**Crop Biotech.**
Autumn and Winter (2013) 5: 117-127

**مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی**
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۱۲۷- ۱۱۷)

# تجزیه مکان‌های ژنی کمّی مرتبط با آنزیم‌های تحمّل به شوری در جو (*Hordeum vulgare* L.)

**حسین جعفری[۱]*، محمدنقی انصاری [۲]، محمدعلی ابراهیمی[۳]، مهدی طاهری[۴] و ابراهیم دستکار[۵]**
۱، ۴، استادیار،۵ ، کارشناس آزمایشگاه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، زنجان، ۲، آموزشکده فنی الغدیر زنجان و دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور، ۳، دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران.
(تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۷ - تاریخ تصویب: ۹۲/۷/۳۰)

# Analyses of Quantitative Trait Loci Involved in Production of Enzymes Conferring Salt Tolerance in Barley (*Hordeum vulgare* L.)

**H. JAFARY[1]*, M.N. ANSARI[2], M.A. EBRAHIMI[3], M. TAHERI[4] AND E. DASTKAR[5]**
1, 4, Assistant Professor, 5, Laboratory Technician of Agricultural and Natural Resource Research Center of Zanajn Province, Zanjan, Iran. 2, Alghadir Technical College, Zanjan and M.Sc. Graduated of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Iran, 3, Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran
(Received: Apr. 6, 2013 - Accepted: Oct. 22, 2013)

**چکیده**

آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز دو آنزیم فعّال در شرایط تنش شوری هستند که اندازه گیری سطوح فعالیت آن‌ها در ارقام حساس و متحمّل می‌تواند برای مکان‌یابی QTLهای دخیل در تحمّل به شوری مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق ابتدا والدین چهار توده نقشه‌یابی جو برای مطالعه وجود تنوّع لازم در سطوح فعّالیت‌های آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز مورد آزمایش قرار گرفتند. تنوّع قابل ملاحظه‌ای از نظر فعّالیت دو آنزیم مذکور بین والدین جمعیّت OWB مشاهده شد. برای مکان‌یابی QTLهای دخیل در تحمّل به شوری، تعداد ۹۴ لاین دابل هاپلوئید این جمعیّت مورد آزمایش قرار گرفت. در این مطالعه مقدار کمّی این دو آنزیم به عنوان صفت کمّی در دو سطح شوری [صفر (شاهد) و ۲۰۰ میلی‌مول NaCl] در افراد این جمعیّت اندازه گیری شد و متعاقباً آنالیزهای مربوط به مکان‌یابی QTLها به‌وسیله نرم‌افزار MAPQTL 5 انجام گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که فعّالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش شوری با دو QTL بزرگ اثر بر روی کروموزوم‌های (3H) ۳ و (4H) ۴ و دو QTL کوچک‌اثر بر روی کروموزوم‌های (1H) ۵ و (5H) ۷ کنترل می‌شود. برای آنزیم پراکسیداز QTL مکان‌یابی نشد. نتایج این تحقیق نشان داد که سطح فعّالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش شوری می‌تواند به عنوان یک شاخص کمّی برای مکان‌یابی ژن‌های دخیل در فرایند تحمّل به شوری مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** مکان‌یابی QTLها، جو، کاتالاز، پراکسیداز، مکانیسم‌های تحمّل شوری

**Abstract**

Peroxidase and Catalyse are two important enzymes involved in reaction of many crop species to salt tolerance. Assessment of activity of these enzymes in the seedlings of barley during salt stress and using quantitative data for mapping of QTLs involved in salt tolerance has been addressed in this study. Parents of four barley mapping populations were exposed to the different concentrations (0 mM, 100mM and 200 mM) of salt (NaCl) and the level of activity of Catalase and Proxidase were quantified in the seedlings stage. There was a high variation in enzymatic activities of parents of OWB population (Dom and Rec) in 200mM of NaCl. In order to map QTLs involved in salt tolerance in OWB, 94 doubled haploid lines were exposed to 0 mM and 200mM of NaCl and the activity of Catalase and Peroxidase were quantified. Mapping of QTLs was performed using MAPQTL5 software. The results showed that the position of QTLs depends on both concentration of salt and on the type of enzyme. For Peroxidase activity there was no QTL mapped despite a high variation between individuals of mapping population while for Catalase in the concentration of 200 mM of NaCl, two QTLS in Chromomes 3(3H) and 4(4H) were mapped. Two other minor QTLs with LOD values slightly lower than the threshold were mapped in chromosomes 5(1H) and 7(5H). The results showed that quantification of the level of activity of Catalase can be used as quantitative data for mapping of QTLs involved in salt tolerance in barley.

**Keywords:** QTL mapping, Barley, Catalase enzyme, Peroxidase enzyme, mechanisms of salt tolerance

* نویسنده مسئول: حسین جعفری
E-mail: hjafaryir@yahoo.com

## مقدمه

یکی از موانع جدی در تولید محصولات مهم کشاورزی، شوری خاک است. بیش از ۲۰ درصد زمین‌های تحت کشت دنیا شور هستند (Zhu, 2001) و هرساله نیز در اثر شرایط تشدیدکننده و نامساعد، به سطح و میزان شوری زمین‌های کشاورزی افزوده می‌شود. به دلیل هزینه‌های بسیار زیاد استراتژی اصلاح خاک، زهکشی و کنترل آب آبیاری، به نظر می‌رسد تولید ارقامی با سطح تحمّل بالای شوری به دلیل هزینه‌های پایین‌تر و نیز کارائی بیشتر، راه مؤثرتری در جهت غلبه بر مشکلات ناشی از افزایش شوری خاک و آب در آینده باشد.

شوری باعث تغییرات قابل ملاحظه‌ای در فعّالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی گیاهان می‌گردد. تنش شوری به دلیل اثرات اسمزی، در بسیاری از فعّالیت‌های متابولیکی، کمبود آب را به دنبال دارد (Greenway and Munns, 1980) که نتیجه آن تشکیل گونه‌های فعّال اکسیژن[1] است. در گیاهان با سطوح بالایی از آنتی‌اکسیدانت‌های ساختمانی یا القایی، تحمّل بیشتری به این آسیب اکسیداتیو گزارش شده است. فعّالیت آنزیم‌های اکسیداتیو مثل کاتالاز (CAT)، اسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD)، گلوتاتیون ریداکتاز (GR) و سوپر اکسید دیسموتاز، تحت تنش شوری در گیاهان افزایش می‌یابد و اغلب یک ارتباط مثبتی بین سطوح این آنزیم‌ها و تحمّل به شوری مشاهده شده است (Parida and Das, 2005). چنین همبستگی تاکنون در گونه‌های مختلف گیاهان زراعی مورد بررسی قرار گرفته است.

Ahmad و همکاران (۲۰۰۸)، گزارش کردند که تنش شوری در گیاه نخودفرنگی منجر به افزایش معنی‌دار فعّالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت می‌گردد. در این مطالعه میزان فعّالیت آنزیم‌های SOD، APX، GR و DHAR در هر دو رقم مورد مطالعه تحت شرایط تنش افزایش یافته بود.

طی مطالعه‌ی Esfandiari و همکاران (۲۰۰۷) اثر تنش شوری بر فعّالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت دو رقم گندم به نام‌های سرداری و الوند بررسی گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فعّالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت SOD، CAT و GR در رقم سرداری با افزایش سطح تنش شوری افزایش می‌یابد اما در رقم الوند میزان فعّالیت آنزیم‌های مذکور در تمام سطوح تنش ثابت بود. این محققین پیشنهاد کردند که در رقم سرداری مهار ROSها توسط سیستم کنترل به‌خصوص SOD، CAT و GR انجام می‌شود و به این وسیله آسیب به غشاء کنترل می‌شود.

اثر تنش شوری بر فعّالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در ده رقم گندم دوروم توسط Kahrizi و همکاران (۲۰۱۲) مطالعه شد. نتایج این تحقیق نشان داد که ضمن وجود اثر معنی‌داری متقابل شوری و رقم در تمام صفات مورد مطالعه، میزان فعّالیت آنزیم‌های ATPase، SOD و POX تحت تنش شوری افزایش می یابد در حالی که فعّالیت CAT در مقایسه با شاهد کاهش یافت. در مطالعه‌ای روی گیاه جو تحت تنش شوری توسط Ali و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردید که تنش شوری ضمن کاهش سرعت رشد گیاه، منجر به افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها و افزایش فعّالیت پراکسیداز و ایندول استیک اسید اکسیداز می‌گردد.

در جو، QTLهای متعددی برای تحمّل به شوری توسط محققین مختلف (Mano and Takeda, 1996; Dadshani *et al*., 2004;) شناسایی شده و این کار به طور مداوم در حال توسعه است. تحمّل به شوری یکی از پیچیده‌ترین صفات کمّی است که کنترل آن به وسیله چندین ژن کوچک اثر کنترل می‌شود. برای مکان‌یابی ژن‌های دخیل در تحمّل به شوری معمولاً از اندازه گیری برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی به عنوان داده کمّی استفاده می‌شود. از این شاخص‌ها می‌توان به درصد جوانه زنی، زیست توده ریشه و زیست توده اندام‌های هوایی در شرایط تنش شوری اشاره کرد. با این حال به نظر می‌رسد سازگاری‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی به تنش شوری در سطح سلولی، مسئول اصلی تحمّل شوری باشند و این سازگاری‌ها را می‌توان در سطح مولکولی آنالیز کرده و ژن‌های القاء پذیر از شوری را شناسایی کرد (Shinozaki *et al*., 1998). بنابراین می‌توان با اعمال تنش شوری در ارقام مختلف و اندازه‌گیری میزان فعّالیت آنزیم‌های مرتبط با شوری درگیاه جو، از آن‌ها به عنوان شاخص کمّی در مکان‌یابی ژن‌های دخیل در تولید آنزیم‌های مرتبط با تحمّل به شوری استفاده کرد. اگر چه انجام چنین مطالعاتی مستلزم تهیه توده نقشه‌یابی و نقشه ژنتیکی می‌باشد که خود نیازمند صرف چندین سال وقت است، بررسی توده‌های نقشه‌یابی موجود که احتمالاً برای مقاصد دیگری غیر از مکان‌یابی ژن‌های مرتبط با تحمّل به شوری ایجاد شده‌اند، مسیر را کوتاه‌تر و دستیابی به هدف را آسان‌تر می‌کند. در چنین مواردی، اگر بین دو والد یک توده نقشه‌یابی از نظر شاخص‌های مرتبط با تحمّل شوری تفرق مشاهده شود، می‌توان از آن‌ها برای مطالعه ژن‌های دخیل در

1. Reactive Oxygen Species (ROS)

تحمّل به شوری استفاده کرد. لذا، این مطالعه با هدف تعیین سطوح فعّالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مرتبط با تحمّل شوری (کاتالاز و پراکسیداز) در گیاه جو و شناسایی مکان‌های ژنی (QTLهای) مرتبط با تولید آنزیم‌های مذکور روی کروموزوم‌های آن، در مرحله گیاهچه جو و تحت تنش شوری انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

مطالعه حاضر در سال ۹۰-۱۳۸۹ در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان طی دو مرحله انجام شد. در مرحله اول والدین چهار توده نقشه‌یابی جو (از دو نوع RIL[1] و DH[2]) در سه سطح شوری صفر (شاهد)، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک کلریدسدیم (NaCl)، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در محیط گلخانه تحت تیمار قرار گرفتند.

جمعیّت‌های RIL، حاصل پروژه‌های تحقیقاتی دانشگاه واخنینگن هلند بوده و شامل: ۱- جمعیّت LxV، حاصل تلاقی والدهای Vada و L94 با ۱۰۳ لاین و دارای نقشه لینکاژی با حدود ۵۶۰ نشانگر (Qi *et al*., 1998). ۲- جمعیّت Su xV، حاصل تلاقی دو والد Susptrit و Vada با ۱۵۲ لاین و نقشه لینکاژی با ۴۵۰ نشانگر (Jafary *et al*., 2006). ۳- جمعیّت Su x CC، حاصل تلاقی بین والدهای Susptrit و Cebada Capa با ۱۱۳ لاین و نقشه لینکاژی با ۴۹۵ نشانگر (Jafary *et al*., 2008). ۴-جمعیّت دابل هاپلوئید OWB حاصل تلاقی بین والدهای Dom و Rec (Costa *et al*., 2001) دارای ۹۴ لاین و نقشه ژنتیکی مرکب از ۷۹۷ نشانگر که در مطالعات ژنتیکی به عنوان مرجع مورد استفاده قرار می‌گیرد (جدول ۱) بود.

### ارزیابی سطح آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در والدین توده‌های نقشه‌یابی

تعداد پنج بذر ضدعفونی شده با محلول هیپوکلریت سدیم از هر یک از والدین، در گلدان‌هایی به قطر پنج سانتی متر و حاوی مخلوط به نسبت حجمی یک به یک (۱:۱) ماسه و پرلیت و در سه تکرار کشت شد. به مدت دو هفته، یعنی تا استقرار مناسب دانه‌رست‌ها (تا مرحله سه برگی) گلدان‌ها با آب مقطر آبیاری شدند و پس از استقرار دانه‌رست‌ها، به مدت سه هفته (تا پایان مرحله رشد رویشی) نسبت به اعمال تنش شوری به همراه محلول غذایی هوگلند (جدول ۲) اقدام گردید. بلافاصله پس از پایان دوره تنش، نمونه‌های برگی از برگ‌های سبز انتهایی بوته‌ها تهیه و جهت استخراج و اندازه-گیری فعّالیت آنزیمی، در مجاورت نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل شد. برای استخراج آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، یک گرم برگ تازه در داخل هاون چینی و در مجاورت ازت مایع کوبیده شده و سپس ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم پتاسیم (200mM, pH= 7.0) به نمونه‌ها اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه تکان دادن در مجاورت یخ-آب، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۱۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ و سپس محلول روشناور برداشته شد و در میکروتیوپ‌های متعدد توزیع و به منظور اندازه‌گیری فعّالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و پروتئین محلول کل استفاده گردید. اندازه گیری فعّالیت آنزیم پراکسیداز به روش Chane (1955) وMaehly و آنزیم کاتالاز به روش Aebi (1984) با اندکی تغییرات انجام شد.

### کمّیت سنجی سطح فعّالیت آنزیمی درتوده نقشه‌یابی OWB

پس از آنالیز داده‌های حاصل از مرحله قبل و با توجه به وجود تفاوت‌های قابل ملاحظه و معنی‌دار بین والدین جمعیّت OWB (Dom و Rec) در سطح فعّالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، از این توده نقشه‌یابی برای مکان‌یابی ژن‌های دخیل در تنش شوری استفاده شد. برای این منظور افراد توده نقشه‌یابی فوق (۹۴ لاین دابل هاپلوئید) انتخاب و با همان شرایط مرحله قبل درون گلدان‌های حاوی پرلیت و شن و در دو تکرار مختلف کشت شدند. مراحل کشت، تهیه مواد غذایی و تیمار با کلرید سدیم همانند مرحله قبل انجام گردید با این تفاوت که این آزمایش تنها در دو سطح (شاهد و ۲۰۰میلی‌مولار NaCl) انجام گردید. مراحل نمونه برداری، استخراج آنزیم‌ها واندازه گیری سطوح فعّالیت آنزیمی همانند روش ذکر شده برای والدین توده نقشه‌یابی بود.

### آنالیز مکان‌های ژنی مرتبط با فعّالیت آنزیمی

سطح فعّالیت آنزیمی برای دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز برای هر یک از افراد جمعیّت OWB در دو تکرار اندازه گیری و میانگین آن به عنوان داده کمّی ( Qua. file) ثبت گردید. فایل داده مربوط به نقشه‌های لینکاژی (map file) و نیز فایل ژنوتیپ مکان‌های ژنی (loc. file) از سایت دانشگاه اورگون آمریکا (http://www.barleyworld.org/) استخراج گردید. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار MAPQTL

1. Recombinant Inbreed Lines
2. Doubled Haploids

5 استفاده شد.

جدول ۱- ویژگی‌های چهار توده نقشه‌یابی جو مورد استفاده برای تعیین سطوح حساسیت والدین به شوری

| جمعیّت‌ها | | | نشانگرها | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| نام | نوع | تعداد لاین | RAPD | RFLP | AFLP | SSR | ژن* | نشانگرهای دیگر **ا | کل |
| L x V | RIL | 103 | 0 | 0 | 785 | 138 | 5 | 29 | 957 |
| Su x V | RIL | 152 | 0 | 0 | 420 | 24 | 2 | 4 | 450 |
| Su x Cc | RIL | 113 | 0 | 0 | 481 | 14 | 0 | 0 | 459 |
| OWB | DH | 94 | 5 | 103 | 594 | 76 | 14 | 5 | 797 |

* نشان‌دهنده نشانگرهای بیو شیمیایی و مورفولوژیک و ژن‌های مهم مقاومت به بیماری است.

** شامل نشانگرهایی از جمله SCAP، SNPو CAPS می‌باشد.

جدول ۲- مقادیر عناصر و اجزاء تشکیل دهنده محلول غذایی هوگلند و سطوح تنش

| مقدار (گرم در ۱۰۰۰میلی لیتر) | فرمول شیمیائی | ترکیب مورد استفاده |
|---|---|---|
| 3 | $Ca(No3)2.4H_2O$ | نیترات کلسیم |
| 1.25 | $K(No)_3$ | نیترات پتاسیم |
| 1.1 | $MgSO_4$ | سولفات منیزیم |
| 0.3 | $(NH_4)_3PO_4$ | منو فسفات آمونیم |
| 6 | NaCl | کلریدسدیم (برای تنش ۱۰۰میلی‌مول) |
| 12 | NaCl | کلریدسدیم (برای تنش ۲۰۰میلی‌مول) |

جهت مکان‌یابی QTLها ابتدا از آنالیز مکان‌یابی درون فاصله‌ای[1] استفاده شد. سپس انتخاب کوفاکتورها با استفاده از گزینه انتخاب خودکار کوفاکتورها توسط نرم افزار و نیز روش گام به گام آزمون و خطا و روش حذف برگشتی انجام گردید. نشانگرهای انتخاب شده به عنوان کوفاکتور، با استفاده از روش MQM mapping، جهت مکان‌یابی دقیق QTLها مورد استفاده قرار گرفتند. آستانه معنی‌داری ( LOD threshold) با استفاده از روش Permutation test در نرم افزار Map QTL برای هر یک از آنزیم‌های مورد مطالعه محاسبه گردید.

## نتایج و بحث

### سطوح فعّالیت آنزیمی والدین توده‌های نقشه‌یابی

اندازه گیری فعّالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در شرایط تنش در والدین توده‌های نقشه‌یابی جو نشان داد که از نظر فعّالیت آنزیمی تفاوت‌هایی بین این ژنوتیپ‌ها وجود دارد.

### والدین جمعیّت L x V

از نظر میزان فعّالیت آنزیم پراکسیداز، والدین این جمعیّت ( L94 و Vada) درسطح شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بودند ($P< 0.01$) و با افزایش سطح شوری تاسطح ۱۰۰ میلی‌مول NaCl با توجه به اینکه میزان فعّالیت این آنزیم در والد L94 به شدّت کاهش و در والد Vada اندکی افزایش یافت میزان تفاوت بین دو والد غیر معنی‌دار شد. با افزایش سطح شوری تا میزان۲۰۰ میلی‌مول NaCl در والد L94 میزان فعّالیت این آنزیم به شدّت افزایش نشان داد ولی در والد Vada اندکی کاهش فعّالیت مشاهده شد. بین والدین این جمعیّت از نظر فعّالیت آنزیم کاتالاز در این سطح شوری تفاوت بسیار معنی‌داری مشاهده شد ($P< 0.01$). اگر چه بین دو والد این توده از نظر میزان فعّالیت آنزیم کاتالاز در سطح شاهد تفاوت جزئی وجود داشت، امّا این تفاوت معنی‌دار نبود.

### والدین جمعیّت Cc x Su

بین والدین این جمعیّت ( SusPtrit وCebada capa) از نظر میزان فعّالیت هر دو آنزیم در تمام سطوح شوری تفاوت معنی‌دار بود اما الگوی تغییرات آن‌ها یکسان نبود به طوری که روند فعّالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو با افزایش شوری به سطح ۱۰۰میلی‌مول NaCl سیر کاهشی داشت که این روند در والد SusPtrit شدیدتر بود. با افزایش سطح تنش به ۲۰۰ میلی‌مول NaCl روند برای والد SusPtrit کاهشی اما برای والد Cebada capa افزایشی بود. میزان فعّالیت آنزیم کاتالاز نیز در هر دو والد با افزایش شدّت تنش از سطح شاهد به ۱۰۰ میلی‌مول NaCl و از ۱۰۰ به ۲۰۰ میلی‌مول NaCl روند کاهشی داشت اما این شیب بین شاهد تا ۱۰۰ میلی‌مول بسیار تندتر از ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌مول NaCl بود.

### والدین جمعیّت V x Su

میزان فعّالیت آنزیم پراکسیداز در والد SusPtrit با

1. Interval mapping

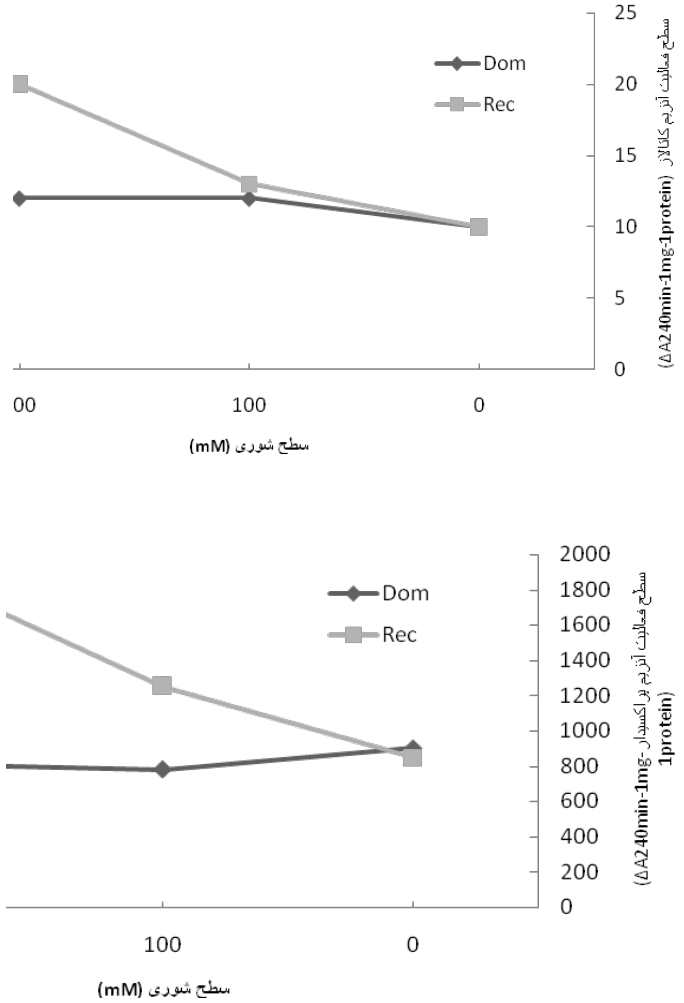
افزایش سطح شوری از روند کاهشی و در والد Vada از روند افزایشی برخوردار بود. میزان فعّالیت این آنزیم در هر سه سطح تنش بین والدین این جمعیّت تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد نشان داد. میزان فعّالیت این آنزیم در دو سطح شاهد و ۱۰۰ میلی‌مول NaCl بین دو والد تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد داشته و در سطح ۲۰۰ میلی‌مول NaCl تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

**والدین جمعیّت OWB**

تنها در بین والدین این جمعیّت از نظر میزان فعّالیت هر دو آنزیم مورد مطالعه در سطح شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده و با افزایش سطح شوری از شاهد به ۱۰۰ و از ۱۰۰ به ۲۰۰ میلی‌مول NaCl ضمن مشاهده یک روند افزایشی در میزان فعّالیت هر دو آنزیم تفاوت معنی‌داری ($P<0.01$) در هر دو سطح شوری مشاهده شد. میزان فعّالیت هر دو آنزیم در والد Rec از شیب افزایشی تندتری نسبت به والد Dom برخوردار بود.

**انتخاب توده نقشه‌یابی مناسب برای مکان‌یابی QTL**

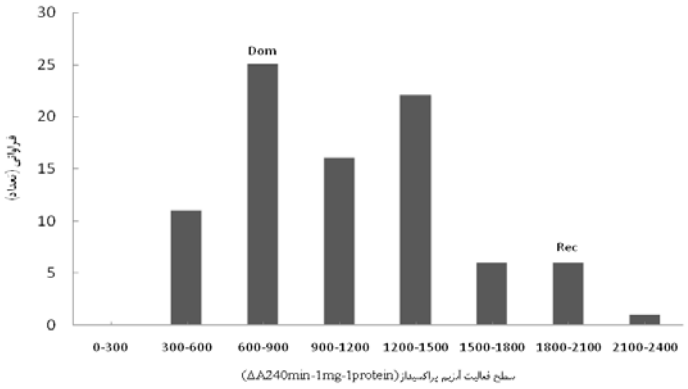
در بین والدین توده‌های نقشه‌یابی مورد مطالعه، تفاوت مشخص و معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های Dom و Rec از نظر سطح فعّالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز درسطح شوری ۲۰۰ میلی‌مول NaCl وجود داشت. این دو ژنوتیپ در شرایط بدون تنش از نظر فعّالیت آنزیمی رفتار مشابهی داشتند درحالی که در شرایط تنش شوری میزان فعّالیت هر دو آنزیم افزایش نشان داد (شکل ۱).



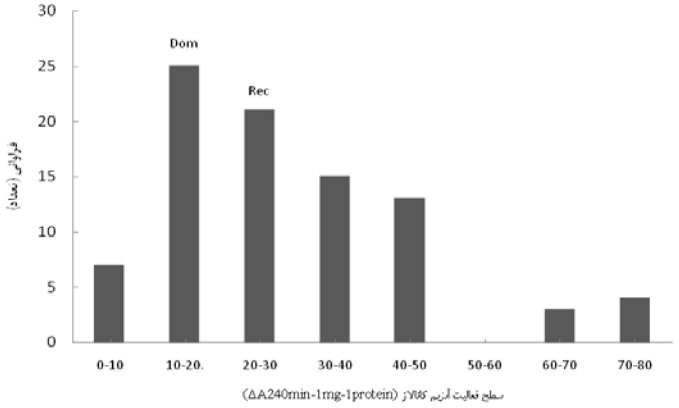

شکل ۱- نمودار تغییرات میزان فعّالیت آنزیم پراکسیداز (بالا) وکاتالاز (پایین) والدین جمعیّت OWB در سطوح مختلف شوری

با توجه به نتایج فوق و با عنایت به این که توده نقشه‌یابی OWB یکی از توده‌های نقشه‌یابی مرجع برای بسیاری از مطالعات ژنتیکی است و همچنین به دلیل انجام مطالعات قبلی در مورد مکان‌یابی QTL برای تحمّل به شوری با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی در این توده نقشه‌یابی، افراد جمعیّت OWB برای مکان‌یابی QTLهای مرتبط با فعّالیت آنزیمی انتخاب شد. نمودار توزیع فراوانی شاخص‌های مورد مطالعه در جمعیّت در سطوح مختلف شوری همانند نمودارهای مورد انتظار برای صفات کمّی و پلی ژنیک به صورت پیوسته و نرمال بود (شکل‌های ۲ و ۳).

همچنین همبستگی بین صفات مختلف در یک تکرار و همبستگی تحمّل به شوری بین تکرارها از نظر هر صفت به طور جداگانه بررسی شد که نتایج آن در جدول ۳ آمده است.




شکل ۲- توزیع فراوانی شاخص فعّالیت آنزیم پراکسیداز در سطح ۲۰۰ میلی‌مول NaCl در افراد جمعیّت OWB. موقعیت والدین توده نقشه‌یابی(Dom و Rec) در بالای ستون های مربوطه درج شده است.




شکل ۳- توزیع فراوانی صفت فعّالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۲۰۰ میلی‌مول NaCl در افراد جمعیّت OWB. موقعیت والدین توده نقشه‌یابی (Dom و Rec) در بالای ستون های مربوطه درج شده است.

جدول ۳- میزان همبستگی بین تکرارهای مختف در یک سطح شوری از نظر صفت جداگانه

| همبستگی بین: | در سطح شاهد ٪ | در سطح ۲۰۰ میلی‌مول NaCl |
|---|---|---|
| تکرار ۱-۲ برای آنزیم کاتالاز | 72 | 86 |
| تکرار۱-۳ برای آنزیم کاتالاز | 88 | 89 |
| تکرار۲-۳ برای آنزیم کاتالاز | 86 | 96 |
| میانگین مربوط به کاتالاز | 82 | 90 |
| تکرار۱-۲ برای آنزیم پراکسیداز | 88 | 92 |
| تکرار۱-۳ برای آنزیم پراکسیداز | 91 | 95 |
| تکرار۲-۳ برای آنزیم پراکسیداز | 90 | 94 |
| میانگین مربوط به پراکسیداز | 89 | 94 |

نتایج مربوط به آستانه معنی‌داری LOD با روش permutation test برای میزان فعّالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز جمعیّت OWB در سطوح مختلف تنش نیز در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۴- آستانه معنی‌داری LOD برای فعّالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز با استفاده از روش permutation test

| صفت | آستانه LOD | |
|---|---|---|
| | کاتالاز | پراکسیداز |
| فعّالیت آنزیمی در سطح شاهد | 2.77 | 2.69 |
| فعّالیت آنزیمی در ۲۰۰ میلی‌مول NaCl | 2.52 | 2.92 |
| تفاضل فعّالیت آنزیمی بین شاهد و۲۰۰ میلی‌مول | 2.68 | 3.1 |

علی‌رغم وجود واریانس بالا بین افراد جمعیّت OWB، مقدارعددی LOD برای فعّالیت آنزیم پراکسیداز در هیچ یک از گروه‌های لینکاژی بالاتر از دو نبود. بنابراین هیچ مکان ژنی مرتبط با فعّالیت آنزیمی پراکسیداز در Interval mapping مکان‌یابی نشد. برای میزان فعّالیت آنزیم کاتالاز، ۴ پروفایل برای غلظت ۲۰۰ میلی‌مول NaCl با LOD بالاتر از دو (شکل ۴)، روی کروموزوم‌های ۳ (3H)، ۴ (4H)، ۵ (1H) و ۷ (5H) ظاهر گردید (شکل‌های ۴ و ۵).

بعد از انجام Interval mapping در مورد هر یک از گروه‌های لینکاژی (کروموزوم‌ها)، اقدام به انتخاب کوفاکتور(ها) گردید. کوفاکتورهای انتخاب شده در مورد میزان فعّالیت آنزیم کاتالاز در سطح شوری۲۰۰ میلی‌مول NaCl، در جدول ۵ نشان داده شده است.

پس از انجام MQM، تعداد دو QTL با مقادیر LOD بالای ۳ و دو QTL دیگر با مقادیر عددی اندکی پایین‌تر از آستانه، مکان‌یابی شدند. مشخصات این QTLها در جدول ۶ آمده است.

جدول ۵- کوفاکتورهای انتخاب شده برای انجام MQM برای فعّالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۲۰۰ میلی‌مول با استفاده از Automatic co-factor selection

| کروموزوم | 7 | 6 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| لوکوس | Bmac0096 | Bmac0218c | WMC1E8 | Blp | ABG494 | ABG003A | Dhn6 | Bmac0144d | MWG883 |
| موقعیت | 44.100 | 86.300 | 139.800 | 118.000 | 57.500 | 42.900 | 41.500 | 184.600 | 173.900 |

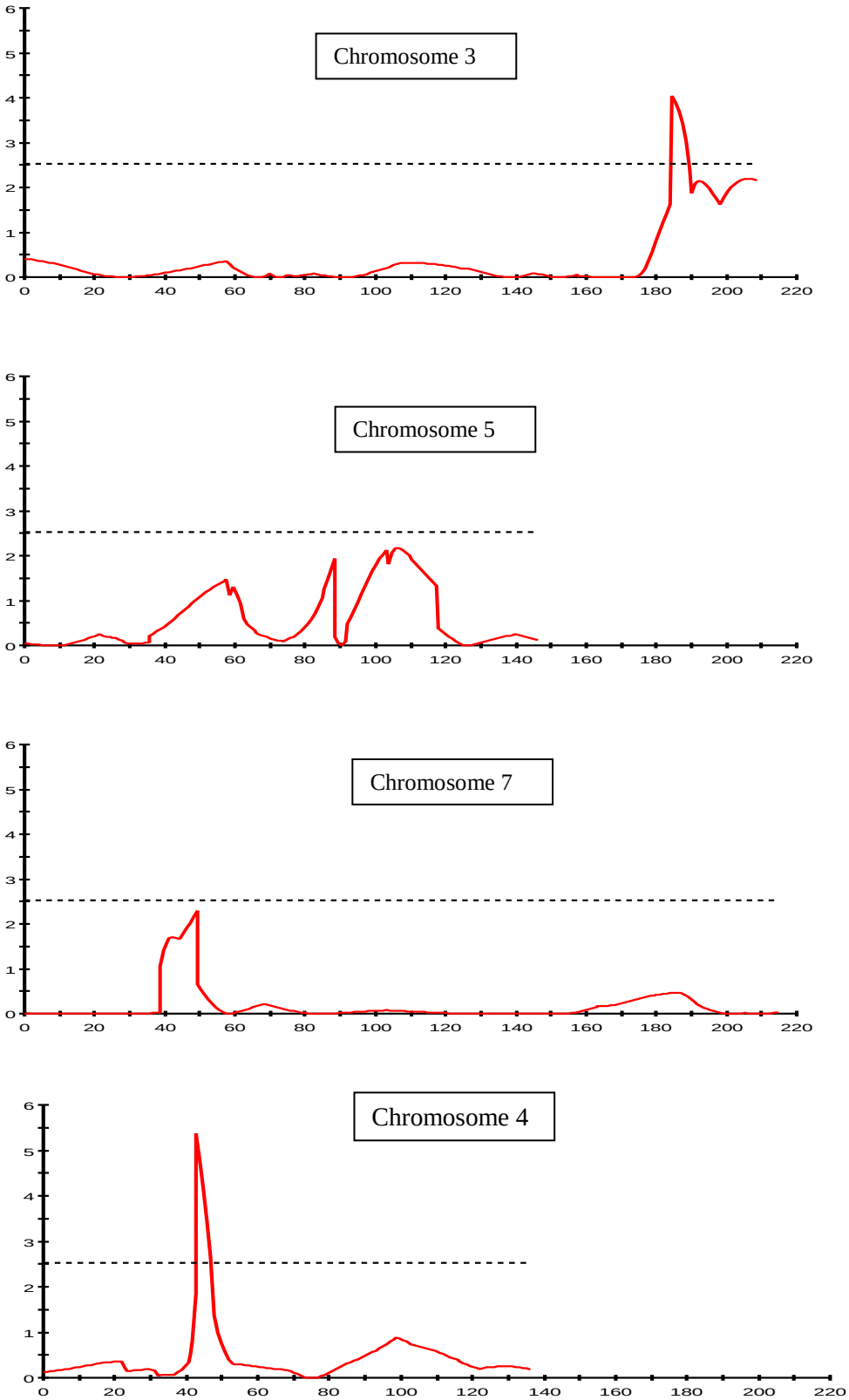
جدول ۶- موضع QTLهای ردیابی شده برای فعّالیت آنزیم کاتالاز در سطوح صفر و ۲۰۰ میلی‌مول NaCl

| سطح شوری (mM) | کروموزم | موضع[1] (cM) | LOD | EXP٪ | نشانگر قبل | نشانگر بعد |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 200 | 3(3H) | 184–192 | 4.1 | 20.5 | Bmac0144d | Hvm62 |
| 200 | 4(4H) | 42–53 | 5.37 | 28.2 | ABG003A | Bmac0113g |
| 200 | 5(1H) | 92–118 | 2.22 | 8.5 | Bmag00113a | Blp |
| 200 | 7(5H) | 44–49 | 2.33 | 9.1 | Bmag0096 | KFP002 |

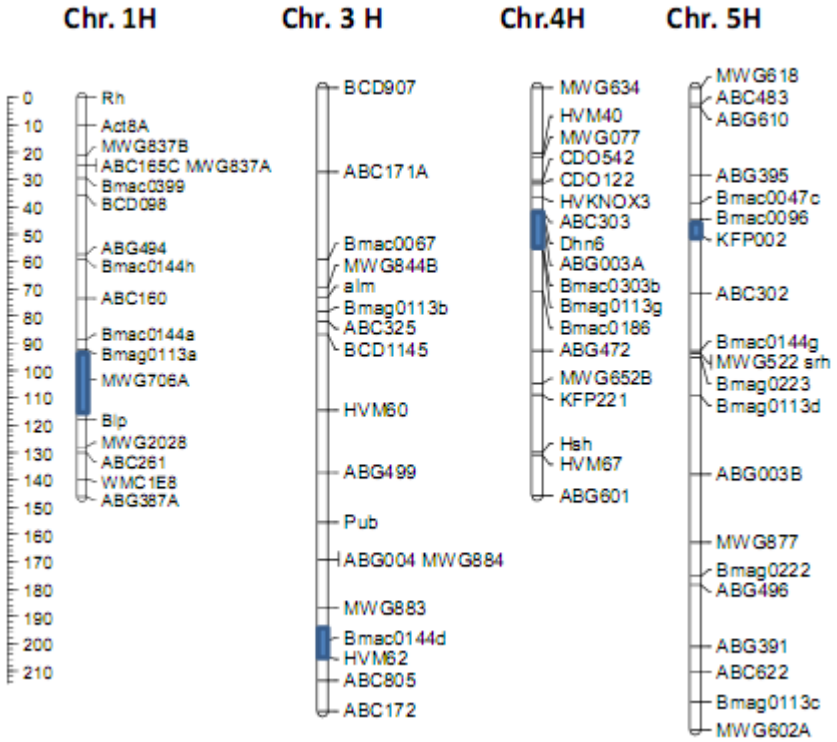
EXP٪= درصد تغییرات آزمایشی (تغییرات فنوتیپی) که با QTL توجیه می‌شود.

هنگامی که گیاهان با شرایط تنش‌های محیطی مانند شوری روبرو می‌شوند، تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعالیت آنتی اکسیدانت‌ها به هم می‌خورد که اغلب نتیجه آن آسیب اکسیداتیو است. گیاهانی که دارای سطوح بالایی از آنتی اکسیدانت‌های ساختمانی یا القایی هستند، مقاومت بیشتری به این آسیب اکسیداتیو دارند و اغلب یک همبستگی بین سطوح این آنزیم‌ها و تحمل شوری در گیاهان وجود دارد (Parida and Das, 2005). تحقیقات انجام یافته در مورد فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در جو تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار نشان داده است که مقدار پراکسید هیدروژن در ریشه گیاهچه‌های جو همبستگی بسیار بالایی با میزان فعالیت آنزیم کاتالاز دارد. این یافته نشان می‌دهد که آنزیم کاتالاز نقش مهمی در غیر سمی کردن پراکسید هیدروژن تولید شده تحت تنش شوری در جو دارد Kim *et al.*,

(2005). بر این اساس می‌توان انتظار داشت که سطح کمّی آنزیم‌های مرتبط با آسیب اکسیداتیو مانند کاتالاز در




شکل ۴- پروفایل LOD برای ۴ گروه لینکاژی (کروموزوم های ۳، ۵، ۷ و ۴) توده نقشه‌یابی OWB جو که برای شاخص سطح فعّالیت آنزیم کاتالاز در سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مول NaCl با نرم افزار MAP QTL5 تهیه شده است.




شکل ۵- موقعیت QTLهای مکان‌یابی شده برای سطح فعّالیت آنزیم کاتالاز روی کروموزوم‌های جو در توده نقشه‌یابی OWB

ژنوتیپ‌های مختلف جو به عنوان یک شاخص مهم برای ارزیابی تحمل به شوری مورد استفاده قرار گیرد. هر چقدر ارتباط بین یک شاخص کمّی و صفت مورد مطالعه (شوری) بیشتر باشد، آن شاخص می‌تواند به طور مؤثرتری در گزینش ارقام متحمل و نیز مکان‌یابی ژن‌های کمّی دخیل در تحمل به شوری به کار گرفته شود (Van Ooijen, 1992).

نتایج این تحقیق نشان داد که بین والدین توده‌های نقشه‌یابی چهار جمعیّت مورد مطالعه، اغلب اختلاف معنی‌داری در سطح فعّالیت آنزیم‌های مرتبط با تحمّل به شوری وجود دارد. این تفاوت‌ها از یک طرف ممکن است ناشی از اثرات محیطی و تأثیر پذیری فعّالیت این آنزیم‌ها از شرایط محیط آزمایش باشد و از طرف دیگر می‌تواند به عنوان شاخصی برای نشان‌دادن سطح تحمّل آن‌ها نسبت به شوری محسوب شود.

نتایج نقشه‌یابی QTLها برای فعّالیت آنزیم کاتالاز در این مطالعه نشان داد که از میزان فعّالیت آنزیم‌های مرتبط با تحمّل به شوری می‌توان به عنوان یک شاخص کمّی برای برای نقشه‌یابیQTLهای مربوط به تحمّل شوری استفاده کرد. آنچه حائز اهمیّت است یافتن آنزیم‌هایی است که فعّالیت آن‌ها بیشترین ارتباط را با سطح تحمّل به شوری داشته باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که آنزیم کاتالاز دارای چنین ویژگی می‌باشد و می‌توان از سطح فعّالیت این آنزیم به عنوان یک شاخص مهم برای ارزیابی فنوتیپی استفاده کرد. این نتایج با نتایج تحقیقات قبلی در مورد اهمیت آنزیم کاتالاز در تنش شوری در جو هم خوانی دارد (Kim *et al.*, 2005). با این حال در مورد آنزیم پراکسیداز، علی رغم وجود تفاوت‌های زیاد دربین افراد جمعیّت، هیچگونه QTL مکان‌یابی نشد. این نتایج نشان می‌دهد که تنها وجود تغییرات در بین والدین و جمعیّت‌ها همیشه دلیل محکمی بر تفرق QTLها دریک زمینه ژنتیکی نیست. ممکن است این تفاوت‌ها به خاطر اثرات محیطی باشند.

با مرور نتایج به دست آمده از تحقیقات مختلف در خصوص نقش آنزیم‌های آنتی کسیدانت در تحمّل به شوری می‌توان نتیجه گرفت که اغلب در گونه‌های گیاهی مختلف، آنزیم‌های متفاوتی در شرایط تنش فعال هستند و همچنین یک آنزیم آنتی اکسیدانت لزوماً در همه شرایط تنش و در تمام بافت‌های یک گونه گیاهی فعّالیت یکسانی ندارد Mittler, (2002). در تحقیق انجام یافته توسط Celik و Atak (۲۰۱۲) در خصوص اثر تنش شوری بر آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدانت در دو رقم تنباکو، مشخص شد که هیچ تفاوتی در سطح فعّالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت SOD، APX، GPX و CAT در دو رقم وجود ندارد در حالی که میزان فعّالیت GR تحت شرایط تنش در هر دو رقم مورد مطالعه افزایش نشان داد. ایشان پیشنهاد نمودند که آنزیم GR یک عنصر کلیدی در ارزیابی تحمّل به تنش شوری در گیاه تنباکو است. نتایج این تحقیق از طرف دیگر تاییدی است بر پیچیدگی ژنتیکی و فیریولوژیکی صفت تحّمل به شوری که در مورد گونه‌های مختلف گیاهی شواهد متعددی برای آن ارایه شده است. Ashraf (۱۹۹۴) معتقد است تحمّل شوری توارث چند ژنی دارد و توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود و علاوه بر این اثرات متقابل ژنوتیپ–محیط و اثرات بزرگ محیطی نیز کوشش‌های اصلاحی را برای تشخیص فرآیند تحمّل شوری پیچیده می‌کند. هر چند در این آزمایش از سه تکرار استفاده شد و در بین تکرارها نیز همبستگی خوبی وجود داشت، ولی به نظر می‌رسد که در آزمایشات مربوط به فعّالیت‌های آنزیمی، انجام تعداد بیشتری از تکرارها برای حصول نتیجه مطمئن اجتناب ناپذیر باشد. این امر به علّت تأثیر پذیری شدید فعّالیت آنزیمی از اثرات محیطی و همپوشانی فعّالیت بعضی از آنزیم‌های دخیل در تنش‌های مختلف مانند شوری و خشکی می‌باشد (Xiong, 2002). عدم مکان‌یابی QTLها برای آنزیم پراکسیداز همچنین ممکن است به خاطر این واقعیّت باشد که مکانیسم‌های تحمّل به شوری در بین گیاهان و حتّی ژنوتیپ‌های یک گونه گیاهی متفاوت است. به‌نظر می‌رسد برای تحمّل شوری، وجود مکانیسم‌ها و صفات مختلف و ترکیب مناسب آن‌ها اهمیّت زیادی داشته باشد (Ashraf, 2004) .

یکی از جالب‌ترین سوالاتی که در خصوص ژنتیک تحمّل به شوری وجود دارد این است که آیا در هر ژنوتیپ جو مجموعه مشابهی از QTLها تحمّل به شوری را کنترل می‌کنند یا این که در هر ژنوتیپ، جایگاه و تعداد این QTLها نسبت به ژنوتیپ دیگرمتفاوت است. در صورت مثبت بودن جواب این سوال، پیچیدگی‌های ژنتیک تحمّل به شوری در جو باز هم بیشترخواهد شد. وجود تنوّع بالا در بین والدین توده‌های نقشه‌یابی این امکان را ایجاد می‌کند که بتوان در جمعیّت‌های دیگر (غیر از جمعیّت OWB مورد مطالعه در این تحقیق) نیز QTLهای مرتبط با تحمّل به شوری را مکان‌یابی کرده و محل احتمالیQTLها را در جمعیّت‌های مختلف مقایسه نمود. در این صورت می‌توان به وجود تنوّع در جایگاه‌های ژنی مرتبط با تحمّل به شوری پی برد.

## سپاسگزاری

مراحل مختلف این پژوهش در آزمایشگاهای بیولوژی و خاک و آب مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان و گلخانه این مرکز به انجام رسیده است. نگارندگان از آقایان مهندس اسماعیل سهرابی و محمد تکاسی به خاطر همکاری در مراحل مختلف تحقیق قدردانی می‌نمایند.

## REFERENCES

Abbaspour H (2012) Effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes, and proline accumulation in Pistachio plants. Journal of Medicinal Plants Research. 6 (3): 526-529.

Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology. 105: 121-126.

Ahmad P, John R, Sarwat M, Umar S (2008) Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. International Journal of Plant Production. 2 (4): 353-365.

Ali RM, Abbas HM (2003) Response of salt stressed barley seedlings to phenylurea. Plant Soil Environ. 49 (4): 158–162.

Armillas P (1961) A history of land use in arid regions. Arid Zone Research. 17: 255-276.

Ashraf M (1994) Breeding for salinity tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences. 13: 17–42.

Ashraf M (2004) Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. Flora. 199: 361–376.

Celik O, Atak C (2012) The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties. Turkish Journal of Biololgy. 36: 339-356.

Chance B, Maehli AC (1955) Assay of catalases and proxidases. Method in Enzymology. 2: 764- 775.

Costa JM, Corey A, Hayes PM, Jobet C, Kleinhofs A, Kopisch- Obusch A, Kramer SF, Kudrna D, Li M, Riera-Lizarazu O, Sato K, Szucs P, Toojinda T, Vales MI, Wolfe RI (2001) Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-

haploid population. Theoretical and Applied Genetics. 103: 415–424.

Dadshani SAW, Weidner A, Buck-Sorlin GH, Börner A, Asch F (2004) QTL Analysis for Salt Tolerance in Barley. University of Bonn, Institute of Plant Nutrition, Germany, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Germany, Brandenburgisch-technische Universität (BTU).

Epstein E, Norlyn JD, Rush DW, Kingsbury R, Kelley DB, Wrana AF (1980) Saline culture of crops: a genetic approach. Science. 210: 399-404.

Esfandiari E, Shekari F, Shekari F, Esfandiari F (2008) The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 35(1): 48-56.

Flowers TJ, Flowers SA (2005) Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? Agricultural Water Management. 78: 15–24.

Forster BP, Russell JR, Ellis RP, Handley LL, Robinson D, Hackett CA, Nevo E, Waugh R, Gordon DC, Keith R, Powell W (1997) Locating genotype and genes for abiotic stress tolerance in barley: a strategy using maps, markers and the wild species. New Phytologist. 137: 141–147.

Greenway H, Munns R (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. Annual Review of Plant Physiology. 31: 149-190.

Jafary H, Szabo LJ, Niks RE (2006) Innate nonhost immunity in barley to different heterologous rust fungi is controlled by sets of resistance genes with different and overlapping specificities. Molecular Plant-Microbe Interactions. 19: 1270–1279.

Jafary H, Albertazzi G, Marcel TC, Niks RE (2008) High diversity of genes for nonhost resistance of barley to heterologous rust fungi. Genetics. 178: 2327–2339.

Kim SY, Lim JH, Park MR, Kim Y J, Park T, Seo YW, Choi KG, Yun SJ (2005) Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 38( 2): 218-22.

Kahrizi S, Sedghi M, Sofalian O (2012) Effect of salt stress on proline and activity of antioxidant enzymes in ten durum wheat cultivars. Scholars Research Library. 3 (8):3870-3874.

Mano Y, Takeda K (1996) Genetical studies on salt tolerance at germination in recombinant inbred, isogenic, and doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.). Bull. Res. Inst. Bioresour. Okayama Univ. 4: 79-88.

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Science. 7: 405-410.

Norlyn JD, Epstein E (1982) Barley production: irrigation with seawater on coastal soil. In A San Pietro, ed, Biosaline Research, A Look to the Future. Plenum Press, New York. 525-529.

Parida KP, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety. 60: 324–349.

Qi X, Stam P, Lindhout P (1998) Use of locus-specific AFLP markers to construct a high density-molecular map in barley. Theoretical and Applied Genetics. 96: 376-384.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Mizoguchi T, Uraro T, Katagiri T, Nakashima K, Abe H, Ichimura K, Liu QA, Nanjyo T, Uno Y, Luchi S, Srki M, Lto T, Hirayama T, Mikami K (1998) Molecular responses to water stress in Arabidopsis thaliana. Journal of Plant Research. 111: 345-351.

Van Ooijen JW (1992) Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. Theor. Appl. Genet. 84: 803-811.

Zhu JK, (2001) Plant salt tolerance. Trends in Plant Science. 6 (2): 66-71.

Xiong L, Schumaker KS and Zhu JK(2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell. S165-S183.