دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تجزیه همبستگی نشانگرهای اختصاصی مرتبط با زمان گلدهی در جو

زینب رستمی[1]، آرش فاضلی[2] و مهرشاد براری[3]

۱ و ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام
۲- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام (نویسنده مسوول: a.fazeli@ilam.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۳۱

چکیده

به منظور شناسایی رابطه‌ی نشانگرهای طول روز موثر بر زمان گلدهی در گیاه جو و چهار ژن اختصاصی (FT4, FT3, FT2, Ppd-H1)، ۲۶ ژنوتیپ و رقم جو زراعی و وحشی در دو شرایط مزرعه و گلخانه مورد مطالعه قرار گرفتند. گیاهان در هر دو شرایط کشت شده و صفت فنولوژیک روز تا ۵۰ در صد گلدهی در هر دو شرایط یادداشت برداری شد. علاوه بر این، ۱۱ صفت مورفولوژی نیز جداگانه در شرایط گلخانه اندازه‌گیری شد. ارتباط صفت با مارکر نشان داد که ژن Ppd-H1 بیشترین همبستگی منفی و معنی‌دار با صفت روز تا گلدهی را در هر دو شرایط داشته است که بیانگر این است که آلل غالب Ppd-H1 موجب کاهش تعداد روز تا گلدهی تحت شرایط روز بلندی می‌شود. نشانگرهایی که به طور معنی‌دار با صفت روز تا گلدهی مرتبط بودند در تجزیه رگرسیون مورد استفاده قرار گرفتند که بر اساس آن، بیشترین تغییرات توسط نشانگر Ppd-H1 در هر دو شرایط توجیه شد و این بیانگر نقش عمده این ژن در بروز تغییرات تعداد روز تا گلدهی می‌باشد. در نهایت، ژنوتیپ‌های زودرس با آلل غالب Ppd-H1 به عنوان بهترین ژنوتیپ‌ها برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی و مناطق با فصول رشدی کوتاه و تنش‌های محیطی انتهایی معرفی می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: زمان گلدهی، آغازگرهای اختصاصی، جو، تجزیه همبستگی، تجزیه رگرسیون

مقدمه

زمان مناسب گلدهی یک صفت ضروری برای تکثیر و بقای گونه‌های گیاهی است و منجر به گرده افشانی، رشد، تکامل و پراکنش مناسب دانه‌ها می‌شود (۱). به‌طورکلی مدت زمان طول فصل رشدی یک غله بستگی به طول مدت دوره رشدی (جوانه‌زنی- سنبله‌دهی و رسیدگی) دارد. در گندم و جو کنترل طول مدت جوانه‌زنی- سنبله‌دهی اساسا توسط سیستم ژنتیکی ژن‌های *vrn*[1] (پاسخ به ورنالیزاسیون) و Ppd[2] (پاسخ فتوپریودی به طول روز) روز، با عناوین *Ppd-H1* و *Ppd-H2* (ژن کاندیدای *HvFT3*) وجود دارد که به ترتیب روی کروموزوم‌های 2HS و 1HL قرار گرفته‌اند (۹). آلل‌های غالب *Ppd-H1* (حساس به فتوپریود طول روز) تعیین‌کننده اصلی پاسخ به روزبلندی در جو هستند و باعث گلدهی زود هنگام تحت روزهای بلند می‌شوند ولی تحت روز کوتاهی تاثیری در گلدهی ندارند (۹،۵). گانگ وانگ و همکاران (۱۶) در بررسی ارتباط ژن‌های طول روز و بهاره‌سازی با QTL برای صفات زمان گلدهی و زراعی، نتیجه گرفتند که ۴ ژن *Ppd-H1*، *VRN-H2* و *VRN-H3* *اثرات* قابل توجهی روی زمان گلدهی لاین‌های الحاقی جو وحشی نشان می‌دهند و در این تحقیق مشخص شد که *Ppd-H1* تعیین‌کننده عمده پاسخ به روزبلندی در گیاه جو می‌باشد. همچنین نشان دادند *که Ppd-H1*، *VRN-H3* *VRN-H2* اثرات پلیوتروپیک[3] روی عملکرد و صفات مرتبط با عملکرد دارند. در مطالعه سباستین فائور و همکاران (۳) بر روی خانواده ژنی Flowering-Locus T-like در گیاه جو (*Hordeum vulgar* L.) گزارش شد که ژن‌های *HvFT* منابع مهمی از تنوع زمان گلدهی در گیاه جو را فراهم می‌کنند و همچنین نشان دادند که ژن *HvFT1* تحت شرایط روزبلندی در زمان انتقال فاز از رویشی به زایشی و ژن‌های *FT2* و *FT4* بعد از انتقال و توسعه گلدهی در سطح بالایی بیان شدند و همچنین *FT3* یک ژن کاندیدا برای *Ppd-H2* و یک QTL موثر بر زمان گلدهی تحت شرایط روز کوتاه می‌باشد. همچنین زلوتینا و همکاران (۱۷) از مارکرهای آللی خاص، ژن‌های *Vrn* و *Ppd* برای پیش‌بینی طول فصل رشدی در واریته‌های جو استفاده کردند و نشان دادند که واریته‌های جو دارای آلل غالب *Ppd-H1* نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر نسبت رشدی (از لحاظ سنبله‌دهی) و بلوغ زودتری تحت شرایط روز بلندی داشتند. شعف و همکاران (۱۲) نیز در مطالعه تجزیه ارتباطی زمان گلدهی و تنوع تک نوکلئوتیدی ژن‌های *Ppd-H1*، *HvCO1* و *HvGI* بر روی ۵۲ رقم ایرانی و خارجی جو دریافتند که تنوع نوکلئوتیدی بالایی در ناحیه اگزون ژن *Ppd-H1* وجود دارد ولی ژن‌های *GI* و *CO* تنوع محدودتری نشان دادند. همچنین ارتباط معنی‌داری بین ژن‌های *GI* و *Ppd-H1* با زمان گلدهی مشاهده شد به‌طوری‌که به تفاوت یک هفته‌ای در زمان گلدهی منجر گردید. گوگردچی و همکاران نیز در بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط صفات فنولوژیک مرتبط با فرار از خشکی در ۵۵ لاین جو با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره نتیجه گرفتند که شناسایی نشانگرهای مثبت می‌تواند در برنامه‌های مکان یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات فنولوژیک و عملکرد مرتبط با فرار از خشکی مورد استفاده قرار گیرد و شناسایی ژنوتیپ‌های جو فرار کننده از خشکی را تسهیل کرده و موجب صرفه‌جویی در وقت، هزینه و نیروی انسانی گردد

1- Vernalization 2-Photoperiod 3- Pleiotropic

(۶). یکی از نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق نشانگر CAPS[1] می‌باشد که به معنای توالی چند شکل تکثیر یافته برشی و جز پلی مورفیسم‌های تک نوکلوتیدی (SNP)[2]، می‌باشد. در این نوع نشانگر تشخیص مکان SNP توسط آنزیم‌های برشی مناسب که توالی تغییر یافته توسط SNP را شناسایی می‌کنند همراه با یک روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز صورت می‌گیرد (۱۳،۱۰). نشانگر دیگر مورد استفاده در این تحقیق نشانگر Indel[3] می‌باشد که مخفف (درج/ الحاق)، و به معنای تفاوت در طول توالی‌های DNA می‌باشد (۱۵،۲). تعیین ژنوتیپ این نوع نشانگرها با روش‌های ساده تفکیک بر اساس اندازه صورت می‌گیرد. به‌طورکلی هدف این تحقیق ارزیابی و مطالعه میزان تنوع و تفرق جمعیت‌ها و توده‌های بومی مناطق غرب کشور، جهت شناسایی ژنوتیپ‌های زودرس از لحاظ فنوتیپی و ژنتیکی جهت استفاده بهینه از آنها در برنامه‌های به‌نژادی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۲۶ ژنوتیپ و رقم جو وحشی و زراعی، که توسط بانک ژن غلات و حبوبات غرب کشور واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام جمع‌آوری شده بود و چند نمونه از بذور جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان ایلام استفاده شد (جدول۱). کشت مواد آزمایشی در شرایط گلخانه در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار درون گلدان هایی با مساحت پانزده صدم مترمربع انجام گردید. آزمایش در شرایط مزرعه در قالب طرح آگمنت بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی در شرایط آب و هوایی استان ایلام در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام، با مشخصات جغرافیایی، ۴۶ درجه و ۲۸ دقیقه طول جغرافیایی، و ۳۳ درجه و ۳۷ دقیقه عرض جغرافیایی و با ارتفاع ۱۱۷۴ متر از سطح دریا انجام گرفت. DNA ژنومی از برگ‌های تازه و جوان در مرحله ۳ تا ۴ برگی طبق روش دویل و همکاران (۱۹۸۷) استخراج گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۸ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۰ میلی‌مولار، ۱/۸ میکرولیتر dNTP ۱ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر پیش رونده و معکوس (غلظت ۱۰ پیکومول) (جدول۲)، ۰/۴ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد)، ۲ میکرولیتر بافر واکنش (غلظت x 10)، و در نهایت با ۱۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه اپندروف (Ependrof)، با برنامه زمانی ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (دمای توصیه شده جهت اتصال آغازگرها)، ۱ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط و تکثیر صورت گرفت و در نهایت بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. فرآورده‌های حاصل با استفاده از الکتروفورز افقی و ژل آگارز۱ و ۱/۵ درصد به ترتیب برای نتایج استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در بافر TAE,1X و رنگ‌آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید انجام گردید. برای آنزیم‌های *NdeI* و *BstNI* واکنش در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر، شامل ۵ میکرولیتر محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ۲ میکرولیتر بافر واکنش *X*۱۰، ۱/۵ میکرولیتر آنزیم، و در نهایت با ۶/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام گردید. برای آنزیم *SwaI* واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ۲ میکرولیتر بافر واکنش X۱۰، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم، و در نهایت با ۱۴/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام گردید. فرایند انکوباسیون در دستگاه اپندروف با برنامه زمانی ۳ ساعت در دمای ۳۰ درجه انجام شد (جدول۲). الکتروفورز فراورده آنزیم‌ها همانند فراورده‌های حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گردید. امتیازدهی باندها به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) برای هر نشانگر انجام شد. ابتدا تجزیه واریانس ساده صفت فنولوژیک تعداد روز تا گلدهی بر روی نمونه‌های مورد مطالعه انجام شد. سپس ارتباط صفت روز تا گلدهی با نشانگرهای اختصاصی در هر دو شرایط گلخانه و مزرعه با استفاده از ضریب همبستگی پیرسونی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی رابطه خطی بین متغیر مستقل (نشانگرهای اختصاصی) و متغیر وابسته (صفت روز تا گلدهی) از روش رگرسیون خطی چند گانه گام به گام استفاده شد. در این تحقیق نشانگرهایی که به طور معنی‌دار با صفت روز تا گلدهی مرتبط بودند وارد مدل شدند. به منظور بررسی اثرات پلیوتروپیک نشانگرهای اختصاصی بر روی سایر صفات مورفولوژیک ارزیابی شده در شرایط گلخانه از تجزیه همبستگی پیرسونی استفاده شد. در نهایت برای بررسی میزان شباهت بین جمعیت‌های مورد استفاده و گروه‌بندی آنها، دندروگرام اطلاعات مولکولی و فنوتیپی صفت روز تا گلدهی ترسیم شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 انجام گردید.

1- Cleaved Amplified Polymorphism Sequence (CAPS) 2- Single Nucleotide Polymorphism 3- Insertion-Deletion

جدول ۱- نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. The samples used in this study

ردیف	کد استفاده شده	نام علمی	محل جمع‌آوری
۱	۱	*HoereumVulgar*	ایلام، شیروان ، زردلان
۲	۴	*H.Vulgar*	کرمانشاه، اسلام آباد،حمیل
۳	۵	*H.Vulgar*	چشمه سرده
۴	۶	*H.Vulgar*	کرمانشاه، قصرشیرین
۵	۷	*H.Vulgar*	آیلام ، آبدانان، گل گل
۶	۸	*H.Spontaneum*	کرمانشاه، اسلام آباد، حمیل
۷	۱۰	*H.Vulgar*	ایلام، دره شهر، کل سفید
۸	۱۲	*H.Spontaneum*	ایلام، شیروان، تخم بلوط
۹	۱۴	*H.Spontaneum*	لرستان، پلدختر
۱۰	۱۵	*H.Vulgar*	کرمانشاه، اسلام آباد، حمیل
۱۱	۱۷	*H.Vulgar*	ایلام، دره شهر، کل سفید
۱۲	۱۸	*H.Vulgar*	ایلام، دره شهر، ماژین
۱۳	۲۰	*H.Spontaneum*	ایلام، ایوان، باباگیر
۱۴	۲۲	*H.Spontaneum*	ایلام، بلبین
۱۵	۲۵	*H.Vulgar*	ایلام، دره شهر، گله‌دار
۱۶	۲۷	*H.Vulgar*	کرمانشاه، قصرشیرین
۱۷	۲۸	*H.Spontaneum*	ایلام، دره شهر، کل سفید
۱۸	۲۹	*H.Vulgar*	ایلام، ایوان، باباگیر
۱۹	۳۰	*H.Spontaneum*	ایلام، ایوان، اسماعیلی
۲۰	۳۱	*H.Vulgar*	رقم زراعی
۲۱	۳۳	*H.Vulgar*	ایلام، دره شهر، کل سفید
۲۲	۳۵	*H.Vulgar*	ایلام، شیروان، بردبل
۲۳	۳۸	*H.Spontaneum*	ایلام، دره شهر، سراب
۲۴	۴۱	*H.Spontaneum*	ایلام، سه راهی ملکشاهی-بدره
۲۵	۴۲	*H.Spontaneum*	ایلام، روبروی کارخانه سیمان
۲۶	۴۶	*H.Spontaneum*	ایلام، دره شهر، سراب- کبیر کوه

جدول ۲- آغازگرها و آنزیم‌های برشی مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. Primers and restriction enzymes used in this study

نشانگر	توالی ۳-۵	دمای اتصال (C)	اندازه قطعه (bp)	آنزیم برشی
Ppd-H1	F-CCATGCTGCCAACTATGGTA R-TCCCAAAGTTCCTCTCTTTTCTC	۵۰	۲۰۹	–
HvFT2	F-GGGTGCTTGAGATTGTCCAT R-TCGTAGACGCATCTTTGTCG	۵۰	۵۳۴	NdeI
HvFT3	F-TTTTGCCCATCCTTAACACC R-CTGATCCACCTTCCCTTTGA	۵۰	۶۶۲	SwaI
HvFT4	F-CGTTGAGATTGGTGGTGATG R-GTACGGGGATGTTTGTACGG	۵۰	۵۵۴	BstNI

نتایج و بحث

تجزیه واریانس ساده صفت تعداد روز تا گلدهی بر روی ۲۶ ژنوتیپ مورد مطالعه نشان داد که ژنوتیپ‌ها دارای تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشند و این نشان دهنده تنوع ژنتیکی زیاد بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ صفت مذکور می‌باشد. طبق نتایج بدست آمده از تجزیه همبستگی در شرایط گلخانه (جدول ۳)، صفت روز تا گلدهی با نشانگر اختصاصی *Ppd-H1* بیشترین همبستگی منفی و معنی‌دار (r = -۰/۴۹۶*) را در سطح احتمال آماری ۵ درصد نشان داد که منطبق با این واقعیت است که حضور آلل غالب *Ppd-H1* با کاهش تعداد روز تا گلدهی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه همراه است. همچنین همبستگی منفی و معنی‌داری (r = -۰/۴۵۸*)، بین مارکر *FT3* و صفت روز تا گلدهی مشاهده شد که با توجه به نتایج حاصل از بررسی صفت روز تا گلدهی در شرایط مزرعه‌ای که در ادامه عنوان شده است علت این امر ممکن است به دلیل اثر متقابل ژنوتیپ در محیط و یا وجود ژنوتیپ‌های بهاره در بین ارقام باشد که در آنها آلل غالب (*Ppd-H2*) *FT3* موجب کاهش تعداد روز تا گلدهی می‌شود. همچنین همبستگی منفی و غیرمعنی‌داری (r= -۰/۲۸۹)، نیز بین مارکر *FT2* و روز تا گلدهی نیز وجود داشت که بیانگر این واقعیت است که حضور آلل *FT2* در مواقعی که آلل غالب *Ppd-H1* وجود دارد بیشتر است و موجب کاهش تعداد روز تا گلدهی می‌شود. آلل *FT4* نیز همبستگی ضعیف مثبت و غیر معنی‌دار (r =۰/۱۰۰)، با صفت روز تا گلدهی نشان داد که بیانگر نقش جزئی این نشانگر در بروز زمان گلدهی می‌باشد. طبق نتایج بدست آمده از تجزیه همبستگی در شرایط مزرعه‌ای (جدول ۳)، صفت روز تا گلدهی با نشانگر اختصاصی *Ppd-H1* بیشترین همبستگی منفی و معنی‌دار (r= -۰/۷۰۷**) را در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد که بیانگر این است که شرایط مزرعه‌ای در بروز آلل غالب و اثر آن بر کاهش تعداد روز تا گلدهی موثرتر بوده است. همچنین نشانگرهای *FT2, FT3* و *FT4* همبستگی منفی و غیرمعنی‌داری در بروز صفت روز تا گلدهی داشتند که نشان‌دهنده نقش ضعیف این ژن‌ها در کاهش زمان تعداد روز

تا گلدهی می‌باشد. این نتیجه با بررسی انجام شده توسط ترونر و همکاران (۱۴)، که نشان دادند بین زمان سنبله‌دهی ارقام جو تحت شرایط روز بلندی و حضور آلل غالب *Ppd-H1* همبستگی وجود دارد مطابقت داشته است. در رگرسیون خطی چندگانه صفت روز تا گلدهی و نشانگرهایی که به طور معنی‌دار با این صفت مرتبط بودند تحت شرایط گلخانه از بین ۴ نشانگر، دو نشانگر *Ppd-H1* و *FT3* و در شرایط مزرعه‌ای نیز از بین ۴ نشانگر، تنها نشانگر *Ppd-H1* رابطه معنی‌داری داشته و در نتیجه وارد مدل شدند. بنابراین بر طبق نتایج رگرسیونی بدست آمده در شرایط گلخانه نشانگر *Ppd-H1* رابطه معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با تغییرات صفت روز تا گلدهی نشان داد و میزان تغییرات تبیین شده توسط این نشانگر ۲۸/۸۶ درصد بوده است. در شرایط مزرعه‌ای نیز نشانگر *Ppd-H1* رابطه معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با صفت تعداد روز تا گلدهی نشان داده و تغییرات تبیین شده توسط آن ۵۱/۲۷ درصد بدست آمده است (جدول ۴). این نتایج با نتایج گانگ وانگ و همکاران (۱۶) مطابقت دارد که نشان دادند آلل غالب *Ppd-H1* در میان ۱۰ ژن کاندیدای مرتبط با طول روز و نیاز به بهاره‌سازی، بالاترین سهم تغییرات تبیین شده (۲۲/۷) را بر عهده دارد.

جدول ۳- تجزیه همبستگی نشانگرهای اختصاصی با صفت روز گلدهی در شرایط گلخانه و مزرعه

Table 3. Correlation analysis of specific markers with the days to flowering trait in the greenhouse and field

گلخانه/مزرعه	*Ppd-H1*	*FT2*	*FT3*	*FT4*	زمان گلدهی
Ppd-H1	۱	۰/۰۲۶	۰/۱۸۵	۰/۰۴۹	-۰/۷۰۷**
FT2	۰/۰۲۱۶	۱	۰/۱۸۵	-۰/۱۸۵	-۰/۱۰۴
FT3	۰/۱۸۵	۰/۱۸۵	۱	۰/۱۳۱	-۰/۲۱۰
FT4	۰/۰۴۹	-۰/۱۸۵	۰/۱۳۱	۱	-۰/۱۳۰
زمان گلدهی	-۰/۴۹۶*	-۰/۲۸۹	-۰/۴۵۸*	۰/۱۰۰	۱

** و *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد

جدول ۴ - خلاصه نتایج رگرسیون گام به گام صفت روز تا گلدهی با نشانگرهای اختصاصی در هر دو شرایط مزرعه و گلخانه

Table 4. Results summary of stepwise regression of days to flowering trait with specific markers in both greenhouse and field conditions

شرایط	صفت	نشانگر	R^2	P- Value
گلخانه	روز تا گلدهی	*Ppd-H1*	۲۸/۸۶	۰/۰۱
	روز تا گلدهی	*FT3*		۰/۰۶۸
مزرعه	روز تا گلدهی	*Ppd-H1*	۵۱/۲۷	۰ /۰۰

به علت اینکه نشانگرهای اختصاصی مورد مطالعه بصورت پلیوتروپیک روی سایر صفات زراعی تاثیر دارند لذا تجزیه همبستگی آنها با سایر صفات مورفولوژی اندازه‌گیری شده در شرایط گلخانه با استفاده از ضریب پیرسون محاسبه گردید (جدول ۵). نتایج همبستگی نشان داد که نشانگر *Ppd-H1* بیشترین همبستگی مثبت را با صفات عملکرد و وزن صد دانه دارا بوده است. نشانگر *FT2* با صفت وزن صد دانه همبستگی مثبت و با صفت تعداد دانه در سنبله همبستگی منفی و معنی‌دار (r= -۰/۵۸۴**) نشان داد. همچنین نشانگر *FT3* با صفتی مانند طول برگ پرچم همبستگی مثبت و معنی‌دار (r=۰/۴۹۳*) و با صفاتی نظیر ارتفاع بوته همبستگی منفی را نشان داد (جدول ۵). نشانگر *FT4* نیز با صفاتی مانند تعداد سنبله و عملکرد دانه همبستگی مثبت و معنی‌دار (r= ۰/۵۹۲** و r=۰/۶۴۴**) و با صفت عملکرد زیستی همبستگی منفی و معنی‌دار (r= -۰/۳۹۹$^{+}$) نشان داد (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه همبستگی یازده صفت موفولوژیک اندازه‌گیری شده در گلخانه با نشانگرهای اختصاصی

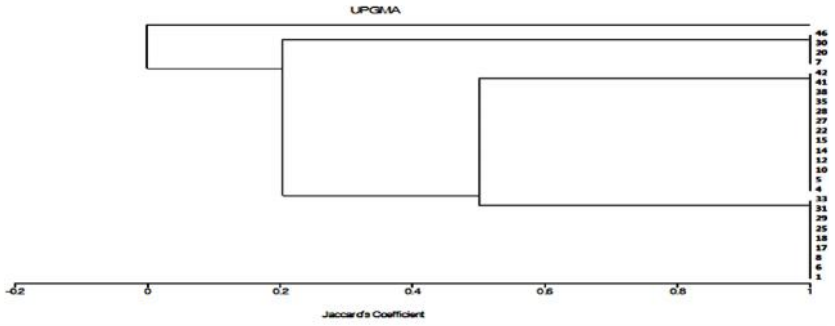
Table 5. Correlation analysis of eleven morphological traits that have measured in greenhouse with specific markers

صفت	*FT4*	*FT3*	*FT2*	*Ppd-H1*
ارتفاع بوته	۰/۱۱۲	-۰/۳۸۶	۰/۰۳۳	۰/۰۰۶
طول پدانکل	-۰/۱۴۰	۰/۰۵۰	۰/۱۹۰	۰/۱۵۳
طول سنبله	۰/۲۵۱	۰/۲۹۴	۰/۱۴۴	۰/۰۰۲
طول برگ پرچم	-۰/۱۰۳	۰/۴۹۳*	۰/۲۲۰	۰/۰۴۷
طول ریشک	-۰/۱۴۰	۰/۳۴۰	۰/۱۸۳	۰/۲۱۲
دانه در سنبله	۰/۲۶۰	-۰/۲۴۷	-۰/۵۸۴**	-۰/۰۳۸
وزن سنبله	۰/۰۱۶	۰/۴۱۹$^{+}$	۰/۰۱۹	۰/۰۸۵
وزن صددانه	۰/۲۲۵	۰/۳۸۸	۰/۳۹۱$^{+}$	۰/۲۴۷
عملکرد بیولوژیک	-۰/۳۹۹$^{+}$	-۰/۰۳۳	-۰/۱۶۸	-۰/۰۵۱
تعداد سنبله	۰/۶۴۴**	-۰/۱۸۹	-۰/۴۰۷	-۰/۰۷۰
عملکرد دانه	۰/۵۹۲**	۰/۱۹۲	-۰/۲۰۳	۰/۲۸۶

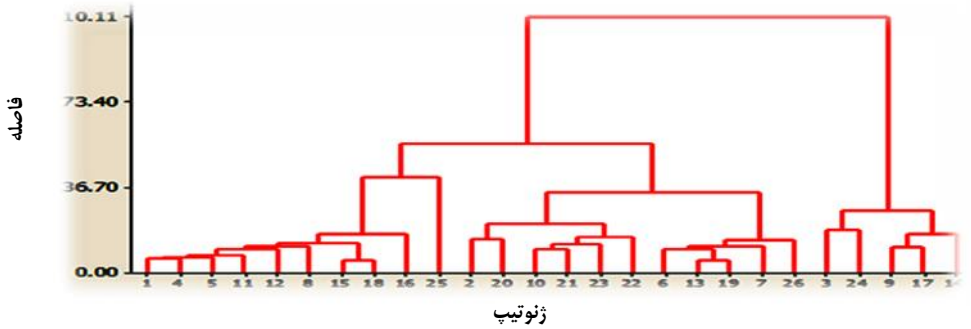
** و *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد

تجزیه خوشه‌ای اطلاعات مولکولی: در این تحقیق تجزیه کلاستر به روش فاصله ژنتیکی جاکارد و الگوریتم UPGMA انجام شد (شکل ۱). در گروه اول ژنوتیپ‌های ۱، ۶، ۸، ۱۷، ۱۸، ۲۵، ۲۹، ۳۱، ۳۳ قرار قرار گرفتند. این ژنوتیپ‌ها از لحاظ

مولکولی دارای ژن‌های اصلی گلدهی از جمله آلل غالب *Ppd-H1* و آلل FT3 می‌باشند و نهایتاً از لحاظ صفت روز تا گلدهی در رده ژنوتیپ‌های زودرس تا متوسط رو به زودرس قرار دارند. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۴، ۵، ۱۰، ۱۲،۱۴، ۱۵، ۲۲، ۲۷، ۲۸، ۳۵، ۳۸، ۴۱ و ۴۲ می‌باشد که در این گروه ژنوتیپ‌های دارای ژن دیررسی (آلل مغلوب *ppd-H1*) و ژنوتیپ‌های فاقد ژن *Ppd-H1* قرار گرفتند و این گروه از لحاظ صفت روز تا گلدهی در رده ژنوتیپ دیررس تا متوسط رس قرار گرفته‌اند. گروه سوم نیز شامل ژنوتیپ‌های ۷، ۳۰، ۲۰ و ۴۶ می‌باشد که بر اساس داده‌های مولکولی دارای آلل غالب *Ppd-H1* و فاقد آلل FT3 مربوط به زمان گلدهی بوده‌اند و از لحاظ صفت تعداد روز تا گلدهی در رده ژنوتیپ‌های زودرس قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای صفت روز تا گلدهی: برای متغیرهای کمی کلاسترها از روش تجزیه سلسله مراتبی استفاده می‌شود. در کلاستر اول ژنوتیپ‌های ۱، ۶، ۷، ۱۷، ۱۸، ۱۲، ۲۵، ۲۹، ۲۷، و ۴۲ قرار گرفتند که از لحاظ صفت تعداد روز تا گلدهی ژنوتیپ‌های زودرس می‌باشند. در کلاستر دوم ژنوتیپ‌های ۴، ۳۱، ۱۵، ۳۳، ۳۸و ۳۵ قرار دارند که از لحاظ صفت فوق الذکر متوسط رو به زودرس می‌باشند. کلاستر سوم ژنوتیپ‌های ۸، ۲۰، ۳۰، ۱۰، و ۴۶ را در بر دارد که ژنوتیپ‌های متوسط رو به دیررس هستند و در کلاستر چهارم ژنوتیپ‌های ۵، ۴۱، ۱۴، ۲۸ و ۲۲ قرار دارند که از لحاظ صفت تعداد روز تا گلدهی ژنوتیپ‌های دیررس می‌باشند. نتایج حاصل از گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مولکولی تا حد زیادی گروه‌بندی فوق را تایید می‌کند.



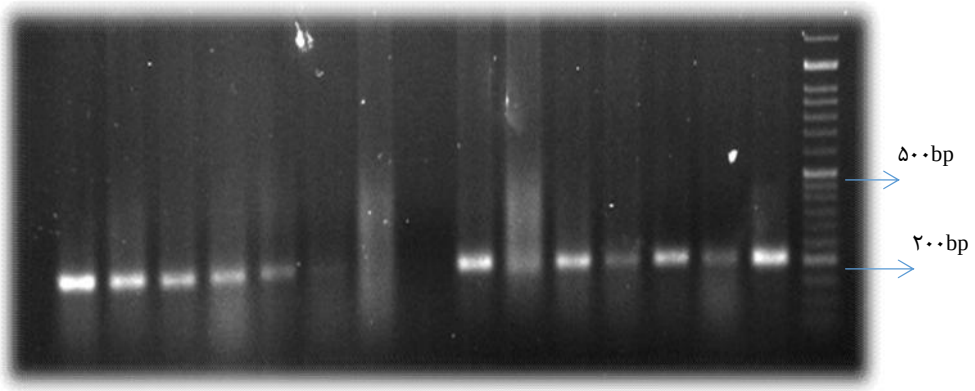
شکل ۱- دندوگرام مولکولی بر اساس ۴ آغازگر اختصاصی
Figure 1. molecular dendrogram based on 4 specific markers



شکل ۲- دندوگرام صفت روز تا گلدهی نمونه های مورد مطالعه
Figure 2. dendrogram of days to flowering time trait in our studied samples

به‌طورکلی با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق مشاهده شد که در ژنوتیپ‌هایی که از لحاظ نشانگر *Ppd-H1* دارای ۹ جفت باز حذف شده بوده‌اند تعداد روز تا گلدهی کمتری نسبت به ژنوتیپ‌هایی که از لحاظ این نشانگر دارای ۹ جفت باز الحاقی بودند نشان داده شد (شکل ۳) که منطبق با این واقعیت است که وجود حذف در این نشانگر دال بر حضور آلل غالب *Ppd-H1* می‌باشد و این آلل موجب کاهش صفت روز تا گلدهی به میزان زیادی هم در شرایط مزرعه‌ای و هم شرایط گلخانه‌ای شده است. اما در بعضی ژنوتیپ‌ها که از لحاظ نشانگر*Ppd-H1* دارای ۹ جفت باز الحاقی بوده‌اند دوره رویشی طولانی‌تر و در واقع تعداد روز تا گلدهی بیشتری را طی کرده‌اند که این امر حاکی از این واقعیت است که وجود ۹ جفت باز الحاقی در این نشانگر مرتبط با وجود آلل مغلوب *ppd-H1* می‌باشد و این آلل موجب افزایش روز تا گلدهی در شرایط روز بلندی می‌شود که با یافته‌های زلوتینا و همکاران (۱۷) مطابقت دارد. بنابراین طبق نتایج بدست آمده تاخیر در گلدهی ناشی از حضور آلل مغلوب *ppd-H1* می‌باشد که این تاخیر در ارقام و ژنوتیپ‌های زمستانه موجب مواجه شدن آنها با خشکی آخر فصل و در نتیجه کاهش عملکرد گیاه می‌گردد. اما در ارقام بهاره تاخیر در گلدهی ناشی از آلل مغلوب

ppd-H1 و در کنار آلل مغلوب (*ppd-H2*) آل*FT3* سبب افزایش طول دوره رویشی به منظور افزایش ظرفیت منبع و پتانسیل آن در دوران زایشی می‌شود و در نهایت موجب افزایش عملکرد در آنها می‌گردد. بنابراین حضور آلل مغلوب *ppd-H1* در این مطالعه سبب افزایش تعداد روز تا گلدهی در تعدادی از ژنوتیپ‌ها شد که این نتایج با کلاستربندی ژنوتیپ‌ها و ارقام جوهای زراعی و وحشی هم از لحاظ فنوتیپی و هم مولکولی هم خوانی دارد به طوری که ژنوتیپ‌هایی که دارای آلل غالب *Ppd-H1* (۹ جفت باز حذف)، بودند در یک گروه قرار گرفتند و از لحاظ صفت روز تا گلدهی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها زودرس تر بوده‌اند و ژنوتیپ‌های دارای آلل مغلوب*ppd-H1* از لحاظ گلدهی دیررس بوده و در یک گروه قرار گرفتند. به علاوه در این مطالعه مشاهده شد که همبستگی منفی بین صفت روز تا گلدهی با نشانگر اختصاصی *FT3* وجود دارد که نشان‌دهنده این مهم می‌باشد که ممکن است آلل غالب (*Ppd-H2*)، در ژنوتیپ‌های بهاره فاقد ژن *Ppd-H1* موجب کاهش تعداد روز تا گلدهی شده است و یا بیان ضعیفی در شرایط روز بلندی داشته است و موجب کاهش تعداد روز تا گلدهی شده باشد. این نتیجه با مطالعات لیور و همکاران (۹) و کیکوچی و همکاران (۸) مطابقت دارد. به علاوه بر طبق نتایج بدست آمده توسط گانگ و همکاران (۱۶)، حضور نشانگر *FT2* در ارقام زودرس و در زمان بروز آلل غالب *Ppd-H1* بیشتر است و در این ارقام توسط آنزیم برشی *NdeI* بصورت ۲ باند ۲۰۶+ ۳۲۸ جفت بازی دیده می‌شود که این نتیجه با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد به طوری که در اکثر ژنوتیپ‌های با نوع حذف نشانگر *Ppd-H1*، نشانگر FT2 نیز به صورت دو باند ۲۰۶+۳۲۸ جفت بازی ظاهر شده است و این نشانگر نیز در کنار آلل غالب *Ppd-H1* موجب کاهش تعداد روز تا گلدهی می‌شود. اما آنزیم‌های *SwaI* و*BstNI* در هیچ ژنوتیپی عمل برش انجام ندادند. همچنین بر طبق نتایج بدست آمده ژنوتیپ‌های جو دو ردیفه نسبت به شش ردیفه زودرس‌تر و ژنوتیپ‌های زراعی نیز نسبت به ژنوتیپ‌های وحشی زودتر وارد فاز گلدهی شدند که این نتایج با نتایج شعف و همکاران (۱۲) مطابقت دارد. بر طبق نتایج جونیس و همکاران (۷)، جوهای با آلل غالب *Ppd-H1* می‌توانند در مناطق با فصول رشدی کوتاه و تابستان خشک سازگاری بیشتری داشته باشند و بالعکس ژنوتیپ‌های غیر پاسخگو به شرایط روزبلندی یعنی *ppd-H1* بایستی در مناطق با فصول رشدی طولانی و تابستان مرطوب سازگارترند. در تحقیق حاضر ژنوتیپ‌های ۱۶،۷،۲۵،۱۷،۱۸،۲۹ که در هر دو شرایط گلخانه و مزرعه تعداد روز تا گلدهی کمتری را سپری کردند و دارای آلل غالب *Ppd-H1* *بودند* زودرس‌تر بوده و عملکرد بالاتری را نیز نشان دادند. بنابراین، این ژنوتیپ‌ها مناسب مناطق با فصول رشدی کوتاه جهت فرار از تنش خشکی آخر فصل می‌باشند. هم چنین از ژنوتیپ‌های جو وحشی دارای آلل غالب *Ppd-H1* و پاسخگو نسبت به شرایط روز بلندی از جمله ژنوتیپ‌های ۲۰، ۳۰ و ۴۶ که فنوتیپ نسبتاً زودرسی نشان دادند می‌توان برای برنامه به‌نژادی و انتقال ژن زودرسی به سایر ارقام و ژنوتیپ‌ها استفاده نمود. همچنین علاوه بر اهمیت شناسایی روابط ژنتیکی صفات مرتبط با تنش خشکی در جو و تاثیر آنها بر عملکرد دانه شناخت و بررسی خصوصیات موفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه جو جهت تعیین اهمیت هر یک از آنها در افزایش عملکرد و استفاده در برنامه‌های به‌نژادی نیز از اهمیت خاصی برخوردار است. به‌طوری‌که در بررسی انجام شده توسط نخعی بدرآبادی و همکاران جهت تعیین روابط بین انتقال ماده خشک و برخی صفات مورفولوژیک بر روی ۴۰ ژنوتیپ جو به کمک تجزیه به عامل‌ها تحت شرایط تنش کم آبی چنین استنباط شد که در هر سه سطح تنش صفات سهم انتقال ماده خشک از ساقه و سپس پدانکل به دانه بسیار حایز اهمیت بودند و با افزایش سطح تنش صفات مقدار انتقال ماده خشک از ساقه و پدانکل، وزن هزار دانه، ارتفاع بوته، طول میانگره دوم، طول پدانکل و طول محور سنبله اهمیت بیشتر و صفات کارایی انتقال از ساقه و پدانکل به دانه، تعداد دانه در سنبله و عملکرد دانه اهمیت کمتری در گزینش بهترین ژنوتیپ‌ها پیدا کردند. به‌طورکلی، صفات مربوط به انتقال می‌توانند شاخص‌های مهمی برای ارزیابی و انتخاب ژنوتیپ‌های جو تحت شرایط تنش خشکی به حساب آیند (۱۱).



شکل ۳- الگوی تکثیر نشانگر *Ppd-H1* در برخی نمونه‌ها
Figure 3. Show amplification the pattern of Ppd-H1 marker in some samples

منابع

1. Baurle, I. and C. Dean. 2006. The timing of developmental transitions in plants. Journal of cell, 4: 655-664.
2. Erixon, P. and B. Oxelman. 2008. Whole-gene positive selection, elevated synonymous substitution rates, duplication, and indel evolution of the chloroplast *clpP1* gene. PLoS ONE, Journal of Pone, 86-113 pp.
3. Faure, S., J. Higgins, A. Turner and D.A. Laurie. 2007. The FLOWERING LOCUS T-like gene family in barley *(Hordeum vulgare*). Journal of Genetics, 1: 599-609.
4. Fisher, R.A. and R. Maurer. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars I. Grain yield responses. Journal of Agricultural Research, 5: 897-912.
5. Griffiths, J.F., J.H. Miller. D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbert. 1996. An Introduction to Genetic Analysis. 7th eden. Freeman W.H, 800 pp.
6. Gougerdchi, V., S. Dezhsetan, M. Izadi Dogonchi, M.A. Ebrahimi, A. Asghari and B. Sadeghzadeh. 2017. Assessment of Genetic Diversity and Association Analysis for Phonological Traits Related to Drought Escape in Barley Lines using Microsatellite Markers, 8: 60-69 (In Persian).
7. Jones, H., F.J. Leigh, I. Mackay, M.A. Bower, L.M.J. Smith, M.P. Charles, G. Jones, M.K. Jones, T.A. Brown and W. Powell. 2008. Population-Based Resequencing Reveals That the Flowering Time Adaptation of Cultivated Barley Originated East of the Fertile Crescent. Journal of Molecular Biology and Evolution, 10: 2211-19.
8. Kikuchi, R., H. Kawahigashi, T. Ando, T. Tonooka and H. Handa. 2009. Molecular and Functional Characterization of PEBP Genes in Barley Reveal the Diversification of Their Roles in Flowering. Journal of Plant Physiology, 3: 1341-1353.
9. Laurie, D.A., N. Prachett, J.H. Bezant and J.W. Snape. 1995. RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter 9 spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. Journal of Genome, 3: 575-585.
10. Lee, S. 2012. Converting SNPs to CAPS and CAPS and Dcaps marker. Dept, of Horticulture and Crop Science, 32-59 pp.
11. Nakhaeei Badrabad, M., M. Shokrpour, A. Asghari and A.O. Esfandyari. 2012. Determining Relationships among Dry Matter Remobilization and Some Morphological Traits in Barley Genotypes Using Factor Analysis Metho under Low Water Stress. Journal of Crop Breeding, 4: 109-122 (In Persian).
12. Shaaf, S., M.H. Bihamta, A. Talei, V.A. Moohamadi and B. Kilian. 2012. Association analysis of single nucleotide variation in flowering time genes Ppd-H1, HvCO1, HvGI, in barley (*H. vulgar*). Journal of Novin Genetic, 2: 179-191 (In Persian).
13. Thiel, T., R. Kota, I. Grosse, N. Stein and A. Graner. 2004. SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. Journal of Oxford, 1: 5 pp.
14. Turner, A., J. Beales, S. Faure, R.P. Dunford and D.A. Laurie. 2005. The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. Journal of Science, 57: 1031-1034.
15. Väli, U., M. Brandström, M. Johansson and H. Ellegren. 2008. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. Journal of BMC Genet, 8: 1471-2156.
16. Wang, G., I. Schmalenbach, M.V. Korff, J. Le´on, B. Kilian, J. Rode and K. Pillen. 2010. Association of barley photoperiod and vernalization genes with QTLs for flowering time and agronomic traits in a BC_2DH population and a set of wild barley introgression lines. Theoretical and Applied Genetics, 8: 1559-1574.
17. Zlotina, M.M., O.N. Kovaleva, I.G. Loskutov and E.K. Potokina. 2013. The Use of Allele Specific Markers of the Ppd and Vrn Genes for Predicting Growing Season Duration in Barley Cultivars. Russian Journal of Genetics, 4: 254-264.

Correlation Analysis of Specific Markers Linked to Flowering Time in Barley (*Hordeum vulgare* L.)

Zeinab Rostami[1], Arash Fazeli[2] and Mehrshad Barary[3]

1 and 3- Graduated M.Sc. and Assistant Professor, Ilam University
2- Assistant Professor, Ilam University (Corresponding Author: a.fazeli@ilam.ac.ir)
Received: November 4, 2014 Accepted: April 20, 2015

Abstract

In order to identify the relationships between photoperiod effects on flowering time in barley and four specific genes *(FT2, FT3, FT4* and *Ppd-H1*), 26 cultivated and wild genotypes were studied in both greenhouse and filed conditions. The Plants were grown at two conditions and phenological traits of days to 50% flowering were recorded in both situations. In addition, the morphology of the 11 traits were measured separately in greenhouse conditions. Marker-trait assosiation showed that *Ppd-H1* gene had the most significant negative correlation with days to flowering in both conditions, indicating dominant allele *Ppd-H1*, reduced the number of days to flowering under long day conditions. Marker was significantly associated with the trait of day to flowering was used in regression analysis and represented the largest variation in *Ppd-H1* in both conditions and explained the expression of this gene has a major role in the number of days to flowering. In conclusion, genotypes with dominant *Ppd-H1* allele are introduced as the best for using in breeding programs and for growing in the areas with short growing seasons.

Keywords: Barley, Correlation analysis, Flowering time, Regression analysis, Specific markers