مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۱۱۲-۱۰۵)

شناسائی ژن‌های کمّی مرتبط با تحمل به سرما در گندم زمستانه (*Triticum aestivum* L.)

رضاقلی میرفخرایی[۱]، محسن مردی[۲]، علیرضا طالعی[۳]، سیروس محفوظی[۴]* و عباسعلی زالی[۵]
۱، ۳، ۵، دانشجوی دکتری و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۲، استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج
۴، استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (بخش تحقیقات غلات)
(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۳۰- تاریخ تصویب: ۸۸/۷/۸)

چکیده

تحمل به تنش سرما ویژگی اقتصادی مهمی در گندم‌های زمستانه است که توانایی تحمل گیاه را در دماهای پایین انجماد مشخص می‌کند. برای شناسائی ناحیه‌های ژنومی مرتبط با تحمل به دماهای پایین در گندم‌های هگزاپلویید، جمعیت F2:3 حاصل از تلاقی والد زمستانه متحمل به سرما، میرنووسکایا ۸۰۸ (LT50 = -20°C) و والد بهاره حساس به سرما، پیشتاز (LT50 = -7°C)، استفاده شد. LT50، سطح دمائی که ۵۰ درصد از گیاهان در آن زنده می‌مانند به عنوان شاخص تحمل به سرما انتخاب شد. افراد F2:3 توزیع پیوسته‌ای را از این شاخص (LT50 = -۳ تا -۲۳°C) نشان دادند که دلیل بر پلی‌ژنیک بودن و واجد توارث کمّی بودن تحمل به تنش سرما بود. ارزیابی ژنوتیپی والدین با استفاده از ۱۷۰ جفت آغازگر ریزماهواره و ۲۲ ترکیب آغازگر AFLP انجام گرفت. ۷۵ جایگاه نشانگر چند شکل شامل ۲۰ نشانگر ریز ماهواره و ۵۵ نشانگر AFLP، برای غربال افراد F2 استفاده شدند. نقشه پیوستگی با استفاده از نشانگرهای چند شکل تهیه شد. نشانگرهای چند شکل به ٦ گروه پیوستگی منتسب شدند. براساس تجزیه تک نشانگری و مکان‌یابی فاصله‌ای، یک QTL روی بازوی بلند کروموزوم 5B شناسائی گردید. این QTL، ۱۱/۳ درصد از تغییرات فنوتیپی (LT50) را توجیه کرد.

واژه‌های کلیدی: **تحمل به تنش سرما، دمای ۵۰ درصد زنده‌مانی، نقشه‌یابی QTL، گندم هگزا پلویید.**

مقدمه

تنش دماهای پایین تولید غلات را در مناطق سرد محدود می‌کند و در بعضی از سالها خسارات فراوانی وارد می‌سازد. با توجه به نرخ رشد جمعیت، تا سال ۱۴۰۰ بالغ بر ۹۰ میلیون نفر جمعیت کشور برآورد می‌گردد. از بین غلات، سرانه مصرف گندم، ۲۲۰ کیلوگرم می‌باشد که بدین ترتیب تا سال مذکور نیاز سالانه کشور به حدود ۲۰ میلیون تن خواهد بود.

اقلیم‌های سرد و فراسرد، بیش از ۶۲ درصد از سطح کشور را تحت پوشش خود دارند(Khalili et al., 1991). بنابراین، تنش سرما در فرم‌های سرمازدگی، انجماد و افت ناگهانی دما، زراعت‌های گندم را در اراضی واقع در اقلیم‌های مذکور تهدید می‌کند، به طوری که متوسط خسارات این تنش در ۵ سال گذشته در حدود ۳٪ تولید سالیانه را به خود اختصاص داده است. بر این اساس تلاش برای تولید ارقام گندم، به منظور افزایش میزان تحمل به سرما و امکان ازدیاد و پایداری عملکرد در واحد سطح ضروری است. همچنین نیاز به دیگر اراضی

* نویسنده مسئول: سیروس محفوظی تلفن: ۰۹۱۲-۵۶۴۸۳۱۸ E-mail: siroosmahfoozi@yahoo.com

واقع در اقلیم‌های سرد و فراسرد که تا کنون بایر مانده‌اند، اهمیت این بخش از پژوهش‌های به‌نژادی را برجسته‌تر می‌سازد. چند ژنی بودن کنترل این صفت کمی و تاثیرات محیط که کارآیی لازم را در گزینش فنوتیپی برای این صفت کاهش می‌دهد (Asghari et al., 2005)، لزوم استفاده از نشانگرهای مولکولی را در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر به عنوان مکمل روش‌های کلاسیک روزافزون ساخته است. و این مهم از طریق مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده تحمل به تنش سرما، امکان پذیر می گردد.

توانایی تحمل شرایط سرما و انجماد در اقلیم‌های سرد در طول دوره عادت یافتن به سرما که مشتمل بر تغییرات بیوشیمیایی، ساختاری، به صورت سنتز پروتئین‌های جدید، و فیزیولوژیک می‌باشد، حفاظت گیاه را در مقابل خسارات آنها تقویت می‌کند (Thomashow, 1999). در غلات زمستانه، عادت یافتن به سرما به طور همزمان با بهاره‌سازی اتفاق می‌افتد و حداکثر تحمل به سرما زمانی پدیدار می‌گردد که بهاره سازی به نقطه اشباع خود از نظر طول ساعات دمای پایین مورد نیاز رسیده باشد و سپس قدرت تحمل به سرما کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر ژن‌های بهاره‌سازی بر ژن‌های تحمل به سرما اثرات تنظیم‌کنندگی دارند (Fowler et al., 1996).

اولین جمعیت در حال تفرق مورد استفاده برای بررسی مقاومت به سرما در گندم، مربوط به یک جمعیت از لاین‌های جایگزین شده با ویژگی‌های حساس به سرما و غیرحساس به بهاره‌سازی از رقم چینی بهاره (*Triticum spelta* 5A) و یک لاین واجد کروموزوم جایگزین شده مقاوم به سرما و حساس به بهاره‌سازی از دیگر رقم چینی بهاره (*Cheyenne* 5A) به دست آمده است. نتایج در این تحقیق نشان دادند که ژن بهاره سازی *vrn-A1* و ژن مقاومت به سرمازدگی $Fr-1$ با فاصله قابل توجهی روی بازوی بلند کروموزوم 5A قرار دارند (Galiba et al., 1995).

Fowler et al. (1983) ۳۴ ویژگی بیولوژیک، فیزیولوژیک و مورفولوژیک گندم‌های زمستانه را برای تعیین میزان کارآیی هر یک از آنها برای برآورد قدرت زمستان‌گذرانی آزمون کردند. تفاوت‌ها از نظر قدرت سرماسختی در بین ژنوتیپ‌های مختلف در اغلب ویژگی‌های ارزیابی شده، معنی‌دار بود. ارتباط خطی نزدیک در بین بعضی از ویژگی‌ها، نشان داد که امکان استفاده از چند مورد از آنها از طریق غربال کردن، می‌تواند به عنوان مکمل در آزمایشات زمستان‌گذرانی در مزرعه، پیشرفت برنامه به‌نژادی را تسریع کند. برآوردها از بقاء در شرایط مزرعه[1] (FSI) و LT_{50} کمترین اشتباهات آزمایشی را داشتند و بالاترین اندازه‌های توارث‌پذیری متعلق به آنها بود. همچنین بیشترین همبستگی نیز بین FSI و LT_{50} به دست آمد.

برای شناسائی نواحی ژنومی که علاوه بر آلل‌های بهاره‌سازی (*vrn1*)، سطح تحمل به دمای پایین را در گندم‌های هگزاپلویید مشخص می‌سازد، دو جمعیت هاپلویید مضاعف با استفاده از والدین واجد تیپ رشد زمستانه (*vrn- D1,vrn–B1, vrn–A1*) نیازمند به بهاره‌سازی و دارای قدرت متفاوت در تحمل به سرما تهیه شدند. نقشه پیوستگی تلفیقی با استفاده از نقشه‌های پیوستگی دو جمعیت، مشتمل بر ۵۶۴ جایگاه نشانگر ریزماهواره و ۳۴۰ نشانگر AFLP گردید و توانست ۲۸۷۳ سانتی‌مورگان از ژنوم را پوشش دهد. سطوح تحمل به دمای پایین در نتاج حاصل از تلاقی نورستار ($LT_{50} = -20.7^{\circ}C$) با مانیتو زمستانه ($LT_{50} = -14.3^{\circ}C$) دارای محدوده‌ای از ۱۲- تا ۲۲°C- بود. تجزیه تک‌نشانگری و مکان یابی فاصله‌ای، نشان داد که یک QTL بزرگ اثر روی کروموزوم 5A و یک QTL کوچک اثر برروی کروموزوم 1D در کنترل این صفت موثرند. جایگاه 5AQTL در فاصله ۴۶ سانتی‌مورگان از ژن *vrn-A1* مستقر بوده و ۴۰ درصد از تغییرات تحمل به سرما را توجیه کرد (Bagha et al., 2007).

هدف از انجام این پژوهش شناسائی ژن‌های کمّی (QTLs) مرتبط با ویژگی LT_{50} در تحمل به سرما در گندم بود که اطلاعات حاصل بتواند در برنامه‌های به‌نژادی مولکولی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

رقم زمستانه میونووسکایا ۸۰۸ به عنوان والد متحمل

1. Field Survival Index

به سرما ($LT_{50} = -20^{\circ}C$) و رقم بهاره پیشتاز به عنوان والد حساس به سرما ($LT_{50} = -7^{\circ}C$) جهت تولید جمعیت $F_{2:3}$ استفاده شدند.

ارزیابی فنوتیپی

ارزیابی فنوتیپی با استفاده از ویژگی LT_{50} (دمائی که حداقل ۵۰٪ از بوته‌ها تحت شرایط تنش سرما زنده می‌مانند) در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر[۱] ـ بخش تحقیقات غلات ـ در پاییز سال ۱۳۸۵، انجام شد. بذور والدها و ۱۷۸ نتاج $F_{2:3}$ آنها در گلخانه در گلدان‌ها کشت گردیدند. تعداد بذور برای ۱۱ سطح دمای انجماد با پنج تکرار برای هر ژنوتیپ معین شده بود. پس از جوانه‌زنی بذور، مراحل داشت شامل آبیاری، تنظیم نور با شدت ۳۵۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه و با نسبت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی و تنظیم دما در ۲۰°C به انجام رسید. دوره عادت یافتن[۲] به سرما، طی ۴ هفته در فضای آزاد مذکور سپری شد (Bagha et al., 2007). بدین ترتیب بوته‌ها جهت تهیه طوقه و انجام آزمون به روش Limin & Fowler (1988) آماده شدند. پس از تهیه طوقه‌ها، آنها را در ظروف آلومینیومی قرار داده و فضای باقیمانده ظروف با شن مرطوب به صورت فشرده پوشانده شده و سپس این ظروف به فریزر قابل برنامه‌ریزی منتقل گردیدند. آنگاه با رسیدن دمای فریزر به ۳°C-، طوقه ها با سرعت کاهش ۲ درجه سلسیوس در هر ساعت، در معرض دماهای انجماد تا ۲۳°C- قرار گرفتند. طوقه‌های متعلق به هر ژنوتیپ به ازای تحمل هر ۲°C کاهش دما، از فریزر خارج و به مدت ۱۰ ساعت برای خروج از وضعیت انجماد در دمای ۳°C+ در ا تاق رشد نگهداری شدند. آنگاه با انتقال مجدد به گلخانه رشد و تهیه بستر حاوی هوموس گیاهی مناسب در گلدان‌ها کشت و دوره بازپروری را به مدت ۳ هفته سپری کردند. رشد مجدد بوته‌ها از هر ژنوتیپ و هر سطح دمائی از طریق شمارش بوته‌های زنده مورد ارزیابی قرار گرفته، دمائی که حداقل ۵۰٪ بوته‌ها حیات خود را حفظ کردند (LT_{50})، به عنوان تحمل به تنش سرما ثبت گردید.

ارزیابی ژنوتیپی

استخراج DNA با استفاده از برگ‌های والدین و افراد F_2 در مرحله ۵-۱۰ برگی با استفاده از روش Dellaporta et al. (1983) انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. از نمونه‌های DNA پس از تعیین غلظت، نمونه‌های جدیدی با غلظت یکسان ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تهیه شدند و در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، برای آغازگرهای ریزماهواره، مورد استفاده قرار گرفتند.

برای تجزیه مولکولی علاوه بر آغازگرهای ریزماهواره از آغازگرهای AFLP نیز استفاده شد. برای تجزیه SSR، چند شکلی والدین با استفاده از ۱۷۰ جفت آغازگر ریزماهواره از سری Xgwm مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، کلرورمنیزیم ۲۵ میلی‌مولار، ۱۰ $dNTP_S$ میلی‌مولار، ۱۰x بافر PCR و ۰/۱ واحد Taq DNA Polymerase در حجم ۱۵ میکرولیتر انجام گرفت.

برنامه تکثیر به صورت ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه برای وا سرشت سازی اولیه، و متعاقب آن به روش Touchdown PCR، مرحله اول شامل ۱۲ چرخه با کاهش تدریجی دمای اتصال و مرحله دوم شامل ۲۵ چرخه با مشخصات واسرشت‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، اتصال آغازگرها به قطعات DNA با دمای مطابق با دمای مندرج در جدول آغازگرها (Roeder et al., 1998) و گسترش قطعات جدید به ترتیب در ۳۰ ثانیه و ۷۲°C بود. در سیکل آخر، مرحله بسط در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. تفکیک قطعات تکثیر با استفاده از ژل پلی آکریل آمید واسرشت‌ساز ۶ درصد انجام و برای رنگ‌آمیزی از روش نیترات نقره استفاده شد.

تجزیه چند شکلی حاصل از طول قطعات تکثیر یافته (AFLP) براساس روش Vos et al. (1995) انجام گرفت. هضم برشی DNA ژنومی با استفاده از دو آنزیم *Mse* I و *Pst* I انجام و قطعات حاصل به سازگارسازهای اختصاصی ۲ آنزیم مذکور متصل گردید. مرحله تکثیر

---

۱. موسسه مذکور در کرج واقع است. این منطقه در محدوده‌ای به طول جغرافیائی ۵۰/۵۶ درجه شرقی و عرض ۳۵/۳۷ درجه شمالی قرار دارد و از نظر تیپ دمائی، جزء اقلیم های سرد شناخته می شود.

2. Cold acclimatation

انتخابی با استفاده از آغازگرهای[1] *Pst* I+A و *Mse* I +CT انجام گردید. محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید واسرشت‌ساز ۶ درصد تفکیک و به روش رنگ آمیزی نیترات‌نقره آشکارسازی شدند.

تجزیه‌های آماری

مقادیر LT_{50} با استفاده از روش پیشنهادی Limin & Fowler (1988) تعیین گردیدند. امتیازدهی نوارهای SSR و AFLP بر اساس روش Lander et al. (1987) انجام شد. تجزیه پیوستگی نشانگرهای چند شکل پس از آزمون انحراف از تفرق در هر جایگاه با فرض کمتر از ۵۰ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور و لگاریتم آماره[2] ضریب درست‌نمائی (LOD) ≤ ۳ با استفاده از نرم‌افزار MAPMAKER ver 3.00 انجام شد. تبدیل نسبت‌های نوترکیبی بین نشانگرها به واحد نقشه سانتی‌مورگان از طریق تابع نقشه Kosambi (1944) انجام گرفت. برای یافتن رابطه بین داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی به منظور مکان‌یابی QTLs فرضی، تجزیه تک‌نشانگری و مکان‌یابی فاصله‌ای با استفاده از نرم‌افزار Win QTL Cartographer 2.5 (Wang et al., 2007) و LOD =۲/۵ انجام گرفت.

نتایج

تجزیه فنوتیپی

اندازه‌های LT_{50} لاینهای والدینی، میرنووسکایا ۸۰۸ و پیشتاز، برای ۱۷۸ نتاج $F_{2:3}$ در شکل ۱ ارائه شده است. در این هیستوگرام، فاصله گروه‌ها مطابق با سطوح دماهای آزمون انجماد می باشد.

این توزیع پیوسته از مقادیر LT_{50} (۳- تا ۲۳- °C) دلیل بر توارث کمی تحمل به تنش سرما در گندم است. میانگین LT_{50}، در جمعیت ۱۴/۵۲°C- بود و خطای معیار برابر با ۰/۳۲ گردید. بیش از ۵ درصد خانواده‌ها (۱۰ خانواده) دارای LT_{50} کمتر از والد حساس، پیشتاز و بیش از ۲۴ درصد خانواده‌ها (۴۴ خانواده) دارای LT_{50} بیش از والد مقاوم، میرنووسکایا ۸۰۸، بودند.

تجزیه مولکولی

نقشه پیوستگی

از مجموع ۱۷۰ جفت نشانگر ریز ماهواره (SSR)، ۲۰ نشانگر و از تعداد ۲۲ ترکیب آغازگر اختصاصی AFLP (*Mse* I+2/ *Pst* I+1) ۱۰ ترکیب بین والدین چند شکل بودند که در مجموع ۷۵ جایگاه چند شکل حاصل گردید. برای هر جایگاه، انحراف از نسبت‌های مندلی مورد انتظار، از طریق آزمون نیکوئی برازش کای‌مربع[3]، بررسی شد. برخی از نشانگرهای واجد انحراف، با سایر نشانگرها، پیوستگی نشان ندادند. بدلیل اینکه انحراف از تفرق ممکن است ضرایب نوترکیبی را تحت تاثیر قرار دهد نشانگرهای بسیار مبهم (p<0/01) قبل از تهیه نقشه پیوستگی از تجزیه حذف شدند. بدین ترتیب از بین ۷۵ نشانگر، ۲۸ نشانگر به ۶ گروه پیوستگی با متوسط فاصله ۸/۰۷ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور منتسب شدند که حدود ۲۲۶ سانتی‌مورگان ژنوم گندم را پوشش دادند. ۴۷ نشانگر دیگر در هیچ یک از گروه‌های پیوستگی قرار نگرفتند. از مجموع ۲۸ نشانگر در نقشه پیوستگی، ۳ نشانگر ریزماهواره و بقیه نشانگر AFLP بودند. هر گروه پیوستگی حداقل شامل ۲ نشانگر بود (شکل ۲).

شناسائی نشانگرهای مرتبط با تحمل به سرما

براساس تجزیه تک نشانگری ۱۰ نشانگر مرتبط با تحمل به سرما، باستثنای یک مورد، براساس موقعیت‌های نشانگرهای SSR (Roeder et al., 1998) روی کروموزم‌های 4A، 5B و 5D شناسائی شدند (جدول ۱).

جدول ۱- نشانگرهای مرتبط با تحمل به سرما در جمعیت حاصل از تلاقی میرنووسکایا ۸۰۸ با پیشتاز

نشانگر	کروموزوم	bo	b1	F(1,n-2)	P-value
CA24	5B	۱۴/۰۵۴	-۱/۶۳۳	۱۲/۸۷۶	0.000
CA21	5B	۱۴/۱۱۰	-۱/۸۶۶	۱۶/۷۴۹	0.000
Xgwm371	5B	۱۴/۱۴۰	-۱/۷۶۳	۱۵/۳۹۲	0.000
CA45	5B	۱۴/۱۰۲	-۱/۶۷۵	۱۴/۳۶۵	0.000
CA15	5B	۱۴/۱۵۰	-۱/۶۴۱	۱۲/۴۷۰	0.000
CA10	5B	۱۴/۰۸۶	-۱/۲۵۲	۷/۸۴۳	0.006
CA51	5B	۱۴/۲۵۲	-۱/۸۳۰	۱۵/۱۶۹	0.000
CA27	-	۱۳/۷۶۹	-۱/۳۶۴	۶/۶۹۲	0.010
Xgwm 397	4A	۱۴/۳۲۸	-۱/۸۰۰	۱۴/۲۰۳	0.000
Xgwm 174	5D	۱۴/۲۸۸	-۱/۳۵۶	۵/۶۰۱	0.019

۱. آغازگرهای مرحله تکثیر انتخابی، به اختصار با دو حرف C و A (CA) نمایش داده شده اند.

2. Logarithm of Likelihood Ratio

3. Chi- squar goodness-of- fit test

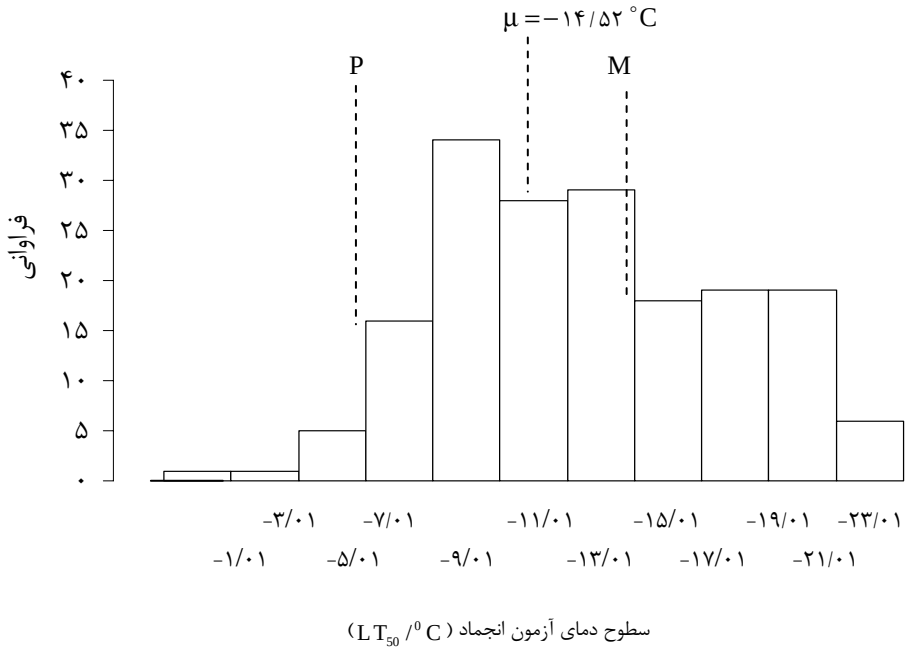
بر اساس مکان‌یابی فاصله‌ای یک ناحیه معنی‌دار شناسائی شد که LOD آن برابر با ۳/۷۸ بود (جدول ۲).

این ناحیه روی کروموزم 5B، گروه اول پیوستگی، در بین دو نشانگر CA24 و CA21، با فاصله ۰/۵۴۲ سانتی‌مورگان از نشانگر CA21 قرار داشت. هر دو نشانگر، در تجزیه تک نشانگری نیز شناسائی شده‌اند. این QTL، ۱۱/۳ درصد از تغییرات LT_{50} را در تحمل به سرما توجیه کرد (جدول ۲). در شکل ۳، منحنی حاصل از مکان‌یابی فاصله‌ای، در گروه پیوستگی ۱ دیده می‌شود.

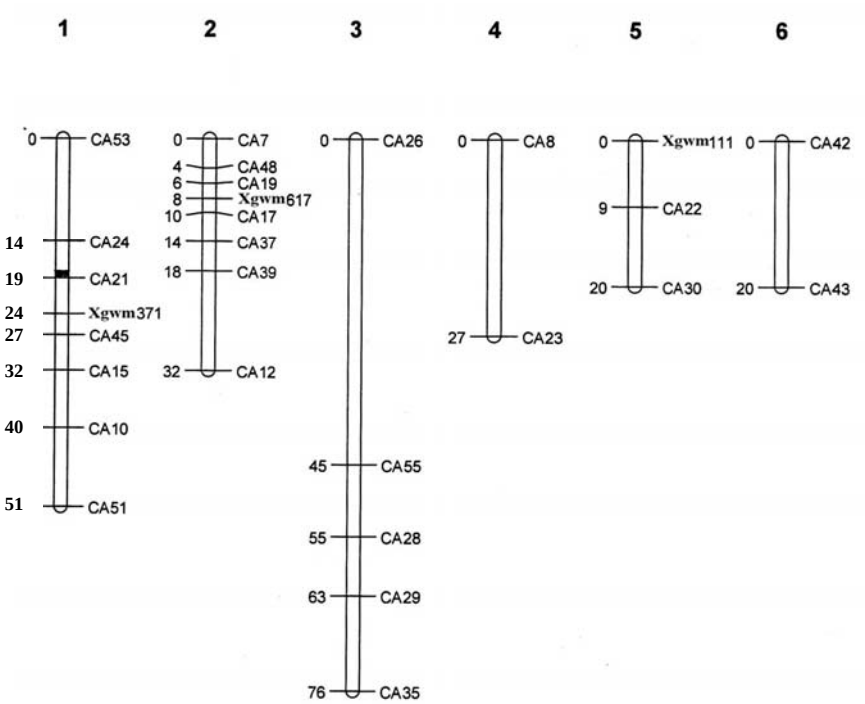
بحث

نتایج تجزیه فنوتیپی نشان داد که علاوه بر آنکه صفت تحمل به سرما، از توزیع پیوسته‌ای برخوردار است در انتخاب والدین نیز دقت لازم به عمل آمده است، زیرا تنوع ژنتیک گسترده در نتاج $F_{2:3}$ مشاهده شد. به این ترتیب با دسترسی به جمعیت در حال تفرق و رابطه‌ای که در این نوع جمعیت بین عدم تعادل لینکاژی و فاصله ژنتیکی وجود دارد، شناسائی آلل‌های کمی امکان‌پذیر گردید (de Vienne & Causse, 1998). مکان‌یابی ژن‌های مرتبط با تحمل به سرما، در تجزیه تک‌نشانگری، ۱۰ نشانگر را در این ارتباط شناسائی کرد که نشانگر واجد بالاترین آماره F، در نقشه‌یابی فاصله‌ای نیز تایید شد. Asghari et al. (2005) با استفاده از ۳۲ نشانگر ریز ماهواره، ارزیابی ژنوتیپی جمعیت F_2 کلزا را برای بررسی تحمل به سرما انجام دادند. براساس جدول ۳، نوع عمل QTL مورد نظر به صورت غالبیت ناقص $0<|d/a|<1$ می‌باشد (Sutka & Snape, 1989)، که سهم اثر افزایشی در کنترل صفت بیش از سهم اثرات غالبیت است و جهت‌های منفی این دو اثر نشان می‌دهند که آلل موثر در تحمل به سرما از والد حساس[1] به نتاج منتقل شده است و می‌بایست در برنامه‌های به‌نژادی کلاسیک، نظیر انتخاب توده‌ای، انتخاب لینه خالص و روش گزینش دوره‌ای بین خانواده‌های حاصل از خودگشنی که در تلفیق با فن‌آوری‌های مولکولی انجام می‌پذیرند، استفاده شود. Snape et al. (2001) در مروری بر تحقیقات انجام‌یافته، وجود لوکوس‌های بهاره‌سازی را برروی کروموزوم‌های گروه ۱، ۴، ۵ و ۷ مورد تایید قرار داده و نیز اعلام می‌کنند که کروموزوم‌های گروه ۵، آلل‌های کمی بزرگ اثر تعیین‌کننده تیپ زمستانه متحمل به دمای پایین و تیپ بهاره حساس به دمای پایین را شامل می‌گردند.

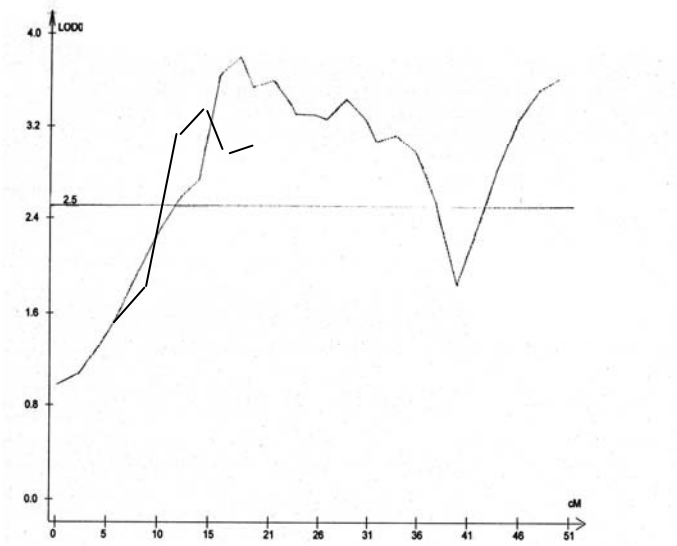
۱. جهت‌های منفی اندازه های LT50 در محاسبات، حذف شده‌اند.



شکل۱- توزیع فنوتیپی جمعیت $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی میرنووسکایا ۸۰۸ (M) با پیشتاز (P)



شکل۲- نقشه پیوستگی با استفاده از نشانگرهای SSR و AFLP در گندم هگزاپلویید
و جایگاه QTL شناسائی شده در گروه پیوستگی اوّل



شکل ۳- منحنی حاصل از مکان یابی فاصله‌ای ساده برای گروه پیوستگی اول

جدول۲- گروه پیوستگی، فاصله مکانی، شماره کروموزوم، LOD، اثرهای افزایشی و غالبیت سهم QTL شناسایی شده در توجیه واریانس تحمل به سرما در گندم هگزا پلویید

سهم در واریانس	اثرهای غالبیت	اثر افزایشی	LOD	کروموزوم	فاصله* مکانی	گروه پیوستگی	QTL
۱۱/۳	-۰/۱۳	-۲/۰۵	۳/۷۸	5B	CA21-CA24	۱	۱

*: مکان‌های ژنی چند شکل حاصل از جفت آغازگر اختصاصی AFLP(*Mse* I-CT/*Pst* I-A)

بررسی نتاج $F_{2:3}$ نشان می‌دهد که ۹۸ ژنوتیپ، این ناحیه مارکری (CA21) را از والد حساس به سرما، پیشتاز، دریافت کرده‌اند که از آن بین ۱۶ ژنوتیپ تحمل به سرمای برابر و یا کمتر از والد حساس $\geq LT_{50}$-۹°C، و ۳۳ ژنوتیپ تحمل به سرمای برابر و یا بیش از والد متحمل، میرنووسکایا ۸۰۸، $LT_{50} \leq$-۱۷°C، نشان داده‌اند و این وضعیت به وضوح نشان می‌دهد که این ناحیه نشانگری با دیگر بخش‌های ژنوم تحت تاثیرات متقابل با یکدیگر قرار دارند که با وجود دارا بودن ناحیه مذکور، در مواردی سطح پایین‌تر از والد حساس را نشان می‌دهند (Chao et al., 1989).

در این پژوهش، مقادیر LT_{50} برای ۱۷۸ خانواده $F_{2:3}$ از ۳- تا ۲۳°C- متغیر بود و میانگین داده‌های دمائی °C ۱۴/۵۲- برآورد شد. بر این اساس، بیش از ۵ درصد خانواده‌ها، ۱۰ خانواده، دارای LT_{50} کمتر ا ز والد حساس و بیش از ۲۴ درصد خانواده‌ها، ۴۴ خانواده، دارای LT_{50} بیش از والد متحمل بودند. بدین ترتیب وجود پدیده تفکیک متجاوز محتمل است و می‌تواند در صورتی که انتقال آلل‌های موثر در صفت از هر دو والد به نتاج باشد، حضور هر دو والد را در کنترل تحمل به سرما تایید کند (Chao et al., 1989)، و امکان تجمیع این آلل‌ها را در ارقام زارعی متحمل‌تر فراهم سازد. هم چنین نقش یکی از کروموزوم‌های گروه پنج گندم، 5B، در تحمل به سرما مشخص گردید.

نتایج به دست آمده، نشان می‌دهد که تحمل به سرما، صفتی کمی بوده و بنابراین تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد (de Vienne & Causse, 1987). گزینش برای این صفت در نسل‌های در حال تفکیک با استفاده از ابزارهای مکملی مانند نشانگرهای مولکولی، کارآئی گزینش و پیشرفت ژنتیک حاصل از آن را افزایش می‌دهد. و با توجه به اینکه در منابع مختلف موثر بودن اثرات افزایشی و غالبیت ژن‌ها در کنترل تحمل به سرما گزارش شده است (Sutka & Snape, 1989) در نتیجه شناسائی QTLs با اثرهای افزایشی و غالبیت مرتبط با تحمل به سرما و نشانگرهای مرتبط با این QTLs، می‌تواند در برنامه‌های گزینش و اصلاح برای این صفت راهگشا باشد. همچنین استفاده از نشانگرها و ژن‌های کاندید مرتبط با تحمل به سرما که روی کروموزوم‌های گروه پنج شناسایی شده‌اند و در بانک‌های اطلاعاتی وجود دارند، می‌توانند باعث تسریع در تحقیقات مولکولی ذیربط گردند.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر، با پشتیبانی حوزه معاونت پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و موسسه بیوتکنولوژی گیاهی و موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر وزارت جهاد کشاورزی به انجام رسیده است. بدین وسیله از تمامی اساتید و کارشناسان تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Asghari, A., Mohammadi, S. A., Moghadam, M., Tourchi, M. & Dabbagh Mohammadi Nasab, A., (2005). QTL mapping of genes controlling cold resistance in Colja using microsattelite markers. *Iranian Journal of Crop Science*, 7 (3), 202-211. (In Farsi).
2. Khalili, A., Hajam, S. & Irannejad, P. (1991). *The comprehensive water country project (climate knowing of Iran- climatic divisions)*. Ministry of Energy Publication, Pp. 274. (In Farsi).
3. Baga, M., Chodaparambil, S. V., Limin, A. E., Pecar, M., Fowler, D. B. & Chibbar, R. N. (2007). Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low temperature tolerance in cold hardy winter wheat. *Funct Integr Genomics*, 7, 53-68.
4. Chao, S., Sharp, P. J., Worland, A. J., Warham, E. J. & Koebner, R. M. D. (1989). RFLP- based genetics maps of wheat homologous group 7 chromosomes. *Theor Appl Genet*, 78, 495-504.
5. Dellaporta, S., Wood, L. & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation. *Plant Mol Biol Reporter*, 1 (14), 19-21.
6. Fowler, D. B., Dvorak, J. D. & Gusta, L. V. (1983). *Breeding for winter hardiness in wheat*. D.B. Fowler, et al. (eds), University of Saskatchwan, printing services. Saskatoon. Pp. 136-184.
7. Fowler, D. B., Chauvin, L. P., Limin, A. E. & Sarhan, F. (1996). The regulatory role of vernalization in the expression of Low- temperature- induced genes in wheat and rye. *Theor Appl Genet*, 93, 554-559.
8. Gill, K. S., Gill, B. S. & Endo, T. R. (1993). A chromosome region- specific mapping strategy gene-rich telomeric ends in wheat. *Chromosoma*, 102, 374-381.

9. Galiba, G., Quarri, S. A., Sutka, J., Morgounov, A. & Snape, J. W. (1995). RFLP mapping of the vernalization vrn1 and frost resistance Fr1 genes on chromosome 5A of wheat. *Theor Appl Genet*, 90, 1174-1179
10. Kosambi, D. D. (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen*, 12, 172-175.
11. Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daley, M. J., Lincoln, S. E. & Newburg, L. (1987). MAPMAKER: an interactive computer pakage of constructing primary genetic linkage map of experimental and natural populations. *Genomics*, 1, 174-181.
12. Limin, A. E. & Fowler, D. B. (1988). Cold hardiness expression in interspecific hybrids and amphiploids of the Triticeae. *Genome*, 38, 361-365.
13. Roeder, M. S., Korzum, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P. & Ganal, M. W. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149, 2007-2023.
14. Snape, J. W., Butterworth, K., Witechurch, E. & Worland, A. J. (2001). Waiting for fine times: genetics of flowering time in wheat. *Euphytica*, 119, 185-190.
15. Sutka, J. & Snape, J. W. (1989). Location of gene for frost resistance on chromosome 5A of wheat. *Euphytica*, 42, 41-44.
16. Thomashow, M. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Plant Mol Biol*, 50, 571-599.
17. de Vienne, D. & Causse, M. (1998). *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. D.de Vienne, (ed), Science Publishers Inc., USA, Pp.117-118.
18. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Homes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acides Res* 23, 4407-4414.
19. Wang, S., Basten, C. J. & Zeng, Z. B. (2007). *Windows QTL Cartographer 2.5*. Department of statistics, North Carolina university, USA.