بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه زابل

مدیریت تحصیلات تکمیلی

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات

نقشه‌یابی QTL برای برخی صفات فیزیولوژیک گندم تحت تنش شوری

استاد راهنما

دکتر براتعلی فاخری

استاد مشاور

خانم لیلا مهراوران

تهیه و تدوین

سمیرا دباغ

مهر ۹۲

چکیده

تحمل به شوری صفتی فیزیولوژیکی است که ژنتیک پیچیده‌ی دارد که توسط مکان ژن‌های صفات کمی کنترل می‌شود. بنابراین، شناسایی ژن‌هایی که گیاهان قادرند در مقابل تحمل به تنش شوری بیان کنند، برای برنامه‌های بهنژادی ضروری می‌باشد. به منظور نقشه‌یابی نواحی ژنومی مرتبط با تحمل به شوری و تعیین سهم هر QTL در تنوع فنوتیپی صفات مربوط، ۱۶۷ اینبردلاین نوترکیب حاصل از تلاقی *M82* و *Seri* *Babax* به همراه دو والد مورد مطالعه قرار گرفتند.این تحقیق در سال زراعی ۹۲-۱۳۹۱ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، در قالب طرح آلفا لاتیس با ۲ تکرار تحت دو شرایط نرمال و تنش شوری به اجرا درآمد. صفات مورد مطالعه عبارتست از: عملکرد دانه، میزان پرولین، کربوهیدرات، رطوبت نسبی (RWC)، کلروفیلa، کلروفیل b، کارتنوئید، سدیم و پتاسیم. پس از اندازه-گیری صفات، ابتدا تجزیه‌های آماری شامل تجزیه واریانس، همبستگی بین صفات، رگرسیون گام به گام، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه مولفه‌های اصلی و تجزیه عامل‌ها به کمک نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۰ انجام گرفت. تفاوت معنی‌داری بین لاین‌ها در دو شرایط نرمال و تنش برای اکثر صفات مورد بررسی وجود داشت. حداکثر همبستگی بین صفت کلروفیل b با کارتنوئید مشاهده گردید. در رگرسیون گام به گام در شرایط نرمال، پرولین و کربوهیدرات اولین صفاتی بودند که وارد مدل شدند و در مجموع ۶۰ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند. در شرایط تنش به ترتیب پرولین و رطوبت نسبی اولین صفاتی بودند که وارد مدل شدند و در مجموع ۶۱ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند. در تجزیه به مولفه‌های اصلی در شرایط نرمال سه مولفه اول حدودا ۶۲ درصد از تنوع کل را توجیه و در شرایط تنش دو مولفه اول حدودا ۵۰ درصد تنوع کل را تبیین نمودند. تجزیه به عامل‌ها چندین عامل پنهانی را استخراج نمود که بیش از ۷۰ درصد از واریانس کل را تبیین کردند. تجزیه QTL با استفاده از نقشه پیوستگی ژنتیکی حاصل از نشانگرهای مولکولی بدست آمده از ۲۴۹ مارکرAFLP، ۷۴ مارکر SSR و ۲۶۴ مارکر DART و نرم افزار QTL Cartographer به روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) انجام شد. برای صفات مورد بررسی در مجموع ۱۶ عدد QTL (۶ تا برای شرایط بدون تنش و ۱۰ تا برای شرایط تنش) بدست آمد که واریانس فنوتیپی توجیه شده به وسیله این QTLها از ۱۴/۲۲-۶/۲۳ درصد متغیر بود. بیشترین و کمترین واریانس فنوتیپی به ترتیب برای صفات سدیم و کربوهیدرات در شرایط تنش بدست آمد. LOD در دامنه ۵/۷۷-۲/۵۲ قرار داشت. بیشترین و کمترین LOD به ترتیب مربوط به QTLهای سدیم و کربوهیدرات در شرایط تنش بدست آمد. در این تحقیق فقط دو جایگاه واجد QTL در یک مکان قرار داشتند و پایدار بودند (رطوبت نسبی 6A و سدیم 3D).

واژه کلیدی: مکان ژن‌های صفات کمی، تنش شوری، گندم

فهرست مطالب

فصل اول

مقدمه:..... ۲
۲-۱- کلیات..... ۵
۱-۲-۱- معرفی گندم ۵
۲-۲-۱- تاریخچه کشت گندم ۶
۳-۲-۱- ژنتیک گندم ۶
۴-۲-۱- گیاهشناسی گندم ۶
۵-۲-۱- تنش شوری ۷
۶-۲-۱- تحمل به شوری ۷
۷-۲-۱- سایر صفات مؤثر در تنش شوری ۸
۱-۷-۲-۱- اثر شوری بر محتوی کلروفیل برگ ۸
۲-۷-۲-۱-اثر شوری بر روابط آبی گیاه ۹
۳-۷-۲-۱- اثر شوری بر کربوهیدراتهای محلول ۱۰
۴-۷-۲-۱- اثر شوری بر میزان پرولین ۱۱
۸-۲-۱- تعریف QTL ۱۱
۹-۲-۱- تجزیه QTL..... ۱۲
۱۰-۲-۱- مراحل انجام تجزیه QTL ۱۳
۱۱-۲-۱- نقشه پیوستگی یا لینکاژی ۱۳
۱-۱۱-۲-۱- جمعیتهای نقشه یابی ۱۴
۲-۱۱-۲-۱- تشخیص پلی مورفیسم با استفاده از نشانگرهای مولکولی ۱۵
۳-۱۱-۲-۱- آنالیز لینکاژی نشانگرها ۱۶
۱۲-۲-۱- مفهوم فاصله ژنتیکی ۱۶
۱۳-۲-۱- روشهای آماری مورد استفاده در تجزیه QTL ۱۷
۱-۱۳-۲-۱- روش تک نشانگری (SMA)..... ۱۷
۲-۱۳-۲-۱- روش دو نشانگری یا روش مکان یابی به کمک نشانگرهای مجاور ۱۸
۳-۱۳-۲-۱- روش مکان یابی فاصله ای مرکب ۱۸
۱۴-۲-۱- مفهوم QTLهای بزرگ و کوچک ۱۸
۱۵-۲-۱- بک کراس به کمک نشانگر (MAB) ۱۹
۱۶-۲-۱- تک حلقه‌ای به کمک نشانگر (MAP)..... ۱۹
۱۷-۲-۱- تکثیر سریع به کمک MAS (EG-MAS) ۲۰
۱۸-۲-۱- عوامل مؤثر در تشخیص QTL ۲۱

فصل دوم: مروری بر تحقیقات انجام شده

۱-۲- انتخاب QTL برای MAS..... ۲۳
۲-۲- نتایج انتخاب به کمک نشانگر..... ۲۳

۲-۳- مطالعات انجام شده در زمینه تجزیه QTL برای صفات کمی مختلف.....۲۴
۲-۴- نقشه‌یابی QTL در گندم ۲۷
۲-۵- نقشه‌یابی QTLهای مرتبط با شوری ۲۸

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱-مواد ژنتیکی مورد مطالعه: ۳۱
۳-۲-موقعیت و مشخصات آب و هوای محل اجرای آزمایش: ۳۱
۳-۳- عملیات اجرایی: ۳۱
۳-۴- میزان پرولین ۳۲
۳-۵- میزان کربوهیدرات های محلول (WSC) ۳۳
۳-۶-میزان رطوبت نسبی(RWC) ۳۳
۳-۷-میزان سدیم و پتاسیم ۳۳
۳-۸-میزان کلروفیل a، b و کارتنوئید ۳۵

فصل چهارم: نتایج بحث

۴-۱- تجزیه واریانس صفات: ۴۰
۴-۲- همبستگی بین صفات : ۴۳
۴-۳- رگرسیون چندگانه گام به گام ۴۴
۴-۴- تجزیه خوشهای صفات: ۴۶
۴-۴-۱- تجزیه خوشهای برای تیمار شاهد (بدون تنش) ۴۷
۴-۴-۲- تجزیه خوشه ای برای شرایط تنش ۴۷
۴-۵- نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (Principal component analysis) ۴۸
۴-۵-۱- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات مورد بررسی برای شرایط نرمال ۴۸
۴-۶- نتایج تجزیه عامل‌های صفات مورد بررسی ۵۰
۴-۶-۱- تجزیه به عامل‌های صفات مورد بررسی برای شرایط نرمال ۵۱
۴-۶-۲- تجزیه به عامل‌های صفات مورد بررسی برای شرایط تنش ۵۲
۴-۷- تجزیه QTL ۵۴
۴-۷-۱- تجزیه QTL در شرایط بدون تنش ۵۵
۴-۷-۲- تجزیه QTL در شرایط تنش ۵۶
۴-۸- نتیجه گیری کلی ۶۰
۴-۹- پیشنهادات ۶۴
فهرست منابع: ۶۶
ضمائم ۷۷

فهرست جداول

جدول ۱: تجزیه واریانس ساده در شرایط نرمال ۷۷
جدول ۲: تجزیه واریانس ساده در شرایط تنش ۷۸
جدول ۳: آماره‌های توصیفی در شرایط نرمال..... ۷۹
جدول ۴: آماره‌های توصیفی در شرایط تنش ۸۰
جدول ۵: همبستگی ساده فنوتیپی در شرایط نرمال ۸۱
جدول ۶: همبستگی ساده فنوتیپی در شرایط تنش ۸۲
جدول ۷: نتایج رگرسیون گام به گام در شرایط نرمال ۸۳
جدول ۸: نتایج رگرسیون گام به گام در شرایط تنش ۸۳
جدول ۹: مقادیر ویژه و میزان واریانس حاصل از تجزیه به مولفه‌ها در شرایط نرمال ۸۴
جدول ۱۰: مقادیر ویژه و میزان واریانس حاصل از تجزیه به مولفه‌ها در شرایط تنش.....۸۴
جدول ۱۱: بردارهای ویژه برای پنج مولفه اصلی در شرایط نرمال..... ۸۵
جدول ۱۲: بردارهای ویژه برای پنج مولفه اصلی در شرایط تنش.....۸۶
جدول ۱۳: همبستگی حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی ساده فنوتیپی در شرایط نرمال ۸۷
جدول ۱۴: همبستگی حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی ساده فنوتیپی در شرایط تنش ۸۸
جدول ۱۵: نتایج تجزیه به عامل‌ها در شرایط نرمال..... ۸۹
جدول ۱۶: نتایج تجزیه به عامل‌ها در شرایط تنش ۹۰
جدول ۱۷: QTLهای شناسایی شده برای شرایط نرمال ۹۱
جدول ۱۸: QTLهای شناسایی شده شرایط تنش ۹۲

فهرست اشکال و نمودارها

شکل ۱: دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به شرایط نرمال.....۹۳
شکل ۲: دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به شرایط تنش ۹۴
شکل ۳: دسته‌بندی خوشه‌ای‌ها بر اساس دو مؤلفه اول و دوم حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی شرایط نرمال ۹۵
شکل ۴: نمودار چگالی سه بعدی خوشه‌ای‌ها بر مبنای مؤلفه‌های اول و دوم در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی شرایط نرمال ۹۵
شکل ۵: دسته‌بندی خوشه‌ای‌ها بر اساس دو مؤلفه اول و دوم حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی شرایط تنش ۹۶
شکل ۶: نمودار چگالی سه بعدی خوشه‌ای‌ها بر مبنای مؤلفه‌های اول و دوم در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی شرایط تنش ۹۶

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱- مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه:

تنش محیطی همیشه عامل کاهش کمیت و کیفیت محصولات زراعی بوده‌اند. با مواجه شدن گیاه با این تنش‌ها، تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی زیادی در جهت تحمل گیاه به سازگار شدن آن به تنش حاصل می‌شود و این تغییرات در گونه‌های مختلف گیاهی و حتی واریته‌های مختلف گونه و بسته به نوع تنش و همچنین اشکال مختلف یک تنش، متفاوت است (Shinozaki *et al*., 1997).

شوری در ایران بالغ بر ۲۵ میلیون هکتار تخمین زده شده است و اهمیت بهره‌گیری از این اراضی در تولید محصول ایجاب می‌کند تا علاوه بر اقداماتی که در زمینه معرفی ارقام متحمل یا مقاوم به شوری صورت‌گرفته، فعالیت‌های جهت‌دار و کامل‌تری در زمینه اصلاح ارقام برای این قبیل اراضی انجام شود (اهدایی، ۱۳۷۲).

تنش شوری خود شکلی از خشکی فیزیولوژیک می‌باشد. یکی از آثار مشترک این دو تنش افزایش پتانسیل اسمزی و در نتیجه کاهش پتانسیل آب می‌باشد. در شرایط تنش شوری، یک گیاه می‌بایست مواد غذایی مورد نیاز برای فرایندهای حیاتی خود را جذب کند و از جذب یون‌های سمی نیز جلوگیری نماید. جذب و جابجایی عناصر اصلی مانند K و Ca در نتیجه تنش شوری به شدت کاهش می‌یابد و به طور مخربی بر تحمل به شوری گیاهان اثر می‌گذارد. در این شرایط بسته به شدت و مدت تنش و مرحله رشدی گیاهان، تغییرات زیادی در صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک آنها به وجود می‌آید. یکی از مهمترین پارامترها جهت مقاومت به شوری، فعال نمودن

مکانیسم تنظیم اسمزی است که با سنتز و یا تجمع ترکیبات سازگارکننده مانند پرولین و کربوهیدرات صورت می‌گیرد. با این عمل تا حدی شرایط لازم برای ادامه جذب آب و عناصر غذایی از محیط ریشه فراهم و فتوسنتز و تولید مواد آلی ادامه می‌یابد (Mass and Haffman, 1977).

گندم با نام علمی *Terticum aestivum* L. مهمترین گیاه زراعی خانواده گرامینه با سطح زیر کشتی معادل یک ششم سطح زیر کشت گیاهان زراعی دنیا، تامیین کننده ۴۰ درصد غذای انسان، ۲۰ درصد کل کالری و پروتئین مورد نیاز بشر است. این گونه یکی از ارزشمندترین و اولین گیاهان زراعی اهلی شده از ده هزار سال قبل است که بیش از هر محصول دیگری در دنیا کشت می‌شود، گندم مهم‌ترین گیاه زراعی ایران وجهان است زیرا علاوه بر آنکه غذای اصلی و ثابت تمام سفره‌های ایرانی است از جمله محصولات استراتژیک نیز بوده و اهمیت آن برکسی پوشیده نیست. سطح زیر کشت گندم در ایران و دنیا به ترتیب بالغ بر ۶ و ۲۷۰ میلیون هکتار می باشد و میزان تولید آن به ترتیب بالغ بر ۱۵ و ۶۰۰ میلیون تن می باشد (FAO, 2000).

با تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به یک رقم گندم در شرایط شور نتیجه گرفتند که گیاه نیمه متحمل به شوری است. این در حالیست که فرانکوئیس و همکاران (Francois *et al.*, 1986) با مطالعه بر روی رقم دیگری از گندم نتیجه گرفتند که میزان تحمل به شوری گندم مشابه جو می‌باشد. از طرف دیگر گزارش شده است که برخی ارقام کانادایی گندم به شوری حساس تا نیمه حساس می‌باشند (Steppuhn and Wall, 1977). اصلاحگران نبات در روش‌های مرسوم اصلاح نباتات، بدون اطلاع از تعداد، نحوه اثر و محل ژن‌های کنترل‌کننده صفات و فقط با استفاده از اطلاعات فنوتیپی موجود، با استفاده از روش‌هایی نظیر تلاقی، گزینش و غیره به دنبال جمع‌آوری ژن‌های کنترل‌کننده صفات زراعی مطلوب در یک رقم هستند و این روش‌ها فقط زمانی که فنوتیپ به خوبی معرف ژنوتیپ باشد (صفت مورد مطالعه وراثت‌پذیری بالایی داشته باشد)، کارایی لازم را دارد. بدیهی است که داشتن اطلاعات راجع به تعداد، نحوه اثر و مکان ژن‌های کنترل‌کننده

صفات کمی Quntitative Trait Loci (QTL) می‌تواند روند اصلاح این صفات را تسریع و تسهیل نماید. علی‌رغم این‌که اصول مکان‌یابی صفات کمی از سال‌ها پیش توسط متخصصان آمار و ژنتیک توسعه داده شده است، اما از این روش‌ها تا زمان روی کار آمدن نشانگرهای مولکولی و برنامه‌های کامپیوتری مختص این تجزیه‌ها، استفاده عملی گسترده‌ای نشده است. اکنون بیش از سه دهه است که محققان در سراسر جهان با استفاده از نقشه‌های ژنتیکی حاصل از نشانگرهای مولکولی و روش‌های آماری توسعه داده شده در این زمینه، تحقیقات گسترده‌ای را در مورد مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی صفات مختلف، در گیاهان و حیوانات اهلی انجام داده‌اند (Ramagosa *et al.*, 1996).

QTL در واقع پلی است که رابطه بین تنوع پیوسته فنوتیپی و مکانیزم‌های توارثی حاصل از تنوع ژنتیکی مکان‌های ژنی منفرد را برقرار می‌سازد و شناسایی QTL، امکان گزینش نشانگرمحور (Selection Assisted Marker) را فراهم می‌آورد (Phillinpa, 1998). وقتی نشانگرهایی با QTL پیوسته باشند، انتخاب به کمک نشانگرها، انتخاب بر اساس ژنوتیپ خواهد بود و پاسخ به گزینش به حداکثر خود خواهدرسید (Dudley, 1997). گزینش به کمک نشانگر یک روش گزینش غیر-مستقیم بوده و متکی بر نشانگرهایی غیر از ژن مورد نظر است. گزینش به کمک نشانگر، به‌جای گزینش فنوتیپی بر پایه گزینش ژنوتیپ نشانگر پیوسته با ژن مؤثر بر فنوتیپ مورد نظر، استوار است. ارزیابی صفات در مرحله گیاهچه، سرعت بیشتر نسبت به ارزیابی فنوتیپی، امکان انتخاب همزمان صفات متعدد با یک نمونه DNA، شناسایی ژن‌های فرعی در حضور ژن‌های اصلی و تشخیص ژن‌های مطلوب و نامطلوب از دیگر مزایای گزینش به کمک نشانگر است (Dudley, 1997).

بدین جهت در بررسی‌های انجام شده در این تحقیق، فرضیات و اهداف زیر مدنظر بوده است.

۱- شناسایی QTL صفات فیزیولوژیک مرتبط با مقاومت به شوری و تعیین مکان آنها روی کروموزوم‌ها

۲- بررسی همبستگی ژنتیکی و استفاده ازنشانگرهای وابسته به این صفات برای انتخاب به کمک نشانگر

۳- برآورد سهم هر QTL مکان‌یابی شده در توصیف تنوع فنوتیپی صفات مورد مطالعه

۴- مقایسه QTLهای شناسایی شده تحت تنش شوری و نرمال و تشخیص QTLهای پایدار جهت استفاده انتخاب به کمک نشانگر

۵- استفاده از نشانگرها برای شناسایی QTLهای بزرگ اثر مرتبط با تحمل شوری

۲-۱ کلیات

۱-۲-۱ معرفی گندم

گندم نان غذای اصلی انسان است که بطور مستقیم مورد مصرف قرار می گیرد. به این ترتیب سطح کشت و تولید جهانی آن از سایر محصولات بیشتر است. گندم منبع اصلی کربوهیدرات غذای انسان را تشکیل داده و از لحاظ تهیه نان و ارزش نانوایی، ارزشمندترین آرد را در بین آردهای غلات دیگر دارا می باشد. علاوه بر تغذیه مستقیم، گندم به شکل غیر مستقیم در مصرف دام و طیور و صنایع، نقش بسزایی در زندگی انسان ها ایفا می کند (زمانی، ۱۳۸۵).

در کشور ما نیز مانند بسیاری از کشورهای جهان، نان گندم مهمترین ماده غذایی روزانه مردم را تشکیل می دهد و نقش عمده ای در تامین انرژی و پروتئین مورد نیاز بدن بر عهده دارد. افزایش عملکرد در هکتار همراه با بهبود کیفیت در گیاهان زراعی یکی از ضروریات کشورها برای هماهنگی با افزایش جمعیت آنها است (زمانی، ۱۳۸۵).

۲-۲-۱- تاریخچه کشت گندم

بررسی های علمی نشان می‌دهد کشت گندم از حدود ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح یعنی حدود ۵۰۰۰ سال پیش در مصر رواج داشته است ، طبق مدارک موجود یکی از نباتاتی که در دنیا کشت می‌شده گندم می‌باشد و موطن اصلی گندم آسیای مرکزی است (قارونی، ۱۳۸۲).

منطقه‌ی پیداش آن ابتدا در سوریه و فلسطین بوده و از آنجا به مصر و بین النحرین و سپس به ایران آمده و بعداً از طریق ایران به هندوستان، چین و روسیه و بالاخره به اروپا رفته و سپس به سایر نقاط دنیا انتقال یافته است. درایران کار اصلاح و هیبریداسیون گندم از سال ۱۳۰۹ در کرج و ورامین شروع و اولین هیبرید بین دو رقم به نام «عطایی» و «شاه پسند» برای تهیه‌ی گندم «شاه پسند زودرس» انجام گردید (قارونی، ۱۳۸۲).

۳-۲-۱- ژنتیک گندم

گندم (*triticum aestivum* L) با ژنوم AABBDD یک گیاه آلوهگزاپلوئید با هفت گروه از کروموزوم های همولوگ می باشد. نقشه ژنتیکی آن به منظور به نژادی گیاه از ارزش بالایی برخوردار است (*sishen et al., 2007*). گندم آلوپلوئیدی است که از تلاقی سه گونه دیپلوئید دارای ژنوم A، B و D بوجود آمده است (Kimer and sears, 1987).

۴-۲- ۱- گیاه‌شناسی گندم

گندم معمولی یا گندم نان گیاهی است تک لپه، خودگشن، روز بلند، یکساله است. از نظر سطح پلوئیدی، گندم به سه گروه دیپلوئید (2n=۱۴)، تتراپلوئید (2n=۲۸) و هگزاپلوئید (2n=۴۲) تقسیم بندی می شود. گندم از نظر رده بندی گیاهی از خانواده غلات می باشد. ساقه های گندم راست، استوانه ای و بند بند یا ماشوره ای است. برگ‌های دوسویه بطور متناوب در دو ردیف ساقه قرار دارند که تعداد آنها هفت یا هشت عدد می باشد. گل آذین گندم سنبله است که هر سنبلچه آن

توسط دو گلوم در بر گرفته می شود. گندم گیاهی دو جنسه است و به دلیل نداشتن کاسبرگ گلبرگ، گل آن ناقص است لما دارای ریشک و یا فاقد آن باشد. در اطراف ادگی دو پولک کوچک به نام پوشینک وجود دارد. مادگی به کلاله دو شاه پرمانند ختم می‌شود. تعداد پرچم ها اغلب سه عدد و به ندرت شش عدد و یا یک عدد می باشد. دانه گندم مانند سایر غلات از نوع گندمه، خشک و ناشکوفا می باشد (زمانی،۱۳۸۵ و طاهرنژاد، ۱۳۸۵).

۵-۲-۱- تنش شوری

تنش‌های محیطی مثل خشکی، شوری، درجه حرارت و سمیت شیمیایی به طور جدی کشاورزی را تهدید می‌کنند. تنش‌های محیطی، باعث کاهش محصولات کشاورزی در سرتاسر جهان می‌شود و کاهش میانگین عملکرد ناشی از این تنش‌ها برای گیاهان زراعی مهم بیش از ۵۰ درصد می‌باشد (Wang *et al*., 2003). در بین تنش‌های محیطی شوری و خشکی بیش‌ترین اثر را روی گیاهان زراعی دارند و ممکن است تا سال ۲۰۵۰ میلادی، بیش از ۵۰ درصد زمین‌های کشاورزی شور شود (Ashraf, 1994; Vinocur et al., 2005).

۶-۲-۱- تحمل به شوری

گیاهان از لحاظ تحمل به شوری در دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند، اولی گیاهان مقاوم به شوری یا هالوفیت‌ها و دومی گیاهان حساس به شوری یا گلیکوفیت‌ها می‌باشد (Flowers and Flowers, 2005).

گیاهانی که قادر به کامل کردن سیکل زندگی خود در محیط‌های شوری می‌باشند و هیچ گونه کاهش رشدی در غلظت‌های بالای Na^+ در ۲۰۰ میلی‌مول Nacl نشان نمی‌دهند هالوفیت نامیده می‌شوند (Green way and Munns, 1980). رشد این گیاهان در مقادیر پایین نمک خاک کم

بوده و با افزایش نمک خاک، بهبود می‌یابد و فقط در غلظت‌های بیش از حد نمک صدمه می‌بینند. هالوفیت‌ها در ۲ تا ۵ درصد مول نمک رشد می‌کنند، این گیاهان عمدتاً یون‌ها را در واکوئل سلول-ها جمع می‌کنند زیرا سیستم آنزیمی و متابولیکی سلول همانند غیرهالوفیت‌ها حساس به شوری است. در حقیقت هالوفیت‌ها از نمک‌های غلیظ شده در واکوئل‌ها به عنوان متعادل کننده اسمزی استفاده می‌کنند و تعادل اسمزی خود را با محیط بیرونی سلول حفظ می‌کنند (Flower et al., 1986). هالوفیت‌ها در ۲۵۰۰۰۰ هزار گونه از گیاهان گل‌دار گسترش کمی دارند و کمیاب هستند، ولی تمام گیاهان زراعی گلیکوفیت می‌باشد (Flowers and Flowers, 2005). دومی گلیکوفیت‌ها گیاهانی هستند که نمی‌توانند در صورت وجود شوری خوب رشد کنند. هر چند که غلظت شوری خیلی رقیق‌تر از آب دریا باشد. تقریباً تمام گونه‌های زراعی گلیکوفیت هستند این گیاهان در خاک‌های غیر شور یک مزیت گزینشی نسبت به هالوفیت‌ها دارند زیرا بر طبق یک قاعده‌ی کلی سرعت رشد آنها زیادتر می‌باشد (Shannnon, 1984). تنوع قابل توجهی در تحمل گلیکوفیت‌ها به نمک وجود دارد. این تنوع اغلب در بین گونه‌ها و داخل گونه‌های گلیکوفیت‌ها اتفاق می‌افتد (Flowers and Flowers, 2005).

از خصوصیات بارز هالوفیت‌ها، محدودیت روزنه‌ای کمتر، میزان فتوسنتز بالاتر، میزان پایین Na^+ و CL^- در کلروپلاست و سیتوپلاسم، کارایی مصرف آب بالا، غلظت CO_2 داخلی بیشتر، نقطه اشباع بالاتر نسبت به گلیکوفیت‌ها در شرایط تنش شوری می‌باشد (Parida and Das, 2005).

۷-۲-۱- سایر صفات مؤثر در تنش شوری

۱-۷-۲-۱- اثر شوری بر محتوی کلروفیل برگ

محتوی کلروفیل برگ به عنوان یک فاکتور مهم در تعیین ظرفیت فتوسنتزی برگ محسوب می‌شود و کاهش محتوی کلروفیل به عنوان یک عامل غیر روزنه‌ای می‌تواند منجر به کاهش

ظرفیت فتوسنتزی برگ شود (Srivastava, 1988; Jiang and Huwang, 2001; Husain *et al*., 2003).

شوری باعث تخریب ساختار کلروپلاست‌ها و عدم پایداری ترکیب‌های رنگیزه – پروتئین می شود (Abd-Elsamad and Shadad, 1996). در اثر شوری مقدار کلروفیل کاهش می‌یابد که احتمالاً به خاطر افزایش فعالیت کلروفیلاز توسط هورمون آبسیزیک اسید، اتیلن و ... تشدید می شود که در شرایط تنش غلظت این مواد افزایش می‌یابد (حیدری شریف آباد، ۱۳۸۰).

(Kao *et al*., 2005) در عکس العمل سه گونه سویا به تنش شوری اظهار داشتند، تنش شوری سبب کاهش میزان کلروفیل ارقام سویا شد که این کاهش با افزایش محتوی سدیم بافت‌ها رابطه مثبت و هماهنگی داشت. به طوری که افزایش سدیم، کاهش کلروفیل را در پی داشت. (Rodriguez *et al*., 1999) تأثیر سوء شوری بر فرایند فتوسنتز را ناشی از بسته شدن روزنه‌ها، تخریب ترکیبات رنگیزه – پروتئین مانند کلروفیل و کاروتنوئید، کاهش فعالیت آنزیم‌های کربوکسیلاسیون و اختلال در چرخه انتقال الکترون فتوسنتزی دانسته‌اند. در شرایط شوری میزان فعالیت کلروفیلاز و در نتیجه تخریب کلروفیل افزایش یافت. به طور کلی با افزایش شوری میزان کلروفیل a و b در گیاهان مختلف کاهش می‌یابد. اما این موضوع از روند یکسانی پیروی نمی‌کند.

۲-۷-۲-۱- اثر شوری بر روابط آبی گیاه

درصد رطوبت نسبی بافت گیاهی RWC، یکی از مهم ترین مؤلفه‌های نشان‌دهنده وضعیت آبی گیاه است. به هنگام تجمع یون‌ها در محیط ریشه و بروز تنش شوری، پتانسیل آب خاک کاهش یافته و در نتیجه توانایی گیاه در جذب رطوبت از خاک کاهش می‌یابد. این حالت را تنش خشکی فیزیولوژیک یا کاذب می‌گویند. در این حالت کمبود رطوبت در بافت‌هایی نظیر برگ‌ها، سبب اختلال در فرایندهای حیاتی نظیر فتوسنتز و پایداری آنزیم‌ها می‌شود (Valentovic *et al*.,

2006). طی تحقیقی روی ذرت بیان نمودند که تنش شوری سبب کاهش RWC در ارقام حساس و مقاوم ذرت شد، اما این کاهش در رقم مقاوم به شوری در مقایسه با رقم حساس در شرایط یکسان توانست تورگر و سطح برگ خود را به مدت بیشتری حفظ نماید. با بررسی رابطه میان RWC برگ چند گیاه زراعی و تحمل شوری بیان نمودند که همبستگی مثبتی بین RWC برگ و تحمل شوری در این گیاهان وجود دارد. گیاهان مقاوم به تنش قادرند در شرایط تنش خشکی یا شوری با استفاده از سازوکار تجمع یون در واکوئل سلول‌ها یا تجمع ترکیبات آلی نظیر بتائین و پرولین در واکوئل و سیتوپلاسم سلول، پتانسیل اسمزی سلول را کاهش داده و موجب جذب آب بیشتر توسط گیاه شدند. این فرایند که تنظیم اسمزی نامیده می‌شود، سبب حفظ فشار آماس سلول و ادامه فرایندهای حیاتی گیاه تحت شرایط تنش می‌شود.

۳-۷-۲-۱- اثر شوری بر کربوهیدرات‌های محلول

کربوهیدرات‌های محلول یکی از مهم ترین اسمولیت‌های سازگار فیزیولوژیکی می‌باشند که در بسیاری از گیاهان تجمع بالایی توسط تنش شوری و خشکی القا می‌شود (Ashraf and Heris, 2004). قندهای محلول نقش مهمی در تنظیم اسمزی سلول به عهده دارند (Bolarin *et al*., 1995). تغییرات غلظت کربوهیدرات‌ها در القای سازوکارهای تحمل در برابر تنش بسیار مهم است؛ زیرا این ترکیبات به طور مستقیم با واکنش‌های فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، انتقال مواد فتوسنتزی و تنفس در ارتباط هستنند (Mckersie and Leshem, 1994). کربوهیدرات‌های محلول به عنوان واکنش میان مدت به خشکی شاخصی برای تنظیم اسمزی در شرایط تنش می باشد. متابولیسم قندها به شکل نامطلوبی در گیاهان تحت تنش شوری تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Ahmadi and Niaz Ardakani, 2006).

باقری و حیدری شریف آباد (۱۳۸۸) به این نتیجه رسیدند که تنش شوری باعث افزایش کربوهیدرات‌های محلول در جوی بدون پوشینه می‌شود که این امر منجر به افزایش تحمل به شوری می‌شود.

۴-۷-۲-۱- اثر شوری بر میزان پرولین

در زمان وقوع تنش، گیاه با افزایش زیست ساخت اسیدهای آمینه‌ای مثل پرولین باعث حفظ فشار آماس و ادامه رشد سلول می‌گردد (Mckersie and Leshem, 1994). در شرایط تنش شوری میزان تولید پرولین برای ایجاد مقاومت در گیاه و شرکت در فرآیندهای تنظیم اسمزی افزایش می‌یابد (Vendruscolo *et al.*, 2007). افزایش میزان پرولین در شرایط تنش یکی از معیارهای ایجاد مقاومت در گیاه به شمار می‌رود و پرولین می‌تواند نقش حفاظتی را برای پروتئین‌ها و آنزیم ها در شرایط وقوع تنش داشته باشد (Kuznetsov and Shevykova, 1999). افزایش پرولین در ریشه و بخش هوایی کلزا طی تنش شوری گزارش نمودند (حیدری و همکاران، ۱۳۸۸).

۸-۲-۱- تعریف QTL

به علت کوچک بودن اثر ژن‌های صفات کمی و تغییرات محیطی، شناسایی و تعیین دقیق تعداد و محل قرار گیری آنها در روی کروموزوم ممکن نیست و روش‌های مختلف تنها مناطقی از ژنوم را که احتمال حضور این ژن‌ها در آن‌ها بیشتر است را به صورت یک حدود اعتماد مشخص می‌کنند. بنابراین به جای اصطلاح ژن، از اصطلاح لوکوس صفت کمی[1](QTL) برای آن‌ها استفاده می‌شود. در واقع QTL به قسمتی از ژنوم گفته می‌شود که روی صفت کمی تاثیر می‌گذارد و معمولاً شامل تعداد بسیار زیادی ژن است که همه یا بعضی و یا گاهی حتی فقط یکی از آن‌ها به

[1]- Quntitative Trait Locus

صفت کمی مربوط می‌شوند. یا به عبارت دیگر QTL قطعه ای از کروموزوم است که در بروز صفت کمی نقش دارد (امین‌فر، ۱۳۸۷).

با پیشرفت تکنولوژی و ابداع روش‌های مارکر مولکولی، به تدریج دانشمندان قادر شدند تا قسمت‌های مختلف ژنوم را علامت‌گذاری و نشانه‌گذاری کنند. همزمان با بیشتر شدن تعداد این نقطه‌ها، به تدریج بین آنها لینکاژ دیده شده و راه برای تهیه نقشه‌های لینکاژی باز شد. دانشمندان از این فرصت جدید برای مکان‌یابی ژن‌های نسبتاً کوچک اثر استفاده کردند. در روش‌های جدید، دیگر لازم نبود که تعداد ژن‌ها را بسیار زیاد و اثرات آنها را نامساوی در نظر بگیرند. همچنین، علاوه بر برآورد تعداد فاکتورهای مؤثر، می‌شد اثرات آنها را هم دقیق‌تر و به صورت انفرادی بررسی کرد و با تعیین محل آن‌ها در ژنوم، این فاکتورها، به مفهوم ژن نزدیک‌تر می‌شدند. در روش‌های جدید امکان برآورد اثرات متقابل ژن‌ها هم به صورت دقیق‌تری موجود است (امین‌فر، ۱۳۸۷).

۹-۲-۱- تجزیه QTL

تعیین محل قرارگیری QTLها در ژنوم و برآورد آنها روی صفت کمی به کمک نشانگرها را تجزیه QTL می‌گویند.

تا همین اواخر، عقیده بر این بود که ساختار ژنتیکی یک صفت کمی از تعداد بسیار زیادی ژن، تشکیل شده که هر کدام از آن‌ها اثرات خیلی کوچکی روی صفت کمی دارند. در صورت صحت این عقیده دیگر تجزیه QTL هیچ جذبه‌ای نداشت، زیرا اطلاعات بدست آمده از شناسایی هر لوکوس قادر به جبران هزینه تلاش مصرف نمی توانست باشد. پس از توسعه نقشه‌های لینکاژی اشباع[1] شده به کمک نشانگرهای مولکولی چند شکل[2]، دانشمندان بالاخره قادر به تفکیک ژنتیکی صفات کمی شدند و معلوم شد که کنترل ژنتیکی این صفات از آن‌چه که پیش‌تر تصور می‌شد

[1]- Saturated linkage map
[2]- Polymorphic molecular marker

خیلی ساده‌تر است (Paterson *et al*., 1998). در واقع معلوم شد که در بیش‌تر موارد تعداد اندکی از لوکوس‌های ژنتیکی بخش بزرگی از واریانس مربوط به یک صفت را کنترل می‌کنند که دانشمندان را برای گزینش به کمک نشانگر ترغیب می‌کند. (Flint and Mott, 2001) روش‌های تعیین محلQTLها ضرورتاً روش‌های آماری هستند. چون محل ژن مسئول صفت کمی به طور دقیق معلوم نیست، به کنایه به آن مه آماری می‌گویند. از طرف دیگر، در مورد ژن‌های اصلی از روی نوترکیبی آنها با مارکرها می‌توان محل آن‌ها را دقیقاً معلوم کرد. در واقع حتی از ژن‌های اصلی به عنوان مارکر برای غنی‌تر کردن نقشه‌های لینکاژی استفاده می‌شود (کروژدهی، ۱۳۸۷).

۱۰-۲-۱- مراحل انجام تجزیه QTL

اجزای جمعیت برای صفت یا صفات کمی مورد نظر در شرایط مزرعه یا گلخانه نمره‌دهی می-شوند (یادداشت‌برداری صفت یا صفات).

اجزای جمعیت از نظر مارکر مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاه بررسی می‌شوند (نقشه مارکری به روش مولکولی تهیه می‌شود).

ارتباط دادن داده‌های فنوتیپی به ژنوتیپی، نقشه‌یابی QTL[1] گویند. (کروژدهی، ۱۳۸۷)

۱۱-۲-۱- نقشه پیوستگی یا لینکاژی

یک نقشه پیوستگی را می‌توان مشابه یک نقشه راه از کروموزوم‌های حاصل از دو والد مختلف تصور نمود که موقعیت و فاصله ژنتیکی نسبی بین نشانگرها در طول کروموزوم همانند علامت‌ها یا نشانه‌های اختصاصی در طول یک بزرگراه نشان داده می‌شود. سه مرحله اصلی تهیه نقشه پیوستگی شامل:

[1]- QTL mapping

انتخاب والدین و تولید یک جمعیت نقشه‌یابی

تشخیص پلی مورفیسم با استفاده از نشانگرهای مولکولی

آنالیز لینکاژی نشانگرها

۱-۱۱-۲-۱- جمعیت‌های نقشه‌یابی

برای ساخت نقشه پیوستگی نیاز به یک جمعیت گیاهی در حال تفرق (جمعیت حاصل از تولید مثل جنسی) می‌باشد. والدین انتخاب شده برای ایجاد جمعیت نقشه‌یابی باید در یک یا تعداد بیشتری صفت مورد نظر متفاوت باشند. اندازه‌ی جمعیت مورد استفاده در نقشه‌یابی از ۵۰ تا ۲۵۰ فرد متغیر می‌باشد (Mohan *et al*., 1997). جمعیت گونه‌های خودگشن، از والدینی که هر دو هموزیگوتی بالایی (اینبرد) دارند منشأ می‌گیرند، در گونه‌های دگرگشن وضعیت پیچیده تر است، زیرا بیش‌تر این گونه‌ها تحمل اینبردینگ را ندارند و همچنین بسیاری از گونه‌های دگرگشن از لحاظ سطح کروموزومی پلی‌پلوئید هستند (Collard *et al*., 2005). جمعیت‌های مختلفی ممکن است برای نقشه‌یابی گونه‌های خودگشن مورد بهره برداری قرار گیرد که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند (McCouch and Doerge, 1995; Paterson, 1996). جمعیت‌های F_2 حاصل از تلاقی هیبریدهای F1 و جمعیت‌های بک کراس (BC) حاصل از تلاقی هیبرید F1 با یکی از والدین، ساده‌ترین انواع جمعیت‌های نقشه‌یابی در گیاهان خودگشن می‌باشند. مزایای اصلی آنها سهولت تشکیل و زمان کوتاه مورد نیاز برای تولید آنهاست. تشکیل رگه‌های اینبرد نوترکیب (RIL) حاصل از خودگشنی گیاهان F_2 که متشکل از یکسری لاین‌های هموزیگوس که هر کدام حاوی ترکیب ویژه‌ای از قطعات کروموزومی والدین اصلی است. زمان مورد نیاز برای تشکیل جمعیت RIL عیب اصلی این جمعیت بوده زیرا معمولاً ۶ تا ۸ نسل برای ایجاد چنین جمعیتی مورد نیاز می باشد. جمعیت‌های هاپلوئید مضاعف (DH) نیز یکی دیگر از جمعیت‌هایی است که