مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال ششم، شماره شانزدهم، زمستان ۱۳۹۵ (۷۳-۶۱)

Crop Biotech.
Winter (2016) 16: 61-73.

تجزیه QTL غلظت سدیم و پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم در گندم تحت شرایط تنش شوری

امین آزادی[1*]، محسن مردی[2]، اسلام مجیدی هروان[3]، سید ابوالقاسم محمدی[4]، فواد مرادی[5]

۱. گروه اصلاح نباتات، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
۳. گروه اصلاح نباتات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
٤. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۵. استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۲٤- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۰/۱۲)

QTL Analysis for Sodium and Potassium Concentration and Potassium to Sodium Ratio in Wheat Under Salt-Stress Condition

Amin Azadi[1*], Mohsen Mardi[2], Eslam Majidi Harvan[3], Seyed Abolghasem Mohammadi[4], Foad Moradi[5]

1. Department of Plant Breeding, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3. Department of Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
5. Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
(Received: Sep.16, 2016 - Accepted: Dec. 2, 2016)

چکیده

تاکنون QTLهای زیادی برای عملکرد و اجزای آن در گندم نان در شرایط نرمال شناسایی شده است. به منظور شناسایی QTLهای مرتبط با غلظت سدیم و پتاسیم در گندم نان تحت شرایط تنش شوری، از جمعیت ۱۸٦ لاین اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی دو والد سوپرهد ۲ و روشن استفاده شد. اعمال تیمارهای تنش شوری با استفاده از سیستم هیدروپونیک و در داخل گلخانه صورت پذیرفت. شرایط نرمال (۱۰ میلی‌مولار NaCl) و تنش شوری (۱۵۰ میلی‌مولار NaCl) در نظر گرفته شد و اعمال تنش به صورت مرحله‌ای صورت پذیرفت. نقشه ژنتیکی شامل ٤۲۸ نشانگر دارت و ۲۳ نشانگر ریز ماهواره بود. سه QTL برای هر یک از صفات غلظت سدیم و پتاسیم و یک QTL برای نسبت پتاسیم به سدیم بر روی کروموزوم‌های 4A، 2B، 3B، 7B و 2D با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب شناسایی گردید. *QNa.abrii-3B*، با LOD برابر ۵/۹، در حدود ۸/۳ درصد از تغییرات واریانس فنوتیپی غلظت سدیم را در شرایط تنش شوری توجیه می‌کرد و نشانگر *gwm247* لینکاژ شدید با این QTL نشان داد. همچنین دو QTL برای غلظت سدیم بر روی کروموزوم‌های 2B و 2D شناسایی شدند و *QNa.abrii-2D* حدود ۹/۲ درصد واریانس فنوتیپی این صفت را در شرایط تنش شوری توجیه می‌کرد. با ادامه تحقیقات در آینده، احتمال شناسایی *QNa.abrii-2B* و *QNa.abrii-2D* به عنوان گروه دو همیولوگی در گندم، در کنار ژن *Nax1* وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: QTL، غلظت سدیم، غلظت پتاسیم، گندم نان، تنش شوری.

Abstract

So far, many quantitative trait loci (QTLs) have been detected for yield and its components in wheat under normal conditions. In order to identify QTLs associated with concentrations of sodium and potassium in bread wheat under salt stress conditions, a population consisted of 186 recombinant inbred lines from a cross between Roshan ×SuperHead#2 were evaluated. Salinity treatments were performed using a hydroponic system in a greenhouse. Normal conditions (10 mM NaCl) and salinity (150 mM NaCl) were considered and stress was conducted in stages. The molecular genetic map of the population consisted of 23 simple sequence repeat (SSR) and 428 diversity arrays technology (DArT) markers. Three QTLs for each of sodium and potassium concentration traits and a QTL for potassium to sodium ratio were detected on chromosomes 4A, 2B, 3B, 7B and 2D using composite interval mapping approach. The *QNa.abrii-3B*, with a LOD score of 5.9, explained 8.3 % of the phenotypic variation for sodium concentration under salt stress conditions and gwm247 marker showed a strong linkage with this QTL. In addition, two novel QTLs for sodium concentration were detected on chromosomes 2B and 2D and *QNa.abrii*-2D explained 9.2 % of the phenotypic variation for this trait under salt stress conditions. Proceed with future researches, there is probability of identifying *QNa.abrii-2B* and *QNa.abrii-2D* as two homoeologous group in wheat, beside *Nax1* gene.

Keywords: QTL, sodium concentration, potassium concentration, bread wheat, Salt stress.

* نویسنده مسئول: امین آزادی
E-mail: azadi.amin@gmail.com

مقدمه

شوری خاک به‌وسیله اندازه‌گیری کل مقدار کاتیون‌های قابل تبادل که خاک می‌تواند نگهداری کند و به‌عنوان ظرفیت کاتیون قابل تبادل (CEC) نامیده می‌شود، اندازه‌گیری می‌شود. کاتیون‌های قابل حل که باعث شوری خاک می‌شوند عبارت از: Na^{2+}، K^{+}، Ca^{2+} و Mg^{2+} و آنیون‌های غالب عبارت از: Cl^{-}، SO_4^{2-}، NO_3^{-} و HNO_3^{-} می‌باشند (Tanji, 1990). بیش از ۱۰۰ کشور دنیا درگیر خاک‌های شور می‌باشند (Rengasamy, 2006) و در حدود ۲۰ درصد زمین‌های کشاورزی دارای خاک شور می‌باشند (Flowers & Yeo, 1995). چیزی حدود ۲۳ میلیون هکتار از خاک ایران تحت تاثیر نمک می‌باشد (Qadir *et al*., 2008).

غربال گیاهان برای تحمل به شوری در شرایط کنترل شده در آزمایشگاه‌های مجهز و گلخانه و یا در شرایط طبیعی مزرعه انجام می‌شود. در داخل گلخانه به دو صورت می‌توان این غربال را انجام داد. الف)گیاهچه‌ها در داخل محلول هوادهی شده حاوی مواد غذایی و نمک قرار داده می‌شوند (Kingsbury & Epstein, 1984; Gorham *et al*., 1986; Azhar & McNeilly, 1988) و ب) بذور در داخل محیط کشت مصنوعی کاشته شده و با مواد غذایی و محلول نمک آبیاری می‌شوند مانند: شن (Munns, 1985; Grieve *et al*., 1993)، سنگ ریزه (Rawson *et al*., 1988)، پرلیت (Nevo *et al*., 1993) و ورمیکولیت (Jana *et al*., 1983). به‌دلیل محدودیت‌های موجود در شرایط گلخانه از قبیل تحقیقات روی مراحل ابتدائی رشد و عدم وجود همبستگی کامل بین واکنش گیاهان در مقابل تنش شوری در محیط گلخانه و شرایط طبیعی خاک شور، لازم است ژنوتیپ‌ها مجدداً در شرایط طبیعی مزرعه حاوی خاک شور آزمایش و بررسی شوند (Epstein, 1977; Norlyn, 1980). البته در مزرعه نیز به دلیل به‌دلیل ناهمگنی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی فواصل مختلف خاک و تغییرات فصلی محدودیت‌هایی به‌وجود می‌آید (Pearce & Moore, 1976; Bartlett, 1978). اما بطور کلی غربال گیاهان در شرایط کنترل شده بواسطه کنترل و تکرارپذیری به‌وسیله اغلب محققان ترجیح داده می‌شود (Genc *et al*., 2007).

تحت شرایط شوری، غلظت پتاسیم در ارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس به شوری می‌باشد که این منجر به کاهش نسبت Na^{+}/K^{+} نیز می‌شود. در گندم نان، تمایز بین غلظت پتاسیم و سدیم در انتقال آنها به اندام‌های هوائی به عنوان نسبت K^{+}/Na^{+} در بافت اندام‌های هوائی شناخته شده است و ظاهراً توسط یک مکان ژنی با نام *Kna1* تعیین می‌شود و به‌وسیله آنالیز RFLP مشخص شده است که کاملاً به ۵ نشانگر روی بازوی بزرگ کروموزوم 4D پیوسته می‌باشد (Gorham *et al*., 1997). بسیاری از محققان نشان دادند که بین محتوای سدیم و تحمل به شوری در گندم رابطه وجود دارد (Garcia *et al*., 1995; Ashraf; O'Leary, 1996; Munns *et al*., 2006; Munns & James, 2003) و ارقام متحمل گندم، یون سدیم کمتری را نسبت به ارقام حساس گندم وارد بافت‌های خود کرده‌اند، از این‌رو، نسبت K^{+}/Na^{+} به‌عنوان شاخص جهت تحمل شوری استفاده می‌شود و بالابودن نسبت K^{+}/Na^{+} در بافت‌های گیاهی که تحت تنش شوری قرار گرفته‌اند، به‌عنوان یکی از ساز و کارهای فیزیولوژیکی مهم در ایجاد تحمل به شوری در بعضی از گونه‌های گیاهی از جمله گندم بوده است. تولید ارقام متحمل به شوری و شناسایی تنوع ژنتیکی و درک مکانیسم‌های کنترل ژنتیکی تحمل به شوری لازم و ضروری است. این امر می‌تواند با استفاده از تکنولوژی نشانگرهای مولکولی و نقشه‌یابی QTLهای موثر در تحمل به شوری صورت پذیرد. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA بطور وسیع برای بررسی تنوع ژنتیکی موجود در

بسیاری از گونه‌های زراعی، مطالعات شجره‌ای و تکاملی و مکان‌یابی ژن‌ها استفاده شده‌اند (Yang *et al*., 1994; Mc Couch *et al*., 1997; Garland *et al*., 1999).

لیندزلی و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه تجزیه QTL برای تحمل به شوری نشان دادند که مکان ژنی کنترل‌کننده صفت محتوای سدیم در گندم دوروم بر روی بازوی بزرگ کروموزوم 2A قرار دارد. آنها چندین نشانگر AFLP و RFLP پیوسته با ژن Nax_1 (خروج سدیم) شناسایی کردند. ادوارد و همکاران (۲۰۰۸) برای شناسایی QTLهای مرتبط با خروج سدیم در گندم نان از دو جمعیت دابل هاپلوئید حاصل از تلاقی بین Halbred/Cranbrook و Excalibur/Kukri استفاده کردند. تجمع سدیم اندام هوایی در هر دو محیط هیدروپونیک و مزرعه اندازه‌گیری شد. در نتیجه یک QTL روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره 7A در هر دو آزمایش (هیدروپونیک و مزرعه) و در هر دو جمعیت مکان‌یابی شد. این QTL ۳ تا ۴۱ درصد از کل تغییرات فنوتیپی در دو جمعیت را تبیین می‌کرد. نتایج تحقیقات اخیر برخی از محققین نشان داد که مکان‌های ژنی دیگری نیز در خروج سدیم برای تحمل به شوری نقش دارند. این QTLها بر روی کروموزوم‌های 2B، 2D، 3D، 4B، 4D، 6D، 7A و7D قرار داشتند و دامنه واریانس فنوتیپی آنها از ۵ تا ۲۵ درصد متغیر بوده است (Ogbonnaya *et al*., 2008).

گندم تتراپلوئید دوروم (AABB)، فاقد ژنوم D می‌باشد، بنابراین به شوری بسیار حساستر از گندم نان است و سطح بالایی از غلظت سدیم در اندام هوایی آن تجمع می‌یابد (Gorham *et al*., 1987, 1990). تفاوت در تحمل به شوری بین گندم‌های دوروم عموماً با خروج یون سدیم از برگ‌ها مرتبط است (Husain *et al*., 2003; Munns & James, 2003). برای شناسایی کنترل ژنتیکی خروج یون سدیم در بافت‌های گندم دوروم از تلاقی بین لاین ۱۴۹ نسبتاً متحمل (حاصل از تلاقی تریتیکوم مونوکوکوم اکسشن ۱۰۱-۶۸ C با گندم دوروم Marrocoss، (The, 1973) می‌باشد که دارای غلظت پایین سدیم و نسبت بالای پتاسیم به سدیم در برگ مشابه با گندم نان می‌باشد) با رقم تجاری حساس به شوری Tamaroi (با غلظت سدیم بالای برگ) استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که غلظت سدیم پایین برگ با دو مکان ژنی غالب بزرگ اثر که با هم اثر متقابل (اپیستازی) داشتند، کنترل می‌شود (Munns *et al*., 2003). این دو مکان ژنی Nax1, Nax2 (Na exclusion loci) نام‌گذاری شدند. لازم به ذکر است که تریتیکوم مونوکوکوم اکسشن۱۰۱-۶۸ C منبع ژن Nax1 در لاین ۱۴۹ است (James *et al*., 2006).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

۱۸۶ لاین اینبرد نوترکیب (F9) حاصل از تلاقی روشن Super Head#2 × برای این آزمایش در نظر گرفته شدند. آزمایش در سال ۱۳۹۰ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام شد. رقم روشن متحمل به شوری بوده و ژرم‌پلاسم Super Head#2 دریافتی از سیمیت و حساس به شوری می‌باشد. والدین به همراه ۱۸۶ لاین اینبرد نوترکیب مورد ارزیابی ژنوتیپی و فنوتیپی قرار گرفتند. ابتدا لاین‌های اینبرد نوترکیب به‌همراه والدین در مزرعه کشت شدند، در مرحله چهار برگی نمونه برگی از هر ژنوتیپ تهیه و در نیتروژن مایع بلافاصله به فریزر۸۰- منتقل شد (همچنین از گیاهچه‌ها تا زمان سنبله دهی مراقبت بعمل آمد تا از بذور حاصل برای ارزیابی فنوتیپی استفاده شود). نمونه‌ها با استفاده از نیتروژن مایع پودر شده و در تیوب‌های دو میلی‌لیتری ریخته و بلافاصله به فریزر ۸۰- منتقل شدند. استخراج DNA با استفاده از پروتکل شرکت Triticarte انجام شد

(http://www.diversityarrays.com/). کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه نانودراپ مدل ۱۰۰۰ تعیین شد.

ارزیابی ژنوتیپی و تهیه نقشه ژنتیکی

پس از تهیه استوکی هم غلظت از تمام نمونه، مقدار ۲۰ ماکرولیتر از هر نمونه به پلیت‌های ۹۶ تایی درب دار منتقل گردید. آنالیز DArT توسط کمپانی Triticarte کشور استرالیا (Triticarte Company, Australia) انجام شد. ۸۶۹ نشانگر DArT برای تجزیه ژنتیکی جمعیت مذکور مورد استفاده قرار گرفت که فقط ۶۱۰ نشانگر DArT دارای چندشکلی در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی روشن × Super Head#2 بودند. همچنین به منظور شناسایی چندشکلی میان والدین، تجزیه SSR با استفاده از ۱۰۷نشانگر ریزماهواره براساس روش Roeder *et al.* (1998) انجام گردید. در نهایت افراد جمعیت توسط ۳۰ نشانگر ریزماهواره چند شکل، مورد تجزیه قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق روش Roeder *et al.* (1998) انجام گردید. جدول ۱ نشانگرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد.

جدول ۱. لیست نشانگرهای استفاده شده

نام نشانگر	نام ایجاد کننده	کد نشانگر ریزماهواره	تعداد مورد بررسی
ریزماهواره	Wheat Microsatellite Consortium	WMC	26
	Marion Röder (IPK)	GWM	66
	Perry Cregan (USDA)	BARC	12
	Marion Röder (IPK)	GDM	1
	Pierre Sourdille (INRA)	CFD	2
مجموع ریزماهواره			107
دارت	Diversity Arrays technology	Wpt	869
تعداد کل نشانگرها			976

انحراف از تفرق (Segregation distortion) تمام مکان‌های ژنی (نشانگرها) با استفاده از آزمون کای‌اسکور بررسی شد و نشانگرهایی که از نسبت‌های مندلی تبعیت نمی‌کردند، حذف گردیدند. جهت تهیه نقشه پیوستگی از نرم‌افزار JoinMap (Van Ooijen & Voorrips, 2001) با ۳ ≤LOD و تابع کوزامبی (Kosambi, 1944) استفاده گردید.

ارزیابی فنوتیپی

ارزیابی در مرحله گیاهچه با استفاده از سیستم هیدروپونیک در گلخانه صورت پذیرفت. ابتدا بذور هر ژنوتیپ پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۵٪ بمدت ۵ دقیقه در داخل پتری قرار داده شده و به هر پتری میزان ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر اضافه گردید. سپس از گلدان‌هایی با اندازه مشخص استفاده شد. برای محل استقرار گیاهچه از یک یونولیت با قطر ۲ سانتی‌متر و هم سایز درب گلدان استفاده شد. برای آماده‌سازی یونولیت با استفاده از هویه برقی سوراخ‌های هم اندازه در یونولیت‌ها ایجاد شده و سپس یک توری با سوراخ‌هایی که ریشه چه براحتی بتواند از آن عبور کند در یک طرف آن چسبانده شد تا بذور بتواند بر روی آن استقرار یابد. پس از استقرار یونولیت‌ها بر روی گلدان، جهت هوادهی ریشه گیاهان از یک پمپ هوا استفاده شد تا هوادهی به صورت مناسب صورت پذیرد. محلول غذایی نیز مطابق محلول غذایی هوگلند و آرنون (۱۹۵۰) با اندکی تغییر (اضافه کردن ۵ گرم Fe-EDTA در یک لیتر و ۱ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر محلول غذایی) تهیه شد. پس از چهار روز از کشت بذور

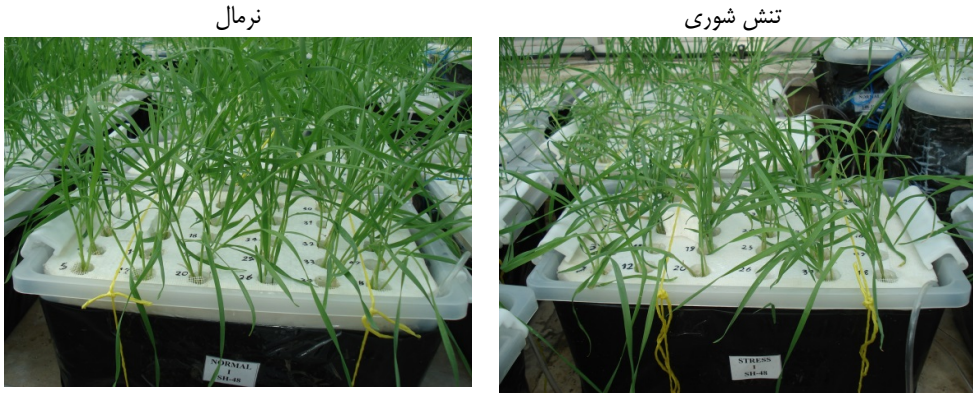
در داخل پتری‌دیش‌ها، تعداد ۳۰ بذر از بذور جوانه زده بصورت یکسان انتخاب و ۵ بذر از هر ژنوتیپ در داخل هر سوراخ قرار داده شد این آزمایش بصورت کرت‌های خرد شده با سه تکرار و در دو سطح نرمال (۱۰ میلی‌مولار NaCl) و تنش شوری (۱۵۰ میلی‌مولار NaCl) انجام شد. جهت اعمال شوری از NaCl استفاده شد. ابتدا جهت جلوگیری از شوک ناگهانی گیاهچه‌ها، به تمام تکرارها چه نرمال و چه شوری نصف محلول غذایی هوگلند داده شد. پس از سه روز به تکرارهای نرمال فقط محلول غذایی هوگلند کامل داده شد و به تکرارهای تحت تنش شوری محلول غذایی هوگلند کامل حاوی NaCl ۵۰ میلی‌مولار داده شد. سپس مقدار شوری به ۱۰۰ میلی‌مولار رسانده شد و در نهایت شوری به حداکثر خود یعنی ۱۵۰ میلی‌مولار رسید. برای اینکار محلول غذایی قبلی با محلول غذایی هوگلند به‌همراه ۱۵۰ میلی‌مولار نمک طعام تعویض شد. از این پس هر هفت روز یک‌بار محلول غذایی تعویض می‌شد. تنظیم pH بصورت روزانه با pHمتر دستی صورت پذیرفت. محدوده pH بین ۵/۵ تا ۶ تنظیم گردید. چهار هفته بعد از شروع اعمال تنش شوری، پس از نمونه‌گیری و خشک کردن، مقدار ۰/۰۱ گرم از هر نمونه وزن گردیده و جهت اندازه‌گیری غلظت سدیم و پتاسیم مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه QTL

در شرایط گلخانه برای تجزیه QTL از میانگین هر صفت در شرایط تنش استفاده شد. مکان‌یابی QTLها به‌وسیله برنامه QTL Cartographer v. 2.5 (Wang *et al*., 2012) و بر اساس روش مکان‌یابی فاصله ای مرکب (CIM)، مدل ۶ (مدل استاندارد) انجام گرفت. حداقل فاصله پویش ۱ سانتی‌مورگان و سایز پنجره ۱۰ سانتی‌مورگان در نظر گرفته شد. برای تعیین سطح آستانه معنی‌دار شناسایی QTLها، از آزمون چرخش داده‌ها (Permutation) با ۱۰۰۰ مرتبه تکرار (Churchill & Doerge, 1994) و سطح معنی‌داری ۵٪ استفاده شد. همچنین واریانس فنوتیپی که توسط هر یک از QTLها توجیه شد، محاسبه گردید. از آنجا که QTLهای نزدیک به هم (تقریباً ۲۰ سانتی‌مورگان و کمتر) معمولاً در جمعیت‌های زیر ۵۰۰ ژنوتیپ به‌عنوان یک QTL دیده می‌شوند (Tanksley, 1993)، فاصله بین دو پیک بر روی یک کروموزوم که به‌عنوان دو QTL مجزا در نظر گرفته می‌شوند ۲۰ سانتی‌مورگان در نظر گرفته شد (Ungerer *et al*., 2002; Ravi *et al*., 2011). برای تعیین فاصله اطمینان از روش Lod drop-off منسوب به لندر و بوتستین (۱۹۸۹) استفاده شد، به‌طوری‌که یک Lod از Lod ماکزیمم پیک کم شد و بدین ترتیب حدود اطمینان مشخص گردید.

نتایج و بحث

میانگین صفات اندازه‌گیری‌شده در گلخانه برای والدین و همه لاین‌های اینبرد نوترکیب در شرایط شاهد (۱۰ میلی‌مولار) و شور (۱۵۰میلی‌مولار) در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که وزن خشک لاین‌های اینبرد نوترکیب در شرایط شور (۱۵۰میلی‌مولار) کاهش یافته است (شکل ۱، جدول ۳). تحت شرایط شوری غلظت پتاسیم، نسبت پتاسیم به سدیم در والد روشن بیشتر از سوپرهد بود (جدول۲). مقایسه شاخص تحمل به شوری دو والد در شرایط نرمال و تنش شوری در شرایط گلخانه (جدول۳) نشان داد که شاخص تحمل به شوری والد روشن (۴۸٪) در حدود دو برابر والد سوپرهد (۲۲٪) می‌باشد. آنالیز شیمیایی نمونه برگ‌های ژنوتیپ‌ها نشان داد که غلظت سدیم در پاسخ به شوری افزایش پیدا کرده است. بنابراین این واریته غلظت سدیم کم و پتاسیم زیادی را تحت شرایط شور دارا بود و توانست نسبت پتاسیم به سدیم بالاتری (۶/۰۵) را به خود اختصاص دهد که این امر مجدداً موید تفاوت تحمل به شوری در دو والد می‌باشد.



شکل ۱. گلدان‌های مربوط به شرایط نرمال و تنش شوری با ژنوتیپ‌های یکسان

جدول ۲. میانگین صفات اندازه گیری شده در گلخانه برای والدین و لاین‌های اینبرد نوترکیب

	تنش شوری		
	K^+/Na^+	K^+ (میلی‌مول بر گرم وزن خشک)	Na^+ (میلی‌مول بر گرم وزن خشک)
روشن	6.05±0.21	3.297±0.31	0.544±0.11
سوپرهد	0.49±0.02	1.14±0.14	2.30±0.21
لاین‌های اینبرد نوترکیب	2.13±0.30	1.05±0.031	1.69±0.09

جدول ۳. شاخص تحمل به شوری دو والد در شرایط نرمال(صفر میلی‌مولار NaCl) و تنش شوری

نام والدین↓	وزن خشک اندام هوایی		شاخص تحمل
	نرمال	150mM Nacl	به تنش(%)
روشن	0.199	0.097	47.8
سوپرهد	0.235	0.053	22.6

از مجموع ۹۷۶ نشانگر (۸۶۹ نشانگر دارت و ۱۰۷ نشانگر SSR) مورد آزمون، جمعاً ۶۴۰ نشانگر (۶۱۰ دارت و ۳۰ SSR) دارای چندشکلی بودند. نسبت‌های تفرق دو کلاس ژنوتیپی در هر مکان ژنی با استفاده از آزمون کای‌اسکوئر ($P\leq$۰/۰۰۵) مورد بررسی قرار گرفت و ۱۰۹ نشانگر دارت و ۳ نشانگر SSR که از نسبت مندلی مورد انتظار (۱:۱) تبعیت نمی‌کردند، حذف گردیدند. همچنین نشانگرها و افراد جمعیت از نظر داده گمشده مورد بررسی قرار گرفتند. حداکثر داده گمشده مدنظر ۳۰ در نظر گرفته شد. در نهایت از ۴۵۱ نشانگر (۴۲۸ نشانگر دارت و ۲۳ SSR) برای تهیه نقشه لینکاژی استفاده شد (حداکثر فراوانی نوترکیبی ۰/۴ و LOD≥3 در نظر گرفته شد). تعداد ۲۷ گروه لینکاژی و ۲۰ کروموزوم با مجموع طول ۱۳۹۰/۳ سانتی‌مورگان به‌دست آمد (متوسط تعداد نشانگر در هر کروموزوم، ۲۲ با متوسط فاصله بین نشانگرها ۳/۰۸ سانتی‌مورگان). همچنین حداقل و حداکثر فاصله بین نشانگرها صفر و ۷۰ سانتی‌مورگان به‌دست آمد. ژنوم‌های A، B و D به‌ترتیب ۷، ۷ و ۶ کروموزوم، پوشش ۴۶۷/۷، ۵۵۱/۳ و ۳۷۱/۳ سانتی‌مورگان را به‌خود اختصاص دادند. تنها کروموزوم 4D تحت پوشش قرار نگرفت. اگرچه از

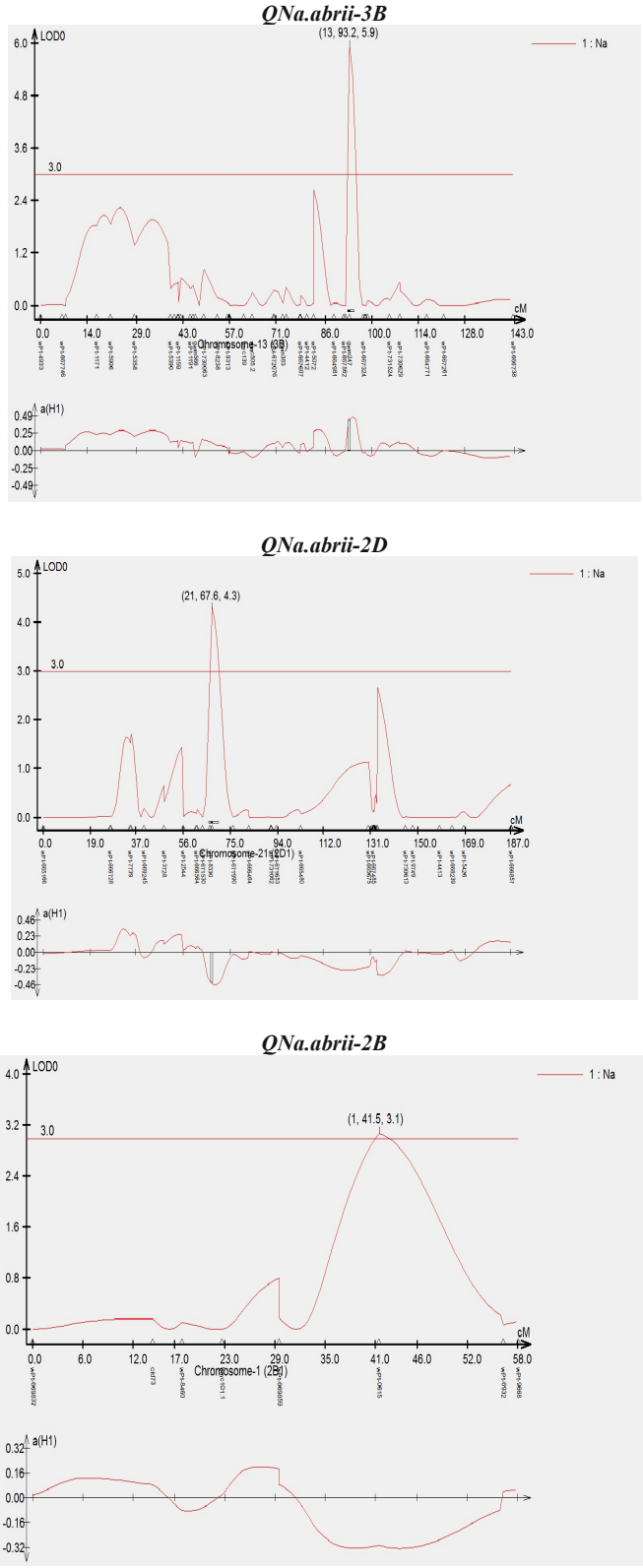
۹۷۶ نشانگر شامل ۱۰۷ نشانگر SSR و ۸۶۹ نشانگر DArT استفاده شد، اما نقشه ژنتیکی حاصله فقط شامل ۴۵۱ نشانگر از مجموع نشانگرها بود، و برخی از مناطق هنوز پوشش کافی نشانگری نداشته و همچنان فواصل بزرگی بر روی برخی گروه‌های لینکاژی حاصله وجود دارد (مانند$1A_1$، $2B_2$، 4B، 5D، $6D_2$ و 1D). لذا با کاربرد نشانگرهای بیشتر، برای برخی کروموزوم‌های ژنوم D و A می‌بایست پوشش ژنومی را تکمیل نمود. در اینجا اکثر نشانگرهای استفاده شده برای تهیه نقشه از نوع DArT بود که توسط محققین مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (Narjesi *et al*., 2015).

به‌دلیل پیچیده بودن ساختار ژنتیکی کنترل‌کننده عملکرد، این صفت به‌عنوان ملاک اصلی در انتخاب برای تحمل به تنش شوری مناسب نمی‌باشد (Flowers & Yeo, 1995). به همین دلیل علاوه بر عملکرد و صفات مرتبط با عملکرد، می‌توان از صفات فیزیولوژیک مرتبط با تحمل به تنش شوری و یا نشانگرهای بیوشیمیائی همچون نسبت K^+/Na^+ و خروج Na^+ نیز برای اصلاح گیاهان در پاسخ به تنش شوری استفاده نمود (Ashraf & O'Leary, 1996; Garcia *et al*., 1995; Munns *et al*., 2006; Asch *et al*., 2000; Munns & James, 2003; Shannon, 1984). در این تحقیق از شاخص‌های مذکور برای شناسائی و مکان‌یابی QTLهای مرتبط با تحمل به تنش شوری استفاده شد.

با استفاده از نقشه ژنتیکی حاصله از جمعیت لاین اینبرد نوترکیب مورد مطالعه، تعداد هفت QTL برای غلظت سدیم، غلظت پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم به‌دست آمد (جدول ۴). برای غلظت سدیم سه QTL بر روی کروموزوم‌های ۲B، ۳B و ۲D شناسایی شدند. *QNa.abrii-3B* با LOD ۵/۹ قوی‌ترین QTL شناسایی شده بود (جدول ۴، شکل۲). این QTL در فاصله نشانگری gwm247 و wPt-667324 قرار داشت و ۸/۳ درصد از تغییرات واریانس فنوتیپی این صفت را در شرایط تنش شوری توجیه می‌کرد. نشانگر *gwm247* دارای لینکاژ شدید با این QTL بود. این نشانگر می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی برای انتخاب به کمک نشانگر مورد استفاده قرار گیرد. آلل روشن مسئول کاهش غلظت سدیم و آلل والد حساس مسئول افزایش این صفت بودند. مکان ژنی کنترل کننده صفت محتوای سدیم در گندم دوروم (*Nax1*) بر روی بازوی بزرگ کروموزوم ۲A قرار دارد (Lindsay *et al*., 2004). با توجه به همیولوگ بودن سه ژنوم گندم هگزاپلوئید احتمال بسیار زیادی وجود دارد که QTLهای بزرگ اثر و یا کوچک اثر دیگری بر روی کروموزوم‌های 2B و *2D* وجود داشته باشد. در این تحقیق دو QTL دیگر به نام‌های *QNa.abrii-2*B و *QNa.abrii-2D* شناسایی شدند (جدول ۴، شکل۲). *QNa.abrii-2D* با LOD برابر ۴/۳، ۹/۲ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را در شرایط تنش شوری توجیه می‌کرد.

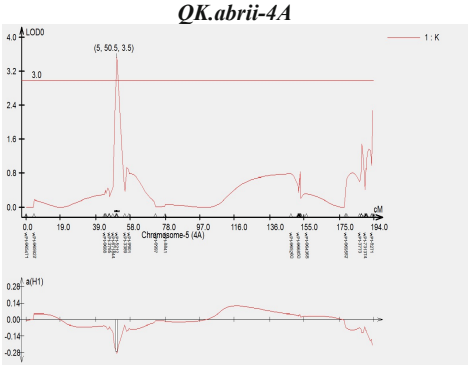
جدول ۴. جدول تجزیه QTLهای مرتبط با تحمل به شوری در گندم نان

نام صفت	نام QTL	فاصله نشانگری یا نزدیکترین نشانگر	موقعیت (cM)	LOD	اثر افزایشی	R^2(%)
غلظت سدیم	*QNa.abrii-3B*	Gwm247 - wPt-667324	93.2	5.9	-0.39	8.3
غلظت سدیم	*QNa.abrii-2B*	wPt-8460 – cfd73	41.5	3.1	0.30	3.5
غلظت سدیم	*QNa.abrii-2D*	wPt-0298	67.6	4.3	-0.51	9.2
غلظت پتاسیم	*QK.abrii-4A*	wPt-5212	50.5	3.5	0.27	4.7
غلظت پتاسیم	*QK.abrii-3B*	Gwm247 - wPt-667324	97.9	4.1	0.10	5.3
غلظت پتاسیم	*QK.abrii-2D*	wPt-669245	40.3	3.7	-0.50	7.9
نسبت پتاسیم به سدیم	*QK/Na.abrii-7B*	wPt-8920	43.2	3.3	-1.58	2.3

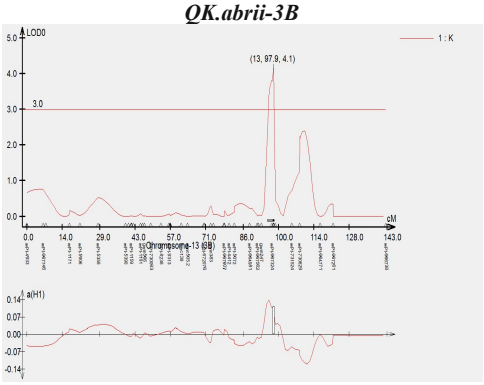


شکل ۲. نمودار حاصل از تجزیه QTL صفات مختلف با استفاده از نرم‌افزار QTL Cartographer

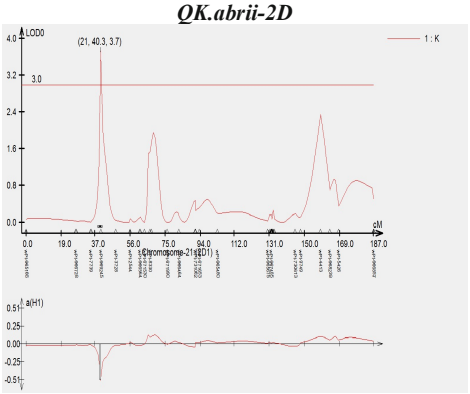
QK.abrii-4A



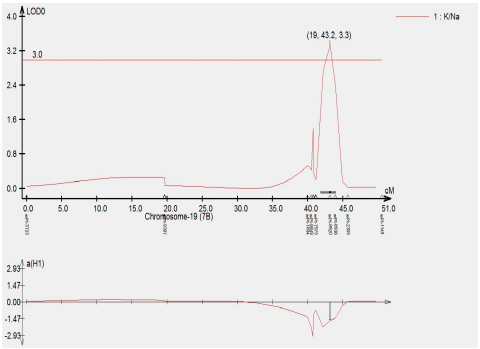
QK.abrii-3B



QK.abrii-2D



QK/Na.abrii-7B



ادامه شکل ۲. نمودار حاصل از تجزیه QTL صفات مختلف با استفاده از نرم‌افزار QTL Cartographer

سه QTL بر روی کروموزوم‌های ۴A، ۳B و ۲D برای غلظت پتاسیم شناسایی شدند (جدول ۴). این QTLها کوچک اثر بوده و جمعا ۱۸ درصد از تغییرات این صفت را توجیه می‌کردند. آلل والد روشن مسئول افزایش این صفت و آلل به ارث رسیده از والد حساس مسئول کاهش این صفت بودند. غلظت پتاسیم در سیتوپلاسم در رابطه با سدیم می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور کمکی برای تحمل به شوری به کار رود (Munns & Tester, 2008). غلظت پتاسیم روشن و سوپرهد در شرایط شوری به‌ترتیب ۸/۶ و ۳۷ درصد کاهش پیدا کرد. در خصوص نسبت پتاسیم به سدیم تنها یک QTL کوچک اثر شناسایی شد که بر روی کروموزوم ۷B قرار داشت و ۳ درصد از تغییرات این صفت را توجیه می‌کرد. بدلیل تعداد کروموزوم زیاد گندم نسبت به سایر گیاهان و دشواری شرایط ایجاد تنش، گزارشات کمی در خصوص QTLهای موثر در تحمل به شوری در گندم منتشر شده است. همچنین مقایسه موقعیت کروموزومی QTLها با هم مشکل است چون محققین مختلف از مواد گیاهی مختلف، نشانگرهای متفاوت، نقشه‌ها و نرم‌افزارهای مختلفی استفاده می‌کنند (Lin *et al*., 2004) و غالباً QTLهای مربوطه در شرایط بهینه رشد معرفی شده‌اند و تحقیقات نسبتا کمی در زمینه QTLهای موثر در تنش شوری در گندم، چه در شرایط کنترل شده (Genc *et al*., 2010; Ogbonnaya *et al*., 2008; Lindsay *et al*., 2004; Liqing *et al*., 2007) و چه در شرایط مزرعه با خاک شور و آب آبیاری شور، انجام شده است (Azadi *et al*., 2015; Narjesi *et al*., 2015; Diaz de Leon *et al*., 2011; Quarrie *et al*., 2005). در این تحقیق، آنالیز QTL برای صفات گلخانه‌ای با استفاده از نرم‌افزار QTL Cartographer v. 2.5 منجر به شناسایی هفت QTL شد. تعداد QTLهای شناسایی درهرسه ژنوم A، B و D گندم به‌ترتیب برابر بود با ۱، ۴ و ۲.

QTLهای متعددی در این تحقیق برای غلظت سدیم در شرایط شور بر روی کروموزوم‌های ۴A، ۳B، ۲D و ۷A شناسایی شدند. محققین مختلف نیز QTLهایی بر روی کروموزوم‌های 6A, 2B,7A, 2B, 2D, 6D شناسایی کردند (Ogbonnaya *et al*., 2008; Lindsay *et al*., 2004). یکی از مهمترین QTLهایی که تاکنون برای خروج سدیم در شرایط شور شناسایی شده و در حدود ۴۰٪ از تغییرات این صفت را توجیه می‌کند، توسط لیندزی و همکاران (Lindsay *et al*., 2004) شناسایی شده است، این ژن Nax1 نام گرفته که بر روی کروموزوم 2A قرار دارد. در این تحقیق QTLی بر روی این کروموزوم یافت نشد. دو QTL از بین QTLهای یافت شده بر روی کروموزوم ۳B قرار داشتند. در تحقیقات قبلی کلاسترهای QTL عملکرد و اجزای آن در شرایط نرمال و تنش شوری بر روی کروموزوم ۳B شناسایی شده است (Azadi *et al*., 2015). همچنین دو QTL *QNa.abrii-3*B و *QK.abrii-3*B هر دو در بازه نشانگری Gwm247-wPt-667324 قرار گرفتند این امر نشان‌دهنده اهمیت این ناحیه از کروموزوم ۳B در تحمل به شوری در گندم می‌باشد. در خصوص نسبت پتاسیم به سدیم که یکی از مهمترین شاخص‌های تحمل به تنش شوری می‌باشد، بدلیل عدم پوشش کروموزوم 4D، قادر به شناسایی ژن Kna1 نبودیم اما QTL معنی‌دار دیگری بر روی کروموزوم ۷B شناسایی شد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی به خاطر فراهم آوردن امکات مالی این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Asch F, Dingkuhn M, Dorffling K, Miezan K, (2000) Leaf K/Na ratio predicts salinity. Induced yield loss in irrigated rice. Euphytica, 113: 109-118.

Ashraf M, O`Leary JW (1996) Responses of some newly developed salt-tolerant genotypes of spring wheat to salt stress: 1. Yield components and ion distribution. J. Agron. Crop Sci, 176: 91-101.

Azadi A, Mardi M, Majidi Hervan E, Mohammadi SA, Moradi F, Tabatabaee MT, Pirseyedi SM, Ebrahimi M, Fayaz F, Kazemi M, Ashkani S, Nakhoda B, Mohammadi-Nejad GH (2015) QTL mapping of yield and yield components under normal and salt stress conditions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Mol. Biol. Rep, 33: 102-120.

Azhar FM, McNeilly T (1988) The genetic basis of variation for salt tolerance in *Sorghum bicolor* L. Moench seedlings. Plant Breeding; 101: 114-121.

Churchill, G. A, Doerge, R. W, (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics; 138: 963-971.

Díaz De León JL, Escoppinichi R, Geraldo N, Castellanos T, Mujeeb-Kazi A, Röder MS (2011) Quantitative trait loci associated with salinity tolerance in field grown bread wheat. Euphytica; 181: 371-383.

Edwards J, Shavrukov Y, Ramsey C, Tester M, Langridge P, Schnurbusch T (2009) Identification of a QTL on chromosome 7AS for sodium exclusion in bread wheat. In: Proceeding of the 11th International Wheat Genetics Symposium. Brisbane, Sydney University Press, Sydney; 3: 891-893.

Epstein E (1977) Genetic potential for solving problems of soil mineral stress: Adaptation of crops to salinity. Proc. of Workshop. Cornell University Exp. Stn. Special Bull., New York.

Flowers T, Yeo A (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? Aust. J. Plant Physiol. 22: 875-884.

Garcia A, Senadhira D, Flowers TJ, Yeo AR (1995) The effects of selection for sodium transport and of selection for agronomic characteristics upon salt resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 90: 1106-1111.

Garland SH, Lewin L, Abedinia M, Henry R, Blakeney A (1999) The use of microsatellite polymorphisms for the identification of Australian breeding lines of rice (*Oriza sativa* L.) Euphytica; 108: 53-63.

Genc Y, McDonald GK, Tester M (2007) Reassessment of tissue Na^+ concentration as a criterion for salinity tolerance in bread wheat. Plant Cell Environ, 30: 1486-1498.

Genc Y, Oldach K, Verbyla AP, Lott G, Hassan M, Tester M, Wall work H, McDonald GK (2010) Sodium exclusion QTL associated with improved seedling growth in bread wheat under salinity stress. Theor. Appl. Genet, 121(5): 877-94.

Gorham J, Forster BP, Budrewicz E, Wyn Jones RG, Miller TE, Law CN (1986) Solute accumulation and distribution in an amphidiploid derived from *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring and *Thinopyrum bessarabicum*. J. Exp. Bot, 37: 1435-49.

Gorham J, Hardy C, Wyn Jones RG, Joppa LR, Law CN (1987) Chromosomal location of a K/Na discrimination character in the D genome of wheat. Theor. Appl. Genet, 74: 584-588.

Gorham J, Wyn Jones RG, Bristol A (1990) Partial characterization of the trait for enhanced K^+-Na^+ discrimination in the D genome of wheat. Planta, 180: 590-597.

Gorham J, Bridges J, Dubcovsky J, Dvorak J, Hollington PA, Luo MC, Khan JA (1997) Genetic analysis and physiology of a trait for enhanced K^+/Na^+ discrimination in wheat. New Phytol, 137: 109-116.

Grieve CM, Lesch SM, Maas EV, Francois LE (1993) Leaf and spikelet primordia initiation in salt-stressed wheat. Crop Sci, 33: 1286-1294.

Husain S, Munns R, Condon AG (2003) Effect of sodium exclusion trait on chlorophyll retention and growth of durum wheat in saline soil. Aust. J. Agr. Res, 54: 589-597.

James RA, Davenport RJ, Munns R (2006) Physiological characterization of two genes for Na^+ exclusion in durum wheat, *Nax1* and *Nax2*. Plant Physiol, 142: 1537-1547.

Kingsbury RW, Epstein E (1984) Selection for salt resistant spring wheat. Crop Sci, 34: 310-315.

Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. Ann. Hum. Genet, 12:172-175.

Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics, 121: 185-199.

Lin HX, Zhu MZ, Yano M, Gao JP, Liang ZW, Su WA, Hu XH, Ren ZH, Chao DY (2004) QTLs for Na and K uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. Theor. Appl. Genet, 108: 253-260.

Lindsay MP, Lagudah ES, Hare RA, Munns R (2004) A locus for sodium exclusion (*Nax1*), a trait for salt tolerance, mapped in durum wheat. Func. Plant Bio, 31: 1105-1114.

Liqing M, Erfend Z, Naxing H, Ronghua Z, Guoying W, Jizeng J (2007) Genetic analysis of salt tolerance in recombinant inbred population of wheat (*Triticum aestivem* L.). Euphytica, 153: 109-117.

McCouch SR, Chen X, Panaud O, Temnykh S, Xu Y, Cho Y, Huang N, Ishii T, Blair M (1997) Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. Plant Mol. Biol, 35: 89-99.

Munns R (1985) Na^+, K^+ and Cl- in xylem sap flowing to shoots of $NaCl^-$ treated barley. J. Exp. Bot, 36: 1032-1042.

Munns R, James RA (2003) Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. Plant Soil, 253: 201-218.

Munns R, James RA, Lauchli A (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. J. Exp. Bot, 57: 1025-1043.

Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology; 59: 651-681.

Narjesi V, Mardi M, Hervan EM, Azadi A, Naghavi MR, Ebrahimi M, Zali AA (2015) Analysis of Quantitative Trait Loci (QTL) for Grain Yield and Agronomic Traits in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Under Normal and Salt-Stress Conditions. Plant Mol. Biol. Rep, 33: 2030-2040.

Nevo E, Krugman T, Beiles A (1993) Genetic resources for salt tolerance in the wild progenitor of wheat (*Triticum dicoccoides*) and barley (*Hordeum sponteneum*) in Israel. Plant Breeding; 110: 338-341.

Norlyn JD (1980) Breeding salt tolerance plants. In genetic engineering of osmoregulation. Plenum, New York.

Ogbonnaya FC, Huang S, Steadman E, Livinus E, Dreccer F, Lagudah ES, Munns R (2008) Mapping quantitative trait loci associated with salinity tolerance in synthetic derived backcrossed bread lines. In: Proceeding of the 11th International Wheat Genetics Symposium. Sydney University Press.

Pearce SC, Moore CS (1976) Reduction of experimental error in perennial crops, using adjustment by

neighbouring crops. Exp. Agr, 12: 267-72.

Qadir M, Qureshi AS, Cheraghi SAM, (2008) Extent and characterization of salt-affected soils in Iran and strategies for their amelioration and management. Land Degrad. Dev, 19: 214-227.

Quarrie SA, Steed A, Calestani C, Semikhodskii A, Lebreton C, Chinoy C, Steele N, Pljevljakusic D, Waterman E, Weyen J, Schondelmaier J, Habash DZ, Farmer P, Saker L, Clarkson DT, Abugalieva A, Yessimbekova M, Turuspekov Y, Abugalieva S, Tuberosa R, Sanguineti MC, Hollington PA, Aragues R, Royo A, Dodig D (2005) A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring × SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. Theor. Appl. Genet, 110: 865-880.

Ravi K, Vadez V, Isobe S, Mir RR, Guo Y, Nigam SN, Gowda MV, Radhakrishnan T, Bertioli DJ, Knapp SJ, Varshney RK (2010) Identification of several small main-effect QTLs and a large number of epistatic QTLs for drought tolerance related traits in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Theor. Appl. Genet, 122(6): 1119-32.

Rawson HM, Richards RA, Munns R (1988) An examination of selection criteria for salt tolerance in wheat, barley and triticale genotypes. Aust. J. Agr. Res, 39: 759-772.

Rengasamy P (2006)World salinization with emphasis on Australia. J. Exp. Bot, 57:1017-1023.

Ro¨der MS, Plaschke J, Ko¨nig SU, Bo¨rner A, Sorrells ME (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol. Gen. Genet, 246: 327-333.

Shannon MC (1984) Breeding, selection, and the genetic of salt tolerance. p. 231-254. In: R.C. Stapless and G.H. Toenniessen. Wiley. New York.

Tanksley SD (1993) Mapping polygenes. Annu. Rev. Genet, 27: 205-233.

Tanji KK (1990) Nature and extent of agricultural salinity. In: Tanji,K.K. (Ed.) Agriculture Assessment and Management .pp, 1-17. American Society of Civil Engineering, New York.

The TT (1973) Transference of resistance to stem rust from *Triticum monococcum* L. to hexaploid wheat. Dissertation. University of Sydney.

Ungerer MC, Halldorsdottir SS, Modliszewski JL, Mackay TFC, Purugganan MD (2002) Quantitative trait loci for inflorescence development in Arabidopsis thaliana. Genetics; 160: 1133-1151.

Wang S, Basten CJ, Zeng ZB (2012b) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm

Yang GP Maroof MAS, Xu CG, Zhang Q, Biyashcv RM (1994) Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in land races and cultivars of rice. Mol. Gen. Genet, 245: 187-194.