مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

مکان یابی QTL های کنترل کننده تمایز ایزوتوپ های کربن در چغندرقند در شرایط بدون تنش و تنش خشکی

اباذر رجبی
عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند
کرج، بلوار شهید فهمیده، مجموعه مؤسسات تحقیقاتی کشاورزی کشور، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند صندوق پستی ۴۱۱۴-۳۱۵۸۵
abazar.rajabi@yahoo.com

چکیده: کارایی مصرف آب می تواند به حفظ و حتی افزایش عملکرد در شرایط تنش خشکی کمک نماید. تبعیض ایزوتوپ های کربن (دلتا) معیار غیرمستقیم کارایی مصرف آب می باشد. به منظور شناسایی نواحی ژنومی دلتا، ۱۴۲ فامیل $F_{2:3}$ چغندرقند در سال ۱۳۸۹ در کرج مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه پیوستگی با استفاده نشانگرهای ریزماهواره (SSR) و چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) انجام شد. در دو شرایط تنش و بدون تنش خشکی، هفت QTL برای دلتا مکان یابی شد. QTL های این صفت در شرایط بدون تنش روی گروه های پیوستگی ۳، ۶، ۷، ۸ و ۹ و در شرایط تنش روی گروه های پیوستگی ۷ و ۹ قرار داشتند که نشان می دهد دو گروه پیوستگی ۷ و ۹ در کنترل ژنتیکی این صفت نقش مهمی دارند. میزان واریانس فنوتیپی توجیه شده بوسیله هر QTL از ۱۰/۶۳ تا ۲۵/۷۰ درصد در شرایط بدون تنش و از ۱۰/۶۰ تا ۱۰/۹۸ درصد در شرایط تنش متغیر بود. اثر افزایشی مثبت برای QTL های شناسایی شده بیانگر انتقال آلل های مطلوب از والد S501 به نتاج در جایگاه های مذکور می باشد. نشانگرهای دارای پیوستگی زیاد با QTL های بزرگ اثر (qDel3n و qDel7n)، می توانند در گزینش لاین های برتر مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: تنش خشکی، دلتا، چغندرقند، نشانگر، QTL

QTL mapping for carbon isotope discrimination in sugar beet under non-stress and water-deficit stress conditions

Abazar Rajabi
Sugar Beet Seed Institute (SBSI), Karaj, Iran
abazar.rajabi@yahoo.com

Abstract: Water use efficiency (WUE) can help maintain or even increase yield in drought stress condition. Carbon isotope discrimination (Delta) is an indirect measure of WUE. In order to identify the genomic regions of Delta, 142 $F_{2:3}$ families of sugar beet were studied in Karaj, Iran in 2010. Linkage analysis was carried out using simple sequence repeat (SSR) and single nucleotide polymorphism (SNP) markers. In the two water treatments, 7 QTLs were identified for Delta. The QTLs were located on the linkage groups 3, 6, 7, 8 and 9 in non-stress condition and on the linkage groups 7 and 9 in stress condition, indicating the important role of the linkage groups 7 and 9 in the genetic control of the trait. The proportion of variance explained by each QTL of Delta ranged from 10.63 to 25.70% in non-stress and from 10.60 to 10.98% in stress conditions. The positive, additive effect of the QTLs identified indicates that the desirable alleles have been transferred from the parent S501 to the progenies in the above-mentioned genomic regions. The markers tightly linked with the major QTLs (qDel3n and qDel7n) can be used for selection of the superior lines.

Keywords: water-deficit stress, Delta, sugar beet, marker, QTL.

مقدمه

تنش خشکی یکی از مهمترین عوامل محدود کننده تولید محصولات زراعی در مناطق خشک و نیمه خشک جهان از جمله ایران می باشد. تهیه و معرفی ارقام متحمل به خشکی برای این مناطق از اهمیت خاصی برخوردار است. کارایی مصرف آب (WUE، مقدار ماده خشک تولید شده به ازاء یک واحد آب مصرف شده)، صفتی است که بهبود آن به ویژه در محیط های کم آب، به عنوان یک صفت مطلوب محسوب می شود. وقتی منابع آب محدود است بهبود WUE می تواند به حفظ یا حتی افزایش عملکرد کمک نماید. تنوع ژنتیکی برای WUE در گیاهان زرعی مختلف همچون گندم [1]، برنج [2]، بادام زمینی [3]، لوبیا چشم بلبلی[4] و چغندرقند [5] گزارش شده است. با وجود این، به علت مشکل بودن اندازه گیری مستقیم WUE در مزرعه، تنوع ژنتیکی موجود در این صفت تا مدت ها مورد بهره برداری قرار نگرفت تا این که فارکوهار و ریچاردز [1] دریافتند که WUE با تمایز ایزوتوپ های کربن (موسوم به دلتا) در گیاهان سه کربنه (C_3) رابطه منفی دارد. این رابطه در چندین گیاه زراعی سه کربنه از جمله گندم [1]، جو [6]، بادام زمینی[7] ، لوبیا چشم بلبلی[4] و چغندرقند [5, 8] در آزمایش های گلخانه ای و مزرعه ای مشاهده شده است. بالا بودن وراثت پذیری و پایین بودن اثر متقابل ژنوتیپ و محیط برای دلتا [3, 4, 5] نشان می دهد که می توان از این صفت به عنوان یک معیار گزینش برای افزایش WUE در گونه های C_3 استفاده کرد. با انجام گزینش براساس دلتا، دو رقم گندم (Drysdale و Rees) در استرالیا اصلاح و در اختیار کشاورزان قرار گرفته است که در شرایط تنش خشکی شدید بطور متوسط ۱۰ درصد عملکرد دانه بالاتری نسبت به ارقام شاهد دارند [9] .

یکی از روش های موثر برای بهبود عملکرد در شرایط تنش خشکی، شناسایی مکانهای ژنی صفات کمی (QTL) و سپس انتخاب به کمک نشانگر است. تجزیه QTL و شناسایی QTL های مرتبط با تحمل به خشکی در گیاهان زراعی مختلف از جمله گندم، جو، ذرت، سورگوم، پنبه و برنج صورت گرفته است [10, 11, 12, 13, 14, 15] . اما این روش تاکنون برای تنش های غیرزیستی در چغندرقند به کار گرفته نشده است. هدف از این تحقیق، مکان یابی QTL های کنترل کننده تمایز ایزوتوپ های کربن در چغندر قند در دو شرایط بدون تنش و تنش کم آبی و معرفی نشانگرهای پیوسته با آنها به منظور انتخاب به کمک نشانگر است.

مواد و روش ها

در این تحقیق، ۱۴۲ فامیل $F_{2:3}$ به همراه دو والد اولیه در قالب یک طرح لاتیس ساده ۱۲×۱۲ در دو شرایط بدون تنش و تنش کم آبی در ایستگاه تحقیقات مهندس عبدالرسول مطهری کرج در سال ۱۳۸۹ مورد بررسی قرار گرفتند. هر کرت شامل دو خط به طول ۳/۵ متر با فاصله ردیف ۵۰ سانتی متر بود که در تاریخ ۲۵ خرداد کشت شد. فاصله بین بوته ها روی ردیف بعد از تنک ۲۰ سانتی متر بود. تا مرحله تنک و وجین (استقرار بوته) آبیاری ها (با سیستم نشتی) در هر دو شرایط به طور یکسان و براساس ۹۰ میلی متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A صورت گرفت، اما بعد از آن، آبیاری گیاهان در شرایط تنش براساس ۲۰۰ میلی متر تبخیر ادامه یافت. در طول فصل رشد، ۵ نمونه برگ از هر کرت برای اندازه گیری دلتاگرفته شد.

برای اندازه گیری دلتا ابتدا نمونه های برگ خشک شده مذکور با یک آسیاب ساچمه ای (Retsch Mixer Mill, MM 200, UK) پودر شدند و از هر نمونه مقدار یک میلی گرم توزین و ترکیب ایزوتوپی آن ($\delta^{13}C$) به وسیله دستگاه اسپکترومتر (IRMS, Europa Scientific, Crewe, UK) و براساس رابطه ۱ اندازه گیری شد:

$$\delta^{13}C=[(R_{\text{گیاه}}-R_{\text{استاندارد}})/R_{\text{استاندارد}}]\times 1000 \quad (۱)$$

که در این رابطه: R که مخفف Ratio یا نسبت می باشد عبارت از نسبت $^{13}C/^{12}C$ بوده و برحسب قسمت در هزار (ppm) بیان می شود. ترکیب ایزوتوپی مواد گیاهی با توجه به یک استاندارد بین المللی به نام Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) که یک سنگ آهک فسیلی در کارولینای جنوبی می باشد و با دقت یک دهم در هزار تعیین گردید. ترکیب ایزوتوپی این استاندارد را براساس قرارداد، صفر در نظر گرفته و ترکیب ایزوتوپی هوا یا مواد گیاهی را براساس آن می سنجند. تفاوت های ایزوتوپی بین CO_2 موجود در هوا و CO_2 تثبیت شده در مواد گیاهی دارای مقدار مثبتی بنام Δ (دلتا) است که براساس رابطه ۲ محاسبه می شود:

$$\Delta=(\delta^{13}Ca-\delta^{13}Cp)/(1+\delta^{13}Cp) \quad (۲)$$

مقدار $\delta^{13}Ca$ را در آزمایشات معمولاً ppm ۸- در نظر می گیرند. در این تحقیق، مبنای مقایسه ژنوتیپ ها از نظر ایزوتوپ های کربن، مقادیر محاسبه شده دلتا بود.

تعیین ژنوتیپ افراد در آزمایشگاه بیوتکنولوژی شرکت بذر KWS آلمان انجام شد. برای این منظور، نمونه برگی از ۱۰ بوته از هر لاین و والدین برداشت و DNA به روش CTAB [16] استخراج و کمیت و کیفیت نمونه ها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد. محصولات تکثیری به کمک الکتروفورز ژل پلی اکریلامید ۴ درصد در دستگاه ژل اسکن تفکیک شد.

پس از استخراج و تکثیر DNA، انجام الکتروفورز و نمره دهی لاین ها، نقشه لینکاژی با استفاده از ۷۵۹ نشانگر ریزماهواره (SSR) و چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) و با استفاده از نرم افزار JoinMap 4 تهیه گردید. نقشه گرافیکی کروموزومها با استفاده از نرم افزار MapChart v. 2.1 [17] ایجاد شد. تجزیه QTL با روش مکان یابی فاصله ای مرکب [18] و با استفاده از نرم افزار PlabMQTL [19] برای شرایط بدون تنش و تنش کم آبی بطور جداگانه انجام شد. مقادیر LOD بالای ۲/۵ به عنوان معیار وجود QTL در نظر گرفته شد. برای QTL های شناسایی شده، اثر افزایشی و درصد تبیین واریانس فنوتیپی صفت محاسبه شد.

نتایج و بحث

بررسی فنوتیپی دلتا حاکی از تنوع کمی و پیوسته آن بود و توزیع فراوانی نرمالی را در هر دو شرایط بدون تنش و تنش کم آبی نشان داد. دو لاین والدینی برای دلتا به طور واضحی از یکدیگر متمایز شدند. با توجه به نقشه پیوستگی، ۷۵۹ نشانگر SSR و SNP توزیع یکنواختی در ۹ گروه پیوستگی ژنی داشتند. نقشه پیوستگی حاصل، ۸۹۶/۵ سانتی مورگان از ژنوم چغندرقند را پوشش داد و میانگین تراکم، تقریبا" یک نشانگر در هر سانتی مورگان بود. ریف و همکاران [20] نیز میانگین فاصله ژنتیکی بین نشانگرهای مجاور در یک جمعیت نقشه یابی چغندرقند را ۳ سانتی مورگان گزارش کردند.

در شرایط بدون تنش، پنج QTL برای صفت دلتا (*qDel3n*، *qDel6n*، *qDel7n*، *qDel8n* و *qDel9n* به ترتیب با اثر افزایشی ۰/۲۸ ، ۰/۱۶، ۰/۳۵، ۰/۲۱ و ۰/۲۱ روی کروموزوم های ۳، ۶، ۷، ۸ و ۹) شناسایی شد. محدوده LOD برای QTL های دلتا از ۳/۳۹ تا ۸/۹۶ متغیر بود. مجموع سهم واریانس فنوتیپی تبیین شده بوسیله QTL های مربوط به دلتا ۸۹/۲۳ درصد بود (جدول ۱). اثر همه QTL های دلتا در این شرایط در سطح احتمال کوچکتر از ۰/۱ درصد معنی دار بود.

در شرایط تنش، دو QTL برای دلتا (*qDel7s* با اثر افزایشی ۰/۲۸ و *qDel9s* با اثر افزایشی ۰/۲۳ به ترتیب روی کروموزوم های ۷ و ۹) مشاهده شد. میزان LOD برای دو QTL دلتا برابر ۳/۳۸ و ۳/۵۱ بود. مجموع سهم واریانس فنوتیپی توجیه شده بوسیله QTL های مربوط به دلتا ۲۱/۵۸ درصد بود (جدول ۱). اثر QTL های این صفت در این شرایط در سطح احتمال کوچکتر از ۰/۱ درصد معنی دار بود

با مقایسه دو شرایط ملاحظه می شود که تعداد QTL های دلتا در شرایط تنش نسبت به شرایط بدون تنش کاهش پیدا کرده است. این نتیجه با نتایج سایر محققین مطابقت دارد [21, 22] . یکی از دلایل احتمالی این امر این است که این صفت از نظر ژنتیکی پیچیده است [23] و بیان آن در برگ ها و سایر بافت های گیاهی بستگی به میزان آب قابل دسترس گیاه دارد. ربتزکه و همکاران [24] گزارش کردند که کمتر بودن میزان آب قابل استفاده خاک، هدایت روزنه ای را کاهش می دهد که می تواند واریانس ژنتیکی و وراثت پذیری دلتا را کاهش دهد.

هر یک از QTL های دلتا در هر دو شرایط بطور متوسط بیش از ۱۰ درصد واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه کردند (جدول ۱). ربتزکه و همکاران [24] با مطالعه سه توده در حال تفرق گندم، تعداد ۹ تا ۱۳ عدد QTL برای دلتا شناسایی کردند که سهم آنها در توجیه تغییرات این صفت بین ۱ تا ۱۰ درصد بود. تاکائی و همکاران [25] پنج QTL برای دلتا در برنج شناسایی کردند. لازا و همکاران [26] پنج QTL برای دلتا پیدا کردند. آدیرجو و همکاران [22] تعداد نه QTL برای کارایی مصرف آب و هشت QTL برای دلتا در دو شرایط تنش و بدون تنش کم آبی در آفتابگردان پیدا کردند و دریافتند که این دو صفت دارای همبستگی زیادی با یکدیگر بوده و از کنترل ژنتیکی مشترکی برخوردار هستند.

جدول ۱. جایگاه ژنومی دلتا و نشانگرهای مولکولی پیوسته با آن در شرایط بدون تنش و تنش کم آبی

QTL	کروموزوم	نشانگر چپ	نشانگر راست	موقعیت QTL	فاصله از نشانگر چپ	فاصله از نشانگر راست	LOD	اثر افزایشی	واریانس فنوتیپی (درصد)	سطح احتمال
شرایط بدون تنش										
qDel3n	3	c73292	c72926	107	4	2	7.35	0.286	21.62	0.0000001
qDel6n	6	c86205	c83027	57	1	4	3.39	0.164	10.63	0.00010
qDel7n	7	c62458	c62803	29	1	2	8.96	0.350	25.70	0.0000001
qDel8n	8	c14812	c13594	69	3	2	5.30	0.217	16.10	0.000001
qDel9n	9	c32197	c31086	62	3	2	4.97	0.211	15.18	0.000003
شرایط تنش										
qDel7s	7	c64247	c64279	36	3	2	3.51	0.284	10.98	0.0001
qDel9s	9	c30492	c33659	1	1	5	3.38	0.235	10.60	0.0001

نتیجه گیری

مطالعه حاضر برای اولین بار QTL های مربوط به تمایز ایزوتوپ های کربن (دلتا) در چغندرقند در شرایط تنش و بدون تنش کم آبی را شناسایی نمود. در مجموع، هفت QTL مرتبط با دلتا شناسایی شد. برای این صفت در شرایط بدون تنش، پنج QTL روی کروموزوم های شماره ۳، ۶، ۷، ۸ و ۹ شناسایی شد که اثر افزایشی آنها به ترتیب معادل ۰/۲۸۶ ، ۰/۱۶۴، ۰/۳۵۰، ۰/۲۱۷ و ۰/۲۱۱ بود. در شرایط تنش، مکان های شناسایی شده برای دلتا روی کروموزوم های شماره ۷ و ۹ قرار داشتند که اثر افزایشی آنها به ترتیب معادل ۰/۲۸۴ و ۰/۲۳۵ بود. برخی از QTL های شناسایی شده (*qDel3n* و *qDel7n*) با تبیین درصد بالاتری از تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه به عنوان QTL بزرگ اثر شناخته شدند که نشانگرهای پیوسته با این QTL ها می توانند در برنامه های اصلاح به کمک نشانگر جهت گزینش لاینهای برتر و انتقال آلل های مطلوب مورد استفاده قرار گیرند.

منابع مورد استفاده

1.Farquhar, G.D. and R.A. Richards, "Isotopic composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes", Aust. J. Plant Physiol. 11: 539–552 (1984).
2.Dingkuhn, M., G.D. Farquhar, S.K. De Datta and J.C. O'Toole, "Discrimination of 13C among upland rice having different water use efficiencies", Aust. J. Agric. Res. 42: 1123–1131 (1991).
3.Wright, G.C., K.T. Hubick and G.D. Farquhar, "Discrimination in carbon isotopes of leaves correlates with water use efficiency of field-grown peanut cultivars", Aust. J. Plant Physiol. 15: 815–825 (1988).
4.Ismail, A.M. and A.E. Hall, "Inheritance of carbon isotope discrimination and water use efficiency in cowpea", Crop Sci. (33): 498–503 (1993).
5.Rajabi A., H. Griffiths, E.S. Ober, W. Kromdijk and J.D. Pidgeon, "Genetic characteristics of water use related traits in sugar beet", Euphytica.160: 175-187 (2008).
6.Hubick K.T. and G.D. Farquhar, "Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gained to water lost in barley cultivars", Plant, Cell and Environment. 12: 795-804 (1989).
7.Hubick, K.T., G.D. Farquhar and R. Shorter, "Correlation between water-use efficiency and carbon isotope discrimination in diverse peanut (*Arachis hypogaea*) germplasm", Plant Physiology. 13: 803-816 (1986).
8.Rajabi, A., E. Ober and E. Griffiths, "Genotypic variation for water use efficiency, carbon isotope discrimination, and potential surrogate measures in sugar beet", Field Crops Res. 112: 172-181 (2009).
9.Condon, A.G., R.A. Richards, G.J. Rebetzke and G.D. Farquhar, "Breeding for high water use efficiency. Journal of Experimental Botany", 55: 2447-2460 (2004).
10.Baum, M., S. Grando, G. Backes, A. Jahoor, A. Sabbagh and S. Ceccarelli, "QTLs for agronomic traits in the Mediterranean environment identified in recombinant inbred lines of the cross 'Arta'×H.spontaneum 41-1", Theoretical and Applied Genetics. 107:1215-1225 (2003).
11.Bidinger, F.R., T. Nepolean, C.T. Hash, R.S. Yadav and C.J. Howarth, "Quantitative trait loci for grain yield in pearl millet under variable post-flowering moisture conditions", Crop Science. 47: 969–980 (2007).

12.Harris, K., P.K. Subudhi, A. Borrell, D. Jordan, D. Rosenow, H. Nguyen, P. Klein, R. Klein and J. Mullet, "Sorghum stay-green QTL individually reduce post-flowering drought-induced leaf senescence", J Exp Bot. 58:327–338 (2007).
13.Levi, A., L. Ovnat, A.H. Paterson and Y. Saranga, "Photosynthesis of cotton near-isogenic lines introgressed with QTLs for productivity and drought related traits", Plant Science. 177: 88-96 (2009).
14.Ribaut, M.J. and M. Ragut, "Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives". J Exp Bot. 58:351–360 (2006).
15.Serraj, R., C.T. Hash, S.M.H. Rizvi, A. Sharma, R.S. Yadav and F.R. Bidinger, "Recent advances in marker-assisted selection for drought tolerance in pearl millet", Plant Production Science. 8: 332–335 (2005).
16.Saghai Maroof, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard, "Ribosimal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, choromosomal location, and population dynamics", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 8014-8018 (1984).
17.Voorrips, R.E, "MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs", Heredity. 93:77-78 (2002).
18.Zeng, Z.B, "Precision mapping of quantitative trait loci", Genetics. 136:1457-1468 (1994).
19.Utz, H.F, "PlabMQTL - Software for meta-QTL analysis with composite interval mapping. Version 0.9', Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany (2011).
20.Reif, J.C., L. Wenxin, G. Manje, P.M. Hans, M. Jens, F. Sandra, S. Axel and W. Tobias, "Genetic basis of agronomically important traits in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) investigated with joint linkage association mapping", Theor and Appl Genet. 121:1489–1499 (2010).
21.Rezaiezad, A., V. Mohammadi, A. Zali, H. Zeinali and M. Mardi, "Mapping QTLs controlling yield and yield components of oilseed rape under normal irrigation and drought stress conditions", Journal of Seed and Plant Improvement. 27(1): 199-218 (2011).