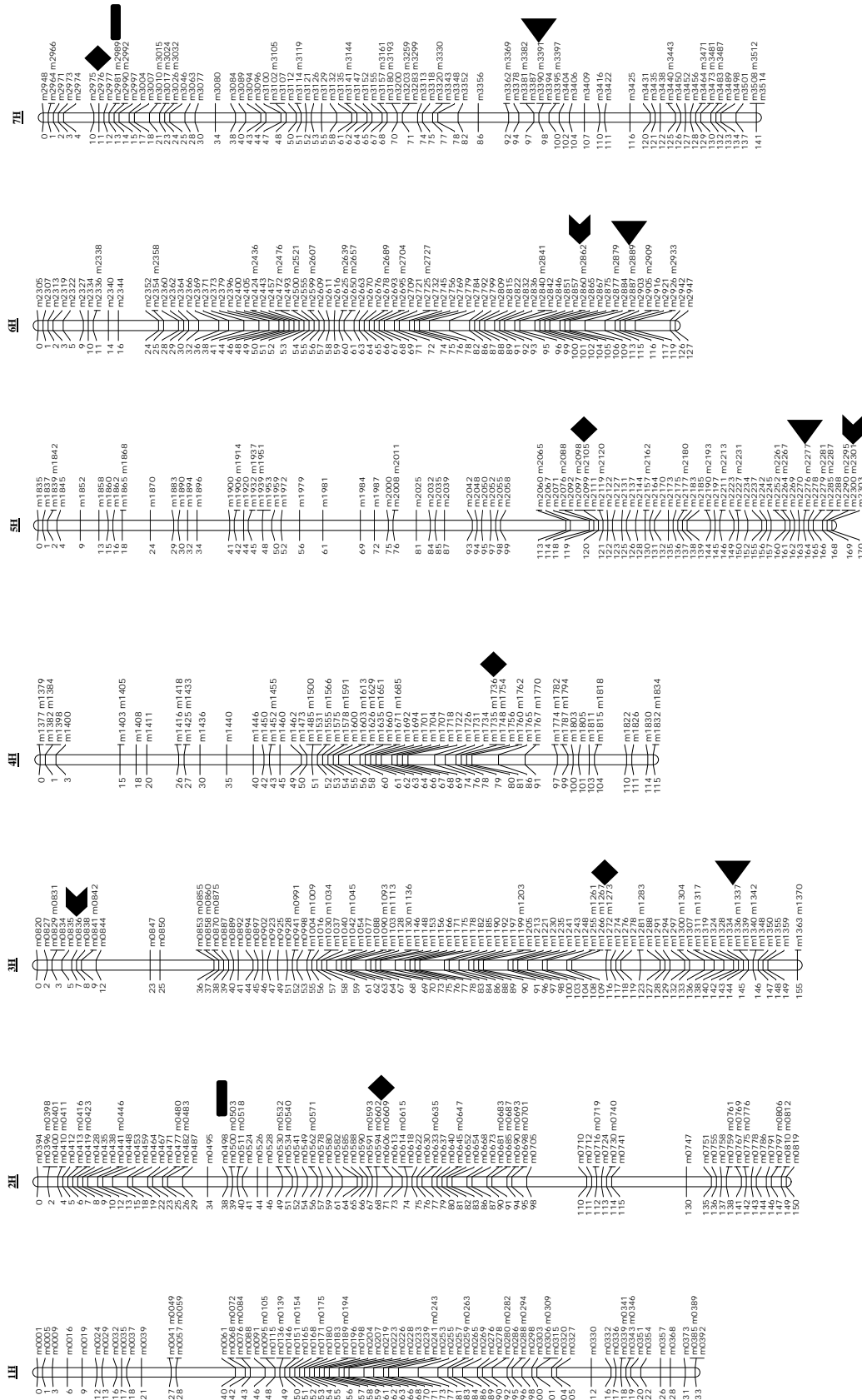
پاکوتاه، با ریشه‌های ضخیم، قوی و گسترش یافته که بتوانند حجم زیادی از خاک را در برگیرند ضروری است (Croock et al., 1994). دو کیو.تی.ال بزرگ‌اثر QKps.BIKy-3H و QHd.DiMo-3H مربوط به تعداد دانه در سنبله و تعداد روز تا گلدهی (Bezant et al., 1997; Pan et al., 1994) بر روی گروه پیوستگی شماره ۳ با دو کیو.تی.ال مربوط به وزن خشک ریشه و میانگین قطر ریشه هم‌مکان بودند. این نتایج نشان می‌دهد صفات ریشه رابطه تنگاتنگی با عملکرد و صفات زراعی دارد.

بدلیل اینکه آب و منابع غذایی در خاک به صورت ناهمگن پخش شده است لذا تولید و عملکرد گیاه تا حد زیادی به شکل فضایی ریشه و صفات مرتبط با آن بستگی دارد. در طول اهلی شدن گیاهان سیستم ریشه تغییر چشمگیری پیدا کرده است و این تغییرات به سمتی بوده است که ریشه گیاه بتواند مساحت بیشتری از خاک را اشغال کند. مسلماً سیستم ریشه گیاهان مانند دیگر صفات تحت تاثیر ژن‌ها می‌باشد لذا جستجو برای یافتن کیو.تی.ال‌های مرتبط با صفات ریشه می‌تواند تا حد زیادی ما را در اصلاح صفات ریشه کمک کند. تعدادی از گزارشات نشان‌دهنده هم مکانی کیو.تی.ال‌های ریشه با کیو.تی.ال‌های عملکرد می‌باشد که این امر حاکی از نقش احتمالی صفات ریشه در تعیین عملکرد نهایی گیاه می‌باشد (Steele et al., 2007). زیست‌توده^۱ و فعالیت اکسیدازی ریشه مهمترین صفاتی هستند که با عملکرد در گیاه ارتباط دارند زیرا زیست‌توده ریشه ارتباط تنگاتنگی با جذب آب، مواد غذایی و میزان زیست‌توده اندام‌های هوایی دارد از طرفی فعالیت اکسیدازی ریشه برای نگهداری ریشه، رشد و نمو اندام‌های هوایی و جذب یون‌ها ضروری است. مدل‌های ریاضی نشان می‌دهد که زیست‌توده ریشه و عملکرد دانه در برنج به صورت معادله درجه دوم و فعالیت اکسیدازی ریشه با نرخ پر شدن دانه به صورت معادله هذلولی با یکدیگر ارتباط دارند (Liu et al., 2002). چنین مطالعاتی نشان می‌دهد که زیست‌توده ریشه و فعالیت اکسیدازی بیشتر منجر به عملکرد بیشتر برنج خواهد شد با این

برنامه‌های بهنژادی انتخاب به کمک نشانگر مورد استفاده قرار گیرد.

لگاریتم احتمال مربوط به SNP_2981، (۳/۴۳) این نشانگر می‌تواند با تحقیقات تکمیلی و دقیق‌تر در

شکل ۶- نقشه ژنتیکی نشانگرهای اس.ان.پی و جایگاه ژنومی نشانگرهای مرتبط با صفات ریشه جو.



◆ نشانگرهای مرتبط با میانگین قطر ریشه

◆ نشانگرهای مرتبط با وزن خشک ریشه

◆ نشانگرهای مرتبط با حجم ریشه

◆ نشانگرهای مرتبط با میانگین تعداد ریشه‌های موبین

سپاسگزاری

از دولت جمهوری اسلامی ایران و وزارت علوم، تحقیقات و فناوری بدلیل فراهم نمودن امکان استفاده اینجانب از فرصت تحقیقاتی و آقای دکتر لویجی کاتیولی و خانم

دکتر لائورا روزینی به ترتیب از موسسه تحقیقات ژنومیکس ایتالیا و دانشگاه میلان بدلیل همکاری‌های صادقانه تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Barrett, J. C. Fry, B. Maller, J. Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 29, 263-265.
2. Bezant, J. Laurie, D. Pratchett, N. Chojecki, J. Kearsey, M. (1997). Mapping QTLs controlling yield and yield components in a spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross using marker regression. *Mol Breed*, (3), 29-38.
3. Bradbury, P. J. Zhang, Z. Kroon, D. E. Casstevens, T. M. Ramdoss, Y. Buckler, E. S. (2007). TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23, 2633-2635.
4. Burke, J. M. Mandel, J. R. Nambeesan, S. Bowers, J. E. Marek, L. F. Ebert, D. Rieseberg, L. H. Knapp, S.J. (2013). Association Mapping and the Genomic Consequences of Selection in Sunflower. *PLoS Genet*, 9(3), e1003378. doi:10.1371/journal.pgen.1003378.
5. Cattivelli, L. Rizza, F. Badeck, F. W. Mazzucotelli, E. Mastrangelo, A.M. Francia, E. Mare, C. Tondelli, A. Santaca, A.M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res.* 105, 1-14.
6. Chen, S. C. Li, S. C, Wang, S. Q. Liu, H.N Deng, Q.M. Zheng, A.P. Zhu, J. Wang L.X. Li, P. (2011). Assessment of the Genetic Diversity and Genetic Structure of Rice Core Parent Guichao 2, its Parents and Derivatives. *Journal of Plant Sciences*, 6, 66-76.
7. Chloupek, O. Forster, B. P. Thomas, W. T. B. (2006). The effect of semi-dwarf genes on root system size in field-grown barley. *Theor Appl Genet.* 112, 779-786.
8. Communications & Information Technology center of Ministry of Agriculture. (2011). *Agriculture Statistics*, Ministry of agriculture, 1, 1-121. (In Farsi)
9. Crook, M. J. Ennos, A. R. (1994). Stem and root characteristics associated with lodging resistance in four winter wheat cultivars. *The Journal of Agricultural Science*, 123, 167-174.
10. Deshmukh, V. V.(2012). *Genome-wide association mapping of drought resistance traits in rice (Oryza sativa L.)*. MSc Biotechnology thesis, Tamil Nadu Agricultural University, India.
11. Ellis, R. P. Forster, B. P. Gordon, D. C. Handley, L.L. Keith, R.P. Lawrence, P. Meyer, R. Powell, W. Robinson, D. Scrimgeour, C. M. Young, G. Thomas, W. T. B. (2002). Wild Phenotype/genotype associations for yield and salt tolerance in a barley mapping population segregating for two dwarfing genes. *Journal of Exp. Botany*, 53(371), 1163 – 1176.
12. Evanno, G. Regnaut, S. Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
13. Gregory, P. J. (1994) Root growth and activity. In: Boote KJ, Bennett JM, Sinclair TR, Paulsen GM (eds) *Physiology and determination of crop yield. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI*, 65-93.
14. Gupta, P.K. Rustgi, S. Kulwal, P.L. (2005). Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*, 57, 461-485.
15. Hammer, Ø. Harper, D.A.T. Paul D. R. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 4- 9.
16. Hoad, S. P. Russell, G. Lucas, M. E. Bingham, I. J. (2001). The management of wheat, barley, and oat root systems. *Adv Agron*, 74, 193-246.
17. Holland, J.B. (2007). Genetic architecture of complex traits in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 156-161.
18. Jacoby, W. G. (2000). A nonparametric, graphical tool for depicting relationships between variables. *Electoral Studies* 19, 577-613.
19. Kanbar, A. Toorchi, M. Shashidhar, H.E. (2009). Relationship between root and yield morphological character in rainfed low land rice (*Oryza sativa* L.). *Cereal Research Communications*, 37, 261-268.
20. Kilian B, Özkan H, Pozzi C, Salamini F. (2009). Domestication of the Triticeae in the Fertile Crescent. *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Volume 7. New York; pp. 81-119.
21. Léon, J. Ibrahim, S. E. Schubert, A. Pillen, K. (2012). QTL analysis of drought tolerance for seedling root morphological traits in an advanced backcross population of spring wheat. *International Journal of AgriScience*. 2(7), 619-629.

22. 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. *Theor Appl Genet*, 110, 1244-1252.
23. Liu, T. J. Qi, C. H. Tang, J. J. (2002). Studies on relationship between the character parameters of root and yield formation in rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 35, 1416-1419.
24. Manschadi, A. M. Christopher, J. deVoil, P. Hammer, G.L. (2006). The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. *Funct Plant Biol* 33:823-837.
25. Manske, G. G. B. Vlek, P. L. G. (2002). Root architecture wheat as a model plant. *Plant roots: the hidden half*. Marcel Dekker, New York, USA, pp 249-259.
26. Marquez-Cedillo, L. A. Hayes, P. M. Kleinhofs, A. Legge, W.G. Rosnagel, B.G. Sato, K. Ullrich, S.E. Wesenberg, D. M. (2001). QTL analysis of agronomic traits in barley based on the doubled haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. *Theor Appl Genet* 103, 625-637.
27. 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.
28. Moose, S. P. Mumm, R.H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol* 147:969-977.
29. Naheif E. M. M., (2008). *Association mapping for drought stress related traits in a structured population with wild and cultivated barley*. Ph.D. dissertation, Bonn University, Germany.
30. Pan, A. Hayes, P.M. Chen, F. Chen, T. H. H. Blake, T. Wright, S. Karsai, I. Bedo, Z. (1994). Genetic analysis of the components of winter hardiness in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Theor Appl Genet*, 89, 900-910.
31. Ramsay, L. Comadran, J. Druka, A. Marshall, D. F. Thomas, W. T. B. Macaulay, M. MacKenzie, K. Simpson, C. Fuller, J. Bonar, N. (2011). INTERMEDIUM-C, a modifier of lateral spikelet fertility in barley, is an ortholog of the maize domestication gene TEOSINTE BRANCHED 1. *Nat Genet*, 43(2), 169-172.
32. Reich, D. E. Cargill, M. Bolk, S. Ireland, J. Sabeti, P. C. Richter, D. J. Lavery, T. Kouyoumjian, R. Farhadian, S. Ward, R. Lander, E.S. (2001). Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*, 411(6834), 199-204.
33. Songsri, P. Jogloy, S. Holbrook, C. C. Kesmala, T. Vorasoot, N. Akkasaeng, C. Patanothai, A. (2009). Association of root, specific leaf area and SPAD chlorophyll meter reading to water use efficiency of peanut under different available soil water. *Agric Water Manage*, 96, 790-798.
34. Sreenivasulu, N. Graner, A. Wobus, U. (2008). Barley Genomics: An Overview, *Inter J Plant Genomics*, Article ID 486258, doi:10.1155/2008/486258.
35. Steele, K. A. Virk, D. S. Kumar, R. Prasad, S.C. Witcombe, J.R. (2007). Field evaluation of upland rice lines selected for QTLs controlling root traits. *Field Crops Res*, 101, 180-186.
36. Tinker, N. A. Mather, D. E. Rosnagel, B. G. Kasha, K. J. Kleinhofs, A. (1996). Regions of the genome that affect agronomic performance in two-row barley. *Crop Sci*. 36, 1053-1062.
37. Van Eeuwijk, F. Kraakman, A.T.W. Niks, R. E. Van den Berg, P.M.M.M. Stam, P. (2004). Linkage Disequilibrium Mapping of Yield and Yield Stability in Modern Spring Barley Cultivars. *Genetics*, 168, 435-446.
38. Yang, J. C. (2011). Relationships of rice root morphology and physiology with the formation of grain yield and quality and the nutrient absorption and utilization. *Scientia Agricultura Sinica*, 44, 36-46.
39. Zhang, H. Li, H.W. Yuan, L.N. Wang, Z. O. Yang, J. C. Zhang, J. H. (2012). Post-anthesis alternate wetting and moderate soil drying enhances activities of key enzymes in sucrose-to-starch conversion in inferior spikelets of rice. *Journal of Experimental Botany*. 63, 215-27.
40. Zhang, L. Y. Marchand, S. Tinker, N. A. Belzile, F. (2009). Population structure and linkage disequilibrium in barley assessed by DArT markers. *Theor Appl Genet*, 119(1), 43-52.
41. Zhou, X.A. Zhou, R. Hai-Feng, C. Xian-Zhi, W. Bao-Duo, W. Shui-Lian, C. Xiao-Juan, Z. Xue-Jun, W. Zhong-Lu, Y. De-Zhen, Q. Mu-Lan, J. (2011). Analysis of QTLs for Root Traits at Seedling Stage in Soybean. *Acta Agron Sin*, 37(7), 1151-1158.