



نقشه‌یابی ارتباطی برخی صفات فنولوژیک در جو تحت تنش شوری

مهديه زارع کهن^۱، نادعلی بابائیان جلودار^۲، رضا اقنوم^۳، سید علی طباطبایی^۴ و سید کمال کاظمی تبار^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: mahdiyehzare65@gmail.com)

۲ و ۵- استاد و دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد

۴- دانشیار، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یزد

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۸

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۶

چکیده

پژوهش حاضر در راستای شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات فنولوژیک روز تا پنجه‌دهی، روز تا ساقه‌دهی، روز تا سنبله‌دهی، روز از ساقه‌دهی تا سنبله‌دهی، طول دوره‌ی پرشدن دانه و تعداد روز تا رسیدن فیزیولوژیک و با استفاده از ۴۰۷ نشانگر AFLP و SSR روی ۱۴۸ ژنوتیپ جو به روش نقشه‌یابی ارتباطی انجام شد. این آزمایش در قالب دو طرح آلفا لاتیس با پنج بلوک ناقص در دو تکرار تحت شرایط نرمال و تنش شوری ($EC=12 \text{ dsm}^{-1}$) در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ و در مزرعه‌ی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی یزد صورت پذیرفت. نقشه‌یابی ارتباطی بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM) با استفاده از نرم‌افزارهای Tassel و Structure انجام شد. براساس ۴۰۷ نشانگر مورد استفاده در این مطالعه، ساختار ژنتیکی جمعیت به دو زیرجمعیت فرعی ($K=2$) تقسیم گردید که نتایج حاصل از رسم پارایلات نیز مؤید آن بود. در نقشه‌یابی ارتباطی به روش MLM، در شرایط نرمال و تنش شوری به ترتیب ۴ و ۶۱ نشانگر ارتباط معنی‌داری با صفات مورد مطالعه نشان دادند و تغییرات قابل توجهی از صفات مورد مطالعه را توجیه نمودند. در این مطالعه چندین مکان ژنی کمی مشترک برای صفات مورد مطالعه شناسایی شد. وجود نشانگرهای مشترک در میان صفات می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، اطلاعات ارزشمندی در زمینه مبنای ژنتیکی صفات مورد مطالعه ارائه می‌دهد که می‌توان در برنامه‌های اصلاحی جو از جمله انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، جو، ساختار ژنتیکی جمعیت، مدل خطی مخلوط، نقشه‌یابی ارتباطی

مقدمه

در خزانه ژنی جو را شامل می‌شوند. بنابراین، احتمالاً تاکنون تنها بخشی از پتانسیل ژنتیکی جو که در بهبود ژنتیکی تحمل به شوری دخیل می‌باشند، مکان یابی شده‌اند. بنابراین، دانشمندان بر این باورند که جو به عنوان منبعی از آلل‌های مطلوب است که می‌توان از آن، با روش‌های کلاسیک و مولکولی در اصلاح مقاومت به شوری در گیاهان استفاده کرد (۱،۲۵). امروزه با پیشرفت علم، روش‌های مهندسی ژنتیک به عنوان عامل اصلی موفقیت در تولید و معرفی ارقام متحمل به تنش شوری مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۶). مقاومت به شوری در گیاهان زراعی یک صفت کمی پیچیده‌ی ژنتیکی و فیزیولوژیکی است و با چندین مکان ژنی کنترل می‌شود (۱۱). اطلاع از مکان ژنی صفات کمی و نیز پیدا کردن مقدار اثر آن‌ها روی صفت کمی در مبحثی تحت عنوان نقشه‌یابی مکان ژنی صفت کمی (QTL) مطرح می‌شود. دو روش رایج برای شناسایی و مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل‌کننده‌ی صفات کمی، نقشه‌یابی پیوستگی^۱ و نقشه‌یابی ارتباطی^۲ هستند (۱۰). امروزه با پیشرفت بیولوژی مولکولی و بیومتری، نقشه‌یابی ارتباطی به عنوان یک ابزار جدید و قدرتمند در جهت تکمیل و افزایش اطلاعات حاصل از تجزیه پیوستگی، برای مطالعه‌ی ژنتیکی صفات کمی بکار می‌رود. در این نوع نقشه‌یابی، شناسایی QTL، به جای یک جمعیت خاص و در حال تفرق در یک جمعیت عمومی انجام می‌شود (۳۹) و دارای سه مزیت عمده نسبت به نقشه‌یابی پیوستگی می‌باشد، از جمله بررسی تعداد آلل بیشتر، دقت بالای نقشه‌یابی (به دلیل تعداد زیاد میوز و نوترکیبی در طول شجره‌ی اجداد، نقشه‌ی ژنتیکی وضوح بالایی دارد و به راحتی می‌توان از آن در فرآیند انتخاب به کمک نشانگر استفاده کرد) و صرفه‌جویی در زمان و هزینه به دلیل عدم نیاز به ایجاد جمعیت‌های دو والدی می‌باشد

تنش‌های محیطی از جمله شوری همواره عامل کاهش کمیت و کیفیت محصولات زراعی بوده‌اند که این تغییرات در گونه‌های مختلف گیاهی و حتی وارته‌های مختلف یک گونه و بسته به نوع تنش و همچنین اشکال مختلف یک تنش، متفاوت است و از آنجایی که بیشتر محصولات زراعی حساس به شوری هستند بنابراین امروزه شوری یک خطر جدی برای کشاورزان محسوب می‌شود (۱۲). شوری در ایران و بسیاری از مناطق خشک و نیمه خشک جهان به عنوان یک مشکل رایج کشاورزی و عامل محدودکننده‌ی رشد و عملکرد گیاهان زراعی محسوب می‌شود. این مشکل هر ساله رو به افزایش است که ناشی از تغییرات آب و هوایی و مدیریت ضعیف آبیاری می‌باشد. در این مناطق زارعین سعی می‌کنند که با مصرف نهاده‌های بیشتر مانند کود، بذر و آب خسارت‌های ناشی از شوری را جبران کنند که گاهی اوقات هزینه‌ی این نهاده‌ها حدود ۶۵ درصد درآمد کشاورزان را شامل می‌شود. در بین غلات تحمل به تنش شوری در گیاه جو بیشتر از سایر گیاهان مشاهده شده است (۲۶،۲۱). بنابراین کشت این گیاه در زمین‌های بایر و شور مناسب‌تر از کشت گندم و سایر غلات است. جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) متعلق به خانواده گرامینه می‌باشد که امروزه 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 (۳۲)، زیرا جو گیاهی است خودگشن، دیپلوئید با تعداد کروموزوم کم ($2n=2x=14$) و نسبتاً بزرگ (۸-۶ میکرومتر) و همچنین دورگ‌گیری نیز در آن آسان انجام (۳۵)، الیس و همکاران (۲) و کیلیان و همکاران (۱۷) اشاره کردند که ارقام جدید جو تنها ۴۰-۱۵٪ از کل آلل‌های موجود

1- Quantitative trait loci

2- Linkage mapping

3- Association mapping

4- Marker-assisted selection

برای تعیین QTL‌های کنترل‌کننده صفات پیچیده در جو به‌کار بردند. هدف از مطالعه، شناسایی نواحی ژنومی ارقام اصلاحی جو برای تعیین ارتباط دقیق مکان ژنی و صفت بود که در نهایت ۴۱ ارتباط معنی‌دار بین صفت و نشانگر شناسایی شد که ۳۱ عدد از آن‌ها قبلاً با روش‌های نقشه‌یابی پیوستگی (جمعیت‌های دو والدی) گزارش شده بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که ژن‌هایی با اثرات اصلی هنوز در ژرم پلاسما جو در حال تفرق هستند و استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی کل ژنوم در جمعیت‌های اصلاحی جو می‌تواند مؤثر واقع شود. از آنجایی که شناسایی ژن‌ها و مکان‌های اصلی مؤثر در مقاومت به شوری در جو می‌تواند درک بهتری از اصلاح ژنتیکی مقاومت به شوری را در اختیار اصلاح‌گر قرار دهد و در شناخت مکانیسم‌های مولکولی و فیزیولوژیکی، کمک شایانی کند. بدین جهت، پژوهش حاضر به‌منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با برخی صفات فنولوژیک تحت شرایط نرمال و تنش شوری با روش نقشه‌یابی ارتباطی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش ۱۴۸ رقم از ارقام رایج جو موجود در شمال و غرب اروپا که توسط دانشگاه واخینگن هلند جمع‌آوری شده‌اند مورد استفاده قرار گرفت (برای جزئیات بیشتر مراجعه شود به منبع ۱۹). تحقیق حاضر در قالب دو طرح آزمایشی آلفا لاتیس با دو تکرار در پنج بلوک ناقص و هر بلوک شامل ۳۰ کرت در دو محیط نرمال و شوری (آب چاه با $dsm-1$ $EC=12$) بود که در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ در ایستگاه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی یزد (عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۵۵ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۱۶ دقیقه شرقی) به ارتفاع ۱۲۱۳ متر از سطح دریا اجرا شد. در این طرح هر کرت شامل ۳ ردیف ۲ متری بود و از دو طرف هر کرت حدود نیم متر برای اثر حاشیه در نظر گرفته شد. برای اعمال تنش شوری در این آزمایش ابتدا آبشویی اولیه‌ی خاک قبل از کاشت انجام شد و برای اینکه سطح شوری کرت‌ها ثابت باشد میزان آب مصرفی برای هر کرت به یک میزان استفاده شد. صفات مورد بررسی شامل تعداد روز تا پنجه‌دهی، تعداد روز تا ساقه‌دهی، تعداد روز تا سنبله‌دهی، تعداد روز از ساقه‌دهی تا سنبله‌دهی، طول دوره‌ی پرشدن دانه و تعداد روز تا رسیدن فیزیولوژیک بودند. ابتدا تست نرمال بودن داده‌ها براساس روش کولموگروف اسمیرنوف با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. سپس تجزیه واریانس مرکب، برای دو شرایط تنش شوری و بدون تنش با نرم‌افزار SAS محاسبه گردید. در این پژوهش، از نقشه‌ی ژنتیکی نشانگرهای مولکولی شامل ۴۰۷ نشانگر AFLP و SSR، که توسط کراکمن و همکاران (۱۸) و اکتوم و همکاران (داده‌های منتشر نشده) تهیه شده است، استفاده شد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه کلاستر به روش Neighbor Joining با نرم‌افزار TASSEL 4.3.15 انجام گرفت.

به‌منظور تعیین زیرگروه‌های احتمالی و بررسی ساختار جمعیت از روش بیزین و نرم‌افزار Structure 2.3.4 (۳۰،۷)

(۹،۲۴). بنابراین این روش معایب و محدودیت‌های نقشه‌یابی پیوستگی را ندارد. در این نوع نقشه‌یابی، ساختار جمعیت، اندازه‌ی نمونه و فراوانی آلی خاص ممکن است توانایی این روش در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات را تحت تأثیر قرار دهد و موجب ارتباطات دروغین نشانگر-صفت شود (۳۸). بدین جهت به‌منظور به حداقل رساندن نتایج دروغین در مطالعات مرتبط با تجزیه‌ی ارتباط لازم است ابتدا ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در جمعیت مورد استفاده، مطالعه شده و در تجزیه‌ی ارتباط لحاظ شود (۳۷). روش‌های GLM^2 و MLM^3 به‌منظور تجزیه‌ی ارتباط پیشنهاد شده است که در روش GLM ساختار جمعیت (ماتریس Q) با استفاده از چند نشانگر که به‌صورت تصادفی در ژنوم توزیع شده‌اند پیش‌بینی شده و در تجزیه‌ی ارتباط به‌عنوان کواریت در مدل وارد می‌شود. از این‌رو در این روش نتایج حاصل از ارتباطات دروغین بین نشانگر-صفت به حداقل می‌رسد. امروزه روش آماری MLM به‌طور گسترده‌ای برای تجزیه‌ی ارتباط در گیاهان استفاده می‌شود (۱۳). در روش MLM هم ساختار جمعیت (ماتریس Q) و هم روابط خویشاوندی بین افراد (ماتریس K) با استفاده از چند نشانگر پیش‌بینی شده و در مدل به‌عنوان متغیرهای کمکی^۴ استفاده می‌شوند. مطالعات گسترده‌ای در زمینه‌ی نقشه‌یابی ارتباطی در جو تحت تنش شوری (۳، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۲۰، ۳۱)، تنش خشکی (۲۲) و در شرایط نرمال (۲۷، ۲۸، ۲۹) انجام شده است. در آزمایشی که توسط فان و همکاران (۸) انجام شد، ۲۰۶ ژنوتیپ جو با ۴۰۸ نشانگر، ژنوتیپ یابی و برای تحمل به تنش شوری مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه تجزیه‌ی ارتباطی با هر دو روش مدل خطی معمولی و مدل خطی مخلوط براساس ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی انجام شد و در نهایت ۲۴ نشانگر که ارتباط زیادی با صفات داشتند، شناسایی شدند. مکان ژنی $bPb-9668$ که روی کروموزوم 4H قرار دارد در هر دو مدل شناسایی شد و نتایج نشان داد که در مطالعات قبلی شناسایی نشده بود. مطالعه‌ی جهت تعیین QTL‌های مقاومت به شوری در جو با روش نقشه‌یابی ارتباطی توسط سبئی و همکاران (۳۱) انجام شد. در این آزمایش طیف وسیعی از مقاومت به شوری بین ژنوتیپ‌های جو دیده شد و هفت QTL معنی‌دار روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 3H، 4H و 5H مکان‌یابی شد که از این بین ۵ مکان ژنی در مطالعات قبلی شناسایی شده بودند. الاخدر و همکاران (۴) ساختار جمعیت و ارتباط صفت-نشانگر را با استفاده از روش GLM (مدل خطی معمولی) برای ۶۰ ژنوتیپ جو در شش محیط شوری بررسی کردند. در این مطالعه طی برآورد ساختار جمعیت دو زیر جمعیت اصلی تعیین شد و LD^5 (عدم تعادل پیوستگی) تفاوت معنی‌داری بین کروموزوم‌های جو داشت که نشان‌دهنده‌ی اینست که این عامل می‌تواند در دقت نقشه‌یابی ارتباطی QTL‌های شناسایی شده روی کروموزوم‌های متفاوت، مؤثر واقع شود. طی مدت دو سال ۴۶ QTL برای ۱۴ صفت ارزیابی شده و یک QTL اصلی که کنترل‌کننده‌ی تحمل به شوری می‌باشد روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 4H و 7H شناسایی شدند که فاکتورهای مهمی در بهبود تحمل به شوری جو محسوب می‌شوند. اولی و همکاران (۲۹) روش نقشه‌یابی ارتباطی را

1-False marker-trait associations 2 - General linear model 3- Mixed linear model 4- Covariate
5- Linkage disequilibrium 6- Bayesian Method

عضویت یک ژنوتیپ به یک کلاستر بیشتر یا مساوی ۰/۷ باشد، ژنوتیپ به آن کلاستر نسبت داده می‌شود، ولی در صورتی که درصد عضویت آن کمتر از این مقدار باشد، به‌عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط شده) در نظر گرفته می‌شود (۳۴) در اینجا هر گروه با رنگی متمایز مشخص شده است که دو رنگ مجزا از هم برای هر فرد نشان‌دهنده‌ی تعلق آن فرد به یکی از دو گروه یا هر دو گروه است.

نقشه‌یابی ارتباطی

در روش نقشه‌یابی ارتباطی، مکان‌یابی QTLها براساس عدم تعادل پیوستگی (LD) صورت می‌گیرد (۱۴). در این مطالعه، عدم تعادل پیوستگی مربوط به هر جفت نشانگر با آماره‌ی r^2 برای هر گروه پیوستگی (مکان ژنی چند آلی) برآورد شدند.

مکان‌یابی ارتباطی براساس مبنای ژنتیکی مرتبط با صفات متنوع به‌طور موفقیت آمیزی در گیاهان زراعی انجام گرفته است. اطلاعات نشانگری به‌دست آمده از نقشه‌های پیوستگی، محدودیت‌هایی همچون در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق، نبود پیوستگی مناسب بین صفات گیاهی و نشانگرهای مولکولی و زمان ناکافی، کارایی این نقشه‌ها را در زمینه‌ی شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات گیاهی کاهش می‌دهد (۱۴). با توجه به اینکه روش تجزیه ارتباطی با از بین بردن این محدودیت‌ها و همچنین با در نظر گرفتن ساختار و روابط خویشاوندی (روش MLM) و حذف ارتباط دروغین نشانگر-صفت، اطلاعات نشانگری مناسبی را در اختیار محققان قرار می‌دهد، در این مطالعه به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه از تجزیه ارتباطی با روش MLM در نرم‌افزار Tassel استفاده شد. برای تجزیه ارتباطی فقط نشانگرهایی با فراوانی بیش از ده درصد مورد استفاده قرار گرفت و آماره P-value با ۱۰۰۰ جایگشت برآورد شد.

استفاده شد. این آنالیز روی ۱۴۸ ژنوتیپ جو در حالت Admixture با ۱۰۰۰۰۰ بار Burn-in (استقلال فراوانی آلی) و ۱۰۰۰۰۰ تکرار MCMC در مقادیر مختلف K (از ۱ تا ۱۰ و ۱۰ تکرار برای هر K) انجام گرفت و عدد K بهینه براساس روش delta K محاسبه و تعیین شد. در نهایت با تعیین K بهینه که مربوط به بیشترین مقدار delta K به دست آمده بود، میانگین شاخص تثبیت (Fst) و ماتریس سهم عضویت (Q) با همین نرم‌افزار محاسبه شد. در ادامه به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه در شرایط نرمال و تنش شوری از نقشه‌یابی ارتباط (با کاربرد ماتریس Q و ماتریس خویشاوندی) به روش MLM (مدل خطی مخلوط) در نرم‌افزار TASSEL4.3.15 بهره گرفته شد.

نتایج و بحث

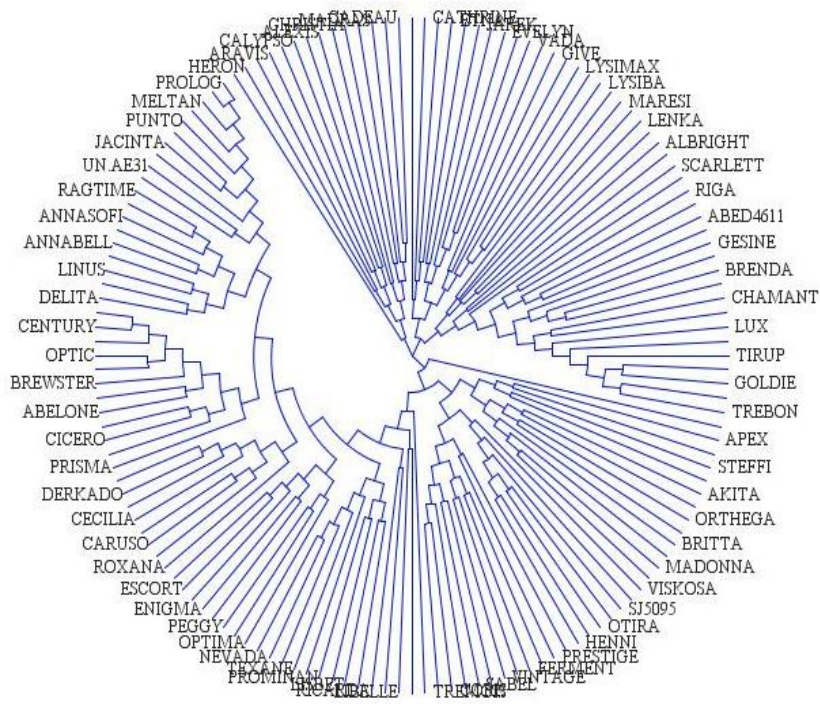
نتایج تجزیه واریانس مرکب در شرایط نرمال و تنش شوری (جدول ۱) نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در بین ژنوتیپ‌ها از نظر تمام صفات وجود دارد که حاکی از تنوع بالا در داخل جمعیت می‌باشد. همچنین اثر متقابل ژنوتیپ × محیط برای صفات روز تا پنجه‌دهی، روز تا ساقه‌دهی، روز تا سنبله‌دهی و روز از ساقه‌دهی تا سنبله‌دهی معنی‌دار بود که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا بین ژنوتیپ‌ها در واکنش به تنش شوری است. دندروگرام حاصل از روش Neighbor Joining ۱۴۸ ژنوتیپ جو را در سه گروه اصلی قرار داد (شکل ۱). مقدار $K=2$ به‌عنوان مناسب‌ترین عدد برای محاسبه‌ی ماتریس سهم عضویت (Q) و میانگین شاخص تثبیت (Fst) هر گروه تعیین شد (شکل ۲). بارپلات ارائه شده توسط نرم‌افزار Structure 2.3.4 برای ۱۴۸ ژنوتیپ جو (شکل ۳)، نیز مؤید مقدار K بهینه می‌باشد که محور افقی مربوط به ژنوتیپ‌ها و محور عمودی سهم تعلق هر فرد به هر گروه را نشان می‌دهد. همچنین در این بار پلات، وقتی درصد

جدول ۱- تجزیه واریانس مرکب صفات مورد بررسی در شرایط نرمال و تنش شوری

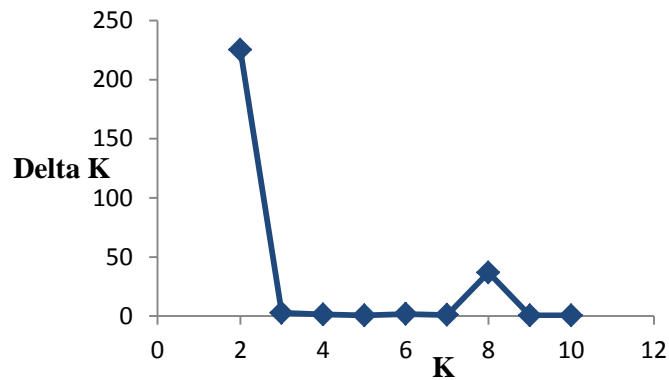
Table 1. Combined analysis of variance of investigated traits under normal and salt stress conditions

میانگین مربعات							
منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد روز تا پنجه‌دهی	تعداد روز تا ساقه‌دهی	تعداد روز تا سنبله‌دهی	تعداد روز از ساقه‌دهی تا سنبله‌دهی	طول دوره‌ی پرشدن دانه	تعداد روز تا رسیدن فیزیولوژیک
محیط	۱	۱۷۵/۳**	۷۵/۷ ^{ns}	۴۹۴/۴**	۶۳۹/۹**	۳۶۱۹/۸**	۴/۴ ^{ns}
تکرار (محیط)	۲	۵۵/۳*	۶۰۴۶**	۹۸/۷*	۵۶۳۹/۹**	۳۲۹/۷ ^{ns}	۸۲۷/۷*
ژنوتیپ	۱۴۷	۲۹/۶**	۴۷۷/۵**	۱۲۲/۴**	۳۶۵/۹**	۳۳۳/۱*	۲۶۴/۳*
ژنوتیپ × محیط	۱۴۷	۲۵/۲**	۲۲۶/۲**	۳۵/۵**	۲۳۶/۵**	۳۳۰/۸ ^{ns}	۲۱۷/۹ ^{ns}
بلوک (تکرار × محیط)	۱۶	۱۰/۸ ^{ns}	۲۸۰۲/۹**	۲۲/۵ ^{ns}	۲۸۷۴/۶**	۳۳۹/۸ ^{ns}	۱۸۱/۳ ^{ns}
خطا	۲۷۷	۱۳/۳۸	۱۰۰/۳	۲۴/۷	۱۱۱/۹	۳۱۵/۱	۲۰۲/۸
ضریب تبیین (%)	-	۶۹/۷	۸۵/۳	۸۰/۷	۸۳/۱	۵۵/۱	۵۷/۳
ضریب تغییرات (%)	-	۱۴/۱	۹/۹۵	۳/۷	۳۲/۴	۴۵/۱	۸/۳

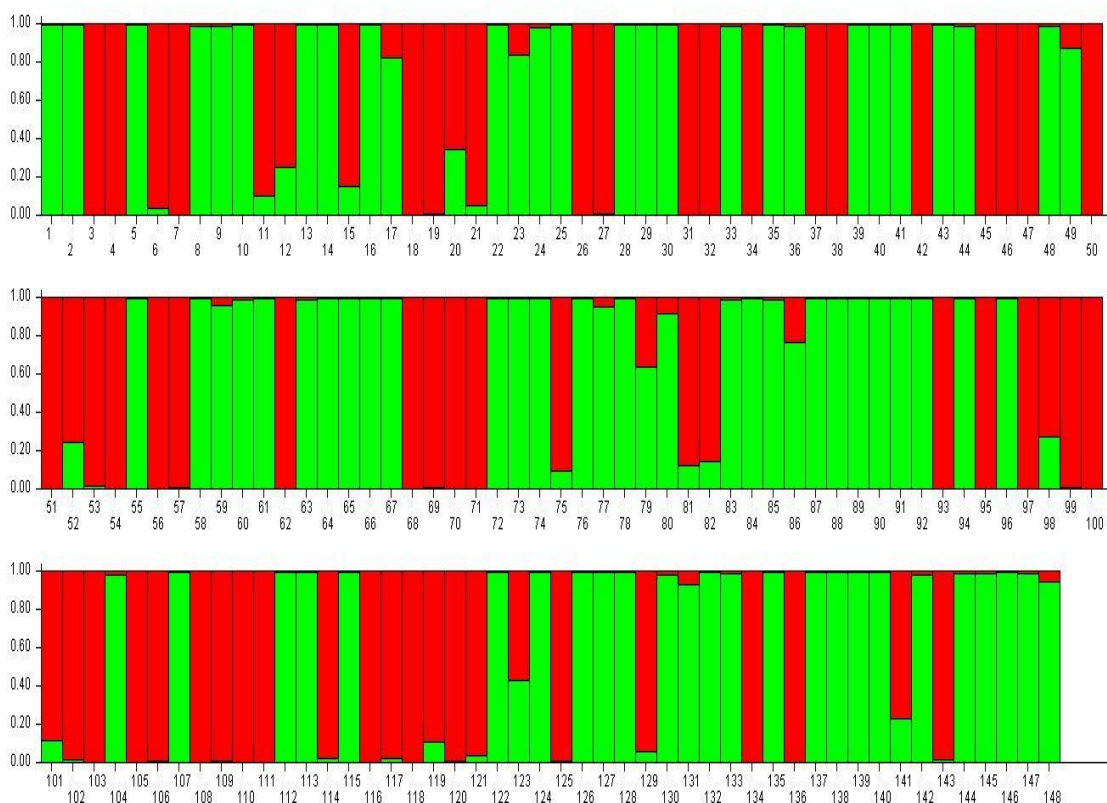
*، ** و ^{ns}: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیرمعنی‌دار



شکل ۱- دندروگرام ۱۴۸ ژنوتیپ جو با روش Neighbor-Joining براساس ۴۰۷ مکان ژنی نشانگرهای AFLP و SSR.
 Figure 1. Dendrogram of 148 barley genotypes based on 407 AFLP and SSR markers by Neighbor-Joining method



شکل ۲- نمودار دو طرفه برای تعیین مقدار بهینه K
 Figure 2. Two-way graph to determine the optimum value of K



شکل ۳- بارپلات رسم شده توسط نرم‌افزار Structure 2.3.4 بر مبنای داده‌های حاصل از ۴۰۷ مکان ژنی حاصل از نشانگرهای AFLP و SSR، محور افقی مربوط به ژنوتیپ‌ها و محور عمودی سهم تعلق هر ژنوتیپ به هر گروه را نشان می‌دهد
Figure 3. Barplot drawn up based on 407 AFLP and SSR markers by Structure 2.3.4 software, the horizontal axis is related to genotypes and the vertical axis shows the share owned by each genotype in each group

نشانگرها و صفات مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش همزمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند (۳۶،۱۵). وجود نشانگرهای مشترک در میان برخی صفات بررسی شده می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. نشانگر E33M54-063 با مکان ژنی ناشناخته برای سه صفت تعداد روز تا سنبله‌دهی، طول دوره‌ی پرشدن دانه و تعداد روز تا رسیدن فیزیولوژیک مشترک بود. نشانگرهای E45M49-226 و E38M55-226 با مکان ژنی ناشناخته، نشانگرهای Bmac0134-151، Bmac0134-173، Bmac0134-142، Bmac0134-132 و Bmac0134-160 با مکان ژنی 2H و ۷/۹ سانتی مورگان، نشانگرهای Bmac0018-144 و Bmac0018-146 با مکان ژنی 6H و ۶۰/۴ سانتی‌مورگان، نشانگرهای Bmag0009-177 و Bmag0009-180، HVM74-189 و HVM74-191 با مکان ژنی 6H و ۶۱/۱ سانتی مورگان برای دو صفت طول دوره‌ی پرشدن دانه و تعداد روز تا رسیدن فیزیولوژیک مشترک بودند.

شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه در شرایط نرمال

نتایج تجزیه ارتباطی بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM) نشان داد که چهار نشانگر (مکان ژنی) ارتباط معنی‌داری ($P > 0.01$) با صفات مورد مطالعه در شرایط نرمال داشتند (جدول ۲). در این آزمایش یک مکان با صفت تعداد روز تا پنجه‌دهی، یک مکان با صفت تعداد روز از ساقه‌دهی تا سنبله‌دهی و دو مکان با تعداد روز تا رسیدن فیزیولوژیک مرتبط بودند. بین سایر نشانگرها و صفات مورد مطالعه در شرایط نرمال، ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه در شرایط تنش شوری

نتایج تجزیه ارتباطی بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM) نشان داد که ۴۶ نشانگر (مکان ژنی) ارتباط معنی‌داری ($P > 0.01$) با صفات مورد مطالعه در شرایط تنش شوری داشتند (جدول ۳). در این آزمایش ۱۵ مکان با صفت تعداد روز تا پنجه‌دهی (روی کروموزوم‌های 2H، 3H، 4H و 7H)، یک مکان با تعداد روز تا ساقه‌دهی (روی کروموزوم 3H)، یک مکان با تعداد روز تا سنبله‌دهی، ۱۵ مکان با طول دوره‌ی پرشدن دانه (2H، 6H و 7H) و ۱۴ مکان با تعداد روز تا رسیدن فیزیولوژیک (2H و 6H)، مرتبط بودند. بین سایر

شدند. همچنین، الیوج و همکاران (۶)، اینوستروزا و همکاران (۱۶)، ال - دناری و همکاران (۵)، لانگ و همکاران (۲۰)، سبئی و همکاران (۳۱)، الاخدر و همکاران (۳۴) و فان و همکاران (۸) از نقشه‌یابی ارتباطی در شرایط تنش شوری در جو استفاده کردند.

در آزمایشی که توسط فان و همکاران (۸) انجام شد، ۲۰۶ ژنوتیپ جو با ۴۰۸ نشانگر، ژنوتیپ‌یابی و برای تحمل به تنش شوری مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه تجزیه ارتباطی با هر دو روش مدل خطی معمولی و مدل خطی مخلوط براساس ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی انجام شد و در نهایت ۲۴ نشانگر که ارتباط زیادی با صفات داشتند، شناسایی

جدول ۲- نشانگرهای مرتبط با صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های جو براساس MLM در شرایط نرمال
Table 2. Markers associated with studied traits in barley genotypes based on MLM under normal conditions

صفت	نشانگر	R ²	P-value	کروموزوم	موقعیت نشانگر (CM)
روز تا پنجه‌دهی	E45M49-382	۰/۱۲	۰/۰۰۰۲۶۰	unmapped	-
روز از ساقه‌دهی تا سنبله‌دهی	E38M54-112	۰/۱۱	۰/۰۰۰۴۲۳	unmapped	-
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	E35M48-400	۰/۱۰	۰/۰۰۰۸۷۰	5H	۱۷۸/۷
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	E38M50-464	۰/۱۰	۰/۰۰۰۸۴۲	unmapped	-

جدول ۳- نشانگرهای مرتبط با صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های جو براساس MLM برای شرایط تنش شوری
Table 3. Markers associated with studied traits in barley genotypes based on MLM under salt stress conditions

صفت	نشانگر	R ²	P-value	کروموزوم	موقعیت نشانگر (CM)
روز تا پنجه‌دهی	E35M48-133	۰/۱۱	۰/۰۰۰۳۹۵	2H	۵۸/۴
روز تا پنجه‌دهی	E35M48-250	۰/۳۴	۰/۰۰۰۰۰۰	3H	۲۲/۷
روز تا پنجه‌دهی	E35M48-326	۰/۲۱	۰/۰۰۰۰۰۱	unmapped	-
روز تا پنجه‌دهی	E35M54-180	۰/۲۲	۰/۰۰۰۰۰۰	7H	۱۴۰/۵
روز تا پنجه‌دهی	E35M54-309	۰/۲۳	۰/۰۰۰۰۰۰	3H	۶۳/۸
روز تا پنجه‌دهی	E35M54-310	۰/۲۳	۰/۰۰۰۰۰۰	3H	۶۳/۸
روز تا پنجه‌دهی	E37M33-215	۰/۱۱	۰/۰۰۰۵۸۲	4H	۸۰/۶
روز تا پنجه‌دهی	E45M49-068	۰/۱۵	۰/۰۰۰۰۴۱	unmapped	-
روز تا پنجه‌دهی	E45M49-210	۰/۱۶	۰/۰۰۰۰۱۹	unmapped	-
روز تا پنجه‌دهی	E45M49-255	۰/۳۵	۰/۰۰۰۰۰۰	unmapped	-
روز تا پنجه‌دهی	E45M49-285	۰/۲۰	۰/۰۰۰۰۰۲	unmapped	-
روز تا پنجه‌دهی	E45M49-341	۰/۲۰	۰/۰۰۰۰۰۲	unmapped	-
روز تا پنجه‌دهی	E45M49-358	۰/۱۷	۰/۰۰۰۰۱۰	unmapped	-
روز تا پنجه‌دهی	E45M49-380	۰/۱۱	۰/۰۰۰۳۹۹	unmapped	-
روز تا پنجه‌دهی	E45M55-164	۰/۱۲	۰/۰۰۰۲۸۶	unmapped	-
روز تا ساقه‌دهی	Bmag0606-147	۰/۱۱	۰/۰۰۰۵۶۶	3H	۱۱۲/۵
روز تا سنبله‌دهی	E33M54-063	۰/۱۲	۰/۰۰۰۲۵۱	unmapped	-
دوره‌ی پرشدن دانه	E33M54-063	۰/۲۷	۰/۰۰۰۰۰۰	unmapped	-
دوره‌ی پرشدن دانه	E38M55-226	۰/۱۳	۰/۰۰۰۱۶۴	unmapped	-
دوره‌ی پرشدن دانه	E45M49-226	۰/۲۱	۰/۰۰۰۰۰۱	unmapped	-
دوره‌ی پرشدن دانه	EBmac0603-170	۰/۱۰	۰/۰۰۰۷۷۲	7H	۳۸/۳
دوره‌ی پرشدن دانه	Bmac0134-151	۰/۱۴	۰/۰۰۰۰۷۷	2H	۷/۹
دوره‌ی پرشدن دانه	Bmac0134-173	۰/۱۴	۰/۰۰۰۰۸۰	2H	۷/۹
دوره‌ی پرشدن دانه	Bmac0134-142	۰/۱۴	۰/۰۰۰۰۸۲	2H	۷/۹
دوره‌ی پرشدن دانه	Bmac0134-132	۰/۱۴	۰/۰۰۰۰۸۲	2H	۷/۹
دوره‌ی پرشدن دانه	Bmac0134-160	۰/۱۴	۰/۰۰۰۰۸۱	2H	۷/۹
دوره‌ی پرشدن دانه	Bmac0018-144	۰/۱۷	۰/۰۰۰۰۱۱	6H	۶۰/۴
دوره‌ی پرشدن دانه	Bmac0018-146	۰/۱۷	۰/۰۰۰۰۱۱	6H	۶۰/۴
دوره‌ی پرشدن دانه	Bmag0009-177	۰/۱۶	۰/۰۰۰۰۲۴	6H	۶۱/۱
دوره‌ی پرشدن دانه	Bmag0009-180	۰/۱۶	۰/۰۰۰۰۲۴	6H	۶۱/۱
دوره‌ی پرشدن دانه	HVM74-189	۰/۱۹	۰/۰۰۰۰۰۲	6H	۶۱/۱
دوره‌ی پرشدن دانه	HVM74-191	۰/۱۹	۰/۰۰۰۰۰۲	6H	۶۱/۱
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	E33M54-063	۰/۲۳	۰/۰۰۰۰۰۰	unmapped	-
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	E38M55-226	۰/۱۱	۰/۰۰۰۵۱۶	unmapped	-
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	E45M49-226	۰/۲۱	۰/۰۰۰۰۰۱	unmapped	-
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	Bmac0134-151	۰/۱۳	۰/۰۰۰۰۹۴	2H	۷/۹
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	Bmac0134-173	۰/۱۳	۰/۰۰۰۰۹۲	2H	۷/۹
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	Bmac0134-142	۰/۱۳	۰/۰۰۰۰۹۱	2H	۷/۹
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	Bmac0134-132	۰/۱۴	۰/۰۰۰۰۸۸	2H	۷/۹
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	Bmac0134-160	۰/۱۳	۰/۰۰۰۰۹۳	2H	۷/۹
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	Bmac0018-144	۰/۱۷	۰/۰۰۰۰۱۰	6H	۶۰/۴
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	Bmac0018-146	۰/۱۷	۰/۰۰۰۰۱۰	6H	۶۰/۴
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	Bmag0009-177	۰/۱۵	۰/۰۰۰۰۴۰	6H	۶۱/۱
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	Bmag0009-180	۰/۱۵	۰/۰۰۰۰۴۰	6H	۶۱/۱
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	HVM74-189	۰/۲۰	۰/۰۰۰۰۰۲	6H	۶۱/۱
روز تا رسیدن فیزیولوژیک	HVM74-191	۰/۲۰	۰/۰۰۰۰۰۲	6H	۶۱/۱

و Bmac0134-160 با مکان ژنی 2H و ۷/۹ سانتی‌مورگان و نشانگرهای Bmac0018-144 و Bmac0018-146 با مکان ژنی 6H و ۶۰/۴ سانتی‌مورگان، Bmag0009-177، Bmag0009-180 و HVM74-191 با مکان ژنی 6H و ۶۱/۱ سانتی‌مورگان بودند. همانطور که مشاهده می‌شود نشانگرهای Bmag0009 و HVM74 با مکان ژنی مشابه برای این صفت شناسایی شده‌اند که نشان می‌دهد احتمالاً این صفت با این مکان ژنی ارتباط زیادی دارد. شهرکی و همکاران (۳۳) تحت تنش شوری در جو تحت شرایط تنش شوری تعداد ۳ مکان ژنی روی کروموزوم‌های 2H، 3H و 7H که به ترتیب در جایگاه‌های ۶۳/۳، ۹۲/۳ و ۹۴ سانتی‌مورگان قرار داشتند، شناسایی کردند با نتایج ما در مکان ژنی 2H و 7H مشابه است. محمدی و همکاران (۲۳) در شرایط تنش خشکی این صفت را روی کروموزوم‌های 1H، 3H، 5H و 7H شناسایی کردند. الاخدر و همکاران (۴) تحت تنش شوری این صفت را روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 4H و 5H مکان‌یابی کردند.

صفت تعداد روز تا رسیدن فیزیولوژیک

برای هر دو شرایط نرمال و تنش شوری ارتباط معنی‌دار مشاهده شد. در شرایط نرمال نشانگر E35M48-400 با مکان ژنی 5H و ۱۷۸/۷ سانتی‌مورگان و نشانگر E38M50-464 با مکان ژنی ناشناخته و برای تنش شوری ۱۴ نشانگر روی کروموزوم‌های 2H، 6H (نشانگر Bmag0009) و 6H (نشانگر HVM74) که به ترتیب در مکان ۷/۹، ۶۰/۴ و ۶۱/۱ شناسایی شدند.

طبق نتایج، هیچ نشانگر یکسانی در دو محیط مشاهده نشد. ۱۴ نشانگر محیط تنش E33M54-063، E38M55-226 و E45M49-226 با مکان ژنی ناشناخته، نشانگرهای Bmac0134-151، Bmac0134-173، Bmac0134-142، Bmac0134-132 و Bmac0134-160 با مکان ژنی 2H و ۷/۹ سانتی‌مورگان، نشانگرهای Bmac0018-144 و Bmac0018-146 با مکان ژنی 6H و ۶۰/۴ نشانگرهای Bmag0009-177، Bmag0009-180، HVM74-189 و HVM74-191 با مکان ژنی 6H و ۶۱/۱ بودند. می‌شود نشانگرهای Bmag0009 و HVM74 با مکان ژنی مشابه برای این صفت شناسایی شده‌اند که نشان می‌دهد احتمالاً این صفت با این مکان ژنی ارتباط زیادی دارد. طبق نتایج این پژوهش، ساختار ژنتیکی جمعیت به دو زیرجمعیت فرعی (K=۲) تقسیم گردید که نتایج حاصل از رسم بارپلات نیز مؤید آن بود. در نقشه‌یابی ارتباطی به روش MLM، در شرایط نرمال و تنش شوری به ترتیب ۴ و ۴۶ نشانگر ارتباط معنی‌داری با صفات مورد مطالعه نشان دادند و تغییرات قابل توجهی از صفات مورد مطالعه را توجیه نمودند. در این مطالعه چندین مکان ژنی کمی مشترک برای صفات مورد مطالعه شناسایی شد. وجود نشانگرهای مشترک در میان صفات می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که استفاده از روش MLM می‌تواند در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات فنولوژیک مؤثر باشد. شناسایی

صفت روز تا پنجه‌دهی

این صفت در شرایط نرمال با نشانگر E45M49-382 با مکان ژنی ناشناخته و در شرایط تنش شوری با مکان ژنی روی کروموزوم‌های 3H، 3H، 2H، 4H و 7H که به ترتیب در جایگاه‌های ۶۳/۸، ۲۲/۷، ۵۸/۴، ۸۰/۶ و ۱۴۰/۵ سانتی‌مورگان قرار داشتند، مرتبط بود. این ۱۵ نشانگر شامل E35M48-326، E45M49-068، E45M49-210، E45M49-255، E45M49-285، E45M49-341، E45M49-358، E45M49-380 و E45M49-381 و E45M55-164 با مکان ژنی ناشناخته، E35M54-309 و E35M54-310 با مکان ژنی 3H و ۶۳/۸، E35M48-250 با مکان ژنی 3H و ۲۲/۷ سانتی‌مورگان، E35M48-133 با مکان ژنی 2H و ۵۸/۴ سانتی‌مورگان، E37M33-215 با مکان ژنی 4H و ۸۰/۶ سانتی‌مورگان و E35M54-180 با مکان ژنی 7H و ۱۴۰/۵ سانتی‌مورگان بودند. همانطور که مشاهده می‌شود تمام نشانگرهای شناسایی شده در دو محیط متفاوت بودند. طبق نتایج، این نشانگرها تنها در محیط تنش شوری شناسایی شدند و بیانگر وجود پیوستگی این نشانگرها با تنش شوری است.

صفت روز تا ساقه‌دهی

برای این صفت تنها در شرایط تنش و نشانگر Bmag0606-147 که روی کروموزوم 3H و موقعیت مکانی ۱۱۲/۵ سانتی‌مورگان قرار دارد شناسایی شد که نشان‌دهنده پیوستگی این نشانگر با ژن‌های متحمل به شوری است. شهرکی و همکاران (۳۳) تحت تنش شوری در جو تعداد چهار QTL روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 5H و 7H شناسایی کردند که به ترتیب در جایگاه‌های ۶۷/۶، ۴۱/۶، ۶۵/۳ و ۹۳/۳ قرار داشتند و با نتایج ما در مکان ژنی 7H مشابه است.

صفت روز تا سنبله‌دهی

برای این صفت یک ارتباط معنی‌دار با نشانگر E33M54-063 در آزمایش تنش شوری مشاهده شد. ال دناری و همکاران (۵) تحت تنش شوری در جو این صفت را روی کروموزوم‌های 2H و 3H مکان‌یابی کردند.

صفت روز از ساقه‌دهی تا سنبله‌دهی

در آزمایش نرمال نشانگر E38M54-112 با مکان ژنی ناشناخته مرتبط بود.

صفت طول دوره‌ی پرشدن دانه

در شرایط تنش شوری ۱۵ نشانگر روی کروموزوم‌های 2H، 7H، 6H (نشانگر Bmag0009) و 6H (نشانگر HVM74) که به ترتیب در جایگاه‌های ۳۸/۳، ۷/۹، ۶۰/۴ و ۶۱/۱ سانتی‌مورگان قرار داشتند شناسایی شد که این نشانگرها تنها در محیط تنش شوری شناسایی شدند بیانگر وجود پیوستگی این نشانگرها با شوری است. این ۱۵ نشانگر شناسایی شده در محیط تنش شوری شامل نشانگرهای E33M54-063، E38M55-226 و E45M49-226 با مکان ژنی ناشناخته، EBmac0603-170 با مکان ژنی 7H و ۳۸/۳ سانتی‌مورگان، نشانگرهای Bmac0134-151، Bmac0134-132، Bmac0134-142 و Bmac0134-173

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد آقای دکتر سید علی طباطبایی و محققان بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و مدیر شرکت زرین قطره آریا جناب آقای مهندس محمدرضا قاسمی نژاد راثینی که به اجرای این پژوهش کمک کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به دلیل فراهم آوردن زمینه‌ی تحقیق سپاس‌گزاری می‌شود.

ژن‌ها و مکان‌های اصلی مؤثر در مقاومت به شوری در جو می‌تواند درک بهتری از اصلاح ژنتیکی مقاومت به شوری را در اختیار اصلاح‌گر قرار دهد و در شناخت مکانیسم‌های مولکولی و فیزیولوژیکی، کمک شایانی کند. پیشنهاد می‌شود از نشانگرهایی که دارای ارتباط قوی‌تر با صفات خاص هستند (در ارتباط صفت و نشانگر ضریب تبیین یا R^2 بزرگتری دارند)، می‌توان در اشیاع نقشه‌های پیوستگی استفاده نمود. نتایج بدست آمده از این مطالعه اطلاعات ارزشمندی در زمینه‌ی مبنای ژنتیکی صفات مورد مطالعه ارائه می‌دهد که از این اطلاعات می‌توان در برنامه‌های مختلف اصلاحی و از جمله انتخاب به کمک نشانگر درجو استفاده نمود.

منابع

- Colmer, T.D., R. Munns and T.J. Flowers. 2005. Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45: 1425-1443.
- Ellis, R.P., B.P. Forster, D. Robinson, L.L. Handley, D.C. Gordon, J.R. Russell and W. Powell. 2000. Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century? *Journal of Experimental Botany*, 51(342): 9-17.
- Elakhdar, A., M.A. EL-Sattar, K. Amer, A. Rady and T. Kumamaru. 2016. Genetic diversity and association analysis among Egyptian barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes with different adaptations to saline conditions analyzed by SSR markers. *Australian Journal of crop science*, 10(5): 637-645.
- Elakhdar, A., M.A. EL-Sattar, K. Amer, A. Rady and T. Kumamaru. 2016. Population structure and marker-trait association of salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Comptes Rendus Biologies*, 8 pp.
- EL-Denary, M.E., M.N. Noaman, A.F. Abdelkhalek and S.A. Mariey. 2012. Marker traits association of some barley genotypes under soil salinity condition using SSR markers. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 41: 229-252.
- Eleuch, L., A. Jilal, S. Grando, S. Ceccarelli, M.K. Schmising, A. Hajer, A. Daaloul and M. Baum. 2008. Genetic diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of barley germplasm using SSR markers. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8): 1004-1014.
- Falush, D., M. Stephens and J.K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4): 1567-1587.
- Fan, Y., G. Zhou, S. Shabala, Z.H. Chen, S. Cai, C. Li and M. Zhou. 2016. Genome-wide association study reveals a new QTL for salinity tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-10.
- Flint-Garcia, S.A., J.M. Thornsberry and E.S. Buckler. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 357-74.
- Flint-Garcia S.A., A.C. Thuillet, J. Yu, G. Pressoir, S.M. Romero and S.E. Mitchell. 2005. Maize association population: A High resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant Journal*, 44(6): 1054-1064.
- Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55(396): 307-319.
- Flowers, T.J. and S.A. Flowers. 2005. Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agricultural Water Management*, 78(1): 15-24.
- Ghavami, F., E.M. Elias, S. Mamidi, O. Ansari, M. Sargolzaei, T. Adhikari, M. Mergoum and S.F. Kianian. 2011. Mixed model association mapping for Fusarium head blight resistance in Tunisian-derived durum wheat populations, G3: Genes/Genomes/Genetics, 1(3): 209-218.
- Gupta, P.K., S. Rustgi and P.L. Kulwal. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*, 57: 461-485.
- Hittalmani, S., N. Huang, B. Courtois, R. Venuprasad, H.E. Shashidhar, J.Y. Zhuang, K.L. Zheng, G.F. Liu, G.C. Wang, J.S. Sidhu, S. Srivantaneeyakul, V.P. Singh, P.G. Bagali, H.C. Prasanna, G. McLaren and G.S. Khush. 2003. Identification of QTL for growth and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 679-690.
- Inostroza, L., A. delPozo, I. Matus, D. Castillo, P. Hayes, S. Machado and A. Corey. 2008. Association mapping of plant height, yield, and yield stability in recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a source of donor alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background. *Molecular Breeding*, 23: 365-376.
- Kilian, B., H. Ozkan, J. Kohl, A. von Haeseler, F. Barale, O. Deusch, A. Brandolini, C. Yucel, W. Martin and F. Salamini. 2006. Haplotype structure at seven barley genes: relevance to gene pool bottlenecks, phylogeny of ear type and site of barley domestication. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(3): 230-241.
- Kraakman, A.T.W., F. Martinez, B. Mussiraliev, F.A. Van Eeuwijk and R.E. Niks. 2006. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Molecular Breeding*, 17(1): 41-58.

19. Kraakman, A.T.W., R.E. Niks, P.M.M.M. Van den berg, P. Stam and F.A. Van Eeuwijk. 2004. Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics*, 168(1): 435-446.
20. Long, N.V., O. Dolstra, M. Malosetti, B. Kilian, A. Graner, R.G.F. Visser and C.G. van der Linden. 2013a. Association mapping of salt tolerance in barley-(*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126(9): 2335-2351.
21. Maas, E.V. and G.J. Hoffman. 1977. Crop salt tolerance-current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*, 103(2): 115-134.
22. Mohamed, N.E.M., A.A. Said, A.A. Naz, A. Bauer, B. Mathew, H. Schumann, A. Reinders and J. Léon. 2014. Association Mapping for Shoot Traits Related to Drought Tolerance in Barley. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 3(1): 68-79.
23. Mohammadi, M., A. Taleei, H. Zeinali, M.R. Naghavi, S. Ceccarelli, S. Grando and M. Baum. 2005. QTL analysis for phenology traits in doubled haploid population of barley. *Agricultural and Biological Chemistry*, 7(5): 820-823.
24. Moose, S.P. and R.H. Mumm. 2008. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*, 147(3): 969-977.
25. Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167(3):645-663.
26. Munns R. and M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651-681.
27. Munoz-Amatriain, M., A. Cuesta-Marcos, J.B. Endelman, J. Comadran, J.M. Bonman, H.E. Bockelman, S. Chao, J. Russell, R. Waugh, P.M. Hayes and G.J. Muehlbauer. 2014. The USDA Barley Core Collection: Genetic Diversity, Population Structure, and Potential for Genome-Wide Association Studies. *PLoS ONE*, 9(4): 88-94.]
28. Pasam, R.K., R. Sharma, M. Malosett, F.A. van Eeuwijk, G. Haseneyer, B. Kilian and A. Graner. 2012. Genome-wide association studies for agronomical traits in a worldwide spring barley collection. *BMC Plant Biology*, 12(16): 1-22.
29. Pauli, D., G.J. Muehlbauer, K.P. Smith, B. Cooper, D. Hole, D.E. Obert, S.E. Ullrich and T.K. Blake. 2014. Association Mapping of Agronomic QTLs in US Spring Barley Breeding Germplasm. *The Plant Genome*, 7(3): 1-15.
30. Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
31. Sbei, H., K. Sato, T. Shehzad, M. Harrabi and K. Okuno. 2014. Detection of QTLs for salt tolerance in Asian barley (*Hordeum vulgare* L.) by association analysis with SNP markers. *Breeding Science*, 64(4): 378-388.
32. Schulte, D., T.J. Close, A. Graner, P. Langridge, T. Matsumoto, G. Muehlbauer, K. Sato, A.H. Schulman, R. Waugh, R.P. Wise and N. Stein. 2009. The International Barley Sequencing Consortium-At the Threshold of Efficient Access to the Barley Genome. *Plant Physiology*, 149(1): 142-147
33. Shahraki, H., B.A. Fakhri and M. Allahdou. 2013. Genomic regions mapping for some phenological traits associated with salt tolerance in doubled haploid lines of barley (*Hordeum-vulgare* L.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6(7): 403-409
34. Spataro, G., B. Tiranti, P. Arcaleni, E. Bellucci, G. Attene, R. Papa, Z.P. Spagnoletti and V. Negri. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(7): 1281-1291.
35. Sreenivasulu, N., A. Graner and U. Wobus. 2008. Barley Genomics: An Overview. *International Journal of Plant Genomics*, Article, 48: 58-62.
36. Tuberosa, R., S. Salvi, M.C. Sanguineti, P. Landi, M. Maccaferri and S. Conti. 2002. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield in drought stressed maize: case studies, shortcomings and perspectives. *Annals of Botany*, 89(7): 941-963.
37. Yu, J. and E.S. Buckler. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2): 155-160.
38. Zhang, Q., C. Wu, F.Y. Ren and C. Zhang. 2012. Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. *Journal of Crop Science*, 6(6): 1131-1138.
39. Zhu, C., M. Gore, E.S. Buckler and J. Yu. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome*, 1(1): 5-20.

Association Mapping of Some Phenological Traits in Barley under Salt Stress

Mahdiyeh Zare Kohan¹, Nadali Babaeian Jelodar², Reza Aghnoum³,
Seyed Ali Tabatabaee⁴ and Seyed Kamal Kazemi Tabar⁵

1- PhD Student, Department of Plant breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding Author: mahdiyehzare65@gmail.com)

2 and 5- Professor and Associate Professor, Department of Plant breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

3- Assistant Professor of Seed and Plant Improvement Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

4- Associate Professor of Seed and Plant Improvement Research Department, Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yazd, Iran

Received: December 26, 2016

Accepted: February 26, 2017

Abstract

Current research was performed to identify molecular markers associated to phenological traits including days to tillering, days to stem elongation, days to heading, days from stem elongation to heading, grain filling period and days to physiological maturity based on 407 AFLP and SSR markers in 148 barley cultivars by association mapping. This experiment was conducted in two alpha lattice designs with five incomplete blocks in two replications under normal and salt stress ($EC=12 \text{ dsm}^{-1}$) conditions in Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, Yazd, Iran in 2015-16. Association mapping was evaluated based on mixed linear model (MLM) using Structure and Tassel soft wares. Based on the 407 markers used in this study, population genetic structure subdivided into two subpopulations ($K=2$) that barplot results also confirmed it. In association mapping based on MLM, 4 and 46 markers showed significant relation with assessed traits under normal and salt stress, respectively and explained considerable variations of studied traits. In this study, some co-localized QTLs were identified for studied traits. Common markers between of traits can be due to pleiotropic effects or linkage between of genomic regions involved in these traits. Results of the current study presented useful information about the genetic basis of the studied traits and can be used in different barley breeding programs including marker-assisted selection.

Keywords: Association mapping, Barley, Mixed linear model, Population genetic structure, Salt stress