تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد چهاردهم، شماره سوم، پائیز ۱۴۰۰
۷۷۱-۷۸۱
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.3163.1808

مقاله پژوهشی

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده متابولیت‌های ثانویه در جو (*Hordeum vulgare* L.) تحت شرایط تنش شوری

سمیه مختوم[۱]، حسین صبوری[۲*]، عبداللطیف قلیزاده[۳]، لیلا آهنگر[۳]، مهناز کاتوزی[۴]، ابراهیم غلامعلی پورعلمداری[۳]

۱. دانشجوی ارشد بیوتکنولوژی، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس
۲. دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس
۳. استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس
۴. گروه اصلاح نباتات موسسه تحقیقات اگروسکوپ سوئیس

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۱۵

چکیده

به‌منظور ردیابی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده متابولیت‌های ثانویه گیاه جو در مرحله زایشی تحت تنش شوری از ۱۰۶ خانواده F8 حاصل از تلاقی دو رقم بادیا×کویر در سال ۹۸-۱۳۹۷ استفاده شد. برای شناسایی QTLهای کنترل‌کننده و برآورد اندازه اثر یک از آن‌ها، از چهار روش نقشه‌یابی CIM، ICIM، STMIM و STPLM استفاده شد. نقشه پیوستگی با استفاده از ۱۵۲ نشانگر چند شکل SSR، ۷۲ آلل ISSR، ۷ آلل IRAP، ۲۹ آلل CAAT، ۲۷ آلل Scot و ۱۵ آلل iPBS تهیه شد. نشانگرهای مولکولی استفاده‌شده روی ۷ کروموزوم جو جایابی شدند. نقشه حاصل ۹۹۹/۲ سانتی‌مورگان طول ژنوم جو را پوشش داد و میانگین فاصله بین دو نشانگر مجاور از یکدیگر ۳/۳۸۷ سانتی‌مورگان شد. سه ناحیه مهم (کروموزوم یک در مکان ۲۶ سانتی‌مورگان، کروموزوم ۳ در مکان ۴۴ سانتی‌مورگان و در کروموزوم ۴ مکان ۱۱۸ سانتی‌مورگان از تلومر انتهایی کروموزوم‌ها) با کلیه روش‌های مکان‌یابی برای صفات ارزیابی‌شده حاوی ژن‌های کمی مهم تشخیص داده شدند. از بین QTLهای شناسایی‌شده qSUG-4 (برای محتوی قند روی کروموزوم ۴) با ضریب تبیین ۲۰/۲ و QTLهای qPHE-1 و qPHE-2 (برای محتوای فنول روی کروموزوم‌های ۱ و ۲) به ترتیب با ضریب تبیین ۲۱/۳، ۲۹/۱ و qPER-1، qPER-4b، qPER-5، qPER-7 (برای پروکسیداز روی کروموزوم‌های ۱، ۴، ۵ و ۷) با اثرات تأثیرگذار شناسایی شدند و پس از تائید اعتبار، کاندید مناسبی برای برنامه‌های اصلاحی انتخاب به کمک نشانگر در جمعیت‌های جو خواهند بود.

واژه‌های کلیدی: **جو (*Hordeum vulgare* L.)، تنش شوری، متابولیت‌های ثانویه، QTL**

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) با سطح زیر کشت ۱/۶۵ میلیون هکتار و تولید ۳/۴ میلیون تن یکی از گیاهان مهم زراعی است (FAO, 2008). آمار منتشرشده توسط وزارت جهاد کشاورزی ایران نشان می‌دهد که سطح زیر کشت جو آبی در مناطق سرد کشور در سال زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۷ برابر ۲۵۳۳۸ هزار هکتار با تولید ۷۰۳۱۱ هزار تن و میانگین عملکرد ۲۴۸۱ کیلوگرم در هکتار است (Ahmadi et al, 2019).

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. یکی از راه‌های مؤثر برای مقابله بر مشکلات ناشی از افزایش شوری خاک و آب، تولید ارقامی با سطح بالای تحمل شوری است (Jafari et al, 2013).

* نگارنده پاسخگو: حسین صبوری. پست الکترونیک: hos.sabouri@gmail.com

تنش‌های محیطی از مهم‌ترین عوامل اثرگذار بر مقدار متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است. این ترکیبات گیاهان را قادر می‌سازند تا عوامل نامساعد محیطی را تحمل کرده و به بقای خود ادامه دهند. شواهد زیادی برای افزایش متابولیت-های ثانویه تحت تنش‌های محیطی وجود دارد (Walpola and Arunakumara, 2017; Ramakrishna and Ravishankar; 2011). اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ده رقم گندم دوروم توسط زبرجدی و همکاران (Zebarjadi et al., 2012) مطالعه شد نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، ATPase و پراکسیداز (POD) تحت تنش شوری افزایش می‌یابد درحالی‌که فعالیت کاتالاز (CAT) در مقایسه با شاهد کاهش یافت. بنا به گزارش علی و همکاران (Ali and Abbas, 2003) تنش شوری علاوه بر کاهش سرعت رشد گیاه جو، باعث زیادشدن ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدها و افزایش پراکسیداز و ایندول استیک اسید اکسیداز می‌شود. همچنین مقدار آنزیم‌های اکسیدو ردوکتاز مانند کاتالاز اسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز گلوتاتیون ریداکتاز و سوپراکسید دیسموتاز، براثر تنش شوری در گیاهان افزایش پیدا می‌کند و اغلب بین مقدار آن‌ها و تحمل به شوری رابطه مستقیم وجود دارد (Parida and Das, 2005) ازجمله استراتژی گیاهان در تحمل در برابر تنش شوری، تجمع اسمولیت‌ها است (Sairam and Tyagi, 2004). در پژوهشی که به‌منظور بررسی تأثیر تنش شوری بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان قندهای محلول در یونجه انجام شد، گزارش گردید که تنش شوری باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و غلظت قندهای محلول می‌شود (Wang and Zhang, 2009).

تحمل به تنش شوری در گیاهان صفتی پیچیده ژنتیکی و فیزیولوژیکی است. اکثر صفات گیاهی، دارای توارث پیوسته هستند و از شرایط محیطی نیز تأثیر می‌پذیرند (Koyama et al., 2001). شناسایی نشانگرهای کاملاً پیوسته به ژن موردنظر و مکان‌یابی آن‌ها، یک هدف مهم در اصلاح نباتات و گزینش به کمک نشانگر (Marker-aided selection) است (Arif, 2002). مطالعه پیرامون مکان-یابی (Mapping) و یا نشان‌دار کردن (Tagging) تخمینی را در مورد تعداد ژن‌های کنترل‌کننده صفت و در نقشه لینکاژ محل این ژن‌ها (Linkage map) ارائه می‌دهد.

ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیک و فنولوژیک جو برای تعیین اهمیت هر یک از آن‌ها در افزایش عملکرد و استفاده در برنامه‌های به‌نژادی از اهمیت خاصی برخوردار هستند. اکثر صفات مهم، دارای کنترل ژنتیکی پیچیده‌ای بوده و توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند که با محیط واکنش نشان می‌دهد و به همین دلیل پیش‌بینی عملکرد آن‌ها تا حدودی دشوار است. این صفات کمی دارای توزیع پیوسته بوده و قابل‌اندازه‌گیری هستند. خلیلی و محمدیان (Khalili and Mohammadian, 2015) QTLهای مرتبط با تنش شوری را در ۷۲ لاین هاپلوئید مضاعف شده در مراحل جوانه‌زنی شناسایی نمودند. در بررسی ایشان، ۴۷ عدد QTL شناسایی شد و اثرات اپیستازی افزایشی × افزایشی نیز معنی‌دار شدند. درصد توجیه واریانس QTLهای مذکور از ۲۹/۹۷ تا ۷۷/۱۵ بود که کمترین و بیشترین آن به ترتیب برای درصد جوانه‌زنی در تنش ۲۰۰ میلی‌مولار بود و سرعت جوانه‌زنی در شرایط نرمال بود. بیشترین LOD= ۸/۲۷ روی کروموزوم 4Hb برای سرعت جوانه‌زنی در شرایط ۱۰۰ میلی مولار بود. براتی و همکاران (Barati etal.,2013) برای مکان‌یابی QTLهای مرتبط با عملکرد در جو (۱۶۹ لاین نوترکیب جو از تلاقی ارقام ایگری × آریگاشار) نشان دادند که در بین صفات موردمطالعه صفت وزن هزار دانه با بیشترین وراثت‌پذیری عمدتاً توسط اثرات افزایشی کنترل می‌شود. براتی و همکاران (Barati etal.,2013) از نشانگرهای SSR و AFLP برای تهیه نقشه پیوستگی ۴ کروموزوم در جو نقشه‌یابی شد. برای کلیه صفات اندازه‌گیری شده از جمعیت لاین‌های نوترکیب، دو QTL روی گروه‌های پیوستگی شماره ۲ و ۵ به دست آمد.

با توجه به این‌که ردیابی و تغییر ژن‌های مرتبط با صفات فیزیولوژیک ازجمله متابولیت‌های ثانویه یکی از راه‌های اصلاح جو است و از طرفی تاکنون گزارشی از مکان‌یابی ژن‌های فوق گزارش نشده است لذا این پژوهش با هدف ردیابی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده محتوی متابولیت‌های ثانویه در جو تحت شرایط تنش شوری طرح‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

اجرای آزمایش و ارزیابی‌های فنوتیپی

به‌منظور اجرای آزمایش مکان‌یابی صفات مورفوفنولوژیک ژن‌های کنترل‌کننده تحمل به شوری در گیاه جو در مرحله رویشی و زایشی از ۱۰۶ خانواده F8 حاصل از تلاقی دو رقم بادیا × کویر در قالب طرح اگمنت با چهار شاهد استفاده شد.

تلاقی مذکور در سال زراعی ۱۳۸۹-۱۳۸۷ در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی انجام شد. نسل‌های در حال تفرق آن در قالب پروژه‌های مشترک بین سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و دانشگاه گنبدکاووس به‌صورت پایان‌نامه-های تحصیلات تکمیلی توسعه یافت. تحقیق حاضر در سال زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۷ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه گنبدکاووس انجام شد. از ویژگی‌های برجسته والد بادیا می‌توان به عملکرد بالاتر در شرایط نرمال، حساس به ورس و تنش‌های اسمتیک و والد کویر عملکرد پایین‌تر و تحمل به ورس و تنش‌های اسمتیک اشاره کرد (Kaviani Charati et al., 2016). بذور ۱۰۶ خانواده به همراه والدین تلاقی در گلدان جهت بررسی کشت شدند. ابتدا برای کشت بذور در گلدان‌های ۵ کیلویی در گلخانه قرار داده شد، سپس در گلدان‌ها خاک (با خصوصیات جدول ۱) و با مقدار مساوی ریخته شد و در هر گلدان تعداد ۷ بذر قرار داده شد. سپس مراحل داشت زراعی تا مرحله‌ی زایشی جو انجام شد. ویژگی-های خاک در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. ویژگی‌های خاک محل اجرای آزمایش (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر)

Table 1. Soil properties of the experiment site (0-30 cm depth)

Sand ماسه	Silt لای	Clay رس	K پتاسیم	P فسفر	N ازت	Organic carbon کربن آلی	Neutral substances مواد خنثی شونده	pH	EC
----------%----------			---------ppm---------		----------%----------				ds/m
13	58	29	316	11.4	0.09	0.9	9.5	7.6	1.19

برای اعمال تنش شوری، لاین‌ها تا پایان مرحله رویشی تحت شرایط آبیاری نرمال نگهداری شدند و سپس در مرحله خوشه‌دهی با آب شور ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر تا حد ظرفیت مزرعه آبیاری شدند. در انتهای دوره پر شدن دانه از هرکدام از لاین‌ها نمونه برگی از برگ پرچم تهیه شد و برخی متابولیت‌های ثانویه به شرح زیر ثبت شدند:

محتوی قندهای محلول

برای اندازه‌گیری محتوی قند محلول، ۰/۱گرم از ماده خشک گیاهی برداشته و سپس ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد و به مدت یک هفته در یخچال نگهداری گردید تا قندهای محلول آن جدا شود. پس از یک هفته، از محلول رویی نمونه‌ها یک میلی‌لیتر برداشته شد و حجم آن با آب مقطر به دو میلی‌لیتر رسانده شد. پس از اضافه کردن یک میلی‌لیتر فنول ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ، میزان جذب به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera-S 22 در طول‌موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد. میزان قند هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گلوکز محاسبه شد (Kochert, 1978).

محتوی فنول کل

جهت اندازه‌گیری محتوی فنول کل، مقدار ۰/۱ گرم از پودر خشک گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول داغ ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده شد و سپس مخلوط حاصل با دور کم ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس‌ازآن مخلوط رویی در بن‌ماری قرار داده تا غلیظ شده و حدود دو میلی‌لیتر از آن برای ادامه آزمایش باقی بماند. سپس یک میلی‌لیتر از محلول تغلیظ شده با کمک آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در مرحله بعدی مجدداً نیم میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم سه میلی‌لیتر رسید، سپس روی محلول به‌دست‌آمده نیم میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ۵۰ درصد اضافه شد و بعد از سه دقیقه، دو میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به آن افزوده گردید. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده و پس از سرد شدن به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera-S 22 در نقطه جذب ۶۵۰ نانومتر خوانده شد. درنهایت، با توجه به منحنی استاندارد گالیک اسید، میزان فنول کل نمونه برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد (Malick and Singh, 1980).

محتوی آنزیم کاتالاز

برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز، تهیه عصاره آنزیمی جهت رسیدن به حداکثر استخراج آنزیم در برگ‌ها، شرایط

عصاره‌گیری با توجه به مولاریته و pH بافر، استاندارد گردید. تمام مراحل عصاره‌گیری در دمای صفر الی ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. یک گرم نمونه برگی ابتدا با آب مقطر شستشو و با کاغذ صافی خشک گردید. سپس در هاون چینی با حضور ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم سرد (حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر اتیلن دی امین تترااستیک اسید (EDTA)، ۱ درصد (W/V) پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP)، ۰/۵ درصد تریتون X-100 و ۲۰ درصد گلیسرول که در pH= ۷/۸ تنظیم شده است) له گردید. عصاره حاصل در سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا محلول همگنی به دست آید. سپس محلول رویی با دقت جدا و به‌عنوان عصاره آنزیم خام استفاده گردید (Kala, 2015).

فعالیت کاتالاز با توجه به اصلاح روش آبی (Aebi, 1984) برآورد شد. مخلوط واکنش کاتالاز موجود شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷)، ۱۰۰ ماکرولیتر از پراکسیدهیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ ماکرولیتر عصاره گیاهی است. واکنش با افزودن H_2O_2 آغاز می‌گردد و فعالیت آنزیم به‌وسیله میزان تخریب H_2O_2 به کمک اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه تعیین گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی $۴/۳۹ mM^{-1}cm^{-1}$ برای H_2O_2 محاسبه شد. یک واحد از فعالیت آنزیم به‌عنوان مقدار آنزیم موردنیاز برای اکسیداسیون یک میکرومول از دقیقه H_2O_2 در شرایط سنجش تعریف می‌شود.

محتوی آنزیم پراکسیداز

به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۷۸۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱ ایاکول میکرولیتر ۹۰، ۶/۶ pH= با میلی‌مولار ۵۰ درصد، ۹۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد استفاده شد. مواد فوق را در بستر یخ در کووت ۱ میلی‌لیتری با یکدیگر مخلوط و بلافاصله ۲۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی استخراج‌شده از برگ گرفته‌شده به کووت اضافه شد (Kelin and Hemeda 1990) را با تغییرات جذب در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر در یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل S22-libera Biochrom خوانده شد. در محلول بلانک بجای عصاره آنزیمی بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از قانون بیر-لامبرت و ضریب خاموشی محصول کاتالیز ۱ -گایاکول پراکسیداز (۶/۲۶Mcm) محاسبه شد. سپس فعالیت آنزیمی برحسب میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه‌شده در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه گزارش شد.

ارزیابی‌های ژنوتیپی

برنامه حرارتی و دوره‌های زمانی برای تکثیر اختصاصی، با توجه به دمای اتصال آغازگرها، با برنامه دمایی تاچ داون (PCR) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA نمونه‌ها به ترتیب با اسپکتروفتومتری و الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌وسیله ترموسایکر مدل iCycler BIORAD (ساخت کشور آمریکا) اجرا شد. محصولات PCR بروی ژل اکریل‌آمید ۶ درصد بارگذاری شدند و نهایتاً رنگ‌آمیزی به روش سریع نیترات نقره و NaOH انجام شد. سپس داده‌های مولکولی ثبت و ماتریس ژنتیکی تشکیل شد.

تهیه نقشه ژنتیکی و تجزیه QTL

در این راستا ابتدا چندشکلی والدین با استفاده از ۳۱۲ نشانگر SSR، ۳۰ نشانگر ISSR، ۲۰ نشانگر iPBS، ۱۰ نشانگر IRAP، ۱۰ نشانگر Scot و ۱۰ نشانگر CAAT بررسی شدند. سپس نشانگرهای دارای عدم تفرق مناسب و نشانگرهای غیر پیوسته و گروه‌های کوچک فاقد نشانگر SSR حذف شدند. نقشه پیوستگی با نشانگرهای دارای نواربندی کاملاً واضح و مطابق با تفرق مندلی (۱۵۲ نشانگر SSR، ۷۲ آلل ISSR، ۷ آلل IRAP، ۲۹ آلل CAAT، ۲۷ آلل Scot و ۱۵ آلل iPBS) ترسیم شد.

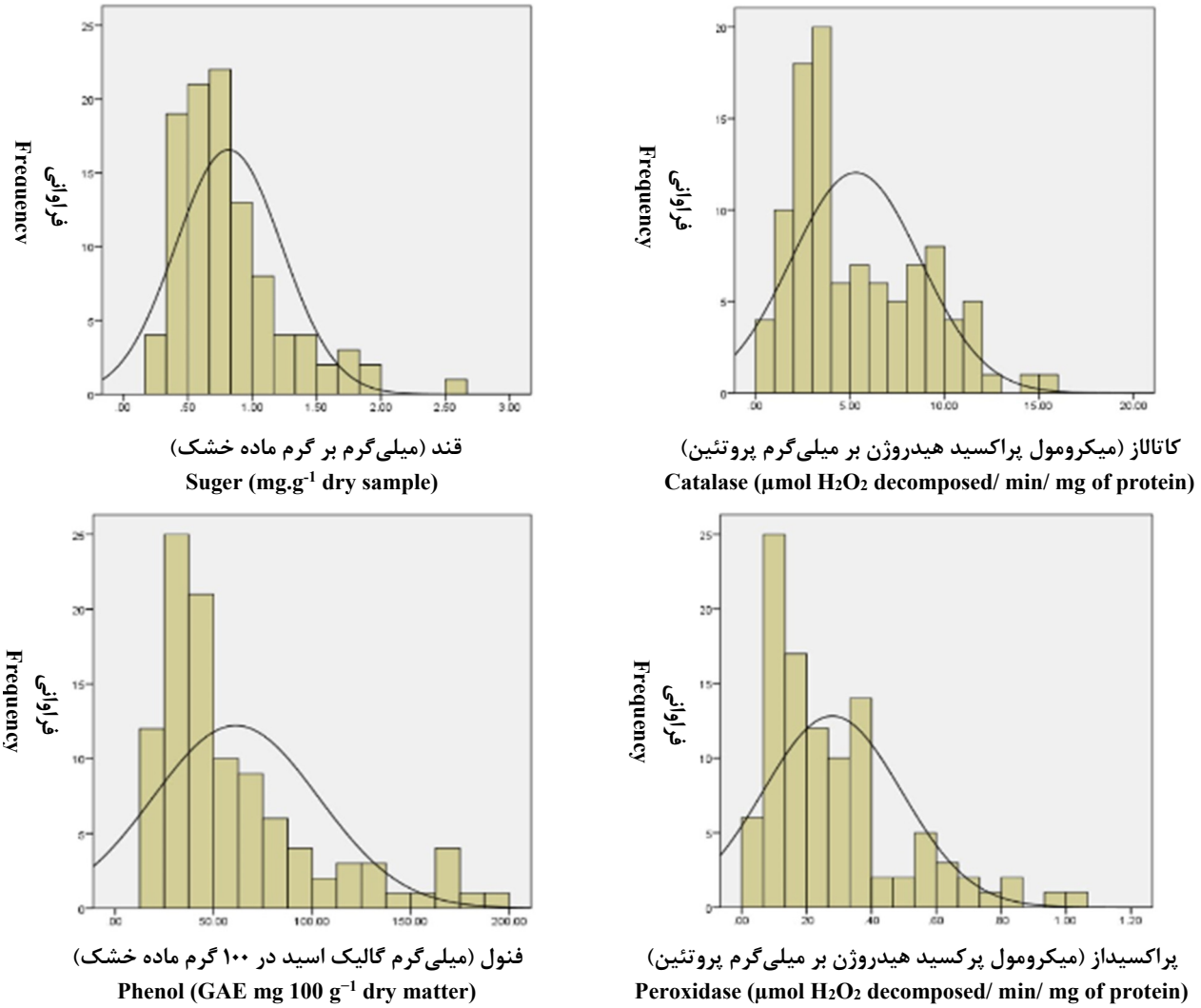
تهیه نقشه پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار Map Manager (Manly and Olson, 1999) انجام شد. ردیابی QTLها با استفاده از نرم‌افزار QGEN انجام شد. از روش‌های مکان‌یابی Composite Interval Mapping، Inclusive Composite Interval Mapping، Single Trait Multiple Interval Mapping و ST- penalized likelihood method استفاده شد حد بحرانی جهت تشخیص QTLها با انجام آزمون Permutation به‌دست آمد.

نتایج و بحث

توزیع فنوتیپی صفات

پراکنش ارزش‌های افراد موردبررسی برای صفات موردمطالعه با نمودار ستونی نشان داد که توزیع فنوتیپی صفات، پیوسته

است (شکل ۱). والد کویر ازنظر محتوی قند، پراکسیداز، کاتالاز و محتوای فنول ارزش بیش‌تری نسبت به بادیا داشت.



شکل ۱. نمودار ستونی برای صفات مورد بررسی در ۱۰۶ لاین حاصل از تلاقی بادیا و کویر تحت تنش شور

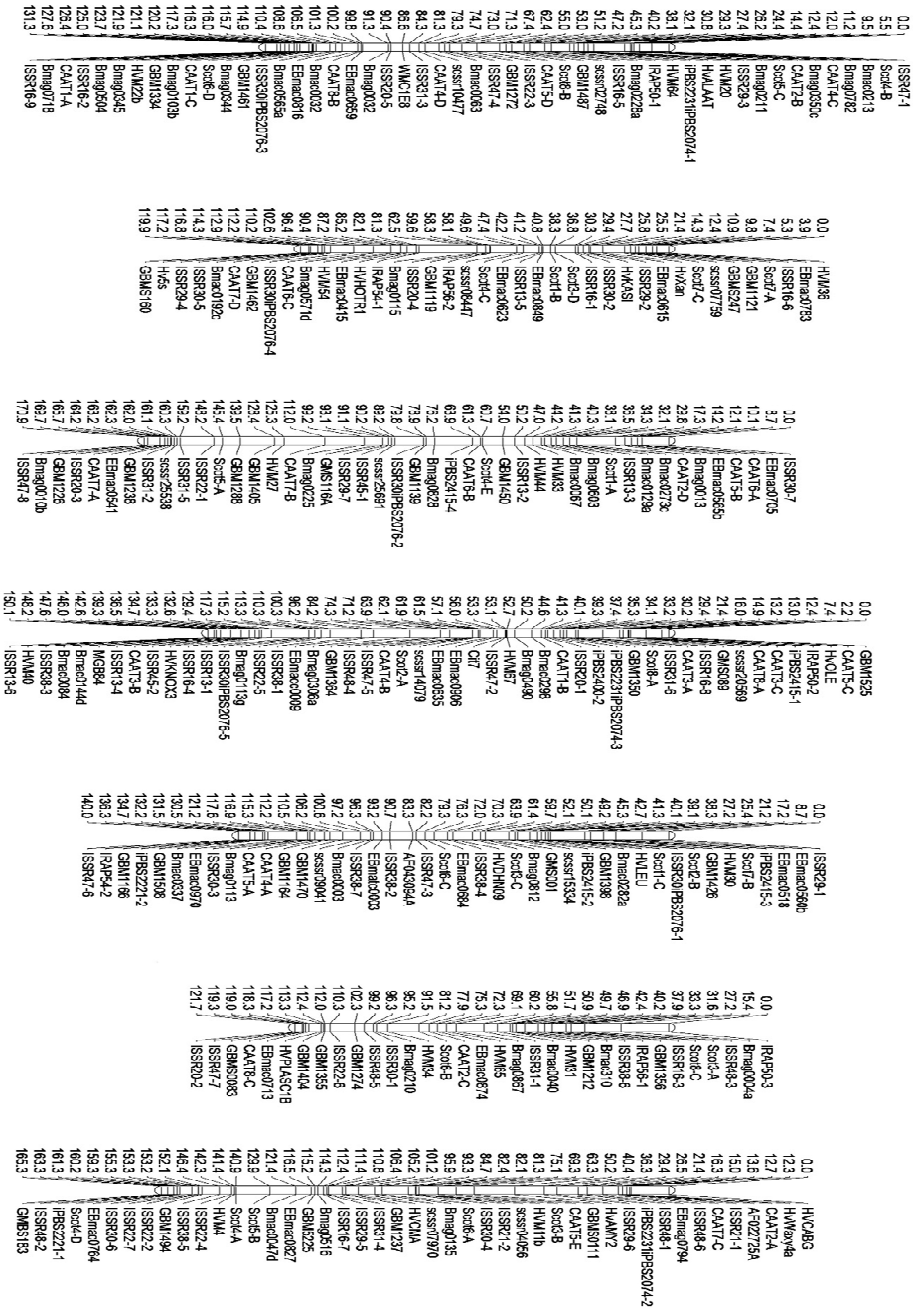
Fig. 1. Histogram for traits studied in 106 lines derived from cross between Badia and Kavir under salinity stress

تهیه نقشه پیوستگی

نقشه پیوستگی با استفاده از ۱۵۲ نشانگر SSR، 72 آلل ISSR، 7 آلل IRAP، 29 آلل CAAT، 27 آلل Scot و ۱۵ آلل iPBS تهیه شد. نشانگرهای مولکولی استفاده‌شده به ۷ گروه پیوستگی مطابق ۷ کروموزوم جو جایابی شدند. کروموزوم‌های ۱ تا ۷ به ترتیب دارای ۵۰، ۳۹، ۴۴، ۴۹، ۴۲، ۳۳ و ۴۵ شدند. طول کروموزوم‌های مذکور به ترتیب ۱۳۱/۳، ۱۱۹/۹، ۱۷۰/۹، ۱۵۰/۱، ۱۴۰/۰، ۱۲۱/۷ و ۱۶۵/۳ سانتی‌مورگان برآورد شد.

خلیلی و محمدیان (Khalili and Mohammadian, 2015) نیز نقشه ژنتیکی جو را با استفاده از ۱۷۰ نشانگر SSR و ۷ نشانگر LTR و ۲۸ نشانگر IRAP و ۶۳ نشانگر ISSR در جمعیت YecoraROJO× NO49 با استفاده از تکنیک REMAP تهیه نمودند. از کل ترکیبات مورد ارزیابی (۹۱ ترکیب) ۲۰ ترکیب آغازگری بین والدین چند شکل بودند. براتی و همکاران (Barati etal., 2013) نیز از نشانگرهای SSR و AFLP جهت تهیه نقشه پیوستگی برای ۴ کروموزوم در جو استفاده نمودند. برای کلیه صفات اندازه‌گیری شده از جمعیت لاین‌های نوترکیب، دو QTL روی

گروه‌های پیوستگی شماره ۲ و ۵ به دست آمد. شاهین‌نیا و همکاران (Shahinia et al., 2014) نقشه پیوستگی با ۱۰۰ نشانگر مولکولی (۶۲ نشانگر AFLP، 34 نشانگر STS، 2 نشانگر ایزوزایم و ۲ نشانگر مورفولوژیک) در جمعیت Kanto Nakate GOLd و Azumamugi تهیه نمودند.



شکل ۲. نقشه پیوستگی حاصل از ۱۵۲ نشانگر SSR، 72 آلل ISSR، 7 آلل IRAP، 29 آلل CAAT، 27 آلل Scot و ۱۵ آلل iPBS در جمعیت لاین‌های نوترکیب بادیا × کویر.

Fig. 2. Linkage map in barley RIL population caused Badia × Kavir crosses using 152 SSR, 72 ISSR, 7 IRAP, 29 CAAT, 27 Scot and 15 iPBS alleles

مکان‌یابی با روش‌های *Composite Interval Mapping* و *Inclusive Composite Interval Mapping*

برای مقدار قند یک QTL روی کروموزوم ۱ ردیابی شد که با داشتن LOD ۲/۸۰۸ در موقعیت ۲۶ سانتی‌مورگان بین نشانگرهای bmaq0211 و scot5 قرار داشت. اثر افزایشی این QTL 161/0 و در جهت افزایش مقدار قند بود و آلل‌های افزایش‌دهنده آن از والد کویر به نتاج منتقل شد.

برای مقدار فنول در این روش‌ها، یک QTL، روی کروموزوم ۱ ردیابی شد که دارای LOD ۲/۷۹۲ در موقعیت ۱۲۶ سانتی‌مورگان بین نشانگرهای (ISSR16-2-CAAT1-A) قرار داشت. اثر افزایشی این ۵۲/۷۳۸- جهت کاهش مقدار فنول بوده که آلل‌های کاهش‌دهنده از والد بادیا به نتاج منتقل شد.

برای QTLهای مقدار پروکسیداز در این روش‌ها، دو QTL، روی کروموزوم‌های ۳و ۴ ردیابی شد که به ترتیب دارای LOD ۳/۳۵ و ۳/۳۳۳ در موقعیت‌های ۴۴ و ۶۰ سانتی‌مورگان بین نشانگرهای (Bmac0067-HVM33 و Ebmac0635-SCssr14079) بودند. اثر افزایش این ۰/۸۵- و ۰/۹۶- جهت کاهش آن بود و آلل‌های کاهش‌دهنده از والد بادیا به نتاج منتقل شد

مکان‌یابی با روش *Single Trait Multiple Interval Mapping*

مقدار قند در این روش با شش QTL که روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۴، ۵ و ۷ شناسایی شد که به ترتیب دارای LODهای ۲/۶۸۲، ۳/۳۲۳، ۴/۶۲۲، ۵/۰۵۴، ۲/۵۲۶ و ۴/۲۵۹ در موقعیت‌های ۱۴، ۶، ۳۲، ۱۱۸، ۱۳۲ و ۷۶ سانتی‌مورگان در فاصله‌های نشانگری Bmag0350c-CAATc ISSR16-6- Scot7-A ISSR16-1- Scot3-D ISSR13-1- ISSR16-4 GBM1508- iPBS2221-2 Scot3-B- HVM11b قرار داشتند. اثر افزایشی در کروموزوم ۱، ۰/۴۸ در جهت افزایش آن بوده که آلل‌های افزایش‌دهنده از والد کویر به نتاج منتقل شد، در کروموزوم ۲ با دو موقعیت اثر افزایشی در موقعیت اول ۰/۴۵۱ در جهت افزایش مقدار قند بوده که این آلل‌ها از والد کویر به نتاج منتقل شد و در موقعیت دوم کروموزوم ۲ اثر افزایشی ۰/۴۵۶- در جهت کاهش مقدار قند بوده که از والد بادیا به نتاج منتقل شد. کروموزوم‌های ۴، ۵ و ۷ به ترتیب با اثر افزایشی ۰/۴۸۹، ۰/۴۶۵، ۰/۴۹۱ در جهت افزایش مقدار قند بوده که از خانواده کویر به نتاج منتقل شدند.

مقدار فنول در این روش با پنج QTL که روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۴ و ۷ شناسایی شد که به ترتیب دارای LODهای ۵/۳۶۹، ۷/۷۰۴، ۲/۵۴۴، ۴/۶۳۱، ۷/۴۵۴، در موقعیت‌های ۳۴، ۱۰۲، ۴۲، ۱۱۸ و ۱۴۴ سانتی‌مورگان بین نشانگرهای iPBS2231iPBS2074-1- HVM64 CAAT6-C- ISSR30iPBS2076-4 CAAT1-B-Bmac0298 ISSR13-1- ISSR16-4 ISSR22-4-ISSR38-5 قرار دارد. اثر افزایشی در کروموزوم‌ها ۱، ۴۴/۷۵۲ در جهت افزایش مقدار فنول بوده که آلل‌های افزایش‌دهنده از والد کویر به نتاج منتقل شد. در کروموزوم ۲، اثر افزایشی ۴۵/۹۷۸- در جهت کاهش مقدار فنول بوده و از والد بادیا به نتاج منتقل شد. در کروموزوم ۴ در دو موقعیت اثر افزایشی به ترتیب ۴۴/۸۱۱ و۴۷/۳۴۷ هر دو جهت افزایش بوده که آلل‌های افزایش‌دهنده از والد کویر به نتاج منتقل شدند. در کروموزوم هفت هم اثر افزایشی ۴۴/۲۸۹ در جهت افزایش بوده؛ که این آلل‌ها از خانواده کویر به نتاج منتقل شد.

برای مقدار پروکسیداز در این روش، هشت QTL که روی کروموزوم‌های ۱، ۳ (سه مورد)، ۴ (دو مورد)، ۵ و ۷، به ترتیب دارای LOD های ۵/۰۳۷، ۳/۵۷، ۴/۹۰۲، ۳/۵۶۵، ۲/۷۱۸، ۶/۳۹۹، ۶/۴۴۳ و۵/۱۸۳ در موقعیت‌های ۸۲، ۴۴، ۶۶، ۱۵۰، ۶۰، ۱۱۸، ۲۶ و ۷۶ سانتی‌مورگان در فاصله‌های نشانگری CAAT4-D- ISSR31-3 Bmac0067- HVM33 iPBS2415-4-Bmag0828 ISSR22-1-ISSR31-5 EBmac0635-scssr14079 ISSR13-1 -ISSR16-4 Scot7-B-HVM30 Scot3-B- HVM11b ردیابی شدند. اثر افزایشی در کروموزوم ۱، ۰/۲۴ در جهت افزایش بوده که آلل‌های افزایش‌دهنده از والد کویر به نتاج منتقل می‌شود در کروموزوم ۳ با سه موقعیت در موقعیت اول اثر افزایشی ۰/۸۴- در جهت کاهش بوده و از والد بادیا به نتاج منتقل شد. در موقعیت دو و سه اثر افزایشی به ترتیب ۰/۲۴۳و ۰/۲۳۹ ۰در جهت افزایش بوده که آلل‌های افزایش‌دهنده از والد کویر به نتاج منتقل شد. در کروموزوم ۴ با دو موقعیت اولی با اثر افزایشی ۰/۰۸۲- در جهت کاهش بوده که آلل‌های از والد بادیا به نتاج منتقل شد در موقعیت دوم کروموزوم ۴ و کروموزوم ۵ و ۷ به ترتیب با اثر افزایشی ۰/۲۳۶، ۰/۲۴۴ و ۰/۲۳۸در جهت افزایش بوده که آلل‌های افزایش‌دهنده از والد کویر به نتاج منتقل شد.

مکان‌یابی با روش ST- penalized likelihood:

به‌طورکلی چهار QTL در این روش مکان‌یابی شد. برای مقدار قند در این روش، یک QTL روی کروموزوم ۱ با مقدار LOD برابر با ۲/۸۶۸ در موقعیت ۲۶/۲ ردیابی شد. QTL مذکور با نشانگر Bmag0211 پیوسته بود و دارای اثر افزایشی ۰/۱۱۷ در جهت افزایش مقدار قند بود. آلل افزایش‌دهنده آن از والد کویر به نتاج منتقل شد.

جدول ۲. QTLهای ردیابی شده صفات محتوی قند، فنول، کاتالاز و پراکسیداز در جمعیت لاین‌های نوترکیب حاصل از تلاقی کویر و بادیا

Table 2. QTLs Detected for Traits Containing Sugar, Phenol, Catalase and Peroxidase in a Population of Recombinant Lines from Kavir and Badia Cross

صفت جهت آلل Traits	QTL	کروموزوم Chr	موقعیت Position	مارکر Flanking markers	LOD	اثر افزایشی Add effect	R^2	جهت آلل Allele direction
Composite Interval Mapping								
Suger	qSUG-1	1	26	Scot5-Bmaq0211	2.808	0.161	11.80	Kavir
Phenol	qPHE-1	1	126	ISSR16-2-CAAT1-A	2.792	-52.738	11.7	Badia
Peroxidas	qPER-3	3	44	Bmac0067-HVM33	3.35	-0.85	13.9	Kavir
	qPER-4	4	60	Ebmac0635-Scssr14079	3.333	-0.96	13.8	Kavir
Inclusive Composite Interval Mapping								
Suger	qSUG-1	1	26	Scot5-Bmaq0211	2.808	0.161	11.80	Kavir
Phenol	qPHE-1	1	126	ISSR16-2-CAAT1-A	2.792	-52.738	11.7	Badia
Peroxidas	qPER-3	3	44	Bmac0067-HVM33	3.35	-0.85	13.9	Kavir
	qPER-4	4	60	Ebmac0635-Scssr14079	3.333	-0.96	13.8	Kavir
Single Trait Multiple Interval Mapping								
Suger	qSUG-1	1	14	Bmag0350c-CAATc	2.682	0.48	11.3	Kavir
	qSUG2-a	2	6	ISSR16-6-Scot7-A	3.323	0.451	13.8	Kavir
	qSUG2-b	2	32	ISSR16-1- Scot3-D	4.622	-0.456	18.7	Badia
	qSUG-4	4	118	ISSR13-1- ISSR16-4	5.045	.489	20.2	Kavir
	qSUG-5	5	132	GBM1508- iPBS2221-2	2.526	0.465	10.7	Kavir
	qSUG-7	7	76	Scot3-B- HVM11b	4.259	0.491	17.3	Kavir
Phenol	qPHE-1	1	34	iPBS2231iPBS2074-1-HVM64	5.369	44.752	21.3	Kavir
	qPHE-2	2	102	CAAT6-C-ISSR30iPBS2076-4	7.704	-45.978	29.1	Badia
	qPHE-4a	4	42	CAAT1-B- Bmac0298	2.544	44.811	10.8	Kavir
	qPHE-4b	4	118	ISSR13-1- ISSR16-4	4.631	47.347	18.7	Kavir
	qPHE-7	7	144	ISSR22-4- ISSR38-5	7.454	44.289	28.3	Kavir
Peroxidas	qPER-1	1	82	CAAT4-D- ISSR31-3	5.037	0.24	20.2	Kavir
	qPER-3a	3	44	Bmac0067- HVM33	3.57	-0.84	14.8	Badia
	qPER-3b	3	66	iPBS2415-4-Bmag0828	4.902	0.243	19.7	Kavir
	qPER-3c	3	150	ISSR22-1-ISSR31-5	3.565	0.239	14.7	Kavir
	qPER-4a	4	60	EBmac0635-scssr14079	2.718	-0.082	11.4	Badia
	qPER-4b	4	118	ISSR13-1-ISSR16-4	6.399	0.236	24.9	Kavir
	qPER-5	5	26	Scot7-B-HVM30	6.443	0.244	25	Kavir
	qPER-7	7	76	Scot3-B-HVM11b	5.183	0.238	20.7	Kavir
ST- penalized likelihood method								
Suger	qSUG-1	1	26.2	Bmag0211	2.868	0.117	12	Kavir
Catala	qCAT-2	2	58.1	IRAP56-2	3.608	1.144	14.9	Kavir
Proxidaz	qPER-3	3	44.2	HVM33	3.468	0.071	14.4	Kavir
phenol	qPEO-2	2	102.5	ISSR30iPBS2076-4	3.05	-18.519	12.7	Badia

برای مقدار کاتالاز نیز یک QTL روی کروموزوم ۲ ردیابی شد. این QTL دارای LOD ۳/۶۰۸ و در موقعیت ۵۸/۱ قرار داشت. نشانگر IRAP56-2 با اثر افزایشی ۱/۱۴۴ و در جهت افزایش مقدار کاتالاز با QTL مذکور پیوسته بود و آلل آن از

والد کویر به نتاج منتقل شد. برای مقدار پروکسیداز، یک QTL روی کروموزوم ۳ با LOD ۳/۴۶۸در موقعیت ۴۴/۲ با نشانگر HVM33 با اثر افزایشی ۰/۰۷۱ردیابی شد. این QTL در جهت افزایش صفت عمل نمود و آلل افزایش‌دهنده آن از والد کویر به نتاج منتقل شد. برای مقدار فنول در این روش، یک QTL روی کروموزوم ۲ با LOD ۳/۰۵ پیوسته به نشانگر ISSR30ipBS2076-4 ردیابی شد. این QTL با اثر افزایشی ۱۸/۵۱۹- در جهت کاهش مقدار پروکسیداز عمل نمود و آلل‌های کاهش‌دهنده آن از والد بادیا به نتاج منتقل شد.

نتیجه‌گیری نهایی

از بین چهار روش مختلف بررسی‌شده، در ناحیه‌ای از کروموزوم ۱ در موقعیت ۲۶ سانتی‌مورگان و در مجاورت نشانگر Bmaq0211 برای مقدار قند با سه روش CIM، ICIM و STPLME مکان‌های ژنی کنترل‌کننده مقدار قند قرار داشت. همچنین در هر چهار روش مکان‌یابی برای مقدار پروکسیداز در موقعیت ۴۴ سانتی‌مورگان با نشانگر Bmac0067-HVM33 مکان‌های ژنی روی کروموزوم ۳ شناسایی شد.

در روش SMIM در موقعیت ۱۱۸ بین نشانگر ISSR13-1-ISSR16-4 برای مقدار قند، فنول، پروکسیداز یک مکان ژنی روی کروموزوم ۴ شناسایی شد. هم‌مکانی برای QTL-های کنترل‌کننده مقدار قند، فنول و پراکسیداز را می‌توان به درگیر بودن آن‌ها در مکانیسم تحمل به تنش گیاه باشد. افزایش میزان ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز در جو تحت تنش شوری نشان‌دهنده سطح مهار انواع فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) نظیر پراکسید هیدروژن، سوپراکسید و هیدروکسی که به‌عنوان رادیکال‌های آزاد می‌باشند. اصولاً تولید ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی در گیاهان بخشی از دفاع شیمیایی گیاه است که تحت کنترل عوامل محیطی و ژنتیکی قرار دارد. ترکیبات فنولی به دلیل دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل در محیط واکنش و احتمال اهداء آن‌ها به رادیکال‌های آزاد موجب افزایش قدرت مهارکنندگی فنول را افزایش می‌دهد. بررسی‌ها نشان داد که میزان فنول‌های کل می‌تواند به‌عنوان شاخصی سودمند برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفته شود (Teow et al., 2007). هم‌چنین افزایش فعالیت کاتالاز نشان‌دهنده مهار کارآمد پراکسید هیدروژن است (Afshar Mohammadian et al., 2016). رابطه مستقیم فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان ترکیبات فنولی در مطالعات متعددی ازجمله کمالی و همکاران (Kamali et al., 2015) در گیاه (Deracocephalum) و جرجانی و همکاران (Jorjani et al., 2016) در گیاه مامیران (*Chelidonium majus* L.) گزارش شده است.

از بین QTLهای شناسایی‌شده qSUG-4 (قند روی کروموزوم ۴) با ضریب تبیین ۲۰/۲ و QTL-های qPHE-1 qPHE-2 (محتوای فنول روی کروموزوم‌های ۱ و ۲) به ترتیب با ضریب تبیین ۲۱/۳، ۲۹/۱ و qPER-1، qPER-4b، qPER-5، qPER-7 (پروکسیداز روی کروموزوم‌های ۱، ۴، ۵ و ۷) پس از تائید اعتبار و درصد توجیه زیاد، جهت برنامه-های اصلاحی انتخاب با استفاده از نشانگر در جمعیت لاین‌های نوترکیب جو، مناسب خواهند بود.

منابع

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods Enzymology. 105, 121–126.

Ali, R.M., Abbas, H.M., 2003. Response of salt stressed barley seedlings to phenylurea. Plant, Soil and Environment. 49, 158–162.

Ahmadi, K., Ebadzadeh, H. R., Hatami, F., Abdshah, H., Kazemian, A. 2019. Agriculture statistics. Ministry of Jihad Agriculture, Deputy of Planning and Economy, Information and Communication Technology Center. 251 pp.

Arif, M., 2002. Molecular mapping of genes QTLs affecting resistance to Xanthomonas Oryzae pv. Oryzae and grain quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). PhD thesis. University of Philippines in Los Banos. Philippines.

Barati, M., Amiri, R., Ebrahimi, M., Naghavi, M., Nikkhah, H., Soltanloo, H., Yousefi Rad S., Ramadanpour, Q., 2013. QTL mapping for yield and yield components in Hordeum vulgare. Modern Genetics. 8, 321-328. [In Persian with English Summary].

FAO. 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of Food and Agriculture. BIOFUELS: prospects, risks and opportunities. Rome. http://www.fao.org/3/i0100e/i0100e00.htm.

Hemeda, H.M., Kelin, B.P., 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts. Journal of Food Science. 55, 184-185

Jafari, H., Ansari, M.N., Ebrahimi, M.A., Taheri, M., Dorostkar, A., 2013. Analysis of quantitative loci involved in production of enzymes conferring salt tolerance in barely (*Hordeum vulgare* L.). Crop Biotechnology Journal. 5, 117-127. [In Persian with English Summary].

Jorjani, A., Niakan, M., Gholamalipour Alamdari, E., 2016. Evaluation of antioxidant activity, secondary metabolites and osmolytes of aerial parts and root organs of Chelidonium majus L. in various phonological stages. Journal of Plant Environmental Physiology. 13, 51-66. [In Persian with English Summary].

Kala, S., 2015. Effect of NaCl salt stress on antioxidant enzymes of isabgol (*Plantago ovata* forsk.) genotypes. International Journal of Scientific and Technology Research. 4, 2277-8616.

Kamali, M., Khosroyar, S., Jalilvand, M., 2015. Evaluation of phenols, flavonoids, thocyanins and antioxidant capacity of different extracts of the aerial parts of medicinal plant Dracocephalum kotschyi. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. 6, 627-634. [In Persian with English Summary].

Kaviani Charati, A., Sabouri, H., Fallahi H.A., Jorjani E., 2016. QTL Mapping of Spike Characteristics in Barley using F3 and F4 Families Derived from Badia × Komino Cross. Plant Genetic Journal. 3, 13-28. [In Persian with English Summary].

Khalili, M., Mohammadian, R., 2015. Identifying QTL associated with salinity tolerance in early stages of barley germination. Journal of Crop Biotechnology. 5 (13), 41-55. [In Persian with English Summary].

Kochert, G., 1978. Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method. In: Helebust, J.A., Craigie J.S. (eds.), Hand book of Physiological Methods. Cambridge University. Press, Cambridge. pp: 96-97.

Koyama, M.L., Levesley, A., Koebner, R.M.D., Flowers T.J., Yeo. A.R., 2001. Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. Plant Physiology. 125, 406-422.

Malick, C.P., Singh, M.B., 1980. In Plant Enzymology and Histo Enzymologhy, Kalyani Publishers, New Dehli.

Manly, K.F., Olson, J.M., 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to map manager QTL. Mammalian Genome, 10, 327-334.

Mohammadian, M.A., Ghanati, F., Ahmadyani, S., Zamani, K.S., 2016. Effect of drought stress on activity antioxidant enzymes and content of soluble sugar in *Mentha pulegium* L. Nova Biologica Reperta. 3, 228-237.

Parida, A.K., Das, A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plant a review. Ecotoxicology and Environmental Safety. 60, 324-349.

Ramakrishna, A., Ravishankar G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Journal of Plant Signaling and Behavior. 6, 1720-1731.

Sairam, p. K., And Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. A review. Current Science. 68, 407-421.

Shahinia, F., Rezai, A., Tabatabai, B., Mohammadi, S., 2014. QTL Mapping of Yield and Yield Components in Barley Lines. Journal of Seed and Plant Improvement. 1-30, 85-101. [In Persian with English Summary].

Teow, C.C., Troung, V.D., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Pecota, K.V., Yencho, G.C., 2007. Antioxidant activities, phenolic and β-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colors. Food Chemistry Journal. 103, 829-838.

Walpola, B.C., Arunakumara, K.K., 2017. Effect of salt stress on decomposition of organic matter and nitrogen mineralization in animal manure amended soils. Journal of Agricultural Science. 5, 9-18.

Wang, Y.X., Zhang, B., 2009. Effects of salt stress in enzyme activity and soluble sugar content of alfalfa. Chinese Journal of Xinjiang Agricultural sciences. 45, 589-591.

Zebarjadi, A.R., Mirany, T., Kahrizi, D., Ghobadi, M., Nikoseresht, N., 2012.

Assessment of drought tolerance in some bread wheat genotypes using drought resistance indices. Biharean Biologist. 6, 94-98

Zhu, J.K., 2001. Plant salt tolerance. Trends in Plant Science. 6, 66-77.