

شناسایی QTL‌های پیوسته به برخی صفات دانه در گندم نان با استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی

رضا میردریکوند^{۱*}، گودرز نجفیان^۲، محمدرضا بی‌همتا^۳ و آسا ابراهیمی^۴

۱- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، خرم‌آباد

۲- دانشیار، موسسه‌ی اصلاح تهیه‌ی نهال و بذر، کرج، تهران

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران

۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۱۹)

چکیده

این مطالعه به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته به برخی صفات دانه گندم انجام شد. یک صد ژنوتیپ گندم، در قالب طرح آلفا لایس با دو تکرار کشت شدند و پس از برداشت دانه‌ی ژنوتیپ‌های مورد آزمایش، صفاتی چون سختی دانه، طول، عرض و وزن هزار دانه‌ی آن‌ها اندازه‌گیری شد. نقشه‌یابی ارتباطی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، در کل ژنوم و همچنین برخی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته به کیو.تی.ال‌ها (QTLs)، انجام گرفت. از تعداد ۹۶ نشانگر به منظور بررسی ساختار جمعیت و ۲۲ نشانگر پیوسته به صفات استفاده شد. ساختار جمعیت، با استفاده از نرم‌افزار Structure تعیین شد و ژنوتیپ‌ها به شش زیر جمعیت تقسیم شدند. در مجموع تعداد ۳۵ نشانگر پیوسته به صفات با استفاده از نرم‌افزار Tassel شناسایی شدند که از این تعداد هشت نشانگر SSR پیوسته به کیو.تی.ال بودند. سایر نشانگرها که با صفات پیوستگی نشان دادند برای بررسی ساختار جامعه مورد استفاده قرار گرفته بودند. نشانگرهای پیوسته به کیو.تی.ال برای صفات، سختی دانه در کروموزوم 5B، 5D و 6D، طول، عرض و وزن هزاردانه در کروموزوم‌های 1B، 2B، 2D، 5B، 5D، 6D و 7B و 1A شناسایی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که نقشه‌یابی ارتباطی می‌تواند به عنوان یک روش مکمل برای مکان‌یابی کیو.تی.ال به منظور انتخاب به کمک نشانگر در گندم نان مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: صفات دانه، گندم، نقشه‌یابی ارتباطی، QTL

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: mirderikvand@khoiau.ac.ir

مقدمه

یکی از کاربردهای مهم نشانگرهای مولکولی، بهبود و افزایش کارایی روشهای مرسوم اصلاح نباتات از طریق انتخاب غیرمستقیم توسط نشانگرهای مولکولی پیوسته به صفات است. نشانگرهای مولکولی در مورد صفات تک ژنی و هم در مورد مکانهای کنترل کننده صفات کمی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نشانگرهای مولکولی چون تحت تأثیر محیط قرار نمی‌گیرند، در تمام مراحل رشدی گیاه می‌توان آن‌ها را بکار برد (Rafalski et al., 1996). نقشه‌یابی پیوستگی (Linkage mapping) و نقشه‌یابی ارتباطی (Association mapping) روش‌هایی هستند که برای مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمی بکار می‌روند. مکان‌یابی ارتباطی روشی است برای پی بردن به اثرات ژن‌ها بر مبنای نقشه‌یابی عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium mapping) و تکمیل کننده تجزیه کیوتی.ال در پیشبرد اهداف مورد نظر در اصلاح مولکولی گیاهان است (Bressegello and Sorrells, 2006). دقت روش مکان‌یابی کیوتی.ال تحت تأثیر عواملی همانند میزان چندشکلی در بین دو والد، اندازه جمعیت، توزیع کاسما در ژنوم و اندازه‌گیری فنوتیپ قرار می‌گیرد (Somers et al., 2003). مکان‌یابی ارتباطی یا مکان‌یابی عدم تعادل گامتی برای تعیین ماهیت ژنتیکی برخی بیماری‌های انسانی برای مدت‌های زیادی مورد استفاده قرار گرفته است (Cardon and Bell, 2001). این روش در سال‌های اخیر برای شناسایی روابط ژنوتیپ-فنوتیپ در گیاهان بکار رفته است (Oraguzie and Wilcox, 2007). برخلاف روش مرسوم تجزیه پیوستگی که یک جمعیت طراحی شده برای پیش‌بینی روابط ژنوتیپ و فنوتیپ مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jannink and Jansen, 2001)، نقشه‌یابی ارتباطی به ایجاد جمعیت خالص ژنتیکی نیاز ندارد (Zhu et al., 2008). اهمیت خصوصیات دانه‌ی گندم و بررسی روابط بین این صفات در پژوهش‌های متعددی مطالعه شده است.

گندم‌های با اندازه‌ی دانه بزرگ‌تر نسبت به گندم‌های دانه کوچک، به‌طور قابل توجهی عملکرد آرد بیشتری دارند (Marshall et al., 1986). ویرزما و همکاران (Wiersma et al., 2001)، در مطالعه‌ی خود دریافتند که در گندم انتخاب دانه‌هایی که اندازه‌ی بزرگ‌تر دارند منجر به افزایش عملکرد آرد می‌شود. برسگلو و سورلز (Bressegello and Sorrells, 2006)، بین طول، وزن، سطح بذر و کیفیت آسیاب شدن دانه گندم رابطه‌ی مثبت را گزارش دادند. دهولاکیا و همکاران (Dholakia et al., 2001) و برسگلو و سورلز (Bressegello and Sorrells, 2007)، همبستگی مثبت و معنی‌دار بین صفات وزن دانه، طول و عرض دانه گزارش کردند. توی و همکاران (Toi et al., 2010) همبستگی بسیار بالا و معنی‌دار بین این صفات گزارش کردند. رامیا و همکاران (Ramya et al., 2010) نیز همبستگی مثبت و معنی‌دار بین وزن هزار دانه، طول و عرض دانه را گزارش کردند.

در مطالعات متعددی نواحی ژنومی مرتبط با صفات وزن و ابعاد دانه گندم با استفاده از لاین‌های مونوزومیک (Giura and Saulescu, 1996; Varshney et al., 2000) و تجزیه کیوتی.ال (Ammiraju et al., 2001 and 2004; Dholakia et al., 2003; Kumar et al., 2006; Bressegello and Sorrells, 2006 and 2007) شناسایی شده‌اند. شناخت اساس ژنتیکی خصوصیات دانه‌ی گندم از موارد ضروری برای اصلاح ارقام زراعی گندم است (Ramya et al., 2010). سختی دانه گندم مربوط به بافت آندوسپرم است و به‌طور کلی گندم‌ها یا دارای دانه‌ی سخت و یا دارای دانه نرم هستند. این صفت در آسیاب شدن و کیفیت نهایی آرد تأثیر دارد. دانه‌های نرم به راحتی آسیاب شده و گرانول‌های نشاسته در آن‌ها دست نخورده باقی می‌مانند و نشاسته در آن‌ها خسارت کمتری می‌بیند (Giroux and Morris, 1997). مطالعات پیشین در مورد وراثت صفت سختی دانه گندم نشان داده است که این صفت تحت کنترل یک ژن اصلی و ژن‌های فرعی تغییردهنده است. مکان ژن سختی دانه (Hardness)، روی

گرفت (جدول ۱). از صد ژنوتیپ ۸ نمونه گندم دوروم و مابقی گندم نان بودند، دوروم‌ها فقط در آزمایش مزرعه‌ای کشت شدند. یک‌صد نمونه در قالب طرح آلفا لایس با ۲ تکرار در مزرعه تحقیقاتی موسسه‌ی تحقیقات اصلاح و تهیه‌ی نهال و بذر کشت شدند ولی در آزمایش مولکولی فقط از ۹۲ گندم نان استفاده شد. پس از برداشت از هر رقم نمونه بذری تهیه شد و صفات سختی دانه، طول، عرض و وزن هزار دانه‌ی آنها اندازه‌گیری شد. صفت سختی دانه توسط دستگاه Near Infrared Reflectance طبق پروتکل استاندارد ۷۰A-۳۹، انجمن آمریکایی شیمیدانان غلات (American Association of Cereal Chemists)، وزن هزار دانه با استفاده از ترازوی دقیق و طول و عرض دانه با استفاده از ریزسنج، اندازه‌گیری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB، انجام شد (Doyle and Doyle 1987). به‌منظور حذف RNA از نمونه‌ها، ۱-۲ میکرولیتر از آنزیم RNase (1mg/ml) برای هر نمونه استفاده شد. کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه پیکودراپ مدل Pico200 (ساخت کمپانی Picodrop انگلستان)، تعیین گردید. سپس از DNAها نمونه‌هایی با غلظت ۵۰ng تهیه شد.

تعداد ۹۶ نشانگر به‌منظور بررسی ساختار جمعیت و ۲۲ نشانگر پیوسته به صفات مورد استفاده قرار گرفتند که توالی تمام آغازگرها در پایگاه اینترنتی به نشانی <http://wheat.pw.usda.gov/GG2> قابل دسترس است. برای انجام واکنش‌های PCR از روش رودر و همکاران (Roder et al., 1998) و به این صورت استفاده شد که یک چرخه در دمای ۹۴ درجه و به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه و به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به مدت ۱ دقیقه و در دمای بین ۵۰ تا ۶۲ درجه (بسته به نوع آغازگر)، سپس تکثیر نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه و در دمای ۷۲ درجه و تکثیر نهایی در همین دما و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. واکنش در حجم

بازوی کوتاه کروموزوم 5D قرار دارد (Mattern et al., 1973). مطالعات متعددی با استفاده از تجزیه کیوتی‌ال برای شناسایی مکان‌های کنترل کننده این صفت انجام شده و جایگاه‌هایی را روی کروموزوم‌های 2D، 5B، 6D، 5A، 7A و 2A شناسایی نموده‌اند (Sourdill et al., 1996; Campbell et al., 1999; Perretant et al., 2000; Galande et al., 2001; Igrejas et al., 2002; Narasimhamoorthy et al., 2006). در مطالعه‌ای که در لاین‌های نوترکیب گندم نان در چند محیط انجام شد، به‌طور کلی ۲۲ کیوتی‌ال در ده کروموزوم گندم شناسایی گردید و سختی و شیشه‌ای بودن دانه، سه جایگاه در کروموزوم‌های 5D، 6A و 3A داشتند (Pshenichnikova et al., 2008). برسگلو و سورلر (Sorrells, 2006)، با استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی در ارقام گندم نان مشخص کردند که کروموزوم 2D در کنترل صفات عرض و وزن دانه و کروموزوم‌های 5A و 5B در کنترل صفت طول دانه نقش بسیار مهمی دارند. رامیا و همکاران (Ramya et al., 2010)، در جامعه لاین‌های نوترکیب گندم نان با استفاده از نقشه‌یابی کیوتی‌ال، ۱۰ کیوتی‌ال را در کروموزوم‌های 1D، 2B، 2D، 4B، 5B، 5D برای وزن هزار دانه شناسایی کردند، درحالی‌که برای طول دانه ۶ کیوتی‌ال در کروموزوم‌های 2D، 5A، 5B، 1A و 5D شناسایی شد. برای عرض دانه ۹ کیوتی‌ال در کروموزوم‌های 1D، 2B، 2D، 4B، 5B، 5D وجود داشت.

هدف از انجام این تحقیق بررسی ارتباط مکان‌های کمی بود که در مطالعات کیوتی‌ال قبلی با صفات مورد مطالعه ارتباط داشته‌اند. همچنین مکان‌یابی ارتباطی نشانگرهای SSR در کروموزوم‌های گندم، معرفی نشانگرهای پیوسته با کیوتی‌ال‌های صفات مورد بررسی و شناسایی کیوتی‌ال‌های چند اثره (Pleiotropic)، بود.

مواد و روش

در این آزمایش ۱۰۰ رقم تجاری گندم شامل ۹۰ رقم زراعی و ۱۰ لاین امیدبخش که از موسسه‌ی تحقیقات اصلاح و تهیه‌ی نهال و بذر، تهیه شدند، مورد استفاده قرار

جدول ۱- اسامی یا شناسه ژنوتیپ های گندم مورد استفاده در تحقیق

Table 1. Names or identity of wheat genotypes used in the study

ردیف	نام/شناسه	ردیف	نام/شناسه	ردیف	نام/شناسه	ردیف	نام/شناسه	ردیف	نام/شناسه
No.	Name/ Identity	No.	Name/ Identity	No.	Name/ Identity	No.	Name/ Identity	No.	Name/ Identity
1	Karaj-1	18	DN-11	35	Khazar-1	52	Falat	69	Adl
2	Karaj-2	19	Bezostaya	36	Mughan-1	53	Heirmand	70	Sardari
3	Karaj-3	20	Navid	37	Mughan-2	54	Darab-2	71	Azar-2
4	Azadi	21	Alamout	38	Mughan-3	55	Atrak	72	Zagross
5	Ghods	22	Alvand	39	Golestan	56	Chamran	73	Sabalan
6	Mahdavi	23	Zarin	40	Alborz	57	Star	74	Sp.Bc of Roshan
7	Niknejad	24	MV-17	41	Kaveh	58	Dez	75	Wi. Bc of Roshan
8	Marvdasht	25	Gaspard	42	Rassoul	59	Vee/Nac	76	Cross of Shahi
9	Pishtaz	26	Gascogne	43	Tajan	60	Line A	77	Maroon
10	Shiraz	27	Soisson	44	Shiroudi	61	Aflak	78	Kavir
11	Sepahan	28	Shahriar	45	Darya	62	Baaz	79	Hamoon
12	Bahar	29	Tous	46	Arta	63	Shahpasand	80	Bam
13	Parsi	30	Pishgam	47	Morvarid	64	Omid	81	Akbari
14	Sivand	31	C-84-8	48	N-85-5	65	Roshan	82	Sistan
15	M-85-7	32	Oroom	49	Arvand	66	Tabassi	83	Arg
16	WS-82-9	33	Zaree	50	Chenab	67	Sholleh	84	Yavarous
17	WS-85-10	34	Inia	51	Bayat	68	Sorkhtokhm	85	Karkheh

شماره های ۸۹، ۹۸، ۹۲، ۸۸، ۸۷، ۸۶، ۸۵ و ۸۴ گندم دوروم و مابقی نان هستند.

No. of 84, 85, 86, 87, 88, 92, 98 and 99 are durum wheat and the others are bread wheat.

پیشنهاد کرده اند از نرم افزار Structure با ۱۰۰۰۰۰ بار اجرا در زمان (Burn in time) و ۱۰۰۰۰۰ جایگشت (Permutation) استفاده شد. K یا تعداد زیر جمعیت از ۱ تا ۱۵ تنظیم و ۵ دور تکرار (Iteration) در هر زیرگروه انتخاب شد. سپس ماتریس داده های مولکولی و ماتریس صفات مورد بررسی و ماتریس کیو (ماتریس ساختار جمعیت) به نرم افزار Tassel نسخه ۲/۱ منتقل شدند (قابل دسترس در www.maizegenetics.net). تحلیل ارتباط بین صفت و نشانگر با استفاده از مدل رگرسیون خطی مرکب با استفاده از نرم افزار فوق انجام شد.

نتایج و بحث

تعداد زیر جمعیت مناسب، زیر جمعیتی هایی هستند که در آن ها آلل ها در تعادل هاردی-واینبرگ بوده و پیوستگی عدم تعادل گامتی در آنها وجود دارد. زیر جمعیتی که در آن حداکثر درست نمایی وجود داشت، یعنی موقعی که Ln Prob of Data روند نزولی را شروع کرد، (بدون در نظر گرفتن علامت آن) به عنوان تعداد مطلوب زیر جمعیت

۱۵ میکرولیتر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر My cycler ساخت کمپانی Bio Rad انجام شد. پس از انجام مراحل تکثیر توسط PCR، به هر نمونه ۳ میکرولیتر از محلول رنگ آمیزی ژل رد (Gel Red) و بافر بارگیری (به نسبت ۱/۵: ۱/۵ میکرولیتر) افزوده شد. ژل ۳/۵ درصد که ترکیبی از ۵۰ درصد آگارز معمولی و ۵۰ درصد آگارز متافور بود که با استفاده از بافر TBE تهیه شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت دو ساعت و نیم اجرا گردید. برای تعیین اندازه قطعات از نشانگر با باندهای استاندارد ۵۰bp استفاده گردید. مشاهده و عکس برداری زیر نور به کمک دستگاه Gel Doc XR (ساخت کمپانی Bio Rad آمریکا) انجام شد.

ساختار جمعیت و تهیه ماتریس کیو (Q matrix) با استفاده از نرم افزار Structure نسخه ۲/۳ (Pritchard and Wen, 2010)، تعیین شد. برای تعیین تعداد زیرگروه ها در جمعیت از داده های ژنوتیپی نشانگر SSR استفاده شد. بر اساس آنچه پریچارد و ون (Pritchard and Wen, 2007)

انتخاب شد. بدین منظور نمودار Ln Prob of Data ترسیم و نقطه‌ای که در آن نمودار نزولی شد تعیین گردید و دیده شد که حداکثر درست نمایی در $K=6$ به دست می‌آید و بنابراین به عنوان تعداد مناسب K یا تعداد زیر جمعیت نظر گرفته شد. بر این اساس ژنوتیپ‌ها در ۶ زیر جمعیت قرار گرفتند. حاصل تجزیه ساختار جمعیت (Population structure) که ماتریس کیو است، شباهت نسبی ژنوتیپ‌ها را در زیرگروه‌ها مشخص نمود. بنابراین برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی از این ماتریس که شش ستون و ۹۲ ردیف داشت، استفاده شد. برای بررسی ارتباط نشانگر و صفت علاوه بر ماتریس کیو، دو ماتریس صفت و داده‌های حاصل از امتیازدهی به نوارهای حاصل از نشانگر SSR، نیز مورد استفاده قرار گرفت.

داده‌های حاصل از این سه ماتریس وارد نرم‌افزار تاسل شده و با استفاده از مدل رگرسیون خطی مرکب (Mixed liner model) ارتباط بین صفات و داده‌های نشانگری بررسی شد. نتایج ارتباط صفات با نشانگرها برای صفات در جدول ۲ آورده شده است. از چهار نشانگر که بر اساس مطالعات قبلی کانرت و همکاران (Kunert et al., 2007)، لی و همکاران (Lie et al., 2008) و ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2011)، مرتبط با صفت سختی دانه معرفی شده بودند، استفاده شد. در مطالعه‌ی حاضر از این نشانگرها، تنها نشانگر Xcfd18 که روی کروموزوم 5D قرار دارد با این صفت پیوستگی معنی‌دار نشان داد.

علاوه بر این نشانگرهای Xcfd5 و Xbarc54 که روی کروموزوم‌های 5B-6D و 3A-6D، نشانگر Xgwm10 روی کروموزوم 2A، نشانگر Xgwm259 روی کروموزوم 1B و نشانگر Xgwm325 روی کروموزوم‌های 6B و 6D قرار دارند با این صفت پیوستگی معنی‌دار داشتند. در مطالعه‌ای که با استفاده از تجزیه‌ی کیو.تی.ال در گندم انجام شد، دو کیو.تی.ال برای سختی دانه شناسایی شد که یکی از آنها در بازوی کوتاه کروموزوم 5D قرار داشت و دیگری در کروموزوم 1D و نزدیک مکان ژنی Glu-D1

قرار داشت (Crepieux et al., 2005). همچنین در مطالعه‌ی دیگری دو نشانگر مرتبط با سختی دانه شناسایی شد که یکی از آنها خیلی نزدیک به ژن PinbD1 و مکان ژنی Ha بود و دیگری در بازوی کوتاه کروموزوم 1D واقع شده بود. (جایی که ژن Glu-A3 قرار داشت) (Arbelbide and Bernardo, 2006). چون در مطالعات مختلف گزارش شده که مکان ژنی Ha که در بازوی کوتاه کروموزوم 5D قرار دارد، در کنترل صفت فوق نقش دارد و در این مطالعه نیز نشانگر Xcfd18 ارتباط معنی‌دار با این صفت داشت، بنابراین این نشانگر به عنوان یکی از نشانگرهای پیوسته به کیو.تی.ال و مؤثر در کنترل صفت سختی دانه معرفی می‌شود. علاوه بر این نشانگر، در مطالعه‌ی حاضر نشانگرهایی که روی کروموزوم‌های 5B و 6D قرار دارند، به دلیل آن‌که در چند مورد با این صفت پیوستگی نشان دادند، بنابراین در کنترل این صفت نقش دارند. در بررسی‌های رامیا و همکاران (Ramya et al., 2010)، در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب، هفت نشانگر Xbarc178, Xbnarc148, Xbarc146, Xbarc13, Xcfd5, Xcfd59 و Xgwm539 که با صفت وزن هزار دانه پیوسته بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. در مطالعه‌ی حاضر همبستگی ارتباطی مشخص کرد که تنها سه نشانگر Xcfd5, Xbarc13 و Xgwm539 که به ترتیب روی کروموزوم‌های 6D, 5B و 2B قرار دارند، با صفت فوق پیوستگی معنی‌دار دارند. علاوه بر این، نشانگرهای: Xcfd5, Xcfa2164 و Xgwm577 که به ترتیب روی کروموزوم‌های 3A و 7B قرار دارند، نشانگرهای Xbarc80 که روی کروموزوم 1B قرار دارد، Xcfa2153 که روی کروموزوم 1A قرار دارد، Xcfd56 پیوسته با صفت عرض دانه که روی کروموزوم‌های 5B-6D قرار دارد با این صفت پیوستگی معنی‌دار نشان دادند. همچنین نشانگرهای Xgwm99, Xgwm149 و Xgwm274 که برای بررسی ساختار جامعه استفاده شدند و به ترتیب روی کروموزوم‌های 1A, 4B و 7B, 5B, 3B, 1B قرار

جدول ۲- تجزیه‌ی همبستگی ارتباطی نشانگرهای پیوسته و صفات

Table 2. Association of SSR markers with traits

صفه	ردیف	نشانگر	کروموزوم	سطح معنی‌داری
Trait	No.	Marker	Chromosome	Significance level
مرتبط با صفت بر اساس مطالعات قبلی	1	Xcfd18	5D	*
Associated with trait based on previous studies				
سختی دانه	1	Xcfd5	5B - 6D	**
مرتبط با سایر صفات یا مربوط به بررسی	2	Xbarc54	3A - 6D	**
Grain hardness	3	Xgwm10	2A, 2B - 3A - 7A	**
ساختار که پیوستگی نشان دادند	4	Xgwm68	5B - 7B	*
Markers that linked to other traits or used to population structure analysis were associated with grain hardness	5	Xgwm259	1B	**
	6	Xgwm325	6B, 6D	*
مرتبط با صفت بر اساس مطالعات قبلی	1	Xcfd5	6D, 5B	*
Associated with trait based on previous studies	2	Xbarc13	2B	*
	3	Xgwm539	2D	*
وزن هزار	1	Xbarc80	1B	*
مرتبط با سایر صفات یا مربوط به بررسی	2	Xcfa2153	1A	*
دانه	3	Xcfa2164	3A	*
ساختار که پیوستگی نشان دادند	4	Xcfd56	2B, D	*
Thousand kernel weight	5	Xgwm99	1A	**
Markers that linked to other traits or used to population structure analysis were associated with thousand kernel weight	6	Xgwm149	4B	**
	7	Xgwm274	1B, 3B, 5B, 7B	*
	8	Xgwm577	7B	*
مرتبط با صفت بر اساس مطالعات قبلی	1	Xbarc74	5B	**
Associated with trait based on previous studies	2	Xgwm539	2D	**
عرض دانه	1	Xbarc149	1D	*
مرتبط با سایر صفات یا مربوط به بررسی	2	Xcfa2153	1A	**
Seed width	3	Xcfd42	6D	**
ساختار که پیوستگی نشان دادند	4	Xgwm515	2A, 2D	**
Markers that linked to other traits or used to population structure analysis, were associated with seed width	5	Xgwm577	7B	**
مرتبط با صفت بر اساس مطالعات قبلی	1	Xcfd40	5A, 5D	*
Associated with trait based on previous studies	2	Xbarc149	1D	*
طول دانه	1	Xbarc80	1B	*
مرتبط با سایر صفات یا مربوط به بررسی	2	Xbarc146	6A, 6B, 6D	**
Seed length	3	Xcfa2153	1A	*
ساختار که پیوستگی نشان دادند	4	Xgwm11	1BL - 1BS	*
Markers that linked to other traits or used to population structure analysis, were associated with seed length	5	Xgwm149	4B	**
	6	Xgwm159	2A	*
	7	Xwmc215	3A, 5A, 5D	**
	8	Wms304	2A	**

** and * significant at 1 and 5% levels of probability, respectively.

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

در مطالعه‌ی حاضر نیز این نشانگرها ارتباط معنی‌دار با صفت وزن هزار دانه داشتند. همچنین نشانگرهای دیگری بر روی کروموزوم‌های 1B, 3A, 4B, 5B, 6D, 7A و 7B مرتبط با این صفت شناسایی شدند. این نشانگرها یا برای صفات دیگر یا برای بررسی ساختار جامعه انتخاب شده

دارند، نیز با این صفت پیوستگی معنی‌دار نشان دادند. نشانگر Xgwm539 در فاصله‌ی ۹۱ سانتی‌مورگانی بازوی بلند کروموزوم 2D و نشانگر Xcfd5 در تلومر بازوی کوتاه کروموزوم 5D در نقشه‌ی مورد توافق سومرز و همکاران (Somers et al., 2004) تعیین محل شدند.

اساس مطالعات قبلی پیوسته با صفت طول دانه معرفی شده بودند (Ramya et al., 2010)، مورد استفاده قرار گرفت. تنها دو نشانگر Xcfd40 که روی کروموزوم‌های 5D و 5A قرار دارد و نشانگر Xbarc149 که روی کروموزوم 1D قرار دارد، با این صفت پیوستگی معنی‌دار نشان دادند. (جدول ۲). همچنین نشانگرهای Xbarc80 (که روی کروموزوم 1B قرار دارد)، Xbarc146 پیوسته با صفت وزن هزار دانه (که روی کروموزوم‌های 6A، 6B، 6D قرار دارد)، Xcfa2153 (که روی کروموزوم 1A قرار دارد)، Xwmc215 (که روی کروموزوم‌های 3A، 5A-5D قرار دارند)، Wms304 پیوسته با صفت سختی دانه (که روی کروموزوم 2A قرار دارد) و همچنین نشانگرهای Xgwm11، Xgwm149 و Xgwm159 که برای بررسی ساختار جامعه استفاده شدند و به‌ترتیب روی کروموزوم‌های 1BL-1BS، 4B و 2A قرار دارند، با صفت فوق ارتباط معنی‌دار نشان دادند. با توجه به اینکه نشانگرهایی که روی کروموزوم‌های 2A و 1B قرار دارند بیش از یک‌بار با صفت طول دانه پیوستگی نشان دادند، چنین استنباط می‌شود که مکان‌های کمی روی این کروموزوم‌ها نیز در کنترل این صفت نقش داشته باشند. دو نشانگر Xcfd40 و Xbarc149 در این مطالعه ارتباط معنی‌دار با صفت طول دانه داشتند که در نقشه‌ی مورد توافق سومرز و همکاران (Somers et al., 2004)، به ترتیب در فاصله‌ی ۳۷ سانتی‌مورگانی بازوی کوتاه کروموزوم 5D و فاصله‌ی ۱۴ سانتی‌مورگانی بازوی کوتاه کروموزوم 1D قرار دارند. برسگلو و سورلز (Bressegello and Sorrells, 2006)، گزارش دادند که نشانگر Xgwm539 در کروموزوم 2D، ارتباط معنی‌دار با طول دانه دارد. علاوه بر این، نشانگرهای Xbarc308 و Xwmc150 که به ترتیب در کروموزوم‌های 5B و 5A قرار دارند با صفت طول دانه پیوستگی بسیار معنی‌دار

بودند. علاوه بر نشانگرهایی که در مطالعات قبلی با این صفت پیوستگی داشتند (که مطالعه حاضر نیز برخی از آنها را تأیید نموده است)، چند نشانگر دیگر که محل آنها در کروموزوم‌های 7B، 1B و 1A، قرار دارد و بیش از یک‌بار با این صفت پیوستگی نشان داده‌اند (جدول ۲)، در کنترل صفت فوق نقش دارند.

پنج نشانگر Xcfd168، Xcfd56، Xbarc183، Xbarc74 و Xgwm539 که قبلاً به‌عنوان مکان‌های کمی کنترل‌کننده‌ی صفت عرض دانه معرفی شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت (Ramya et al., 2010). با توجه به همبستگی ارتباطی انجام شده در تحقیق حاضر از این تعداد، تنها دو نشانگر Xgwm539 و Xbarc74 که به ترتیب روی کروموزوم‌های 5B و 2D قرار دارند، ارتباط معنی‌دار با این صفت نشان دادند. همچنین نشانگرهای Xgwm515، Xgwm577 و Xcfd42 که به ترتیب روی کروموزوم‌های 7B، 2D، 2A و 6D قرار دارند، Xbarc149 که روی کروموزوم 1D قرار دارد و Xcfa2153 که روی کروموزوم 1A قرار دارد، با صفت عرض دانه ارتباط معنی‌دار نشان دادند. نشانگر Xgwm539 در کنترل دو صفت وزن هزار دانه و عرض دانه و نشانگر Xbarc149 در کنترل طول و عرض دانه مؤثر بودند. علاوه بر این نشانگرهای دیگری که مرتبط با سایر صفات و یا برای بررسی ساختار جامعه انتخاب شده بودند و در کروموزوم‌های 7B، 6D، 2D، 2A و 1A قرار داشتند با این صفت پیوستگی نشان دادند. برسگلو و سورلز (Bressegello and Sorrells, 2006)، با استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی در ارقام گندم نان پیوستگی بسیار معنی‌دار بین نشانگرهای Xwmc111 و Xgwm30 که در کروموزوم 2D قرار دارند، با صفت عرض و وزن دانه را گزارش کردند.

هفت نشانگر Xcfd40، Xgwm382، Xgwm271، Xwmc317، Xbarc149، Xcfa2141 و Xwmc469 که بر

داشتند. برخی نشانگرها به طور همزمان پیوستگی معنی دار با دو صفت داشتند؛ مانند نشانگرهای Xcfd5 (سختی دانه و وزن هزار دانه)، Xgwm539 (عرض دانه و وزن هزار دانه) و Xgwm577 (وزن هزار دانه و عرض دانه). به نظر می رسد مکان های ژنی این نشانگرها مربوط به ژن های چنداثره باشند.

با توجه به اینکه در مطالعه حاضر و بررسی های قبلی با استفاده از نقشه یابی ارتباطی و کیو.تی.ال همبستگی معنی دار بین نشانگرهای موجود روی کروموزوم 2D و صفات طول، عرض و وزن دانه وجود داشت، بنابراین این گونه می توان گفت که کروموزوم 2D از کروموزوم هایی است که نقش مهمی در کنترل صفات فوق دارد. در مطالعه دیگری که در ارقام دانه نرم گندم نان با استفاده از نقشه یابی ارتباطی انجام شد، برای وزن هزار دانه کیو.تی.ال هایی در کروموزوم های 4A، 4D، 5B، 7B و 2D شناسایی شد (Jochen *et al.*, 2011). همان طور که ملاحظه می شود کیو.تی.ال های کنترل کننده سه صفت فوق بر روی کروموزوم های مختلف گندم پراکنده شده اند. ولی برخی جایگاه ها در کروموزوم های 5D، 5B، 2D، 2B، 6D و 1B در چندین مطالعه به صورت ثابت برای این صفات به عنوان مکان های کنترل کننده معرفی شده اند که نتایج مطالعه حاضر نیز آنها را تأیید می نماید. بنابراین می توان نتیجه گرفت که کیو.تی.ال هایی که در کروموزوم های ژنوم B و D قرار دارند، نقش مهمی در کنترل طول، عرض و وزن دانه ی گندم دارند. همان طور که در نتایج ملاحظه شد، برخی نشانگرها مرتبط با صفت دیگری بوده و

یا برای بررسی ساختار جامعه استفاده شده اند، ولی در نقشه یابی ارتباطی با صفتی غیر از صفت مورد نظر، پیوستگی نشان داده اند، که ممکن است حاصل اشتباه نوع I بوده و این پیوستگی دروغین باشد. علاوه بر این، برسگلو و سورلز (Bresgello and Sorrells, 2006)، اظهار داشتند که در نقشه یابی ارتباطی در مقایسه با نقشه یابی کیو.تی.ال، احتمال وقوع اشتباه نوع I و II وجود دارد. اشتباه نوع I زمانی رخ می دهد که ساختار جمعیت در نظر گرفته نشود (Pritchard *et al.*, 2000). وقوع اشتباه نوع II و کاهش قدرت نقشه یابی ارتباطی می تواند مربوط به همبستگی پایین بین نشانگر و ژن ها باشد که در نتیجه میزان عدم تعادل گامتی کم این امر رخ می دهد. همچنین ممکن است در نتیجه فراوانی متفاوت آلل ها باشد.

صفات کمی به وسیله تعدادی ژن کنترل شده و کنترل ژنتیکی این صفات به طور طبیعی تغییرات آلی زیادی در چند ژن دارد و تحت تأثیر محیط نیز قرار می گیرند. صفات کیفی دانه گندم هم که به عنوان صفات کمی شناخته شده اند، به وسیله گروهی از ژن ها کنترل می شوند که به شدت تحت تأثیر تغییرات محیطی قرار دارند. بنابراین ممکن است نتایج متفاوت به دست بیاید.

پیشنهاد می شود برای تعیین بهتر ساختار جمعیت مورد بررسی، از تعداد بیشتری نشانگر استفاده شده و با تکرار آزمایش ها در سال های متوالی و یافتن مکان های کمی ثابت کنترل کننده صفات، نتایج قابل استناد به دست آورد و از آنها در اصلاح گندم استفاده نمود.

References

- Ammiraju, J.S.S., Dholakia, B.B., Santra, D.K., Singh, H., Lagu, M.D., Tamhankar, S.A., Dhaliwal, H.S., Rao, V.S., Gupta, V.S. and Ranjekar, P.K. (2001). Identification of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **102**: 726-732.

- Arbelbide, M. and Bernardo, R.** (2006). Mixed-model QTL mapping for kernel hardness and dough strength in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**: 885-890.
- Breseghehlo, F. and Sorrells, M.E.** (2006). Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*, **172**: 1165-1177.
- Breseghehlo, F. and Sorrells, M.E.** (2007). QTL analysis of kernel size and shape in two hexaploid wheat mapping populations. *Field Crops Research*, **101**: 172-179.
- Campbell, K.G., Bergman, C.J., Gualberto, D.G., Anderson, J.A., Giroux, M.J., Hareland, G., Fulcher, R.G., Sorrells, M.E. and Finney, P. L.** (1999). Quantitative trait loci associated with kernel traits in a soft $\times$ hard wheat cross. *Crop Science*, **39**: 1184-1195.
- Cardon, L.R. and Bell, J.I.** (2001). Association study designs for complex diseases. *Nature Reviews Genetics*, **2**: 91-99.
- Committee, A.A.o.C.C.A.M.** (2000). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th edn, AACC, University of Michigan, USA.
- Crepieux, S., Lebreton, C., Flament, P. and Charmet, G.** (2005). Application of a new IBD-based QTL mapping method to common wheat breeding population: analysis of kernel hardness and dough strength. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**: 1409-1419.
- Dholakia, B.B., Ammiraju, J.S.S., Santra, D.K., Singh, H., Katti, M.V., Lagu, M.D., Tmhankar, S.A., Rao, V.S., Gupta, V.S., Dhaliwal, H.S. and Ranjekar, P.K.** (2001). Molecular marker analysis of protein content using PCR-Based markers in wheat. *Biochemical Genetics*, **39**: 325-338.
- Dholakia, B.B., Ammiraju, J.S.S., Singh, H., Lagu, M.D., Röder, M.S. and Rao, V.S, Dhaliwal, H.S., Ranjekar, P.K., Gupta1, V.S., and Weber, W.E.** (2003). Molecular marker analysis of kernel size and shape in bread wheat. *Plant Breeding*, **122**: 392-395.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, **19**:11-15.
- Galande, A.A., Tiwari, R., Ammiraju, J.S.S., Santra, D.K., Lagu, M.D., Rao, V.S., Gupta, V.S., Misra, B.K., Nagarajan, S. and Ranjekar, P.K.** (2001). Genetic analysis of kernel hardness in bread wheat using PCR based markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**: 601-606.
- Giroux, M.J. and Morris, C.F.** (1997). A glycine to serine change in puroindoline β is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**: 857-864.
- Giura, A. and Saulescu, N.N.** (1996). Chromosomal location of genes controlling grain size in a large grained selection of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, **89**: 77-80.
- Igrejas, G., Leroy, P., Charmet, G., Gaborit, T., Marionm, D. and Branlard, G.** (2002). Mapping QTLs for grain hardness and puroindoline content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **106**: 19-27.
- Jannink, J.L., Bink, M.C. and Jansen, R.C.** (2001). Using complex plant pedigrees to map valuable genes. *Trends in Plant Science*, **6**: 337-342.
- Kumar, N., Kulwal, P., Gaur, A., Tyagi, A., Khurana, J., Khurana, P., Balyan, H. and Gupta, P.** (2006). QTL analysis for grain weight in common wheat. *Euphytica*, **151**: 135-144.
- Kunert, A., Naz, A.A. and Dedek, O.** (2007). AB-QTL analysis in winter wheat: I. Synthetic hexaploid wheat (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides* $\times$ *T. tauschii*) as a source of favourable alleles for milling and baking quality traits. *Theoretical and Applied Genetics*, **115**: 683–695.

- Lie, Y., Zhou, R., Wang, J., Liao, X., Branlard, G. and Jia, J. (2012). Novel and favorable QTL allele clusters for end-use quality revealed by introgression lines derived from synthetic wheat. *Molecular Breeding*, **29**: 627-643.
- Marshall, D.R., Mares, D.J., Moss, H.J. and Ellison, F.W. (1986). Effects of grain shape and size on milling yields in wheat. Experimental studies. *Australian Journal of Agricultural Research*, **37**: 331-342.
- Mattern, P.J., Morris, R., Schmidt, J.W. and Johnson, V.A. (1973). Locations of genes for kernel properties in the wheat variety 'Cheyenne' using chromosome substitution lines. In: *Agricultural Experimental Station* (Sears, E.R. and Sears, L.M.S., Eds) pp. 703-707, Proc 4th international wheat genetics symposium, University of Missouri, Columbia.
- Narasimhamoorthy, B., Gill, B.S., Fritz, A.K., Nelson, J.C. and Brown-Guedira, G.L. (2006). Advanced backcross QTL analysis of a hard winter wheat × synthetic wheat population. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**: 787-796.
- Oraguzie, N.C. and Wilcox, P.L. (2007). An overview of association mapping. In: *Association mapping in plants* (Oraguzie, N., Rikkerink, E.A., Gardiner, S. and De Silva, H.N., Eds) pp. 1-9, Springer, New York, USA.
- Perretant, M.R., Cadalen, T., Charmet, G., Sourdille, P., Nicolas, P., Boeuf, C., Tixier, M.H., Branlard, G., Bernard, S. and Bernard, M. (2000). QTL analysis of bread-making quality in wheat using a doubled haploid population. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**: 1167-1175.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Rosenberg, N.A. and Donnelly, P. (2000). Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics*, **37**: 170-181.
- Pritchard, J.K. and Wen, X. (2007). Documentation for structure Software, version 2.3. Department of Human Genetics, University of Chicago, Chicago, USA.
- Pritchard, J.K., Wen, X. and Flash, D. (2010). Documentation for structure Software, version 2.3. Department of Human Genetics, University of Chicago, Chicago, USA.
- Pshenichnikova, T.A., Ermakova, M.F., Chistyakova, A.K., Shchukina, L.V., Berezovskaya, E.V., Lochwasser, U., Röder, M. and Börner, A. (2008). Mapping of the quantitative trait loci (QTL) associated with grain quality characteristics of the bread wheat grown under different environmental conditions. *Russian Journal of Genetics*, **44**: 74-84.
- Rafalski, J.A., Morgante, M., Powell, W., Vogel, J. M. and Tingey, S.V. (1996). Generating and using DNA markers in plants. In: *Analysis of Non-mammalian Genomes: a practical guide* (Birren, B. and Lai, E., Eds) pp. 75-134, Academic Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Ramya, P., Chaubal, A., Kulkarni, K., Gipta, L., Kadoo, N., Dhaliwal, H.S., Chhuneja, P., Lagu, M. and Gupta, V. (2010). QTL mapping of 1000-kernel weight, kernel length, and kernel width in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Genetics*, **51**: 421-429.
- Roder, M.S., Korsun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P. and Ganal, M.W. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, **149**: 2007-2023.
- Somers, D.J., Fedak, G. and Savard, M. (2003). Molecular mapping of novel genes controlling Fusarium head blight resistance and deoxynivalenol accumulation in spring wheat. *Genome*, **46**: 555-564.
- Somers, D.J., Isaac, P. and Edwards, K. (2004). A high density microsatellite consensus map of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 1105-1114.

- Sourdille, P., Perretant, M.R., Charmet, G., Leroy, P., Gautier, M.F., Joudrier, P., Nelson, J.C., Sorrells, M.E. and Bernard, M.** (1996). Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **93**: 580-586.
- Toi, J.T., Hareland, G.A., Simsek, S., Chao, S. and Anderson, J.A.** (2010). Genome mapping of kernel characteristics in hard red spring wheat breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics*, **121**: 717-730.
- Varshney, R.K., Prasad, M., Roy, J.K., Kumar, N., Harjit, S., Dhaliwal, H.S., Balyan, H.S. and Gupta, P.K.** (2000). Identification of eight chromosomes and a microsatellite marker on 1AS associated with QTLs for grain weight in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**: 1290-1294.
- Wiersma, J.J., Busch, H., Fulcher, G.G. and Hareland, G.** (2001). Recurrent selection for kernel weight in spring wheat. *Crop Science*, **41**: 999-1005.
- Zhang, Y., Tang, J. and Zhang, Y.** (2011). QTL mapping for quantities of protein fractions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **122**: 971-987.
- Zhu, C., Gore, M.E., Buckler, S. and Yu, J.** (2008). Status and prospects of association mapping in plants. *The plant genome*, **1**: 5-20.

Detection of QTLs Associated to Some Grain Traits in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.), Using Association Mapping

Reza Mir Drikvand^{1,*}, Goodarz Najafian², Mohammad Reza Bihamta³ and
Asa Ebrahimi⁴

- 1- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran
- 2- Associate Professor, Cereal Chemistry and Technology Unit, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran
- 3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Tehran, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received: June 10, 2014– September 10, 2014)

Abstract

This study was conducted to identify markers associated with some kernel traits in bread wheat in two separate experiments under field and laboratory. One hundred wheat genotypes were evaluated in an alpha lattice experimental design with two replications. Grain hardness, seed length, seed width and thousand kernel weights were measured. Association mapping was performed based on 96 unlinked and 22 SSR QTL linked markers, using structure and Tassel software. Correction for population structure was performed using genome wide SSR markers so that genotypes were divided into six sub-populations. Totally, 35 SSR markers linked to traits were detected; eight of them being QTL linked markers and other markers that were linked to traits, were used to investigate population structure. The QTLs linked markers were as follows: Chromosomes 5B, 5D and 6D had three QTL for grain hardness. Nine QTLs were detected on chromosomes 1A, 1B, 2A, 2B, 2D, 5B, 5D, 6D and 7B for kernel length, kernel width and thousand kernel weights. The results of this study demonstrate that association mapping is a useful approach to complement and enhance previous QTL information for marker-assisted selection in wheat.

Keywords: Kernel traits, Wheat, Association mapping, QTL

* Corresponding Author, E-mail: mirderikvand@khoiau.ac.ir