مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۱، سال ۱۳۸۰ (۱۷۷-۱۵۷)

تجزیه QTL صفات مقاومت به سرما و تاریخ خوشه دهی در گندم، با استفاده از هاپلوئیدهای دوبل شده

حسین دشتی[۱]، بهمن یزدی صمدی[۲]، سیروس عبدمیشانی[۳]، محمدرضا قنادها[۴]
۱، ۲، ۳، ۴ - دانشجوی دوره دکتری، استادان و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات
دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۲/۲۸

خلاصه

برای افزایش پاسخ به گزینش، در اصلاح صفات کمی، یکی از راههائی که امروزه پیشنهاد شده است، تئوری انتخاب بر اساس نشانگرهاست، که این امر مستلزم اثبات رابطه بین نشانگرها (مارکرها) و صفات کمی و به نقشه در آوردن این صفات می باشد. به منظور به نقشه در آوردن صفات مقاومت به سرما و تاریخ خوشه دهی در گندم، ۹۵ هاپلوئید دوبل شده، حاصل از تلاقی دو رقم چاینیز اسپرینگ و SQ_1 با استفاده از ۳۴۵ نشانگر ملکولی و نقشه لینکاژی نیمه اشباع مورد تجزیه QTL قرار گرفت. در یک آزمایش این جمعیت در یک طرح کاملا تصادفی، با سه تکرار در گلخانه کشت و تاریخ خوشه دهی گیاهان یادداشت گردید. در آزمایش دیگری گیاهان در گلدانهای کوچک در چهار تکرار و در هر گلدان ۱۰ بذر کشت و ۷ روز پس از سبز شدن به سردخانه منتقل شد و تحت دمای ۴-۳ درجه سانتی گراد به مدت ۵ هفته قرار گرفت تا عمل سازگاری به سرما در آنها انجام شود. و سپس برای اندازه گیری صفات LT50 و پایداری غشای گیاهان، به اتاقک رشد منتقل و بقای هر ژنوتیپ در دماهای ۶-، ۸-، ۱۱- و ۱۳- درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. پایداری غشای در سه تکرار فقط در دمای $11^{\circ}c$- در طرح آماری بلوک های کامل تصادفی تعیین شد. نتایج نشان داد که چاینیز سپرنیگ‌دیررس تر و SQ_1 از نظر مقاومت به سرما نسبت به چاینیز سپرنیگ مقاومتر بود. تجزیه QTL نشان داد، که تاریخ خوشه دهی دارای یک QTL با اثر زیاد روی کروموزم 5A و یک QTL با اثر کمتر روی کروموزم 5B است که مجموعاً ۵۲٪ از کل واریانس فنوتیپی موجود در جمعیت را توجیه می کنند. یک QTL نیز برای صفات مقاومت به سرما (LT50 و پایداری غشا) روی کروموزم 7A تشخیص داده شد. که ۲۲٪ از واریانس فنوتیپی پایداری غشا و ۱۲٪ از واریانس فنوتیپی LT50 را توجیه کرد.

واژه های کلیدی: تجزیه QTL، مقاومت به سرما، تاریخ خوشه دهی، هاپلوئید دوبل شده، گندم نان

مکاتبه کننده: بهمن یزدی صمدی

مقدمه

تنش های محیطی همیشه عامل کاهش کمیت و کیفیت محصولات زراعی بوده‌اند. مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی ، صفتی است پیچیده و تعداد زیادی ژن درکنترل آن دخالت دارند. با مواجه شدن گیاه با این تنش ها، تغییرات فیزیولوژیکی ،بیوشیمیایی و مورفولوژیکی زیاری در جهت تحمل گیاه و سازگار شدن آن به تنش حاصل می‌شود ، و این تغییرات درگونه های مختلف گیاهی و حتی واریته های مختلف یک گونه و بسته به نوع تنش و همچنین اشکال مختلف یک تنش ، متفاوت است. و متقابلاً راهکارهای متفاوتی در ژنوتیپ های یک گونه برای تحمل و سازگاری گیاه به تنش موجود است . (۲۴،۲۵ و ۲۷). درجه حرارت پایین (سرما)، یکی از تنش هایی است که رشد و تولید غلات را محدود می کند ، در این گیاهان یکی از راهکارهای سازگاری به سرما در انواع زمستانه غلات که با درجه حرارت کنترل می شود، عکس العمل به ورنالیزاسیون است و این مکانیزم مهمترین عامل بقا در زمستان است . گندمهای زمستانه برای خوشه دهی نیاز به گذراندن یک دوره سرما دارند، و از طرفی برای رفع این نیاز باید قادر به تحمل سرما باشند (۹ و ۱۰). آزمایشهای انجام شده نشان می دهد که ارقام بهاره و زمستانه گندم از این نظر کاملاً متفاوت بوده و در داخل ارقام زمستانه نیز تفاوت در نیاز به ورنالیزاسیون (مدت زمان لازم قرارگرفتن در دمای پایین معمولاً $4^{\circ}c$ جهت رفع نیاز سرمایی)، مشهود است و گندمهای بهاره فاقد این نیاز بوده و یا نیازمندی آنها بسیار کم است . نتایج نشان می دهد . که هر چه گیاه به درجه اشباع ورنالیزاسیون نزدیک تر می شود،مقاومت آن به سرما بیشتر شده وLT50 (معیار اندازه گیری مقاومت در مقابل یخ زدگی است، و عبارت است از: درجه حرارتی که ۵۰ ٪ گیاهان تحت آزمایش در اثر سرما از بین می روند)افزایش می یابد، وقتی عمل ورنالیزاسیون کامل شد بعد از آن مقاومت به سرما به تدریج کاهش می یابد ، و یک همبستگی قوی بین زمان رسیدن به نقطه اشباع ورنالیزاسیون و شروع کاهش مقاومت به سرما مشاهده شده است، آزمایشها نشان می دهد که گندمهای بهاره سریعتر به نقطه اشباع ورنالیزاسیون رسیده اند، و حداکثرLT50 آنها $-8^{\circ}c$ بوده ولی گندمهای زمستانه خیلی دیرتر از انواع بهاره به نقطه اشباع ورنالیزاسیون رسیده ولی این ارقام از نظر مقاومت به سرما کاملاً متفاوت بوده اند.بطوریکهLT50 آنها از $-12^{\circ}c$ تا $-20^{\circ}c$ بوده است . و مقاومت به سرمای این ارقام بعد از ۴۹ روز ورنالیزاسیون در دمای $4^{\circ}c$ به تدریج کاهش یافته بطوریکه بعد از۹۸ روز ورنالیزه کردنLT50 بطور متوسط به $-15^{\circ}c$ رسیده است . بر اساس نتایج این آزمایش و سایر آزمایشها ، زمان اشباع ورنالیزاسیون ، زمانی است که LT50 مینیمم می‌شود (منفی ترین درجه) (۹ و ۱۰). فرضیه ژنتیکی که برای توجیه این رابطه ارائه شده می گوید بقای ژنهای مقاومت به درجات حرارت پایین بستگی به مرحله ورنالیزاسیون دارد. وقتی که ورنالیزاسیون کامل شد. بیان ژنهای مقاومت به سرما کاهش یافته و بتدریج خاموش می‌شوند . بطور کلی چنین اظهارنظر شده است که تحمل درجه حرارت پایین تابعی از میزان و مدت بیان ژنهای مسئول تحمل درجه حرارت پایین می باشد. در تائید این فرضیه آزمایشی در سطح ملکولی انجام شده است که از نظر ملکولی رابطه بین بیان ژنهای خا ص مقاومت به سرما و ورنالیزاسیون ثابت شده است (۹). چندین ژن در ارقا د مختلف شناسائی شده که عکس العمل به ورنالیزاسیون را کنترل می‌کنند . و واریته های گندم را در دو گروه زمستانه و بهاره قرار می دهند . ژنهای اصلی که در این رابطه شناخته شده اند ، vrn_1، vrn_2، vrn_3، vrn_4 و vrn_5، روی کروموزمهای 5A، 2B، 5D، 5B و 7B قرار دارند(۲۶) .

اخیراً ژنهای vrn_6 روی ۳B و vrn_7 روی ۴A نیز شناسایی شده اند و از بین ژنهای vrn، vrn_1 قویترین ژن در کاهش نیاز ورنالیزاسیونی است (۴). ژنهای ورنالیزاسیون علاوه بر کنترل عکس العمل به ورنالیزاسیون روی تاریخ خوشه دهی نیز مؤثرند. تحمل یخ در گندم یک صفت کمی پیچیده است که بستگی به ژنوتیپ گیاه و محیط دارد. ارقام زمستانه که نیازمند به ورنالیزاسیون هستند ، درجات حرارت زیر صفر را تحمل می کنند و این مسئله را به چند اثری بودن ژنهای vrn نسبت می داده اند ، ولی آزمایشات نشان داده که مثلا در مورد ژن vrn_1 این نظریه قابل رد است. چون رقم چاینیز سپرینگ و رقم شاین هر دو دارای vrn_1 روی ۵A می باشند ، ولی چاینیز سپرینگ رقمی است حساس و شاین بسیار مقاوم به یخ زدگی ، و علاوه بر این در تلاقیهای دی آلل که بین ارقام بهاره و زمستانه صورت گرفته است میانگین LT50 برای F_1 و جمعیتهای F_2 (F_3 های حاصل از F_2) نشان داده است که داشتن مقاومت به سرمای قابل توجه لزوماً ناشی از رفتار زمستانه داشتن (نیاز به ورنالیزاسیون) نیست و توزیع F_3 ها بر اساس LT50 نشان داده که لاینهای حاصل از گیاهانی که بهاره بوده اند در تمام کلاسهای مقاوم حضور داشته اند،و لاینهای با رفتار زمستانه به سمت انتهای مقاوم توزیع گرایش داشته اند (۱). ژنهایی که مقاومت به سرما را کنترل می کنند در گندم روی کروموزمهای گروه ۵ و کروموزمهای ۴B و۴D و۷A گزارش شده اند که از طریق مطالعه منوزمیک ها و لاین های جایگزین شده ثابت شده است . (۶، ۲۰ و۲۸). با استفاده از تلاقیهایی بین رگه های جایگزین و تولید رگه های نوترکیب برای یک کروموزم و با استفاده از مارکرهای AFLP, RFLP ژن های مقاومت به یخ زدگی (F_1)و(Fr_2)را به ترتیب روی کروموزم های ۵A و ۵D شاین به نقشه در آورده‌اند به نقل از چون و همکاران (۳) فاصله بین ژن vrn و Fr_1 روی کروموزم 5A شاین از طریق آنالیز QTL ۲/۱ سانتی مورگان بر آورد شد (۱۲) و این موضوع مسئله چند اثری بودن ژن vrn_1 را که موجب مقاومت به سرما می شود را رد می کند. و مقاومت به سرما روی کروموزم ۵A دارای ژنی است که پیوستگی شدیدی با vrn_1 دارد. بنابر همین گزارش در این تلاقی لاینهائی تولید شدند که فاقد ژن Vrn_1 (عدم نیاز به ورنالیزاسیون و دارای رفتار بهاره) ولی مقاوم به سرما بودند. پس عدم نیاز به ورنالیزاسیون و بهاره بودن لزوماً به معنای حساسیت به سرما نخواهد بود . کشف این واقعیت علمی دست آورد تکنولوژی تولید مارکرهای ملکولی مبتنی بر پلی مورفیسم ملکولی خصوصاً DNA است که تا قبل از آن بخش زیادی از توالی های کد کننده ماده ژنتیک در طول کروموزم ناشناخته بود . تکنیک های انیو پلوئیدی شامل تجزیه های منوزومیک و رگه های جایگزین قطعاً تحول بزرگی را در شناسایی کروموزمهای مؤثر در صفات کمی اقتصادی مثل مقاومت به تنشهای محیطی بوجود آورد (۲۰). و گاهاً جای این ژنها را روی کروموزمهای مربوطه از طریق تلاقی تعیین کردند. ولی همانطور که می دانیم این مسئله مستلزم این بود که ژنهای با اثر بزرگ (مارکرهای مرفولوژیکی). به اندازه کافی روی کروموزمهای مورد نظر وجود داشته باشند ، شبیه آنچه که لاو (۱۰) و اسنپ و همکاران (۲۶) به ترتیب برای تعیین محل ژنهای کنترل کننده وزن هزار دانه بر روی کروموزم ۷B، وزن دانه و تاریخ خوشه دهی و ارتفاع روی ۵A انجام دادند. موضوع تجزیه QTL در دهه گذشته بخاطر در دسترس قرار گرفتن ، نشانگرهای زیاد ملکولی از جمله SSR,RAPD, AFLP,RLFP و ایزوزایم تحرک و حیات مجددی به خود گرفت . چون قبلاً فقط نشانگرهای مورد استفاده ژنهای مرفولوژیکی و کیفی بودند. ولی نشانگرهای مرفولوژیکی دارای معایب خاص خود می باشند که مهمترین آنها ،محدود بودن آنها بود و عامل دیگر مؤثر در

این تحرک کامپیوتر ها و نرم افزارهای پیشرفته در محاسبات ریاضی و آماری و همچنین اهمیت اقتصادی صفات کمی در گیاهان و حیوانات است . (۱۴ و۲۲). شناسایی ژنهای مفید در ژرم پلاسم گیاهی یکی از اصول مهم راهبردی اصلاح نباتات است . و مارکرهای ملکولی نقش زیادی در تشخیص ژنهای مفیدی چون مقاومت به آفات و امراض و نشانه دار کردن آنها داشته و دارند ، مقوله اصلاح برای صفات کمی و انتخاب بر اساس ژنوتیپ در این صفات و افزایش پاسخ به انتخاب ، مشکلی است که در طول تاریخ اصلاح نباتات ، ذهن محققین این رشته را به خود مشغول داشته است و تحقیقات گسترده در زمینه تجزیه QTL و رفع مشکلات تکنیکهای تولید نشانگرهای ملکولی موجود و ابداع انواع جدید آنها ، و همچنین رفع ایرادات و معایبی که تجزیه های آماری گریبان گیر آنهاست ،تلاشی است در جهت رسیدن به هدف فوق . وقتی که مارکرهای ژنتیکی یک QTL هدف را بصورت مجاوری در بر بگیرند انتخاب بر اساس ژنوتیپ خواهد بود . نه بر اساس فنوتیپ و عکس العمل به سلکسیون ماکزیمم می شود (۵). مقاومت به سرما صفتی کمی و پیچیده و دارای ژنهای متعددی در طول ژنوم و کروموزمهای مختلف واریته های مختلف گندم است . و از طرفی بخاطر پاسخ ضعیف این صفت به انتخاب، به نقشه در آوردن این صفت کمی منطقی و ضروری به نظر می رسد (۱۳). اما قبل از هر چیز باید رابطه قوی بین این صفت و مارکرهای ملکولی موجود اثبات شود . موفقیت در تجزیه QTL نیازمند نیازهایی است که بطور خلاصه عبارتند از :

۱ - جمعیت در حال تفرق از نظر صفت کمی مورد نظر و مارکرهای ژنتیکی ۲ - نقشه لینکاژی بر اساس نو ترکیبی بین مارکرهای ژنتیکی تشکیل دهنده آن ۳ - صفت کمی قابل اندازه گیری روی تک تک افراد جمعیت تحت مطالعه باشد .جمعیتهای F_2,BC, هاپلوئیدهای دوبل شده DH، و اینبرد لاین های نوترکیب RILS، قابل استفاده در تجزیه QTL می باشند ، ولی در عمل این جمعیتها همه دارای ارزش یکسان نیستند. DH ها و RIL ها جمعیتهای پایدار و ماندنی هستند . این جمعیتها و همچنین BILS (اینبرد لاین‌هایی که حاصل از تلاقی برگشتی F_1 با یک والد و بعد SSD اعمال شده)را می توان در هر زمان و مکانی بدون تغییر ژنوتیپ رویاند و نقشه ملکولی آنها را کامل کرده و صفات کمی جدید را اندازه گرفت و آثار متقابل ژنوتیپ و محیط را مطالعه نمود. DH ها سریعاً قابل تولیداند ، اما در جریان تولید این DH ها تغییرات در محیط کشت (invitro) محتمل و معمول است . RIL ها احتمالاً معمولترین و قابل اعتماد ترین مواد می باشند . اما برای تولید زمان زیادی نیاز دارند . در هر صورت نه DH ها و نه RIL ها آثار غالبیت را نمی توانند بر آورد کنند . F_2 و BC ها که سریعاً بدست می‌آیند . آثار غالبیت را بر آورد می کنند . اما عیب آنها این است که ژنوتیپ ها تکرار ندارند. (مگر از طریق رویشی تکثیر شوند) که این ضعف را می توان با خود گشن کردن آنها (تولید F_2) رفع نمود (۱۳،۱۸ و۱۹).برای تشخیص ارتباط بین صفت کمی و مکان مارکری ، مقایسه میانگین فنوتیپی ،کلاسهای ژنوتیپی یک مارکر انجام می گیرد ، این کار از طریق آزمون T برای دو کلاس ژنوتیپی در تلاقیهای برگشتی و یا جمعیتهای DH و RILS و دو ژنوتیپ هموزیگوس در F_2 و یا بطور کلی در همه موارد از تجزیه واریانس یک طرفه استفاده می شود .که این روش تشخیص لینکاژ را مدل تک مارکری گویند (۸، ۱۷ و۱۹). از آنجایی که تعداد زیادی مارکر در طول ژنوم وجود دارد . لذا تعداد زیادی آزمون باید انجام شود ، و میزان اشتباه نوع I در هر آزمون α می باشد بنابراین اشتباه نوع I افزایش می یابد و ثابت نیست لذا یکی از مشکلات در روش تشخیص تک مارکری ، تعیین سطح معنی دار است . برای ثابت ماندن

میزان α راهی را که پیشنهاد کرده اند ، کاهش αاست . مثلاً اگر در یک گروه لینکاژی تعداد ۵۰ مارکر داشته باشیم و α =۰/۰۵ باشد . باید سطح معنی دار بودن در هر آزمون را (۰/۰۵/۵۰=۰/۰۰۱) در نظر گرفت که این مسئله از طرفی باعث افزایش اشتباه نوع IIخواهد شد (۱۱ و۱۹). ایراد دیگری که بر مدل تک مارکری[1] وارد شده است ، عدم برآورد مقدار واقعی اثر QTL است. نو ترکیبی بین مارکر و QTL(اگر QTL کاملاً روی مکان مارکری نباشد)، باعث اختلاط اثر QTL و فاصله مارکر و QTL می شود . چون در این صورت نمی توان مشخص کرد که این اثریک QTL ضعیف است که دقیقاً روی مکان مارکری است و یا یک QTL قوی است که با مارکر فاصله دارد(۱). ولی اگر نقشه لینکاژی اشباع باشد ،می تواند تا حدودی این عیب را برطرف سازد، تعداد مارکر لازم برای پوشش دادن یک ژنوم بستگی به طول ژنوم دارد مثلاً داشتن ۱۵۰-۱۰۰ مارکر که با فاصله مناسب توزیع شده باشند ، در گندم که دارای طول ژنوم ۳۵۰۰ سانتی مورگان است، فاصله بین مارکرها ۳۰-۲۵ سانتی مورگان خواهد بود.

برای تشخیص QTL،افزایش در تعداد مارکر ضرورتاً قدرت آزمون ها را بالا نمی برد ، بطوریکه داروای و همکاران، تراکم مارکری با فاصله ۲۰ سانتی مورگان را کافی، و افزایش تعداد نمونه (نتاج)مورد بررسی را مؤثرتر می دانند (۶).

روش دیگر تشخیص QTL که با تعیین محل QTLنیز توام است ، استفاده از مدلهای چند مارکری است،که به آن اینتروال مپینگ[2] (نقشه یابی درون فاصله ای) گویند .

در روش درون فاصله ای زمانی که نقشه لینکاژی معین شده باشد کروموزم در فاصله بین هر دو مارکر متوالی بطور جداگانه مورد کنکاش قرار می گیرد ، و از طریق حداکثر درستنمایی[3] QTL و محل آن در صورت وجود تشخیص داده می شود و نرم افزار Mapmakrr/QTL که بوسیله لاندرو بوتستین ارائه شده است (۱۷) بر این اساس عمل می نماید و بیشترین احتمال وجود اثر فنوتیپی یک QTL روی صفت در هر چند سانتی مورگان بین دو مارکر محاسبه شده ، و شاخصی بنامLOD[4] محاسبه می شود و در آن فاصله هایی که این شاخص از یک حد آستانه تعیین شده تجاوز نماید، دلیل بر وجود QTLدر آن منطقه است ، و نقطه ماکزیمم LODمحتمل ترین و یا صحیح ترین محل QTL را روی نقشه نشان می دهد . در این جا نیز مشکل تعیین حد آستانه معنی دار وجود دارد، آستانه مناسب بستگی دارد به اندازه ژنوم و درجه اشباع مارکرهای ژنوتیپ شده. لاندر و بوتستین تعیین ارزش آستانه LODرا برای یک کروموزم شناخته شده و طول ژنتیکی معین را شرح داده‌اند(۱۷) . این افراد آستانه معمول LODرا بین ۲ و ۳ جهت اطمینان ثابت ماندن اشتباه نوع I در سطح ۰/۰۵ برای تشخیص QTL پیشنهاد کرده اند. دقت دو روش چند مارکری و مدل تک مارکری ، وقتی که مارکرها نزدیک باشند مشابه است . اما روشهای چند مارکری وقتی که فاصله مارکری زیاد می شود سودمندی بیشتری دارند (۶). هر کدام از روشها دارای مزایا و معایبی می باشند. در هر صورت دقت محل QTL بستگی به اندازه اثر QTL ، اندازه نمونه ، و میزان اشباع بودن نقشه و توزیع مناسب مارکرها در طول ژنوم دارد. ادوارد و همکاران ، مارکرهای ایزوزایمی مؤثر در تغییرات صفات کمی ذرت را در جمعیت F_2 از طریق مقایسه میانگین کلاسهای ژنوتیپی هر مارکر برای ۲۰

1. Single marker analysis
2. Interval mapping
3. Maximum Likelihood
4. Log of odds

لوکوس متفرق شونده مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که لوکوس های مارکری می توانند رفتار ژنتیکی صفات کمی همبسته با مارکرها را بیان نمایند(۸).

ولر و همکاران ، با استفاده از جمعیت F_2 حاصل از تلاقی دو گونه گوجه فرنگی ، رابطه بین ۱۸ صفت کمی را با ۱۰ مکان مارکری ایزوزایمی که در والدین پلی مورفیسم نشان دادند مورد بررسی قرار داده و از طریق آزمون T رابطه بین بعضی از صفات کمی را با مارکرهای ملکولی مشخص کردند(۳۰).

یانو همکاران ، با استفاده از جمعیت F_2 حاصل از تلاقی دو واریته برنج و ۱۳۸۳ مارکر DNA ، یک نقشه اشباع با فاصله ۲ سانتی مورگان تهیه کردند و QTL های مؤثر در تاریخ ظهور خوشه را با استفاده از Mapmaker/QTL در طول ژنوم مورد بررسی قرار دادند و ۵ QTL را روی کروموزمهای ۶، ۷ و ۸ تشخیص دادند(۳۲).

کوآری و همکاران، برای بررسی QTL های مؤثر در تجمع اسید آبسسیک (ABA) در برگ برنج و تاثیر آن روی مقاومت به خشکی و همچنین رابطه بین میزان اسید آبسسیک و اندازه برگ نقشه ژنتیکی را بر اساس مارکرهای AFLP و RFLP با استفاده از جمعیت F_2 حاصل از تلاقی دو واریته برنج که تفاوت زیادی در میزان تجمع ABA ، در شرایط تنش خشکی داشتند ، تهیه نمودند و برای تجزیه QTL، ابتدا تجزیه واریانس یک طرفه برای کلیه مارکر ها جهت تشخیص حضور QTL را محاسبه نمودند، و سپس برای تصحیح و تشخیص دقیق تر QTL های احتمالی و محاسبه اندازه اثر آنها ، تجزیه QTL را از طریق رگرسیون چند گانه دنبال نمودند ، تا از این طریق بتوانند به وجود QTL های احتمالی دیگری در جاهای دیگر ژنوم پی ببرند(۲۳). کوآری و همکاران ، ۴۸ هاپلوئید دوبل شده حاصل از تلاقی دو رقم گندم ، چاینیز سپرینگ و یک لاین بهاره(SQ_1) را که از نظر میزان ABA تولید شده در شرایط خشکی متفاوت بودند ، از طریق مقایسه میانگین کلاسهای ژنوتیپی مارکرهای موجود روی بازوی بلند کروموزم 5A مورد تجزیه QTLقرار دارند ، و آثار آللهای SQ_1 را که باعث افزایش ABA می شد ، محاسبه نمودند و سپس با استفاده ازMapmaker/ QTL محتمل ترین مکان QTL موثر در ABA را بین دو مارکر Psr575;RFLP و Psr426 تعیین کردند (۲۴).

هیز و همکاران، QTL های کنترل کننده مقاومت به سرما در جو را با مطالعه صفات بقا در مزرعه ، LT50 ، رفتار رشدی و محتوای فروکتان طوقه ، در یک جمعیت ۱۰۰تایی هاپلوئید های دوبل حاصل از F_1 روی کروموزوم ۷ به نقشه در آوردند . و نتیجه گرفتند که بیشترین اثر این صفات در یک فاصله ۰/۰۲۱ نو ترکیبی روی بازوی بلند کروموزم ۷ قرار دارد(۱۳).

مواد و روش ها

مواد گیاهی ۹۶ هاپلوئید دوبل شده حاصل از تلاقی بین دو رقم بهاره چاینیز سپرینگ (CS) و SQ_1 که از روش تلاقی F_1 با ذرت تولید و از مؤسسه جان اینز انگلستان در یافت شده اند . این جمعیت هاپلوئید دوبل همراه با والدین در سال ۱۳۷۷ در گلخانه ، هر کدام در سه گلدان ، و در هر گلدان ۵ بوته کشت گردیدند ،و در ضمن تاریخ خوشه دهی ۳ بوته در هر گلدان برای هر ژنوتیپ یادداشت شد ، و مشاهدات در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شدند. بذرهای تکثیر شده در آزمایش مقاومت به سرما مورد استفاده قرار گرفتند .

جهت بررسی مقاومت به سرما از هر ژنوبیپ ۴ گلدان کوچک ، در هر گلدان ۱۰ گیاه کشت گردید ، والدین هر کدام در ۵ گلدان کشت شدند . ۷ روز پس از سبز شدن ،

جهت ورنالیزاسیون و سازگار شدن به سرما در سردخانه در دمای ۴-۳ درجه سانتی گراد و فتوپرید ۱۶ ساعت برای مدت ۵ هفته قرار داده شدند ، و سپس برای آزمایش مقاومت به یخ زدگی به اتاقک رشد (Convivon). منتقل شدند . به مدت ۲ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۴ قرار داده شدند و سپس دمای دستگاه به $^{\circ}C$ ۱ سانتی گراد با سرعت ساعت /$^{\circ}C$ ۲ کاهش داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در این دما نگهداری شدند . سپس دما با سرعت ساعت /$^{\circ}C$ ۲ کاهش داده شد و در نقطه های دمائی ($^{\circ}c$ ۶-، $^{\circ}c$ ۸- $^{\circ}c$ ۱۱- و $^{\circ}c$ ۱۳-)از هر ژنوتیپ یک گلدان خارج گردید، در دمای $^{\circ}c$ ۱۱- از والدین ۲ گلدان خارج شد . گلدانهای خارج شده در هر نقطه دمائی به دمای صفر درجه منتقل شدند و پس از ۱۲ ساعت به دمای $^{\circ}c$ ۴ و سپس از ۱۰ ساعت در گلخانه در دمای ۲۵-۲۰ درجه قرار داده شدند و با محلول هوگلند آبیاری شدند . و پس از ۱۰ روز گیاهان باقی مانده در هر گلدان ، برای هر ژنوبیپ در چهار نقطه دمایی شمارش شد . و از طریق تجزیه پروبیت نقطه LT50 برای هر ژنوتیپ محاسبه شد . اندازه گیری پایداری غشا (الکترولیت لیکیج) . فقط در دمای ۱۱- انجام گرفت . بدین ترتیب که از هر ژنوتیپ ۳ بوته در گلدان انتخاب شد . و برگ اول و دوم و سوم هر گیاه به قطعات ۱ سانتی متری خورد شدند و بطور جداگانه در ۳ ظرف حاوی ۲۰ سانتی متر مکعب آب مقطر قرار داده شدند ، یعنی برای هر ژنوتیپ ۳ تکرار جهت اندازه گیری پایداری غشا در نظر گرفته شد ، و آزمایش در طرح آماری بلوک کامل تصادفی ، (شماره برگ بعنوان بلوک) اجرا گردید. و هدایت الکتریکی محلول پس از ۱۵ ساعت در دمای $^{\circ}c$ ۲۵ قرائت گردید (Eco) . و بعد ظرفهابه مدت ۳۰ دقیقه در دمای $^{\circ}c$ ۹۰ قرار داده شدند ، و پس از سرد شدن قرائت نهائی در دمای $^{\circ}c$ ۲۵ انجام شد (Ectotal) و میزان خسارت غشا با استفاده از فرمول elec=Eco/Ectotal برتین و همکاران (۲)، برای هر تکرار محاسبه و سپس تجزیه واریانس انجام شد.

مارکرهای ملکولی و نقشه های کروموزومی :

تعداد ۳۳۸ مارکر ملکولی شامل SSR, AFLP, RFLPو بیوشیمیایی ، همراه با گروه های لینکاژی تهیه شده در مؤسسه جان اینز انگلستان در اختیا بود همچنین جهت افزایش تعداد مارکرها والدین توسط ۶۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی ، ۵۴ آغازگر UB، و ۶ آغازگر OP مورد تجزیه RAPD قرار گرفتند ، که از بین آنها ۵ آغازگر در مجموع ۷ نوار پلی مورفیک تولید کردند ، که جمعیت برای این ۷ نوار تعیین ژنوتیپ شد.

تجزیه RAPD: استخراج DNA از ۹۵ لاین هاپلوئید دوبل باضافه والدین بروش مینی پرپ (تغییر یافته دلاپورتا) انجام گرفت . پس از استخراج DNA از طریق فتومتری مورد سنجش کمی و کیفی قرار گرفت . و نمونه های با غلظت ۵ng/ul تهیه شد . مواد مورد استفاده در این بررسی از شرکت بورینگر بوده و هر نمونه تهیه شده جهت واکنش PCR با حجم ۲۵ μl شامل : ۱ μl از محلول آغازگر با غلظت (۱۰μM)، ۴ μl از محلول dNTP با غلظت (۱/۲۵mm) ۰/۲μl= ۱u، آنزیم Taq پلی مراز با غلظت (۵ u/μl) ۲/۵μl از بافر(Mg+ ۱۰X)، ۵μl از DNA با غلظت (۵ng/μl برابر با ۲۵ng DNAالگو) و ۱۲/۳μl آب دو بار مقطر. عمل تکثیر (آمپلی فای) توسط دستگاه ترموسایکلر از شرکت فارماسیا، با دوره‌های حرارتی ۲ دقیقه در $^{\circ}c$ ۹۴ ، و ۴۵ سیکل شامل ۱ دقیقه در $^{\circ}c$ ۹۲ ، ۱ دقیقه در $^{\circ}c$ ۳۵ و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراداعمال شد .

الکتروفورز: تفکیک نوارهای تکثیر شده روی ژل آکریلامید ۶٪ با ولتاژ ثابت ۲۰۰V و به مدت ۲/۵ ساعت انجام شد. و رنگ آمیزی با محلول ETBr و تحت نورUV عکس برداری انجام گرفت و اندازه نوارهای پلی مورف از طریق

تجزیه های آماری شامل تجزیه واریانس برای صفات تاریخ خوشه دهی و پایداری غشا و تجزیه پروبیت برای تعیین LT50 ، تعیین همبستگی (r) بین صفات و توزیع فراوانی صفات . در این تحقیق علاوه بر Mapmaker، از نرم افزارهای SPSS, MSTATC و EXCEL استفاده شده است .

تجزیه لینکاژ : برای اضافه کردن ۷ مارکر بدست آمده از تجزیه RAPDبه نقشه های لینکاژی موجود ، از MAPMAKEER/EXP لاندر و بوبستین (۱۷) استفاده شد . چون جمعیت هاپلوئید دوبل برای این نرم افزار معرفی نشده است ، لذا از روش (F_7 -Bakcross) و دستور Try برای وارد کردن مارکرهای RAPD بداخل گروههای لینکاژی استفاده شد، که یکی از مارکرهای RAPD ،(UB103-۲۸۰A) در گروه لینکاژی 5A قرار گرفت و بقیه بصورت مجزا باقی ماندند موقعیت مارکر مذکور در گروه 5A تعیین شد.

تجزیه QTL: برای این منظور ابتدا آزمون نرمال بودن سه صفت تاریخ خوشه دهی، LT50، پایداری غشا انجام گرفت و سپس برای تشخیص ابتدایی QTL کنترل کننده این صفات در طول ژنوم تجزیه واریانس یک طرفه برای تمام مکان های مارکری (روش تک مارکری) انجام گرفت. و مکانهایی که با هریک از این صفات در سطح (α<۵٪) همبستگی نشان دادند مشخص شدند و از این طریق گروههای لینکاژی مربوطه تشخیص داده شدند و همچنین اثر افزایشی QTL ها در هریک از این مکانهای مؤثر در صفات کمی از فرمول زیر محاسبه شد پس از تجزیه مارکر به مارکر مشخص شد که گروههای لینکاژی 5A, 5B, 7A با صفات مذکور رابطه دارند سپس تجزیه QTL توسط MAPMAKER/QTL جهت تعیین محل دقیق تر QTL ها روی کروموزوم 5A, 5B, 7A و تشخیص QTL احتمالی دیگر ، روی سایر کروموزومها دنبال شد و معیار تشخیص QTL ظهور LOD بیشتر از ۲ در نظر گرفته شد (۱۷).

$a(1-2r)= (BB-AA)/2$

a اثر افزایشی QTL

r میزان نوترکیبی بین مکان QTL و مکان مارکری

$\overline{BB}$ میانگین ژنوتیپهای شبیه والد SQ1 برای مکان مارکری مورد نظر

$\overline{AA}$ میانگین ژنوتیپهای شبیه والد CS برای مکان مارکری مورد نظر

نتایج و بحث

از ۶۰ آغازگر (پرایمر) که استفاده شده ، در مجموع ۵۶۴ نوار تولید شد که از بین آنها ۷ نوار پلی مورف بود بطورکلی ۱/۲٪ پلی مورفیسم وجود داشته است دلایل پایین بودن میزان پلی مورفیسم اولا" چون دراین جا فقط ۲ واریته گندم مورد بررسی بوده است و ثانیا" باریک بودن پایه ژنتیکی گندم، بزرگی ژنوم و داشتن حدود ۸۰٪ DNA تکراری ، و همیولوگ بودن اغلب توالیهاست (۳۱).

تکرار پذیری پایین RAPD: و تاثیر پذیری زیاد آن از شرایط محیط همیشه از معایب آن ذکر شده است و این مشکل با توجه به ویژگیهای ژنوم گندم ، برجسته تر و نمود بیشتری پیدا می کند لذا محققین برای ساختن نقشه های لینکاژی در گندم به استفاده از مارکرهای RAPD تمایل نشان نمیدهند (۷).

یکی دیگر از معایب مارکرهای RAPD غالبیت آن است که قادر به تشخیص هتروزیگوت ها نبوده واغلب این مارکر را در مطالعات نشانه دار کردن ژنها، و تهیه نقشه های لینکاژی ، درجمعیت های هاپلوئید و هاپلوئیدهای دوبل شده و اینبرد لاین های نوترکیب بکارمی برند در این جمعیتها نسبت ژنتیکی برای هر مکان مارکر ۱:۱ خواهد بود

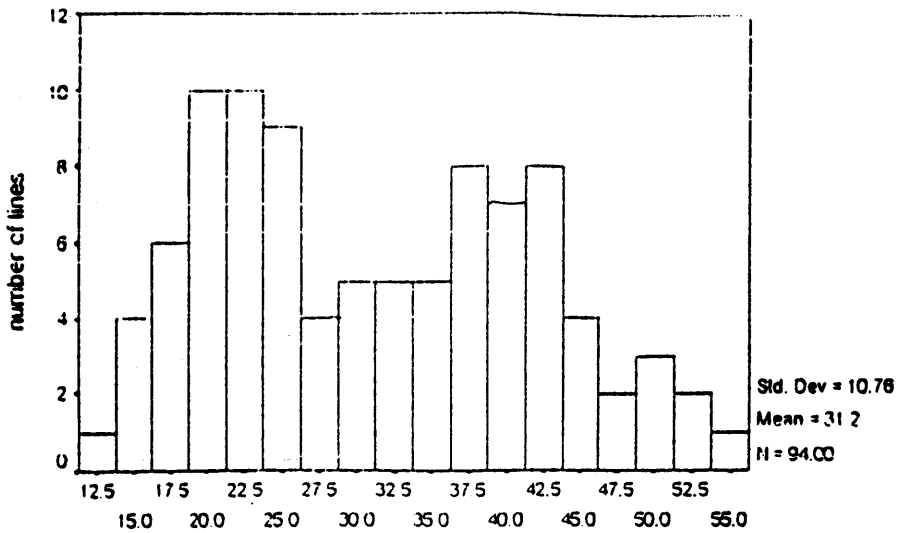
(۲۹ و ۳۱).

جدول ۷ نشان می دهد که ژنوتیپ های بدست آمده برای ۷ مارکر RAPD تفاوت معنی داری با نسبت مندلی ۱:۱ ندارند از بین این ۷ مارکر، مارکر UB103-۲۸۰A در گروه لینکاژی 5A در فاصله بین دو مارکر AFLP (M71P77h , M85P65b) قرا گرفت (شکل ۲) و بقیه بصورت عدم لینکاژ باقی ماندند نتایج تجزیه واریانس صفت تاریخ خوشه دهی (جدول ۱) نشان می دهد که تفاوت زیادی بین ژنوتیپ ها وجود دارد و تفاوت بین والدین نشان می دهد که لاین SQ1 ۲۱ روز از CS زودرس تر بوده است البته این تفاوت در شرایط عدم ورنالیزاسیون بدست آمده است .

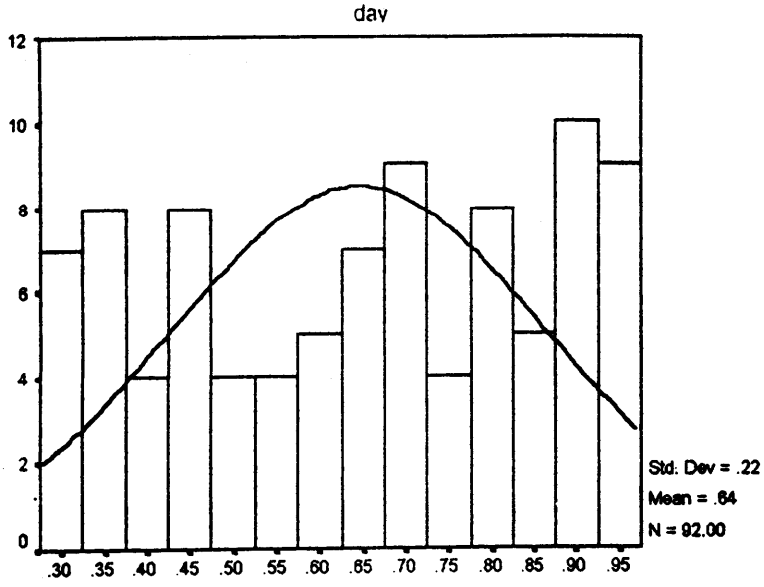
اگر چه CS یک رقم بهاره شناخته شده است ولی به علت داشتن vrn_1 روی 5A به مقدار ۳ هفته نیاز به ورنالیزاسیون دارد. ولی در شرایط عدم ورنالیزاسیون باعث می شود دیر به خوشه برود ولی لاین SQ1 دارای آلل Vrn_1 است و کاملا" بهاره می باشد بر اساس تجزیه QTL که سیمخودکسی و کوآری (۱۹۹۷) برای صفت تاریخ خوشه دهی بر روی همین جمعیت انجام دادند نتیجه گرفتند که روی بازوی بلند کروموزوم 5A منطقه کروموزومی بین دو مارکر Psr426, Psr757 تاثیر بسیار زیادی روی این صفت دارد بطوریکه حدود ۵۵٪ از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه می کند و گفته می شود که ژن vrn_1 در این فاصله قرار دارد و این ژن افراد جمعیت را کاملا" به دوگروه مجزای زودرس و دیرس تقسیم می کند همچنین در این فاصله QTL هایی برای تعداد خوشه چه و میزان ABA در شرایط شوری تشخیص داده اند و با توجه به رابطه منفی که بین تعداد خوشه چه و تاریخ خوشه رفتن در شرایط شوری مشاهده شده است ناشی از چند اثری بودن ژن vrn_1 می‌دانند که نیاز ورنالیزاسیونی را کنترل می کند(۲۵). البته مقاومت به سرما را نیز به آن نسبت می دادند که این فرضیه توسط گالیبا و همکاران رد شد(۱۲). در این آزمایش نیز فاصله بین این دو مارکر که ۱۷/۲ سانتی مورگان است (شکل ۲) بیشترین تاثیر را روی تاریخ خوشه دهی داشته است نقطه ای در این فاصله که ۱۰ سانتی مورگان از Psr775 و ۷/۲ سانتی مورگان از Psr426 فاصله دارد دارای LOD ماکزیمم (شکل ۳ الف) و ۳۹٪ از واریانس فنوتیپی را توجیه میکند محتمل ترین مکان ژنی است که دارای اثر اصلی روی تاریخ خوشه دهی است و جمعیت DH را به دوگروه مجزا، گروه شبیه CS و گروه شبیه SQ_1 تقسیم می کند (شکل-۱الف) که با نتایج سیمخودکسی و کوآری تقریبا" مطابقت دارد(۱۲) .

QTL دیگری نیز با اثر کمتر روی تاریخ خوشه دهی در روی کروموزوم 5B در فاصله بین دو مارکر Prs725, P78m49C که ۱۹/۵ سانتی مورگان فاصله دارند به فاصله ۲ سانتی مورگان از P78m49c و ۱۷/۵ سانتی مورگان از Psr725 تشخیص داده شد که ۱۲٪ واریانس فنوتیپی را توجیه می کند البته شکل منحنی روی کروموزوم 5B (شکل ۳ ب) دارای دو اوج مجاور یکدیگر می باشند که اوج اولی دارای LOD کمتر از اوج دوم می باشد که احتمال‌می رود که دو QTL مجزا باشند. که نقطه ماکزیمم QTL اول روی مارکر Psr118 می باشد.

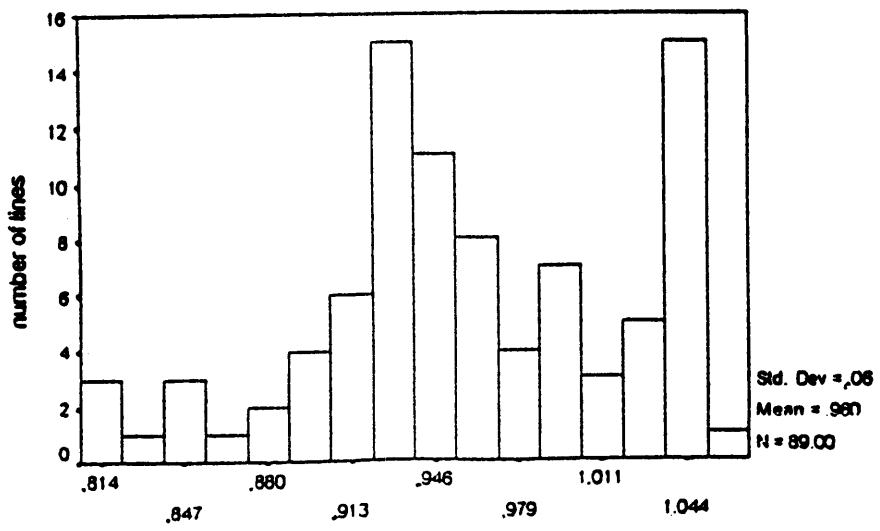
همانطوریکه درجدول ۴ تجزیه مارکر به مارکر نشان می دهد مارکرهای زیادی با این صفت همبستگی دارند ولی هیچکدام محل دقیق و یا محتمل ترین موقعیت QTL را تعیین نکرده اند و تجزیه QTL از طریق بین فاصله ای (اینتروال مپینگ) نشان داده که QTL دقیقا" روی هیچکدام از مارکرهاقرار نگرفته است و آثار افزایشی برآورد شده در هریک از این مکان های مارکری میزان اثر واقعی QTL را نشان نمی دهد. بلکه QTL در فاصله بین دو مارکر قرار



الف -



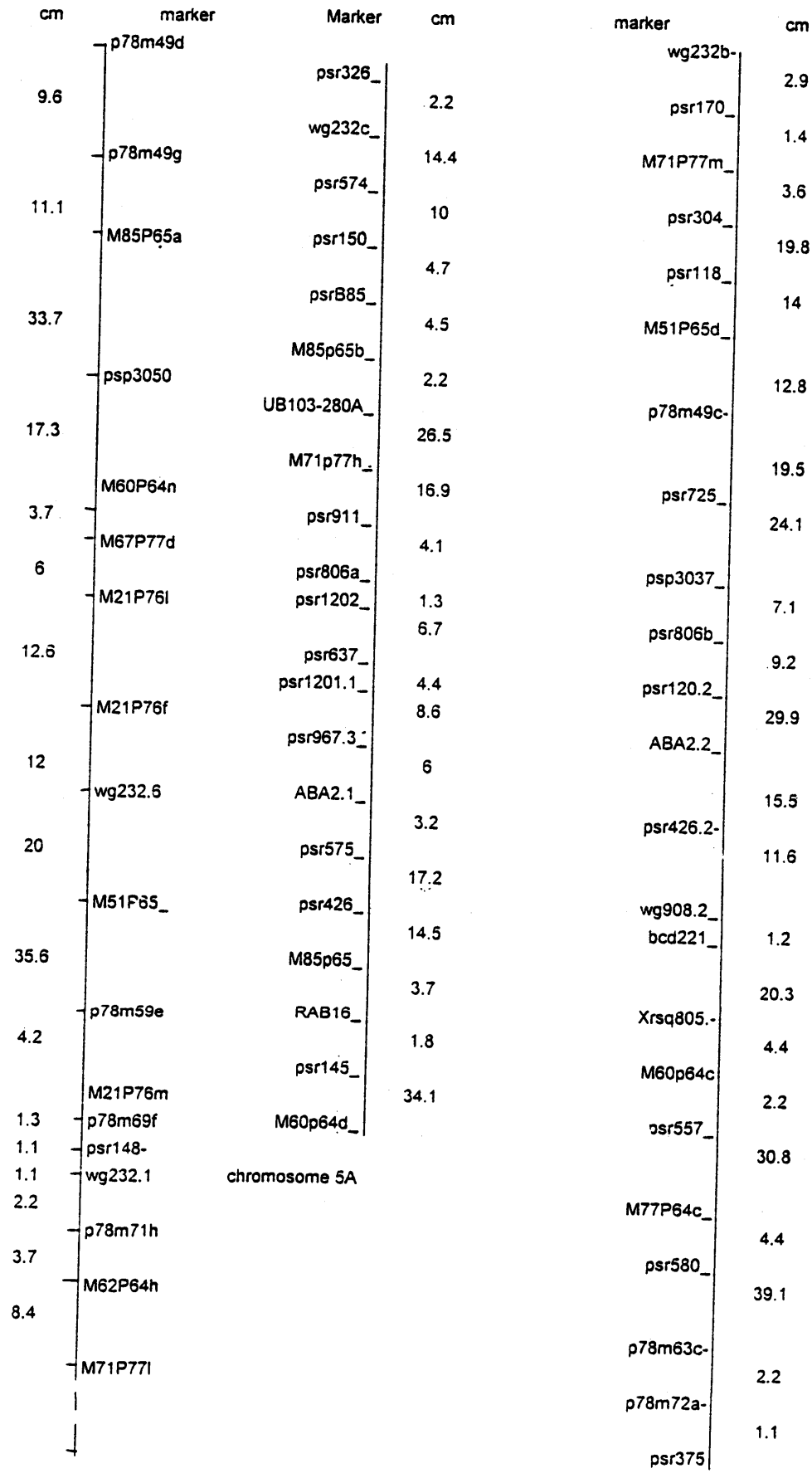
ب -



ج

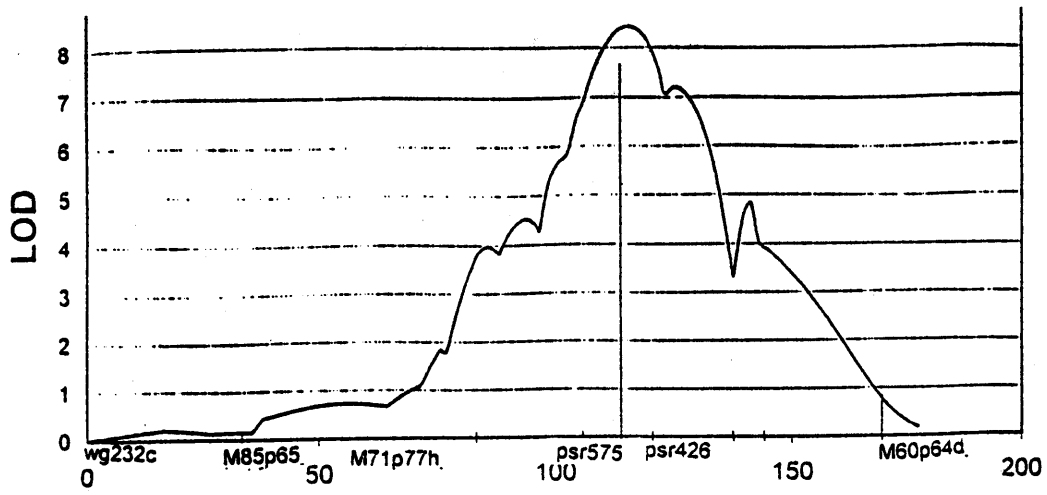
الف : صفت تاریخ خوشه دهی (روز) ب : صفت پایداری غشا ج : صفت LT50

شکل ۱ - توزیع فراوانی صفات مختلف



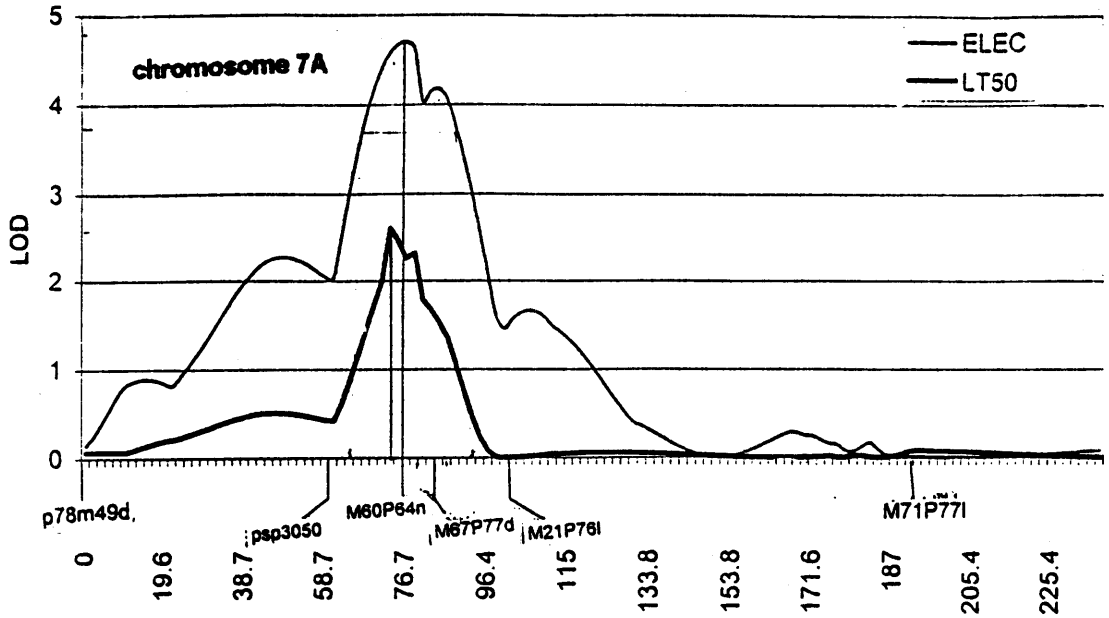
شکل ۲ - نقشه کروموزمهای 5B 7A 5A 5B

الف -



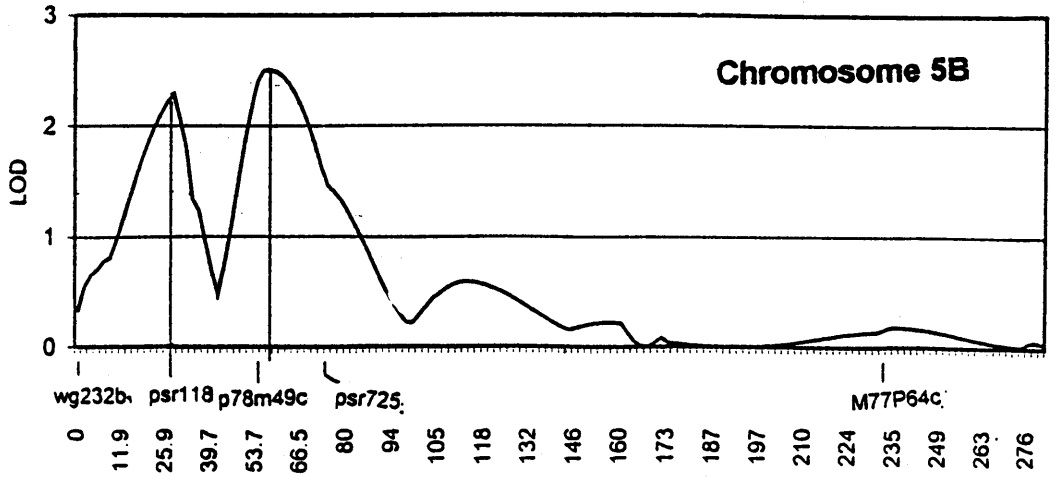
فاصله از اولین مارکر سمت چپ(سانتی مورگان)

ب -



فاصله از اولین مارکر سمت چپ(سانتی مورگان)

ج



فاصله از اولین مارکر سمت چپ(سانتی مورگان)

شکل ۳ : منحنی های LOD برای صفت کمی مختلف

الف : منحنی LOD برای صفت تاریخ خوشه دهی روی کروموزم 5A

ب : منحنی LOD برای صفت پایداری غشا(ELEC) و LT50 روی کروموزم 7A

ج : منحنی LOD برای صفت تاریخ خوشه دهی روی کروموزم 5B

گـرفت و اثـر افـزایشـی آن در ایـن نـقطه ۶/۷۲ روز است (مـحاسبه شـده تـوسط Mapmaker) کـه نشـان مـی دهـد برآورد اثر QTL توسط تجزیه تک مارکری بعلت فاصله یا نوترکیبی بین QTL و مارکر برآوردی اریب بـوده و واقـعی نیست مگر ایـنکه QTL دقـیقا" روی مکـان مـارکری قـرار داشته باشد (۱۷).

نتایج تجزیه واریانس برای صفت پایداری غشـا (در جدول ۲) نشان می دهد که تفاوت زیادی بین ژنوتیپ های هاپلوئید دوبل و والدین آنها وجود دارد این صفت بر اساس تراوش الکترولیتی غشا سیتوپلاسمی که در اثـر یـخ زدگـی صدمه دیده و یونهای داخل سلول وارد محلول می شوند، از طریق هدایت الکتریکی (EC) اندازه گیری شده. لذا هدایت الکـتریکی بـیشتر نشـان دهـنده حـضور یـونهای بـیشتر در محلول، و یونهای بـیشتر در مـحلول بـیانگر ایـن است کـه درصد بیشتری از سلولهای برگ خسارت دیده و از بین رفته اند که ملاک و معیاری برای مقاومت به سرما (یـخزدگی) است. مقدار بیشتر این صفت نشان دهنده حسـاستر بـودن رقم و مقدار کمتر آن نشان دهنده مقاوم تر بـودن آن است. رقم SQ1 با میزان تراوش ۰/۵۵۸ بسیار مقاوم تر از رقم CS با میزان ۰/۹۲۵ می باشد. مقادیر LT50 محاسبه شده برای والدین در جدول ۳ نشان می دهد کهSQ1 با LT50 برابـر ۱۱- درجه سانتی گراد مقاومتر از CS بـا LT50 ۸/۵- $^{\circ}C$ می‌باشد. LT50 معتبرترین شاخص برای تعیین مقاومت به سرما به طریقه مصنوعی در آزمایشگاه است که با بقای در مـــزرعه هـــمبستگی آن ثـابت شـــده است (۱، ۹ و۲۱). همبستگی معنی دار در سـطح ۰/۰۰۱ تـراوش الکـترولیتی غشا با LT50 و همچنین همبستگی معنی دار آن با بقای در ۱۱- $^{\circ}C$ نشان می دهد که این صفت می تـوانـد شـاخصی برای مقاومت به سرما نیز باشد .

تجزیه واریانس مارکر به مارکر (جدول ۵) مارکرهایی را از گروههایی لینکاژی 7A , 5B که بـا صـفات LT50 و تراوش الکترولیتی غشا هـمبستگی دارنـد نشـان مـی دهـد بیشترین اثر افزایشی QTL بـرای ایـن صـفات روی مـارکر M60P64n بدست آمده است که در گـروه 7A قـرار دارد برای هر مارکر (بجز یک مارکر) میانگین ژنوتیپهای مشـابه والدین با فنوتیپ والدین هم جهت بوده یعنی میانگین گروه ژنوتیپی شبیه والد SQ1 در تمام مارکرهای مورد نظر دارای مقدار بیشتری ازژنوتیپ مـقابل است ولی در مـورد مـارکر m71p77m مـیانگین ژنـوتیپها در جـهت خـلاف فـنوتیپ والدین است . ادامـه تـجزیه QTL بـروش بـین فـاصله ای (اینتروال مپینگ) نشان داد که محتمل ترین و یا صحیح ترین مـوقعیت صـفت پـایداری غشـا روی M60p64n و صـفت LT50 بین دو مارکر M60p64n , Psp3050 یعنی در فاصله ۲/۳ سانتی مورگان قبل از M60p64n قرار دارد (شکل ۳ج) حداکثر LOD برای پایداری غشا بـیشتر از ۴/۷ و در ایـن نقطه با اثر افزایشی ۰/۱۰۰۶ و۲۱/۲٪ از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه می کند و حداکثر LOD بـرای LT50 بیشتر از ۲/۶ و در این نقطه با اثر افزایشی ۰/۰۲۲ و۱۲/۷٪ از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه می کند. QTL های دو صفت LT50 و پایداری غشا در یک مـنطقه کـروموزوم 7A قرار دارند و همبستگی بالای این دو صفت مقاومت به سرما (جدول ۴) و انطباق محل کـروموزومی ایـندو تـایید کننده یکدیگر می باشند. بخش زیادی از واریانس فنوتیپی صفت پایداری غشا و LT50 توجیه نشده باقی مانده است که احتمالا" QTL های دیگری باید در کـنترل ایـن صـفت دخالت داشته باشند ولی در اینجا بیش از یک QTL برای صفت مقاومت به سرما تشـخیص داده نشـد چـون قـدرت تشخیص QTL بستگی به درجه اشباع مارکری و همچنین اندازه نمونه دارد اگر چه ۳۴۵ مارکر قادرند بطور متوسط بـفاصله ۱۰cm مـورگان طـول ژنـوم گـندم (۳۵۰۰ سـانتی

جدول ۱ -نتایج تجزیه واریانس صفت تاریخ خوشه دهی برای والدین و هاپلوئیدهای دوبل شده

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	میانگین والدین (روز)		تفاوت والدین (روز)
			SQ_1	CS	
ژنوتیپ	۹۵	۳۴۷/۲۰۷***	۲۰/۳۳	۴۲	۲۱/۶۷***
خطای آزمایشی	۱۹۲	۴/۷۱۲			LSD۰/۰۰۱=۵/۸۳۲

***، معنی دار در سطح ۰/۰۰۱

۱ : از بین ژنوتیپ ها تاریخ خوشه دهی دو لاین مشخص نشد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفت پایداری غشا(الکترولیت لیکیج) برای والدین و هاپلوئیدهای دوبل شده در دمای (-۱۱c)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	میانگین والدین		تفاوت والدین
			SQ_1	CS	
ژنوتیپ[۲]	۹۴	۰/۱۳۹***	۰/۵۵۸	۰/۹۲۵	۰/۳۶۷***
بلوک	۲	۰/۵۹۳***			LSD۰/۰۰۱=۰/۲۶۹
خطای آزمایشی	۱۸۸	۰/۰۱			

***، معنی دار در سطح ۰/۰۰۱

۱ : مشاهدات مربوط به پایداری غشاءتبدیل جذری شده اند ($\sqrt{Xij}$) ۲ - از بین ژنوتیپ ها پایداری غشاء مربوط به سه لاین مشخص نشد.

جدول ۳ - نتایج تعیین LT50 والدین با استفاده از روش پروبیت

SQ_1		CS		تلفات در هر گلدان از ۱۰ گیاه		درجه حرارت C
X^2 برازش	LT50	X^2برازش	LT50	SQ_1	CS	
۴/۱ns	-۱۰/۶۷	۲/۲۵ns	-۸/۵۳	۰	۱	-۶
				۱	۲	-۸
				۳/۵	۸	-۱۱
				۱۰	۱۰	-۱۳

جدول ۴ - ضرائب همبستگی (r) بین صفات مختلف در جمعیت گندم مورد بررسی

LT50	بقاءدر (-۱۱°c)	تاریخ خوشه دهی (روز)	
+۰/۶۵***	-۰/۲۶۳*	-۰/۰۶۴ns	پایداری غشا(elec)
۱	۰/۵۵۲**	-۰/۰۶۷ns	LT50
	۱	-۰/۰۹۹ns	بقاء در (-۱۱°c)
		۱	تاریخ خوشه دهی (روز)

*، **، ***، معنی دار در سطح ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱

جدول ۵ - میانگین مکانهای مارکری که از طریق تجزیه واریانس یک طرفه ، همبستگی آنها با تاریخ خوشه دهی در سطح احتمال P<۰/۰۵ معنی دار تشخیص داده شده، و اثر افزایشی QTL

میانگین ژنوتیپ ها(۱) $\overline{BB}$	میانگین ژنوتیپ ها(۱) $\overline{AA}$	اشتباه نوع I	اثرافزایشی * (QTL)	مارکر	کروموزم
۲۸/۶۷	۳۳/۳۶	۰/۰۲۷	-۲/۴۵	psr۹۱۱	۵A
۲۸/۲۵	۳۴/۷	۰/۰۰۴	-۲/۲۲	psr۸۰۶	۵A
۲۸/۳۲	۳۴/۲۹	۰/۰۰۷	-۲/۹۸	psr۱۲۰۲	۵A
۲۷/۱	۳۶	<۰/۰۰۱	-۴/۴۵	psr۶۳۷	۵A
۲۶/۸	۳۵/۷۸	<۰/۰۰۱	-۴/۴۹	psr۱۲۰/۱	۵A
۲۷/۰۴	۳۶/۷۴	<۰/۰۰۱	-۴/۸۵	psr۹۶۷/۳	۵A
۲۸/۸۹	۳۷/۶۵	<۰/۰۰۱	-۵/۳۸	ABA۲/۱	۵A
۲۶/۳۶	۳۷/۹۵	<۰/۰۰۱	-۵/۷۹	psr۵۷۵	۵A
۲۵/۷۴	۳۷/۳۴	<۰/۰۰۱	-۵/۸	psr۴۲۶	۵A
۲۷/۹۸	۳۴/۸۵	۰/۰۰۲	-۳/۴۳	M۸۵۴۶۵	۵A
۲۶/۴۶	۳۶/۱	<۰/۰۰۱	-۴/۸۲	RAB۱۶	۵A
۲۶/۸۳	۳۵/۸۹	۰/۰۰۱	-۴/۵۳	psr۱۴۵	۵A
۲۷/۸	۳۴/۹	۰/۰۰۲	-۳/۵۵	psr۱۱۸	۵B
۳۱	۳۵	۰/۰۰۱	-۲	Pv۸ m۴۹c	۵B
۲۸	۳۱	۰/۰۱۶	-۱/۵	Pv۸ m۶۹	۵B

۱- $\overline{AA}$ میانگین گروه ژنوتیپی شبیه والد CS و $\overline{BB}$ میانگین گروه ژنوتیپی شبیه والد SQ۱ برای هر مارکر. * علامت منفی اثر افزایشی نشان دهنده اثر کاهش دهنده آللهای والد SQ۱ است .

مورگان) را پوشش دهند ولی توزیع مارکر ها در طول ژنوم یکنواخت نیست خصوصاً" ژنوم D گندم بطور کلی از نظر فراوانی مارکر بعلت کم بودن پلی مورفیسم در این ژنوم بسیار فقیربوده و در این جمعیت مورد تحقیق نیز گروه لینکاژی برای ژنوم D وجود نداشت و از طرفی دقت تشخیص QTL در درجه اول به اندازه جمعیت بستگی دارد تا به فراوانی مارکر ها و افزایش در تعداد مارکرها ضرورتاً" باعث بهبود تشخیص QTL نمی شود(۶ و۱۹). یکی از ضعف های موجود در این تحقیق کوچک بودن جمعیت است که توان تشخیص QTL در آن کم است سمیخودسکی و کواری ، نیز در تحقیقی که در تجزیه QTL برای مقاومت به شوری روی همین جمعیت انجام داده اند به این موضوع اشاره نموده اند(۲۵) .

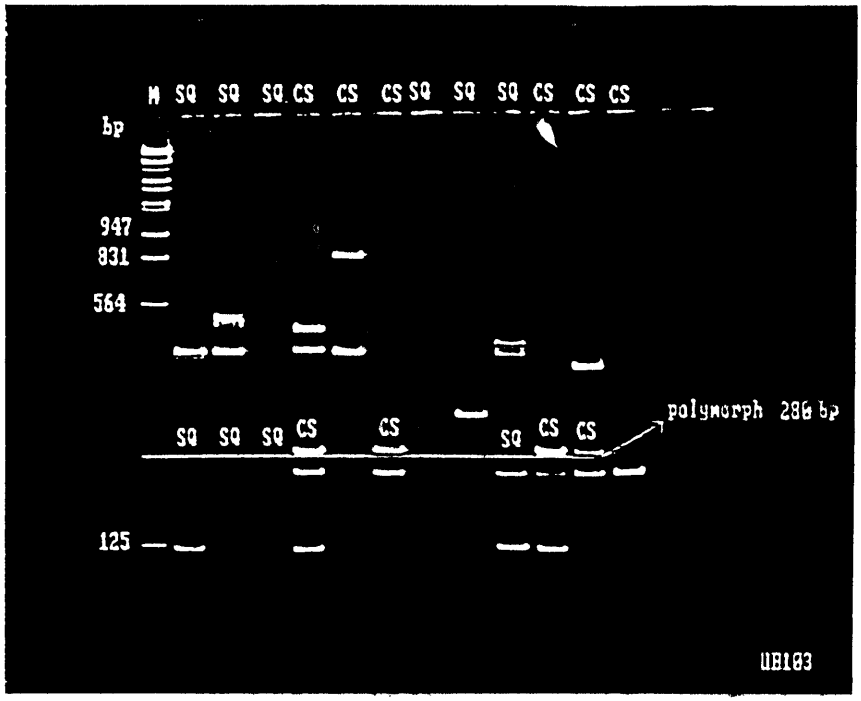
از طریق مطالعات منوزمیک و رگه های جایگزین در گندم ، ژنهای مقاومت به سرما روی کروموزومهای گروه (۵). و کورموزومهای 7A, 4D, 4B گزارش شده است

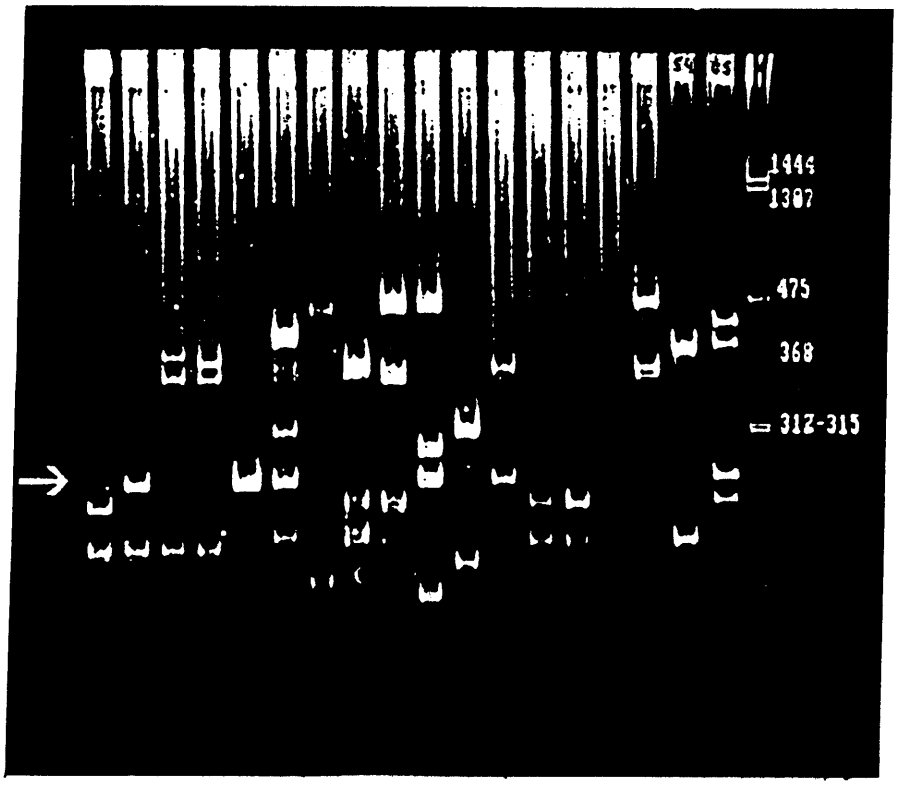
جدول ۶ - نتایج تجزیه واریانس یک طرفه مکانهای مارکری که همبستگی آنها با صفات کمی مقاومت به سرما در سطح ۰/۰۵ > P معنی دار تشخیص داده شده و میزان اثر افزایشی QTL

میانگین ژنوتیپ ها		LT50[1]				میانگین ژنوتیپ ها+		تراوش الکترولیتی (پایدار غشا)			
BB	$\overline{AA}$	کروموزوم	مارکر	اثر افزایشی (QTL)	اشتباه نوع I	$\overline{BB}$	$\overline{AA}$	کروموزم	مارکر	اثر افزایشی	اشتباه نوع I
۰/۹۷۴	۰/۹۴۷	۵B	$P_{V۸}m_{۶۳}c$ ۰/۰۱۳۵	۰/۰۴۹		۰/۶۸۶	۰/۶۰۳	۵B	$m_{V۱}$ $p_{VV}m$ ۰/۰۴۱۵		۰/۰۳۹
۰/۹۷۱	۰/۹۴۰	۵B	$P_{V۸}m_{۸۷}c$ ۰/۰۱۵۵	۰/۰۲۸		۰/۵۹۰۹	۰/۷۰۰	۷B	$psp_{۲۳۲/۶}$ -۰/۰۵۴۵		۰/۰۰۹
۰/۹۷۶	۰/۹۴۰	۷A	$P_{۲۱}m_{۷۶}l$ ۰/۰۱۸	۰/۰۱۱		۰/۵۹۱۷	۰/۷۰۷	۷A	$M_{۲۱}$ $P_{V۶۴}$ -۰/۰۵۷۰		۰/۰۱
۰/۹۷۴	۰/۹۳۴	۷A	$m_{۶۰}P_{۶۴}n$ ۰/۰۲	۰/۰۰۹		۰/۵۳۷۷	۰/۷۳۸۹	۷A	$M_{۶۰}$ $P_{۶۴}n$ -۰/۱۰۰۶		<۰/۰۰۱
۰/۹۷۴	۰/۹۳۹	۷A	$Psp_{۳۰۵۰}$ ۰/۰۱۷۵	۰/۰۰۸		۰/۶۰۸۹	۰/۶۹۷	۷A	$M_{۸۵}$ $P_{۶۵}\alpha$ -۰/۰۴۴		۰/۰۶۴
۰/۹۷۷	۰/۹۴۱	۷A	$m_{۶۷}P_{VV}d$ ۰/۰۱۹	۰/۰۰۵		۰/۵۷۲۲	۰/۷۶۲۲	۷A	PSP ۳۰۵۰ -۰/۰۹۵		<۰/۰۰۱
						۰/۵۶۳۰	۰/۷۳۹۵	۷A	$M_{۶۷}P_{VV}d$ -۰/۰۸۸۲۱		۰/۰۰۱
						۰/۵۵۷۸	۰/۷۴۴	۷A	$M_{۲۱}P_{V۶}l$ -۰/۰۹۳		<۰/۰۰۱

۱ - تبدیل لگاریتمی روی این صفت انجام گرفته است .

+ : $\overline{AA}$ میانگین گروه ژنوتیپی شبیه والد CS و $\overline{BB}$ میانگین گروه ژنوتیپی شبیه والد SQ۱ برای هر مارکر





شکل ۴- الف : ژل آکریلامید مربوط به آغازگر UB۱۰۳ و پلی مورفیسم بین والدین چاینیز سپرینگ (CS) و SQ

ب : نمونه ای از ژل تعیین ژنوتیپ ، تعدادی از جمعیت (DH) برای مارکر UB۱۰۳-۲۸۰A پیکانه نوار مورد نظر را نشان می دهد.

جدول ۷ - فراوانی ژنوتیپ ها در افراد ژنوتیپ شده برای مارکرهای RAPD

مارکر[1]	تعداد افراد ژنوتیپ شده	ژنوتیپ AA	ژنوتیپ BB	مقادیر X^2 (برای نسبت ۱:۱)
UB۱۶۵-۱۳۰۷B	۸۳	۴۶	۳۷	۰/۹۷۵^{ns}
UB۱۸۱-۴۵۰B	۸۳	۴۷	۳۶	۱/۴۵۷^{ns}
UB۱۰۳-۲۸۰A	۹۲	۴۸	۴۶	۰/۰۴۲^{ns}
UB۱۶۶-۱۱۷۰B	۸۲	۴۵	۳۷	۰/۷۸^{ns}
UB۱۶۶-۹۴۰B	۸۴	۴۷	۳۷	۱/۱۹۰^{ns}
UB۱۸۱-۴۰۰A	۷۱	۳۷	۳۴	۰/۱۲۶^{ns}
OPA۱۳-۵۰۰B	۸۰	۴۳	۳۷	۰/۴۵^{ns}

(۱و۱۲). در این جا وجود یک QTL کنترل کننده مقاومت به سرما روی کروموزوم 7A در رقم SQ1 نشان می دهد که تمام گندمهای بهاره که نیاز به ورنالیزاسیون ندارند حساس به سرما نبوده و اگر چه رقم چاینیزاسپرینگ دارای ژن‌مغلوب vrn۱ است و مقداری به ورنالیزاسیون نیازمند است ولی حساستر از رقم SQ1 که دارای ژن غالب Vrn۱ است می باشد و این نتایج با اظهار نظر برولی - بابل و فولر ۱۹۸۸ گالیبا و همکارارن مطابقت دارد(۱ و۱۲).

REFERENCES

1. Brule-Babel and D. B. Fowler. 1988. Genetic control of cold Hardiness and Vernalization Rerquirement. Crop. Sci. 28:(879-884)
2. Bertin., P. J., Bouharmont and J. M. Kinet. 1996. Somaclonal variation and improvement in chiling tolerance in rice. Plant breeding 115:268-272.
3. Chun. J. U., X. M. Yu. and M. Grifith. 1998. Gentic studies of antifreeze proteins and their correlation with winter survival in wheat. Euphytica 102:219-226.
4. Dupcovsky. J. S. Marcucci-ploten. L. Appendino. Ming - cheny Lvo. 1997. RFLP and AFLP maps of a new vernalization Gene in wheat. Plant and Animal Genome V conference.
5. Dudley J. W., 1993. Molecular Markers in plant Improvement : Crop.Sci. 33:660-668.
6. Darvasi. A., A. Weinreb, V. Minke, J. I. Weller and M.Soller. 1993. Detecting Marker-QTL Linkage and Estimating QTL Gene Effect and Map Location using a saturated Genetic Map. Genetiics 134/. 943-951.
7. Devos, K. M. , and M. D. Gale. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA

8 . Edward, M. D., C. W. Stuber and J. F. Wendol 1987. Molecular marker facilitated Investigations of Quantitative trait loci in maze I. Genetics 116: 113-125.

9. Fowler, D. B., A. E. Limin S. Y. Wang and R. W. Ward 1995. Relationship between low-Temprature tolerance and vernalization response in wheat and rye. Can. J. Plant . Sci. 76:37-42.

10. Fowler, D. B. , L. P. Chauvin , A. E. Limin , F. Sarhan. 1996. The regulatory role of vernalization in the expression of low - Temperature- Induced genes in wheat and rye. Theo Appl. Genet, 933:554-559.

11. Falconer, D. S. 1996. Introduction to Quantitativve Genetics. John wiley & sons, Inc. New York.

12. Galiba. G, S. A. Quarrie, J. Sutka, A. Morgounov 1995 RFLP mapping of the vernalization theor . Appl. Genet. 90: 1174-1179.

13. Hayes, P. M. T. Blake , T. H. H. Chen, S. Tra Goonrung and F. Chen . 1993. Quantitative trait location barley chromosome 7 associate with components of winter hardiness. Genome 36:66-71.

14. Kearsey. M. Y. , V. Hyne . 1994. QTL analysis : a simple marker-regression approach theo . Apple Genet. 89:698-702.

15. Law, C. N. 1967. The location of Genetic factors controlling a Number of Quantitative characters in wheat. Genetics 56:445-461.

16. Law, C. N., Jenkins G. 1970. A genetic study of cold resistance .Genet. Re: 15:197-208.

17. Lander. E. S. , and D. Botstein 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkatge maps. Genetic 121:182-199.

18. Lin. S. Y., T Sasaki, M. Yano 1998. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice. Oryza sativa L. using backcross Inbred lines theo. Appl. Genet 96: 997-1003.

19. Louis prioul. J, S. Quarrie, M. Causse and Dominique devionne 1997. Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. J. of Exprimental Botany 48(311). 1151-1163.

20. Lupton, F. G. H. 1997. Wheat breeding chapman and Hall . London

21. Midori, A., E. S. Peteraskman. 1992. Accumulation of high molecular - weight protein in response to cold hardening and abscisic acid treatment in two winter wheat varieties with different frost tolerance J. Plant physiol Vol. 140:617-622.

22. Poehlman. M, D. A. Sleper 1996. Breeding field crops. panima pulishing corporation/ New Delhi/ Bangarlore.

23. Quarrie. S. A.,D. A. Lavrie , J. Zhu. 1997. QTL analysis to study the association between leaf size and abscisic acid accumulation in droughted rice leaves and comparisons across cereals 35: 155-165.

24. Quarrie. S. A., M. Gulli, C. Calestani, A. Steed, N. marmiroli 1994. Location of a gene regulating drought-induced abscisic acid production on the long arm of chromosome 5A of wheat . Theo. Appl. Genet 89:794-800.

25. Semikhodskii AG, SA. Quarrie, J.W. John Innescenter, U.K. unpublished shape . 1997. Mapping quantitative trait loci for salinity responses in wheat.

26. Snape, J. W., C. N. Law., B. A. Parker and A. J. Worland . 1985. Genetical analysis of chromosome 5A of wheat and its influence on importnat Agronomic characters . Theo Appl. Genet. 71:518-526.

27. Shinozaki-K,. and Kazuko yamaguch-shinozaki. 1997. Gene expression and signal transduction in water - stress response. Plant physiol. 115:327-343.

28. Sutka, J., 1981. Genetic studies of frost resistance in wheat theo. Appl. Genet 59: 145-152.

29. Verhaegen, D. and CH. Plomion . 1996. Genetic mapping in Eucalyptus urophylla and Eucalyptus grandis using RAPD markers. Genome 39:1051-1061.

30. Weller J. I., M. Soller and T. Brody. 1988. Linkage analysis of Quantitative traits in an inter specific cross of tomato by means of genetic marker. Genetics 118: 329-339.

31. William, H. M., D. Hoisington, R. P. Singh, and D. Gonzalez - de-leon. 1997. Detection of quantitative trait loci associated with leaf rust ressistance in bread wheat genome. 40: 253-260.

32. Yano, M. Y. Harshima, Y. Nagamura, N. Kurata. Y. Minobe, T. saski. 1997. Identification of Quantitative trait loci controlling heading date in rice using a high-density linkage map theo. Appl. Genet 95:1025-1032.

QTL - analysis on Cold Resistance and Heading Date in Wheat, Using Doubled Haploid Lines

H. DASHTI[1], B. YAZDI-SAMADI[2], C. ABD-MISHANI[3], AND M. R. GHANNADHA[4]

1,2,3,4 - Former Ph.D Student, Professors and Assistant Professor, Faculty of Agriculture , University of Tehran, Karaj, Iran.

Accepted May 17, 2000

SUMMARY

Marker-assisted selection is a method recently developed to improve genetic gain in plant breeding . It is based on identification of tight linkages between markers and QTLs, and also on mapping QTLs involved. To map loci controlling heading date and cold resistance in wheat , QTL- analysis was carried out using 96 doubled-haploid lines (DH), derived from a cross between chinese spring (CS) and SQ1, with 345 Molecular markers in a partially linkage map, two experiments conducted. In the first expriment DH-Lines were planted in greenhouse using a completely randomized design with 3 replications . Heading date was recorded when three plant had its spike emerged, in each replication. Heading date was considered as days from an arbitary date to the time of heading. In the second experiment each DH-line was planted in 4 small pots as four replicates (10 plants / pot). seven days after emergence plants were transfered to cold room under 3-4 °c for five weeks to practise hardening . The pots were then transfered to freeze chamber to determaine plant survival at four freezing points : -6 °c, -8 °c, -11 °c and -13 °c and to find their LT50 as well as electrolyte leakage (memberane stability) . Electrolyte leakage was measured at -11 °c, using a randomized complete block design with 3 replications. The results indicated that SQ1 was earlier and more resistant to cold than CS. QTL-Scan analysis revealed the existance of two QTLs for heading date, one with large effect on chromosome 5A and one with small effect on chromosome 5B, which all-together explained 51% of total phenotypic variation in the DH-population. One QTL was also found for cold resistance on chromosome 7A, which explained 22% and 12% of the electrolete leakage and LT50 phenotypic variations in the DH-line population respectively.

Key words: QTL-analysis, Cold resistance, Heading date, Doubled haploid, Bread wheat