شناسایی QTLهای مقاومت به سفیدک پودری جو با استفاده از خانواده‌های F_3 حاصل از تلاقی ارقام جو بادیا و کویر

سمیرا بختیاری بستاکی[۱]، حسین صبوری[۲*]، مهدی ملاشاهی[۳] و حسین حسینی مقدم[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۵)

چکیده

جو پس از ذرت، گندم و برنج یکی از مهمترین غلات جهان است. سفیدک‌های پودری از قارچ‌های انگل‌های اجباری مهم گیاهان هستند، که با به وجود آوردن پوشش سفید رنگ که شامل اندام‌های رویشی قارچ می‌باشد بر روی قسمت‌های هوایی آن‌ها باعث زردی، خشکی و کاهش کمی و کیفی محصول گیاهان زراعی، درختان میوه، جالیز و زینتی می‌شوند. به منظور مکان‌یابی QTLهای مرتبط با مقاومت به سفیدک پودری در نسل F_3 حاصل از تلاقی ارقام جو بادیا و کویر، جمعیتی شامل ۱۰٤ خانواده در قالب طرح آماری اگمنت در سال زراعی ۹٦ – ۹۵ در دانشگاه گنبد کاووس کشت شدند. برای تهیه نقشه ژنتیکی از ۲۸ نشانگر SSR و ۹ نشانگر ISSR ، ۳ نشانگر IRAP و ۵ نشانگر iPBS (در مجموع ۹۳ آلل) استفاده شد که به ۷ گروه پیوستگی در جو منتسب شدند. در نقشه پیوستگی سانتی‌مورگان برابر با ٦۱۷/۵ و میانگین فاصله بین دو نشانگرهای مجاور برابر با ۵/٤۱ سانتی‌مورگان شد. چهار QTL، روی گروه‌های پیوستگی کروموزوم‌های شماره ۳ ،٤ و ٦ برای مقاومت به سفیدک پودری ردیابی شد. نتایج این مطالعه منجر به ردیابی QTL جدیدی برای صفت مورد نظر شد. qSPM-4b، بین دو نشانگر ISSR13-1 و ISSR16-4 با LOD=۳/۲٦ ، ۱۳/٦ درصد تغییرات صفت را با اثر افزایشی مثبت ۰/۱۲ کنترل نمود. QTLهای ردیابی‌شده در این تحقیق، می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی برای ایجاد افزایش منابع مقاومت به این بیماری و افزایش عملکرد ارقام جدید تولید شده مورد استفاده قرار گیرند. از نتایج بررسی حاضر می‌توان پس از تعیین اعتبار نشانگرهای ردیابی‌شده، در برنامه‌های به‌نژادی همراه با ارزیابی‌های مزرعه‌ای استفاده نمود.

کلیدواژه: QTL، جو، سفیدک پودری، مقاومت، شناسایی.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hos.sabouri@gmail.com

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گنبد کاووس، ایران.

۲. دانشیار گروه تولیدات گیاهی دانشگاه گنبد کاووس، ایران.

۳. استادیاران گروه تولیدات گیاهی دانشگاه گنبد کاووس، ایران.

Identification of the QTLs of resistance to barley powdery mildew using F_3 families derived from the cross Badia and Kavir barley cultivars

S. Bakhtiari[1], H. Sabouri[2*], M. Mollashahi[3], and H. Hosseini Moghaddam[3]

(Received: 4.4.2018; Accepted: 25.4.2019)

Abstract

Barley is one of the most important cereals in the world after corn, wheat and rice. Powdery mildew is one of the important fungal parasites of the plants which cover their above ground parts with the formation of a white fungal vegetative organs causing yellowing, drying and reducing the quantitative and qualitative traits of the field crops, fruit trees and ornamental plants. In order to locating the powdery mildew resistance QTLs in the F_3 generation derived from the cross Badia and Kavir cultivars, a population consisted of 104 families was cultivated in 2017 at Gonbad-e-Kavos University. To provide a genetic map, several groups of markers including of 28 SSR, 9 ISSR, 3 IRAP and 5 iPBS (93 alleles) that were related to barley chromosomes used. Genetic maps were covered 617.5 cM and the mean gap between flanking markers was 5.41 cM. Four QTLs were detected on chromosomes 3, 4 and 6 to powdery mildew resistance. The results of this study led to a new QTL trace for the desired trait. The QTL qSPM-4b with LOD=3.26 that was between the two ISSR13-1 and ISSR16-4 markers, controlled 13/.6 of the phenotypic variations of the respective attribute with an incremental decrease of 0.12. The QTLs detected could be used in breeding programs to increase the resistant sources against the disease and to increase the yield of the new produced cultivars. The results of the current research can be used in breeding programs after determining the validity of markers.

Keywords: QTL, Barley, Powdery Mildew, Resistance Identification

*Corresponding author's E-mail: hos.sabouri@gmail.com
1. MSc in Agricultural Biotechnology, Gonbad Kavous University, Iran.
2. Assoc. Professor, Department of Plant Production, Gonbad Kavous University, Iran.
3. Assist. Professor, Department of Plant Production, Gonbad Kavous University, Iran.

مقدمه

جو زراعی با نام علمی *Hordeum vulgare L.* emend. Bowden متعلق به خانواده گندمیان (*Gramineae*) است (Von Bothmer *et al.*, 1995). جو از مهم‌ترین غلات جهان می‌باشد که کشت آن سابقه هزاران ساله دارد (Majnon-Hosseini,1997). عملکرد کمی و کیفی آن ممکن است تحت تاثیر تنش‌های زنده و غیر زنده کاهش یابد. یکی از این تنش‌های زنده بیماری قارچی مولد سفیدک پودری است که در صورت گسترش و شدت بیماری تاثیر زیادی روی عملکرد کیفی و کمی‌جو دارد. سفیدک پودری جو[1] از ابر سلسله یوکاریوت‌ها، سلسله قارچ‌ها، شاخه آسکومیستا، رده آسکومیست‌های رشته‌ای، راسته Erysiphales و جنس *Blumeria graminis* می‌باشد (Czembor, 2000). این قارچ بیوتروف اجباری است و توسط عواملی از قبیل باد، حشرات و پرندگان پراکنده می‌شود. بیماری سفیدک پودری یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های برگی جو است و به ویژه در آب و هوای سرد و نواحی مرطوب و معتدل شایع می‌باشد. خسارت ناشی از این بیماری در شمال آمریکا و شمال و مرکز اروپا تا حدود ۳۰٪ تخمین زده می‌شود که بیشترین خسارت بیماری مربوط به اروپا می‌باشد (Czembor, 2000). میزان خسارت این بیماری در کل اروپا سالیانه یک میلیارد مارک برآورد شده است (Limpert, 1987). وارد (Ward, 1953, 1957) اولین کسی بود که بررسی مقاومت جوهای موجود در کلکسیون جهانی جو آمریکا را نسبت به بیماری فوق آغاز کرد. در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۲۶ این بیماری توسط اسفندیاری گزارش شد و در تمام مناطق کشور کم و بیش شیوع دارد (Behdad, 1990). در ایران نیز این بیماری در صورت مساعد بودن شرایط آب و هوایی از جمله بیماری‌های مهم و موثر در کاهش تولید این محصول به شمار می‌رود (Behdad, 2006). این بیماری دارای اهمیت اقتصادی زیادی است، زیرا علاوه بر کاهش عملکرد، سبب کاهش کیفیت دانه برداشت شده نیز می‌شود (Zhang *et al.*, 2005). مقاومت به بیماری سفیدک پودری جو ممکن است از نوع مقاومت عمودی (کیفی) که اصطلاحا اختصاصی نژاد اطلاق می‌شود و یا از نوع افقی (کمی) که اصطلاحا غیراختصاصی نژاد گفته می‌شود وجود داشته باشد (Terojilo *et al.*, 2004). بیشتر مقاومت‌های بکار گرفته شده در ارقام تجاری جو از نوع اختصاصی نژاد می‌باشند که معمولا دارای عمر کوتاه بوده و با بروز پرآزاری‌های (Virulences) جدید و مخرب شکسته می‌شوند. پژوهش‌ها نشان می‌دهند حداکثر کاهش محصول در اثر بیماری سفیدک پودری در جو هنگامی‌است که بوته‌ها در مرحله گیاهچه‌ای آلوده شوند و گسترش بیماری تا گلدهی ادامه داشته باشد (Emami and Hasanzadeh, 1994). ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به سفیدک پودری جو عمدتا بر روی کروموزوم‌های دو و هفت می‌باشند (Naghavi *et al.*, 2001). ژن‌های ممانعت کننده‌ای نیز وجود دارند که باعث تغییر در تظاهر فنوتیپ مقاومت می‌شوند (Naghavi *et al.*, 2001). تعداد زیادی از ژن‌های مقاومت به سفیدک پودری در ارقام و ژرم‌پلاسم‌های جو شناسایی شده‌اند، ولی بیشتر آن‌ها با ظهور نژادهای جدید و پرآزار شکسته شده‌اند (Fazeli *et al.*, 2008). کنترل بیماری در شرایطی که سطح مقاومت در ارقام پائین باشد و یا مقاومت شکسته شده باشد و لذا ارقام کاشت شده حساس و یا نیمه‌حساس باشند و از طرفی شرایط جوی و

[1] *Blumeria graminis* DC.ex Merat f.sp. *hordei* Er. Marshal (syn. *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) (BGH)

محیطی نیز برای توسعه بیماری فراهم باشد به طور معمول با استفاده از قارچ‌کش‌ها انجام می‌گیرد (Gullino and Kuijpers, 1994). هونکر از سال ۱۹۳۰ آغازگر استفاده از ژن‌های مقاومت اختصاصی (specific resistance genes) برای کنترل بیماری سفیدک پودری در اروپا بود (Spencer, 1978). با تجزیه QTL جو برای سفیدک پودری مشخص کردند که تعدادی از ژن‌های مقاومت به سفیدک پودری بر روی کروموزم شماره ۷ قرار دارند (Tinker and Mather, 1994). در ایران بین سال‌های ۷۶-۱۳۷۴ از مناطق مختلف کشور (زنجان، اصفهان، مغان، گرگان، تهران، ساری، ارومیه، ورامین، طالقان و دماوند) تعداد ۲۹ نمونه از سفیدک پودری جو جمع‌آوری و از نظر بیماری‌زایی روی ارقام استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده نشان داد که برای ژن‌های مقاوم Mla7+Mlk، Mla7، Mla6، Mla12، Mla3، Mlg+Ml(cp)، Mlh، Mlav، Mla8، Mlo و Mla9 در کشور فاکتور بیماری‌زایی وجود دارد (Pourmansouri, 1988).

برای انتقال کارآمد ژن‌ها، مارکرهای مولکولی می‌توانند کمک بزرگی به شمار آیند مخصوصا وقتی انتقال چندین ژن مقاومت به یک رقم مد نظر باشد (Cenci et al., 1999). از آنجایی که معمولا اثر ژن‌های کمی کوچک است، شناسایی و تعیین دقیق تعداد و محل قرارگیری آنها در ژنوم مشکل بوده و از اصطلاح[2] QTL (مکان ژنی صفت کمی) برای آنها استفاده می‌شود (Naghavi *et al.*, 2009). در واقع QTL به قسمتی از ژنوم گفته می‌شود که روی صفت کمی‌تاثیر می‌گذارد و معمولا شامل تعداد زیادی ژن یا مکان‌های ژنی می‌باشد که همه یا بعضی و یا گاهی حتی یکی از آنها به صفت کمی مربوط می‌شوند. آگاهی از تعداد ژن‌های کنترل‌کننده، جایگاه کروموزومی آنها و سهم نسبی هر یک از ژن‌ها در تظاهر و توزیع فنوتیپی می‌تواند در کارهای به‌نژادی آتی مورد استفاده قرار گیرد. روش‌های تجزیه QTL با شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات می‌تواند به فهم کنترل ژنتیکی آنها و توسعه برنامه‌های گزینش مواد به کمک نشانگر کمک نماید (Joliuo *et al.*, 2006). پاتیور و همکاران (Patiuor *et al.*, 1998) در تحقیقی از بین ۲۷ لاین و رقم مورد بررسی در مرحله گیاه کامل و گیاهچه‌ای، یازده لاین حساس، دو لاین نیمه حساس، سه لاین یا رقم نیمه مقاوم و هشت رقم مقاوم گزارش کردند که سه لاین نیز واکنش‌های متفاوتی در مراحل گیاهچه‌ای و گیاه کامل از خود بروز دادند.

خدایی و همکاران (khodaee *et al.*, 2010)، در ارزیابی تعداد ۲۴ رقم تجاری و لاین امیدبخش به پاتوتیپ برتر بیماری سفیدک پودری در مازندران، رقم شانگرهای با بیشترین میزان آلودگی، حساس‌ترین و لاین SHA7.MILAN با کمترین میزان آلودگی مقاوم‌ترین نسبت به بیماری گزارش شده است.

یوسفی راد و همکاران (Yousefi rad *et al.*, 2010)، در مکان‌یابی ژن‌های مقاومت به بیماری سفیدک پودری در جو با استفاده از لاین‌های خالص نوترکیب، تعداد ۱۶۲ جمعیت لاین‌های خالص نوترکیب (RIL) نسل F6 حاصل از تلاقی دو رقم ایگری و آریگاشار به عنوان والدین با دو تکرار در قالب طرح لاتیس مربع ساده کشت شدند. در آزمایشات ۱۱ جفت ترکیب آغازگر AFLR و ۴۰ جفت آغازگر SSR استفاده شد. ۵ کروموزوم از کروموزم‌های جو شناسایی شدند و ۴ گروه پیوستگی را تشکیل دادند که ۴۲ نشانگر AFLP و ۵ نشانگر SSR بر روی کروموزوم‌های

[2] Quantitative Tratis Loci

۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ ، ۲۷ نشانگر باقیمانده AFLP در ۴ گروه پیوستگی قرار گرفتند. مجموعا ۲ QTL برای صفت مقاومت به بیماری سفیدک پودری از جمعیت لاین‌های خالص نوترکیب بدست آمد که برروی گروه‌های پیوستگی ۱ و ۴ بیشترین درصد تغییرات فنوتیپی را نسبت به بیماری در جمعیت توجیه نمودند.

اگر چه تا کنون مطالعاتی در مورد مقاومت بیماری سفیدک پودری جو در شرایط مزرعه و گلخانه مطالعه شده است، اما نظر به اهمیت جو و همچنین بیماری سفیدک پودری، در این مطالعه هدف بررسی شناسایی نحوه توارث و تعیین ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت در جمعیت حاصل از تلاقی ارقام بادیا و کویر بود.

مواد و روش

مواد گیاهی و محل اجرای آزمایش

برای تعیین وراثت مقاومت ژنتیکی جو به بیماری سفیدک پودری، تلاقی مذکور در سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کشور انجام شد و نسل‌های در حال تفرق آن در دانشگاه گنبدکاووس تهیه شد. ۱۰۴ خانواده F_3 حاصل از تلاقی ارقام جو بادیا و کویر (Taghizadeh *et al.*, 2016) در استان گلستان، شهرستان گنبد به صورت مزرعه‌ای و در قالب طرح آماری اگمنت در بهمن سال ۹۵- ۱۳۹۶ کشت شد. هر خانواده با خطوط یک‌متری با فاصله بین ردیف ۲۰ سانتی‌متری کشت گردید. یادداشت‌برداری از تیپ آلودگی و شدت آلودگی با استفاده از روش وانگ (Wang, 1993) انجام شد. بدین ترتیب عکس العمل خانواده‌های جو نسبت به بیماری سفیدک پودری در مزرعه در ۷ مرحله تعیین شد. یاداشت‌برداری از مرحله پنجه زنی، گیاهچه شدن، تورم سنبله، سبز شدن

شکل۱- علائم بیماری سفیدک پودری جو روی برگ‌های جو

Figure 1. Appearance of symptoms on the leaves

کامل ارقام جو و خمیری شدن دانه با در نظر گرفتن ۲۰ نمونه از برگ پرچم و نزدیک‌ترین برگ به سنبله هر خانواده به صورت تصادفی انجام شد. در نهایت میانگین یادداشت‌برداری در مقابل بیماری مدنظر قرار گرفت. در این پژوهش از ۵ کد برای مشخص کردن درصد آلودگی بیماری استفاده شد.

۰- مصون (مقاوم): بدون هیچگونه آلودگی.

۱- نیمه مقاوم: اسپورزایی ملایم، که بین ۱۰-۲۰ درصد سطح برگ پرچم آلوده شده و نکروز در اطراف لکه‌ها دیده می‌شود.

۲- نیمه حساس: اسپورزایی متوسط، ۲۰-۴۰ درصد سطح برگ پرچم پوشیده شده و نکروز مشاهده نمی‌شود.

۳- حساس: اسپورزایی بین ۴۰-۶۰ درصد سطح برگ پرچم پوشیده شده و علایم نکروز وجود ندارد.

۴- بسیار حساس: اسپورزایی شدید، و بیش از ۶۰ درصد سطح برگ پرچم پوشیده شده و علائم نکروز وجود ندارد.

از میانگین هر کد جهت محاسبات نقشه‌یابی ژنتیکی استفاده شد. طی برنامه‌ریزی انجام شده یادداشت‌برداری از شروع علایم اولیه بیماری تا زمان برداشت این محصول،

جدول ۱- مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در نشانگر ISSR

Table 1. Materials for amplification of ISSR marker using PCR

Components	Concentration	Amount (µl)
Buffer PCR10X	1X	1
MgCl2	50 mM	0.48
dNTP	10 µl	0.6
Taq DNA Polymerase Enzyme		0.12
Primer	60 ng	1.5 µl
DNA diluted	0.75-0.5 ng	2.5 µl
H2O		3.8 µl
the Final content		10 µl

جدول ۲- برنامه حرارتی تاچ داون برای تکثیر جایگاه‌های ISSR

Table 2. Touchdown Thermal Program for amplification of the ISSR Markers

Number of cycles	Time (minute) &(second)	Temperature (C°)	Step
1	5'	95	Primary denaturing
10	45"	95	Denaturing
	45"	-	Annealing
	45"	72	Synthesis
25	45"	95	Denaturing
	45"	-	Annealing
	45"	72	Synthesis
1	5'	72	Final duplication

هفته‌ای یکبار انجام شد.

استخراج DNA ژنومی

برای استخراجDNA، ۲۰ برگ جوان عاری از هر گونه آلودگی از هر خانواده F_3 را به وسیله نیتروژن مایع طبق روش CTAB (Saghi Maroof *et al.*, 1997) استخراج و به تیوپ‌های ۱/۵ (به میزان یک سوم حجم تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری) منتقل شدند. برای اطمینان کار تمام وسایل لازم در این پژوهش با الکل ۷۰٪ ضد عفونی گردید.

بارگیری و رنگ آمیزی محصولات حاصل از انجام عمل PCR

برای تعیین کیفیت DNA استخراجی با استفاده از

جدول ۳- مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در نشانگرهای SSR

Table 3. Materials for amplification of SSR marker using PCR

Components of the reaction	Concentration	Amount (µl)
Buffer PCR10X	1X	1
$MgCl_2$	50 mM	0.48
Dntp	10 mM	0.6
Taq DNA Polymerase Enzyme		0.12
Forward primer	60 ng	0.75
Reverse primer	60 ng	0.75
Diluted DNA	0.75-0.5ng	2.5
H_2O		3.8
The final content		10

جدول ٤- برنامه حرارتی برای تکثیر جایگاه‌های SSR

Table 4. Touchdown Thermal Program for amplification of SSR Markers

	Time (minute) & second)	Temperature (C°)	Step
1	5'	94	Primary denaturing
18	1	94	Denaturing
	30"	64	Annealing
	1'	72	Synthesis
30	1'	72	Denaturing
	1'	94	Annealing
	1'	55	Synthesis
1	5'	72	Final duplication

الکتروفورز افقی (ژل آگارز ۰/۸٪) که روش سریع و ساده برای تعیین کیفیت DNA می‌باشد، استفاده شد. مواد مورد استفاده و میزان آنها در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز SSR، ISSR و برنامه حرارتی تاچ داون برای تکثیر نشانگرها در جدول ۱ الی ۴ آمده است. پس از انجام واکنش PCR، الکتروفورز DNA تکثیری روی ژل اکریل آمید ۶ درصد انجام گرفت. جهت نمایان سازی باندها با روش موسوم به روش سریع رنگ‌آمیزی با نیترات نقره (An *et al.*, 2009; Byum *et al.*, 2009) انجام شد. ژل را در کاورهای پلاستیکی بسته‌بندی و در یخچال جهت نمره‌دهی نگهداری شد پرایمرهای بکار برده شده در جدول ۵ و ۶ نشان داده شده است (Taghizadeh *et al.*, 2016).

جدول ۵- نشانگرهای SSR مورد استفاده در تهیه نقشه پیوستگی

Table 5. The SSR markers used for providing of linkage map

Marker	Chromosome	.Reverse sequence Forward sequence/
HVM20	1	CTCCACGAATCTCTGCACAA/CACCGCCTCCTCTTTCAC
Bmag0782	1	ATGTACCATTACGCATCCA/GAAATGTAGAGATGGCACTTG
Bmac0032	1	CCATCAAAGTCCGGCTAG/ GTCGGGCCTCATACTGAC
Bmag0718	1	ATCGTGACATCTCAAGAACA/CCTGATACTGCCTAGCATTAG
HVM36	2	TCCAGCCGAACAATTTCTTG/AGTACTCCCACACCACGTCC
GBM1462	2	CTGTGGCTAAAGAAGGCACC/ AAGATTGCTGCAGGATAGGC
GBMS160	2	ATCCAGTGGCCTTTGTATGG/TCAGCTCCTCTCTCTTCATGTG
GBMS247	2	ACACCACATTCATCTTCCTTCA/ CATTGCTCTGCTTCCTGTCA
HVM27	3	GGTCGGTTCCCGGTAGTG/TCCTGATCCAGAGCCACC
Bmag0603	3	ATACCATGATACATCACATCG/GGGGGTATGTACGACTAACTA
Bmag0225	3	AACACACCAAAAATATTACATCA/CGAGTAGTTCCCATGTGAC
Bmag0013	3	AAGGGGAATCAAAATGGGAG/TCGAATAGGTCTCCGAAGAAA
HVM67	4	GTCGGGCTCCATTGCTCT/CCGGTACCCAGTGACGAC
Cit7	4	GCAGCCAAGACCTTGAGAAAGC/ GCCTGAACTAGCCCGAGAAATG
EBmac0906	4	CAAATCAATCAAGAGGCC/TTTGAAGTGAGACATTTCCA
HVM40	4	CGATTCCCCTTTTCCCAC/ATTCTCCGCCGTCCACTC
HVM30	5	AGTGGGGAATGAGAGAATGG/TGCTTGTGGGGCATCACAC
GMS001	5	CTGACCCTTTGCTTAACATGC/TCAGCGTGACAAACAATAAAGG
EBmac0684	5	TTCCGTTGAGCTTTCATACAC/ATTGAATCCCAACAGACACAA
Bmag0113	5	GGAATCTTCTGGAACGTC/TTAAGAAGATCATTGTATTGAAGA
HVM65	6	AGACATCCAAAAAATGAACCA/TGGTAACTTGTCCCCCAAAG
Bmac310	6	CTACCTCTGAGATATCATGCC/ATCTAGTGTGTGTTGCTTCCT
Bmac0040	6	AGCCCGATCAGATTTACG/TTCTCCCTTTGGTCCTTG
GBMS0083	6	ACACTATACACATATAT/GAATCCCAACAGACACA
HVM4	7	AGAGCAACTACCAGTCCAATGGCA/GTCGAAGGAGAAGCGGCCCTGGTA
GBMS0111	7	ATATTTATGAAACGGTGTTCG/ GGGTTTATCCTCTGCAGG
Bmag0135	7	ACGAAAGAGTTACAACGGATA/GTTTACCACAGATCTACAGGTG

تجزیه‌های آماری و نرم‌افزارهای مورد استفاده

برای تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار (Manly and Olson, 1999) MapManager QTX17 و برای رسم نقشه از نرم‌افزار MapChart (Voorrips, 2002) و در نهایت برای پیدا کردن QTLها از نرم‌افزار Qgene (Nelson, 1997) استفاده شد.

نتایج و بحث

همان طور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود تمام ژنوتیپ‌ها، شامل والدین و نتایج حاصل از F3، از نظر صفت تجزیه واریانس در بیماری سفیدک پودری در ارقام مختلف در سطح احتمال ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار داشتند. دامنه تغییرات بین ژنوتیپ‌ها برای صفت بیماری سفیدک پودری ۵۹/۳۳ بود.

در بررسی ژنوتیپ مقاومت به بیماری سفیدک پودری خانواده‌ها در ۵ گروه (جدول ۸) : خانواده‌های گروه ۰، مقام (کمتر از ۱۰٪)، گروه ۱، نیمه‌مقاوم (۱۰ تا ۲۰٪)، گروه ۲، نیمه‌حساس (۲۰ تا ۴۰٪)، گروه ۳، حساس (۴۰ تا ۶۰٪) ، گروه ۴، بسیار حساس (بالاتر از ۶۰٪) رده‌بندی شدند. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های ۲، ۱۱، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۹، ۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۳، ۳۸، ۴۱، ۴۳، ۴۵، ۵۳، ۵۸، ۶۲، ۶۳، ۶۷، ۶۸، ۷۱، ۷۴، ۷۵، ۷۶، ۸۰، ۸۱، ۸۳، ۸۴، ۸۷ و ۹۲ بود، این گروه از لحاظ مقاوت به بیماری سفیدک پودری نسبت به سایر گروه‌ها مقاوم‌تر بود. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۱، ۳، ۵، ۷، ۲۴، ۲۷، ۳۱، ۳۲، ۳۴، ۳۶، ۳۷، ۳۹، ۴۸، ۴۹، ۵۱، ۵۲، ۵۵، ۵۹، ۶۱، ۶۶، ۶۹، ۷۰، ۷۲، ۷۷، ۸۸،

جدول٦- نشانگرهای ISSR، IRAP وiPBS مورد استفاده در تهیه نقشه پیوستگی

Table 6. ISSR, IRAP and iPBS Markers used for linkage map contrauction

Marker	Sequence
iPBS	
2231	ACTTGGATGCTGATACCA
2074	GCTCTGATACCA
2076	GCTCCGATGCCA
2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA
2221	ACCTAGCTCACGATGCCA
IRAP	
IRAP56	TGAGTTGCAGGTCCAGGCATCA
IRAP54	ACCCCTTGAGCTAACTTTTGGGGTAAG
IRAP50	CACTTCAAATTTTGGCAGCAGCGGATC
ISSR	
ISSR16	CTCTCTCTCTCTCTCTG
ISSR20	CTCTCTCTCTCTCTCT
ISSR22	CTCTCTCTCTCTCTCTT
ISSR29	TCTCTCTCTCTCTCTCA
ISSR30	GAGGAGAGAGAGAGAG
ISSR31	GAGAGAGAGAGAGAGA
ISSR38	GGAAGGAAGGAAGGAAGGAAT
ISSR47	CTCCTCCTCCTCCTCCTCG
ISSR48	ACACACACACACACACACACTA

۸۹، ۹۱، ۹۳، ۹۶ و ۹۹ بود که در برابر بیماری سفیدک پودری نیمه‌مقاوم بودند. گروه سوم که در رتبه‌بندی نیمه‌حساس قرار داشتند نیز شامل ژنوتیپ‌های دو والد کویر و بادیا، ۶، ۸، ۹، ۱۲، ۱۳، ۱۷، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۶، ۳۵، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۵۰، ۵۴، ۵۶، ۶۰، ۶۵، ۶۵z1، ۶۷، ۷۸، ۸۲، ۹۷، ۹۸، ۱۰۰، ۱۰۱، ۱۰۲، ۱۰۳بود، گروه چهارم شامل ژنوتیپ‌های ۱۰، ۴۰، ۶۴، ۷۹، ۹۴ و ۹۵ که گروه حساس به بیماری سفیدک پودری بودند و گروه آخر که ژنوتیپ‌های این گروه نسبت به گروه‌های دیگر بسیار حساس است شامل ژنوتیپ‌های ۵۷، ۹۰ بود.

نقشه پیوستگی تهیه شده بر اساس ۲۸ نشانگر SSR و ۱۹ نشانگر ISSR (در مجموع ۹۳ آلل) روی ۱۰۴ خانواده F_3 حاصل از تلاقی ارقام جو کویر و بادیا نشان داد که نشانگرهای گزینش شده همه ۷ کروموزم جو را پوشش

جدول۷- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی بر روی خانواده‌های F_4 جو حاصل از تلاقی ارقام بادیا × کویر در بیماری سفیدک پودری

Table 7. The analysis of the variance of the attributes studied on the F_4 families from the confluence of the Badia and Kavir digits in a powdery mildew disease.

Mean of Square	Df	Source of Variation
powdery mildew disease		
0.01484^{ns}	6	Block
0.06118^{*}	106	Cultivar
0.06399^{*}	99	Treatment
0.01188	22	Error
59.33347	CV	

*, ** and ns: significant at the 1% and 5% probability levels, respectively, and not significant.

دادند. این پوشش نیز بر اساس تابع کوزامبی (Kosambi, 1994) برابر ۶۱۷/۵ سانتی‌مورگان با میانگین فاصله ۵/۴۱ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور بود. بالاترین LOD در QTLهای مرتبط به سفیدک پودری ردیابی‌شده، ۳/۲۶ روی کروموزم ۴ و همچنین کمترین LOD با ۲/۰۲ روی کروموزوم ۶ مشاهده شد. در این بررسی مجموعا، چهار QTL برای بیماری سفیدک پودری مکان‌یابی شد. چهار QTL بزرگ اثر بوده که سهم زیادی از تنوع فنوتیپی صفت را کنترل می‌کردند. دو QTL روی کروموزوم (qSPM-4b و qSPM-4a) در موقعیت‌های به ترتیب ۱۱۶و ۸۰ سانتی‌مورگان ردیابی شدند (جدول ۹). این دو QTL توانستند ۲۵/۹ درصد تغییرات فنوتیپی بیماری سفیدک پودری را توجیه کنند که اثر افزایشی در این دو QTL در دو مورد از والد بادیا انتقال یافت. LODهای بدست آمده در این مرحله به ترتیب برابر با ۲/۹۴۸ و ۳/۲۶۵ بود.

دو QTL دیگر روی کروموزوم‌های ۳ و ۶ (qSPM-6 و qSPM-3) با نزدیک‌ترین نشانگرهای ISSR13-3 و ISSR38-6به ترتیب در جایگاه کروموزمی۰ و۴۲ ردیابی شدند. اثر افزایشی در این مرحله از والد کویر انتقال یافت.

جدول۸- رده‌بندی مقاومت ژنوتیپ‌ها به بیماری سفیدک پودری

Table 8. Resistance of genotypes to powdery mildew disease

Group	Genotypes
0	2, 11, 14, 15, 16, 19, 25, 28, 30, 33, 38, 41, 43, 45, 53, 58, 62, 63, 67, 78, 71, 74, 75, 76, 80, 81, 83, 84, 87 and 92
1	1, 3, 5, 7, 24, 27, 31, 32, 34, 36, 37, 39, 48, 49, 51, 52, 55, 59, 61, 66, 69, 70, 72, 77, 88, 89, 91, 93, 96 and 99.
2	Badia, Kavir, 6, 8, 9, 12, 13, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 26, 35, 42, 44, 46, 50, 54, 56, 60, 65, 65z1, 67, 78, 82, 97, 98, 100, 101, 102, 103b
3	10, 40, 64, 79, 94 and 95
4	57, 90

جدول ۹-QTLهای کنترل‌کننده صفت بیماری سفیدک پودری در نسل F_3 حاصل از تلاقی ارقام جو بادیا و کویر

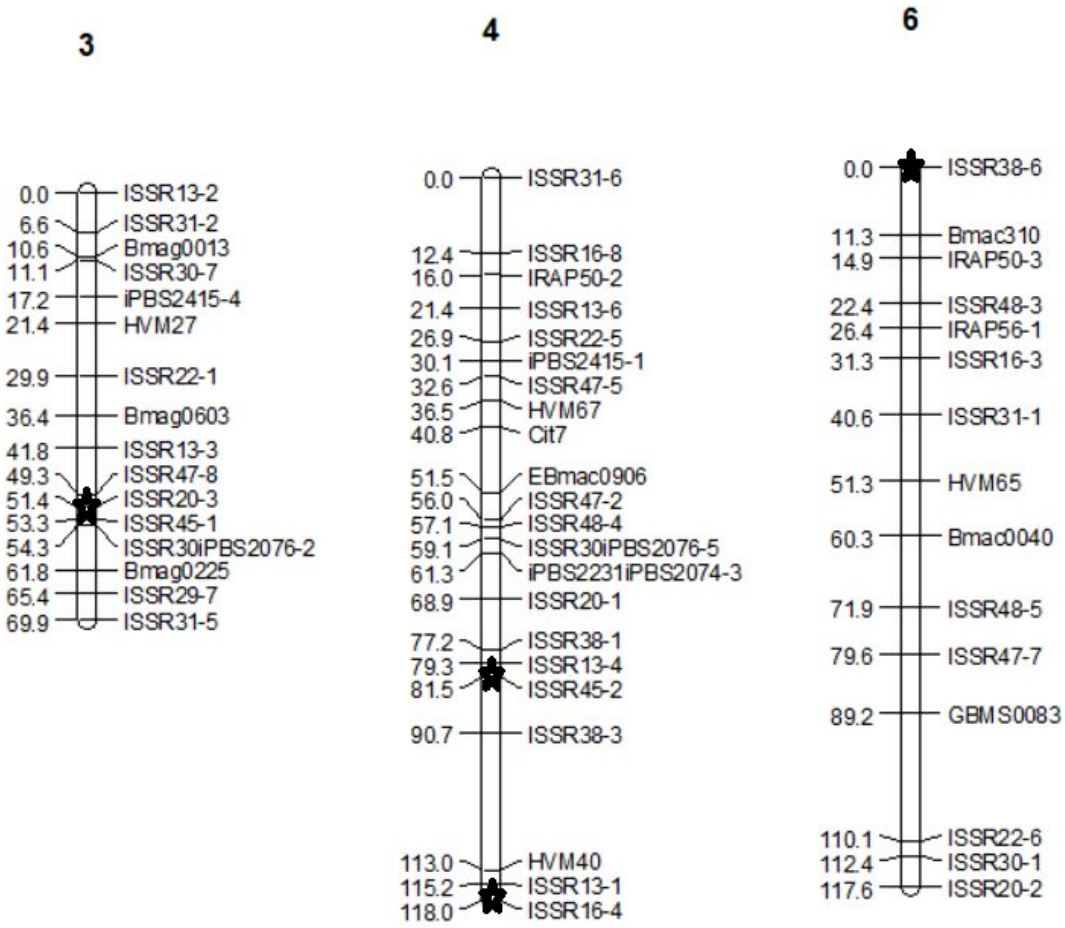
Table 9. The QTLs controlling powdery mildew in F3 families obtained from the cross Badia and Kavir barley cultivars

Direction alelles*	R^2	Addative effect	Distance to the nearest marker	LOD	Marker	position	Chromosome	QTL
Badia	12.3	0.14	76.35	2.94	ISSR13-4-ISSR45-2	80	4	qSPM-4b
Badia	13.6	0.12	111.93	3.26	ISSR13-1-ISSR16-4	116	4	qSPM-4c
Kavir	11.1	0.07	39.73	2.06	ISSR13-3- ISSR47-8	42	3	qSPM-3
Kavir	10.9	0.09	-2.02	2.02	ISSR38-6-Bmac310	0	6	qSPM-6

* نشاندهنده والدی است که آلل از آن به ارث رسیده است.

* Indicates the parent from whom the allele is inherited

میزان LODهای بدست آمده بالاتر از ۲ و به ترتیب ۲/۰۶و ۲/۰۲ بودند (جدول ۸، شکل ۲). آقانوم و نیکس (Aghnoum and Niks, 2011)، چهار QTL برای ژن‌های حساس به بیماری سفیدک پودری جو که در اثر تلاقی بین لاین‌های خیلی حساس و خیلی مقاوم صورت گرفت، شناسایی کردند. سیلور و همکاران (Silvar *et al.*, 2010)، طی یک بررسی با استفاده از مارکرهای مولکولی SSR و QTL مقاومت و کنترل بیماری سفیدک پودری جو را بر روی کروموزوم شماره هفت مشخص نمودند. لی و زو (Li and Zhou, 2011)، نیز QTLهای مقاومت به بیماری سفیدک پودری در یک لاین جو را که حاصل تلاقی بین دو لاین دابل هاپلوئید می‌باشد، بر روی کروموزوم‌های 5H و 7H شناسایی کردند. بر این اساس آنها بیان نمودند که کروموزوم‌های۷ و ۵ جو، حامل ژن‌های مقاومت به بیماری سفیدک جو می‌باشند. در تحقیق دیگر با استفاده از مارکر مولکولیCAPS، دو QTL بر روی بازوی کوتاه کروموزم‌های 1H و 7H شناسایی شد (Repkova *et al.*, 2009). هیکی و همکاران (Hickey *et al.*, 2012)، با تلاقی بین دو لاین جو استرالیایی و اوروگوئه، سه QTL برای این بیماری بر روی کروموزم‌های 4H، 3H و 5H شناسایی کردند که به ترتیب ۱۸/۶، ۳/۴ و ۸/۸ درصد واریانس فنوتیپی را توجیه می‌نمود، انتخاب بر اساس این سه QTL نشان داد که مقاومت حاصله در مقایسه با مقاومت تک ژنی بزرگ اثر می‌باشد و دارای پایدارتری بیشتری خواهد بود. با بررسی و مقایسه نتایج بدست آمده می‌توان گفت QTLهای به‌دست آمده روی کروموزم‌های ۳ و ۴ هیکی و همکاران (Hickey *et al.*, 2012) با نتایج این پژوهش هم‌پوشانی دارد ولی با نتایج کار در تحقیقات لی و زو(Li and Zhou, 2011) و سیلور و همکاران (Silver *et al.*, 2010) و ریکووا (Repkova *et al.*, 2009)



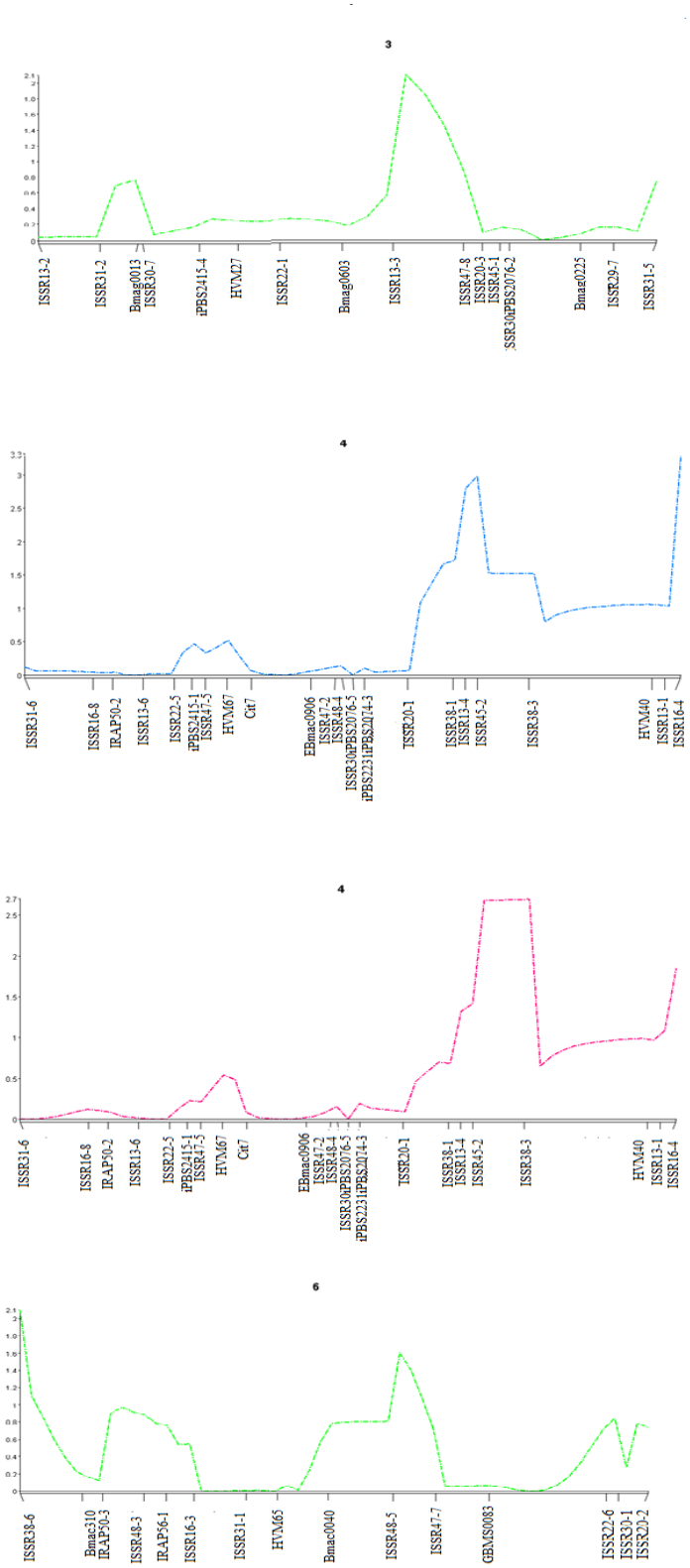
شکل ۲- نقشه پیوستگی حاصل از تلاقی ارقام جو بادیا و کویر براساس ۲۸ نشانگر SSR و ۹ نشانگر ISSR ، ۳ نشانگر IRAP و ۵ نشانگر iPBS (در مجموع۹۳ آلل).

Figure 2: The linkage map obtained from the cross Badia and kavir barley cultivars based on the 28 SSR, 9 ISSR, 3 IRAP and 5 iPBS markers (a total of 93 alleles)

هیچگونه هم‌پوشانی نداشت.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد ارقام مختلف از نظر واکنش به بیماری سفیدک پودری در سطح احتمال ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار داشتند. در این پژوهش گروه مقاوم به بیماری سفیدک پودری شامل ژنوتیپ‌های ۲، ۱۱، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۹، ۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۳، ۳۸، ۴۱، ۴۳، ۴۵، ۵۳، ۵۸، ۶۲، ۶۳، ۶۷، ۶۸، ۷۱، ۷۴، ۷۵، ۷۶، ۸۰، ۸۱، ۸۳، ۸۴، ۸۷ و ۹۲ و گروه بسیار حساس به بیماری سفیدک پودری شامل ژنوتیپ‌های ۵۷ و ۹۰ شناسایی شدند. مناطق مختلف دارای جدایه‌هایی با فاکتورهای بیماری‌زایی متفاوت می‌باشد و کلا جامعه قارچ‌ها از جمله سفیدک پودری نژادهای مختلف بوده و این مسئله باعث بیماری‌زایی یک جدایه روی یک ژن مقاومت (شکستگی مقاومت ژنی) در یک منطقه و عدم بیماری‌زایی روی همین ژن مقاومت



شکل۳- نمایش گرافیکی QTLهای شناسایی شده و مقادیر LOD برای بیماری سفیدک پودری جو روی کروموزوم ۳، ٤ ٦

Figure 3- Graphical representation of the QTLs detected on the chromosome 3, 4 and 6 of barley and their LOD values to powdery mildew disease

(عدم شکستگی مقاومت ژنی) در منطقه دیگر شود (Agrios, 2005). به همین دلیلی ردیابی فاکتورهای بیماری زایی و تولید ارقام مقاوم یک کار دائمی است که باید مورد توجه متخصصین اصلاح نباتات قرار گیرد (Chaube and Pundhir, 2005).

QTLهای ردیابی‌شده در این تحقیق، می‌توانند به عنوان الگویی در برنامه‌های به‌نژادی برای ایجاد مقاومت موثر به این بیماری و افزایش عملکرد مورد استفاده قرار گیرند. در این آزمایش برای صفت بیماری سفیدک پودری جو دو QTLروی کروموزم ۴ و دو QTL روی کروموزم ۳ و۶ بدست آمد. والد بادیا نسبت به والد کویر از مقاومت بیشتری به سفیدک پودری برخوردار بوده و جز گروه نیمه حساس و والد کویر جز گروه بسیار حساس قرار گرفت. هر چهار QTL بزرگ اثر بوده که سهم زیادی از تنوع فنوتیپی صفت واکنش مقاومت را کنترل می‌کردند. از نتایج این بررسی می‌توان پس از تعیین اعتبار نشانگرهای ردیابی‌شده، از آنها در برنامه‌های به‌نژادی جو همراه با درک صحیح از ژنتیک میزبان و عامل بیماری و نیز ارزیابی‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای با هدف ایجاد مقاومت‌های موثر در برابر بیماری استفاده نمود.

سپاسگزاری

نسل اول بذر این آزمایش از موسسه تحقیقات نهال و بذر(ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبد) تهیه و در اختیار نگارندگان قرار داده شده است که بدین وسیله از این موسسه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Aghnoum, R., and Niks, E. 2011. Transgressive segregation for very low and high levels of basal resistance to powdery mildew in barley. Journal of Plant Physiology 168(1):45-50.

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th Edn. Academic Press, New York, USA, ISBN: 0120445654, 952.

An, Z.W., Xie, L.L, Cheng H., Zhou, Y., Zhang, Q., and He, X.G. 2009. A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. Analytical Biochemistry 391(1):77-79.

Behdad, A. 1990. Diseases of Iranian Crops. Neshat Press. Esfahan. 425 pp.

Behdad, E. 2006. Phytopathology and Important Plant Diseases in Iran. Ghom, Iran: Atre-Etrat Publication 785 pp (In Persian).

Byun., S.O. Fang., Q. Zhou., H. and Hickford, J.G. 2009. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry. 385(1):174-5.

Cenci, A., Dovidio, R., Tanzarella, O.A., Ceoloni, C., and Poreeddu, E. 1999. Identification of molecular markers linked to pm 13, an Aegilops longiddima gene conferring resistance to powdery mildew in wheat. Theorctical and Applied Genctics 98: 488-454.

Chaube, H.S. and Pundhir, V.S. 2005. Crop Disease and Their management. Prentice Hell, New Delhi, India.

Czembor, J. H. 2000. Resistance to powdery mildew in population of barley landraces from morocco. Genetic Resources and Crop Evolution 47:439- 449.

Czembor, J.H., and Czembor, H.J. 2000. Powdery mildew resistance in selection from Moroccan barley landraces. Phytoparasitica 28 :65–78.

Emami, K. and Hasanzadeh, J. (1994). Barley diseases guide (Translation). University Publication Center, Tehran. pp249 (In Persian).

Fazeli, A., Babaian Jelodar, N., Nagavi, M.R. and Nik Khah, H.R. 2008. Genetic evaluation of powdery mildew progress in two different barley crosses. Plant Pests and Diseases 76 (1): 1-17.

Gullino, M. L. and Kuijpers, L. A. M. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. Annual Review of Phytopathology 32: 559-579.

Hickey, L.T., Lawson, W., Platz, G.J., Fowler, R.A., Arief. V., Dieters, M., German, S., Fletcher, S., Park, R., Singh, D., Pereyra, S. and Franckowiak, J. 2012. Mapping quantitative trait loci for partial resistance to powdery mildew in an Australian barley population. Crop Science Abstract 52 (3): 1021-1032.

Julio, E., Denoyes-Rothan, B., Verrier, J.L. and Dorlhac de borne, F. 2006. Detection of QTLs linked to leaf and smoke properties in *Nicotiana tabacum* based on a study of 114 recombinant inbred lines. Molecular Breeding 18: 69-91.

Khodaee, C., Foroutan, A., and Alizadeh, A. R. 2010. Evaluation of cultivars and advanced lines to powdery mildew in Mazandaran province. Paper presented at: 19th Iranian Plant Protection Congress, 31 July – 3 August, Karaj, Iran.

Kosambi, D.D. 1994. The estimation of map distance from recombination values. Annals of Eugenics 12: 172-175.

Li, H. B., and Zhou, M. X. 2011. Quantitative trait loci controlling barley powdery mildew and scald resistances in two different barley doubled haploid populations. Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement 27 (4): 479-490.

Limpert, E. 1987. Spread of barley mildew by wind and its significance for hytopathology, aerobiology and for barley cultivation in Euroupe. Pp. 331-336. In: Boehm, G., and Leuschner, R.M. (eds.) Advances in Aerobiology. Birkhauser, Basel.

Majnon-Hosseini, N. 1997. Cereal grain crops. Naghash Mehar Press, Tehran, Iran. (In Persian).

Manly, K. F. and Olson, J. M. 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QTL. Mammalian Genome 10: 327-334.

Naghavi MR, Ghareyazi B, and Hoseini Salekdeh, G. 2009. Molecular Markers. Tehran University Press (in Persian).

Naghavi, M., ghanadha, M.R., Yazdi samadi, B. and Torabi, M. 2001. Inheritance of resistance to barley powdery mildew at adult plant stage. Seed and Plant Improvement Journal 17 (2): 140-150.

Nelson, J. C. 1997. QGENE: Software for marker-based genomic analysis and breeding. Molecular Breeding 3 (3): 239-245.

Patiuor, M., Torabi, M., and Sharifi Tehrani, A. 1998. Resistance of Some Barley Cultivars and Lines to Powdery Mildew in Seedling and Reproductive Stages in Some Regions of Iran. Proceeding of 5th Congress of Agriculture and Plant Breeding. Isfahan University of Technology. Page 177.

Pourmansouri, T. 1998. Virulence factors of Erisiphe graminis f.sp. hordei in samples collected from different part of Iran. 13th Iranian Plant Protection Congress. Karaj, Iran. 26.

Repkova, J., Teturova, K., Dreiseitl, A., and Soldanova, M. 2009. Characterization and chromosomal location of powdery mildew resistance genes from wild barley Pl282605. Journal of Plant Diseases and Protection. 116 (6): 257-259.

SaghiMaroof, M. A., Biyaoshev, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q. and Allard, R.W. 1994. Extra ordinarily polymorphic microsatellites DNA in barly species diversity, chromosomal location, and population dynamics Proceeding of National Academy Science of U S A. 91: 4566-5570.

Silvar, C., Dhif, H., Igartua, E., Kopahnke, D., Gracia, M. P., Lasa, J. M., Ordon, F. and Casas, M. 2010. Identification of quantitative trait loci for resistance to powdery mildew in a Spanish barley

landrace. Molecular Breeding 25: 581-592.

Spencer, D.M. 1978. The Powdery Mildews. Academic Press, London, UK. 259- 280.

Taghizadeh, Z., Sabouri, H., Hosseini Moghaddam, H., Fallahi, H. A., and Katouzi, M. 2016. Mapping of genes controlling of barley (*Hordeum vulgare* L.) germination and morphological traits in F3:4 population caused Badi×Kavir cross using SSR and ISSR markers. MSs Thesis. College of Agricultural and Natural Resource. Department of Plant Production. Gonbad Kavous University. 166 pp.

Tinker, N.A. and Mather, D.E. 1994. Main effects of quantitative trait loci in Harrington /TR306 two-row barely. Barley Genetic Newsletter 23: 72–78.

Trujillo, M., Troeger, M., Niks, R.E., Kogel, K.H. and Huckelhoven, R. 2004. Mechanistic and genetic overlap of barley host and non-host resistance to *Blumeria graminis*. Molecular Plant Pathology 5 (5): 389-396.

Von Bothmer, R., Jacobsen, N., Baden, C., Jorgensen, R. B., and Linde-Laursen, I.1995. An ecogeographical study of the genus Hordeum (2nd edition). j: Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools, 7.p 129.

Voorrips RE. 2002. Map chart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. Journal of Heredity 93(1): 77-8.

Wang, Y, 1993. Genetic studies on resistance to powdery mildew *Uncinula necator* of wild Chinese Vitis

Ward, D. J. 1953. Disease and agronomic notes records on the World collection of barley grown at Bogota, Columbia in 1953. World Collection of Barley. Data Complication No.4. United States Department of Agriculture. 148PP.

Ward, D. J. 1957. Disease and agronomic data on 431 Manchurian barley grown at five locations in the north central U.S. and Manitoba, Canada. In 1956. World Collection of Barley. Data Complication No.5. United States Department of Agriculture.

Yousefi Rad, S., Soltanlou, H., Naghavi, M., Ramezanpour, S. S., Nikkah, H., and Sharbatkhari, M. 2010. Mapping of resistance to powdery mildew disease in the barkey using recombinant inbred lines. MSc Thesis. College of Agriculture. Department of Plant Breeding and Biotechnology. Gorgan Agriculture Science and Natural Resource. Gorgan. Iran.

Zhang, Z., Henderson, C., Perfect, E., Carver, T. L. W., Thomas, B. J., Skamnioti, P. and Gurr, S. J. 2005. Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. Molecular Plant Pathology 6 :561-575.