

مکان‌یابی QTL‌های پیوسته با شاخص‌های تحمل شوری در ژنوم آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.)

فریبا مرسلی آقاجری^۱، رضا درویش زاده^{۲*}، حمید حانمی ملکی^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲. استاد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳. استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۰۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۲

چکیده

تنش شوری نه تنها از طریق کاهش حاصلخیزی، بلکه از طریق تجمع و سمیت ناشی از یونهای سدیم و کلر اثر منفی روی رشد و نمو و عملکرد گیاه دارد. با استفاده از شاخص‌های تحمل می‌توان ارقام با عملکرد بالا در شرایط نرمال و تنش شوری را شناسایی نمود. در تحقیق حاضر، به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با شاخص‌های تحمل به شوری، ۵۹ لاین خویش آمیخته نوترکیب آفتابگردان حاصل از تلاقی PAC2 × RHA266 به همراه والدین در شرایط محیطی نرمال و تنش شوری به صورت آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با شاخص‌های تحمل به تنش، از نقشه پیوستگی با ۲۱۰ نشانگر SSR و ۱۱ نشانگر SNP در ۱۷ گروه پیوستگی استفاده گردید. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه همبستگی، شاخص‌های GMP، MP و HM به عنوان مناسب‌ترین شاخص‌ها برای شناسایی ارقام متحمل به شوری در آفتابگردان روغنی معرفی می‌شوند. در نمودارهای سه بعدی عملکرد در شرایط نرمال و تنش شوری با هر یک از شاخص‌های فوق‌الذکر، لاین‌های C148، C98b، C106، C62، C108، C153، LR1، C70a، C62، C134a، C142، C61، C86 قرار گرفتند. در تجزیه QTL با استفاده از نقشه پیوستگی در مجموع ۵ نشانگر مولکولی پیوسته با شاخص‌های تحمل به شوری شناسایی گردید. می‌توان با نشانگرهای مولکولی مرتبط با شاخص‌های تحمل به شوری در صورت تأیید، گزینش برای تحمل را در شرایط نرمال و مرحله گیاهچه انجام داد.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان روغنی، شاخص‌های تحمل، لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب، مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب.

مقدمه

استفاده بهینه از اراضی متأثر از شوری و منابع آب شور، شناسایی و انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به شوری یک رویکرد مهم به نژادی می‌باشد (Mirmohammadi Meybodi and Ghareyazi, 2002).

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) از نظر گیاه-شناسی، گیاهی دو لپه‌ای، یک‌ساله، یک پایه و دگرگرده‌افشان و بومی آمریکای شمالی می‌باشد (Muller et al., 2009). این گیاه دانه روغنی اغلب به خاطر روغن خوراکی آن کشت می‌شود (Hu et al., 2010). مس و

تنش‌های غیر زنده از قبیل خشکی، شوری، دمای پایین یا بالا، تابش اشعه UV و غیره به طور قابل توجهی رشد و عملکرد گیاهان را کاهش می‌دهند (Tuteja et al., 2012). در این میان، تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زنده محیطی است که با کاهش حاصلخیزی خاک، اثر منفی روی رشد و بهره‌وری گیاهان در سراسر جهان دارد (Khan and Panda, 2008). متأسفانه به دلیل مدیریت غلط آبیاری و بهره‌برداری زیاد از خاک و بالا آمدن سطح آب‌های زیرزمینی، وسعت خاک‌های متأثر از شوری رو به افزایش است. به منظور

هافمن (Mass and Hoffman, 1997) آفتابگردان را به عنوان یک گیاه نیمه حساس به شوری معرفی کردند که در شوری‌های ۷ تا ۸ دسی‌زیمنس بر متر حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد کاهش عملکرد نشان می‌دهد. در آزمایش لیو و شی (Liu and Shi, 2010) با افزایش شوری از سطح صفر به ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر سرعت فتوسنتز خالص، غلظت هدایت روزنه‌ای و محتوای کلروفیل a و b در آفتابگردان کاهش یافت. در آزمایشی دیگری که توسط رادی و همکاران (Rady et al., 2011) انجام گرفت، با افزایش سطوح شوری از ۲ به ۸ دسی‌زیمنس بر متر غلظت سدیم افزایش و غلظت عناصر پتاسیم، فسفر، نیتروژن، منیزیم، آهن، روی و مس و همچنین نسبت پتاسیم به سدیم در اندام هوایی کاهش یافت.

معیارهای مختلفی برای انتخاب ژنوتیپ‌ها بر اساس نمودشان در محیط‌های واجد یا فاقد تنش پیشنهاد شده است. شاخص تحمل تنش (STI)^۱ و میانگین هندسی بهره‌وری (GMP)^۲ که توسط فرناندز (Fernandez, 1992) معرفی شده‌اند قادر به شناسایی ژنوتیپ‌هایی با عملکرد بالا در هر دو شرایط می‌باشند، بنابراین شاخص مناسبی برای انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به تنش محسوب می‌شوند. روزیل و هم‌بلمین (Rosielle and Hamblin, 1981) شاخص تحمل (TOL)^۳ و شاخص میانگین بهره‌وری (MP)^۴ را معرفی نمودند که TOL تفاوت عملکرد گیاه در دو شرایط متفاوت و MP میانگین تولید در شرایط تنش و عدم تنش می‌باشد. مقادیر بالای شاخص TOL بیانگر حساسیت بیشتر به تنش بوده و هرچه مقدار آن کمتر باشد، مطلوب‌تر است. فرناندز (Fernandez, 1992) ارقام را از نظر واکنش آنها در شرایط تنش و نرمال به چهار گروه: ژنوتیپ‌هایی که عملکرد بالایی در هر دو محیط تنش و بدون تنش دارند (A)، ژنوتیپ‌هایی که عملکرد بالایی فقط در شرایط محیطی بدون تنش دارند (B)، ژنوتیپ‌هایی که عملکرد خوبی فقط در شرایط تنش دارند (C) و ژنوتیپ‌هایی که عملکرد پایینی در هر دو محیط تنش و بدون تنش دارند (D) تقسیم و گزارش کرد که شاخصی مناسب‌تر است که بتواند ژنوتیپ‌های گروه (A) را از سایر گروه‌ها متمایز نماید. بوسلاما و اسچاپایوق (Bousslama

and Hoffman, 1997) آفتابگردان را به عنوان یک گیاه نیمه حساس به شوری معرفی کردند که در شوری‌های ۷ تا ۸ دسی‌زیمنس بر متر حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد کاهش عملکرد نشان می‌دهد. در آزمایش لیو و شی (Liu and Shi, 2010) با افزایش شوری از سطح صفر به ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر سرعت فتوسنتز خالص، غلظت هدایت روزنه‌ای و محتوای کلروفیل a و b در آفتابگردان کاهش یافت. در آزمایشی دیگری که توسط رادی و همکاران (Rady et al., 2011) انجام گرفت، با افزایش سطوح شوری از ۲ به ۸ دسی‌زیمنس بر متر غلظت سدیم افزایش و غلظت عناصر پتاسیم، فسفر، نیتروژن، منیزیم، آهن، روی و مس و همچنین نسبت پتاسیم به سدیم در اندام هوایی کاهش یافت.

از آنجایی که برای محاسبه شاخص‌های تحمل نیاز به ارزیابی ژنوتیپ‌ها در هر دو شرایط نرمال و تنش است؛ می‌توان با شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با شاخص‌های تحمل، گزینش ژنوتیپ‌های متحمل را در شرایط نرمال و مرحله گیاهچه انجام داد (Hatami Maleki et al., 2014). یکی از روش‌های مهم برای شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات، نقشه‌یابی پیوستگی^۶ است. مطالعات زیادی در زمینه شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفات مختلف از قبیل مقاومت به بیماری فوما (*Phoma macdonaldii*) حاتمی ملکی و همکاران (Hatami Maleki et al., 2014)، اسکروتینا (*Sclerotinia sclerotiorum*) داور و همکاران (Davar et al., 2010)، مقاومت به خشکی عبدی و همکاران (Abdi et al., 2012) و خصوصیات مرتبط با شکل دانه عیوض‌نژاد و همکاران (Eyvaznegad et al., 2013) در آفتابگردان انجام شده است. اطلاعات کمی در مورد تجزیه ژنتیکی شاخص‌های تحمل به شوری در آفتابگردان وجود دارد. در مطالعه‌ای که توسط رحیمی و همکاران (Rahimi et al., 2013) به منظور شناسایی QTL‌های پیوسته با شاخص‌های تحمل به خشکی در برنج انجام شد، با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب به ترتیب ۳، ۳ و ۲ QTL برای شاخص‌های HM, MP, GMP و STI شناسایی گردید. اخیراً در مطالعه‌ای که توسط حاتمی ملکی

⁴ Mean productivity

⁵ Yield stability index

⁶ Linkage mapping or family mapping

¹ Stress tolerance index

² Geometric mean productivity

³ Tolerance index

هر لاین در هر یک از ۶ گلدان در عمق ۲ سانتی‌متری خاک کاشته شد پس از استقرار گیاهچه‌ها در مرحله ۴ برگی در هر گلدان یک گیاه نگه داشته شد و ارزیابی‌ها براساس تک بوته در سه تکرار انجام گرفت. جهت دستیابی به شوری ۶ دسی‌زیمنس برمتر، بر اساس مقدار شوری اولیه خاک هر گلدان مقدار ۹/۵ گرم نمک NaCl در ۵۰۰ سی‌سی آب حل و پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله ۸ برگی به هر گلدان اضافه گردید. کنترل مقدار شوری خاک گلدان‌ها به وسیله دستگاه EC^۲ سنج انجام گرفت. از ۶ گلدان مربوط به هر لاین به سه گلدان، شوری ۶ دسی‌زیمنس برمتر اعمال و به سه گلدان شوری اعمال نگردید. اعمال شوری در دو مرحله انجام گرفت به این ترتیب که ۲۵۰ سی‌سی از محلول نمک، صبح و ۲۵۰ سی‌سی نیز بعد از ظهر همان روز اعمال گردید (Emam and Pirasteh-Anosheh, 2014). سیستم آبیاری به صورت قطره‌ای و کوددهی در چندین نوبت در طول دوره رشد رویشی گیاه انجام گرفت. آبیاری با کنترل عدم خروج آب از زهکش گلدان‌ها انجام شد. تاریخ کاشت بذرها اوایل خرداد ماه ۱۳۹۲ و طول دوره رشد گیاه تا آخر شهریور ماه همان سال به طول انجامید. برداشت در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک زمانی که پشت طبق‌ها به رنگ زرد متمایل به قهوه‌ای درآمدند انجام گرفت. با استفاده از عملکرد در شرایط نرمال (Yp) و تنش (Ys) شاخص‌های تحمل به شوری بر اساس روابط جدول ۱ محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

برای محاسبه شاخص‌های تحمل به شوری از نرم افزار Excel 2010 استفاده شد. گروه‌بندی لاین‌ها بر مبنای شاخص‌های MP, GMP, YI, YSI, TOL, STI و نیز عملکرد در شرایط نرمال و تنش شوری با استفاده از روش واریانس حداقل (Ward) با استفاده از نرم افزار Minitab 16 انجام گرفت. مقایسه میانگین صفات در گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها با استفاده از آزمون توکی در نرم افزار SPSS انجام گرفت. همبستگی شاخص‌ها با عملکرد در شرایط نرمال و تنش شوری با نرم افزار Minitab 16 محاسبه شد. به منظور انتخاب لاین‌های با تحمل بالا و عملکرد مناسب از نمودار بای پلات استفاده شد. برای رسم نمودارهای سه‌بعدی بر حسب عملکرد لاین‌ها

و همکاران (Hatami Maleki et al., 2016) در آفتابگردان انجام گردیده است، بین شاخص‌های GMP, MP, HM, YI و STI و عملکرد دانه آفتابگردان در هر دو شرایط آبیاری نرمال (Yp) و تنش خشکی (Ys) همبستگی مثبت و معنی‌دار مشاهده گردید. همچنین در این مطالعه حاتمی ملکی و همکاران (Hatami Maleki et al., 2016) گزارش کردند که QTL‌های شناسایی شده برای شاخص‌های YI, MP, GMP در گروه پیوستگی ۱۳، با QTL‌های گزارش شده برای عملکرد در آفتابگردان هم‌مکان بوده و بنابراین می‌توان شاخص‌های GMP, MP, YI را به‌عنوان مناسب‌ترین شاخص‌های گزینشی برای انتخاب لاین‌های متحمل به خشکی در آفتابگردان در نظر گرفت. هدف از پژوهش حاضر، شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با شاخص‌های تحمل به شوری به منظور استفاده از آنها در انتخاب لاین‌های متحمل به شوری در آفتابگردان روغنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش ۵۹ لاین خویش آمیخته نو ترکیب (نسل F9) آفتابگردان از میان ۱۲۵ لاین خویش آمیخته بر اساس نتایج مطالعات قبلی (Abdi et al., 2015; Amouzadeh et al., 2010; Davar et al., 2012, 2013) انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. جمعیت لاین‌ها از تلاقی (♂) PAC2 × RHA266 (♀) با استفاده از روش بالک تک‌بذری توسط انستیتو ملی تحقیقات آگرونومی^۱ فرانسه تهیه شده است. لاین پدری RHA266 از تلاقی بین ژنوتیپ وحشی *H. annuus* و Peredovik توسط وزارت کشاورزی آمریکا (USDA) و لاین مادری PAC2 در INRA فرانسه از تلاقی بین *H. petiolaris* و HA61 تولید شده‌اند. لاین‌های خویش آمیخته نو ترکیب به همراه والدین، تحت دو تیمار تنش شوری (نرمال و تنش شوری ناشی از ۶ دسی‌زیمنس برمتر) اعمال شده با NaCl، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شدند. برای انجام کارهای مربوط به کشت، گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۲۶ و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر تهیه و با خاک مزرعه و پیت ماس به نسبت ۳ به ۱ پر شدند. ابتدا ۳ بذر از

^۲ Electrical conductivity

^۱ INRA

تیمارها زمانی معنی‌دار خواهد بود که اختلاف بین آن‌ها زیاد باشد؛ بنابراین می‌توان گفت که این آزمون در مقایسه با سایر آزمون‌های رایج، دارای خطای تیپ I کمتری می‌باشد. در حقیقت انتخاب لاین‌های کاندید برای تلاقی با اطمینان بیشتری انجام می‌گیرد (اختلافات حقیقتاً معنی‌دار).

در دو شرایط نرمال و تنش و شاخص‌های مطلوب تحمل به شوری، از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. در مقایسه با سایر روش‌های مقایسه میانگین، در آزمون توکی مقدار ملاک و محک بدست آمده برای انجام مقایسات میانگین عدد بزرگتری می‌باشد و به تبع آن اختلاف بین دو به دوی

جدول ۱. شاخص‌های کمی تحمل به تنش

Table 1. Quantitative salt tolerance indices

Index name	نام شاخص	Equation	معادله	Reference	منبع
Geometric mean productivity (GMP)	میانگین هندسی بهره‌وری	$GMP = \sqrt{(Y_S)(Y_P)}$		(Kristin et al., 1997)	
Mean productivity (MP)	میانگین بهره‌وری	$MP = \frac{Y_S + Y_P}{2}$		(Rosielle and Hamblin, 1981)	
Harmonic mean (HM)	میانگین هارمونیک	$HM = \frac{2(Y_P \cdot Y_S)}{Y_P + Y_S}$		(Jafari et al., 2009)	
Tolerance index (TOL)	شاخص تحمل	$TOL = Y_P - Y_S$		(Rosielle and Hamblin, 1981)	
Stress tolerance index (STI)	شاخص تحمل به تنش	$STI = \frac{(Y_S)(Y_P)}{(\bar{Y}_P)^2}$		(Fernandez, 1992)	
Yield stability index (YSI)	شاخص پایداری عملکرد	$YSI = \frac{Y_S}{Y_P}$		(Bousslama and Schapaugh, 1984)	

Y_P و Y_S عملکرد ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش و شرایط بهینه، \bar{Y}_P و \bar{Y}_S میانگین عملکرد تمام ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش و بهینه هستند.

Y_S and Y_P present yield of a given genotype under salt stress and optimal conditions, respectively. \bar{Y}_S and \bar{Y}_P are average yield of all genotypes under salt stress and optimal conditions, respectively.

توجیه شده توسط آن (R^2) استفاده شد (Basten et al., 2002). در مکان‌یابی فاصله‌ای احتمال وجود QTL در نقاط مختلف بین ۲ نشانگر مجاور با روش‌های مختلف آماری از قبیل حداکثر در ست‌نمایی برر سی می‌شود (Lander and Botstein, 1989). مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب بسط روش مکان‌یابی فاصله‌ای با انتخاب تعدادی از نشانگرها علاوه بر نشانگرهای احاطه کننده QTL مورد آزمون، به عنوان کوفاکتور برای تفکیک تغییرات ژنتیکی ناشی از سایر QTL‌های پیوسته و یا ناپیوسته با QTL مورد نظر است (Zeng, 1994).

شنا سایی نشانگرهای پیوسته با شاخص‌های تحمل به تنش با استفاده از نقشه پیوستگی توسعه یافته توسط عموزاده و هم‌کاران (Amouzadeh et al., 2015) انجام گرفت. به طور خلاصه نقشه ژنتیکی با ۲۱۰ نشانگر SSR و ۱۱ نشانگر SNP با میانگین تراکم ۷/۴۴ سانتی‌مورگان بین نشانگرها توسعه یافته است. شناسایی QTL‌ها به روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM)^۱ در نرم‌افزار QGene انجام گرفت. سطح آستانه یا LOD برای شناسایی QTL‌های معنی‌دار از طریق آزمون جایگشت (n=1000) در نرم‌افزار تعیین شد (Churchill and Doerge, 1994). از موقعیت پیک QTL جهت تخمین درصد واریانس فنوتیپی

¹ Composite interval mapping

نتایج

تنوع ژنتیکی از نظر تحمل به شوری

تجزیه خوشه‌ای بر اساس شاخص‌های کمی مورد مطالعه، ۵۹ لاین خویش آمیخته نوترکیب آفتابگردان را در ۳ گروه مجزا قرار داد. در کلاستر اول ۳۴ لاین، کلاستر دوم ۱۴ لاین و در کلاستر سوم ۱۱ لاین قرار گرفتند (شکل ۱). بیشترین فاصله ژنتیکی (۴/۷۸) بین کلاسترهای ۱ با ۳ مشاهده شد که در واقع ناشی از وجود تنوع ژنتیکی بین ۲ مجموعه لاین‌های موجود در این دو خوشه می‌باشد (شکل ۱).

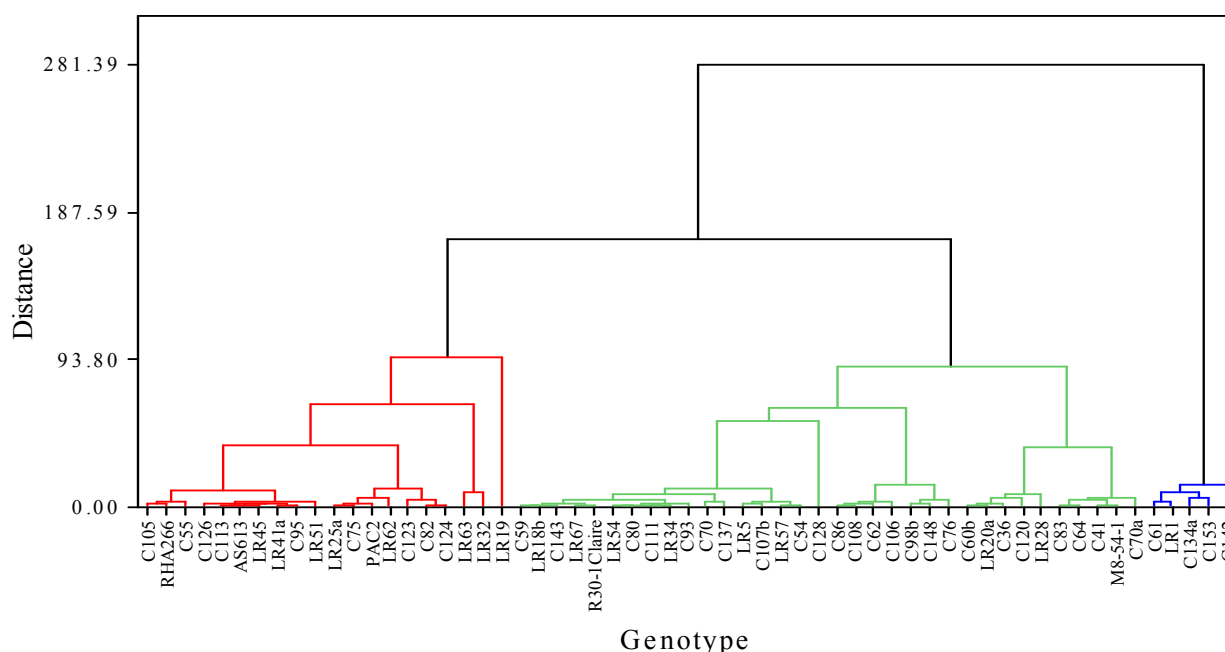
ارتباط بین شاخص‌های تحمل شوری و عملکردهای محیطی

با استفاده از تحلیل همبستگی بین عملکرد دانه در شرایط تنش شوری و نرمال و شاخص‌های کمی تحمل تنش، شاخص‌های تحمل مورد ارزیابی قرار گرفته و مناسب‌ترین شاخص‌ها انتخاب گردیدند (جدول ۲). نتایج تجزیه همبستگی نشان داد که بین شاخص‌های GMP، MP و HM باهم و با عملکرد دانه در شرایط نرمال و تنش همبستگی مثبت و بسیار معنی‌دار وجود دارد. در شرایط تنش علاوه بر شاخص‌های مذکور شاخص STI هم با

عملکرد همبستگی مثبت و معنی‌دار نشان داد (جدول ۲)؛ بنابراین می‌توان شاخص‌های GMP، MP و HM را به‌عنوان مناسب‌ترین شاخص‌ها برای انتخاب لاین‌های متحمل که در شرایط تنش و غیر تنش عملکرد بالایی دارند، در نظر گرفت.

گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به شوری

بعد از انتخاب بهترین شاخص‌های کمی تحمل به تنش شوری، به منظور گزینش لاین‌های متحمل به شوری و با عملکرد بالا در هر دو محیط تنش و بدون تنش، از نمودار سه‌بعدی استفاده شد (شکل ۲). نمودار سه‌بعدی رابطه سه متغیر Yp و Ys و یکی از شاخص‌های تحمل انتخاب شده را نشان می‌دهد که در آن عملکرد در محیط تنش روی محور Yها، عملکرد در محیط بدون تنش روی محور Xها و شاخص‌های تحمل روی محور Zها نمایش داده می‌شوند. بر اساس نمودارهای سه‌بعدی Yp و Ys با شاخص‌های GMP، MP و HM، مشاهده شد که لاین‌های C142، C61، C86، C62، C134a، C108، C153، LR1، C70a، C62، C134a، C106، C98b و C148 و LR1 در گروه A، با بیشترین مقادیر عملکرد قرار دارند.



شکل ۱. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب بر اساس شاخص‌های تحمل به شوری

Fig. 1. Dendrogram of sunflower recombinant inbred lines based on salt tolerance indices.

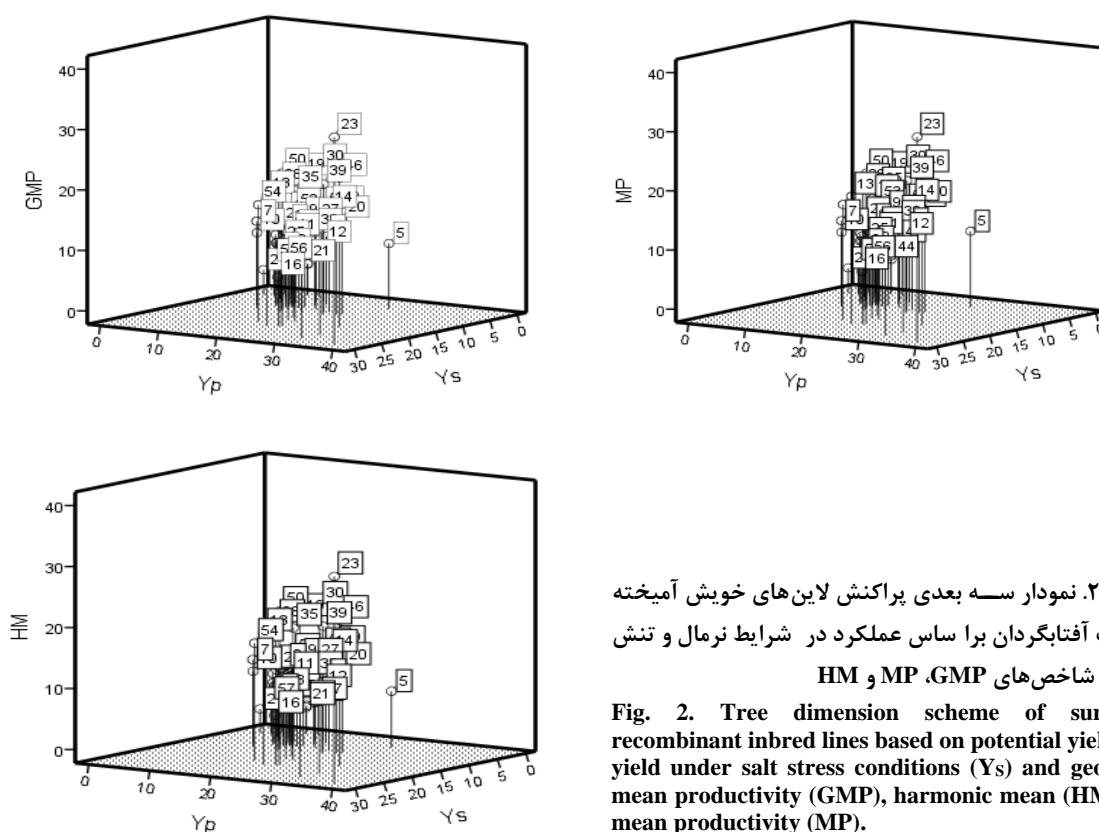
جدول ۲. ضرایب همبستگی بین عملکرد در شرایط تنش و بدون تنش و شاخص‌های تحمل به تنش شوری در آفتابگردان

Table 2. Correlation coefficient between salt tolerance indices and yield in non-stress and salt stressed conditions in sunflower

	Ys	Yp	STI	YSI	GMP	MP	TOL	HM
Ys	1							
Yp	0.82**	1						
STI	0.31*	-0.05 ^{ns}	1					
YSI	0.14 ^{ns}	-0.1 ^{ns}	0.14 ^{ns}	1				
GMP	0.94**	0.91**	0.26*	-0.02 ^{ns}	1			
MP	0.93**	0.93**	0.21 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.98**	1		
TOL	0.04 ^{ns}	0.49**	-0.33*	-0.49**	0.27*	0.34**	1	
HM	0.49**	0.88**	0.3*	-0.03 ^{ns}	0.99**	0.97**	0.21 ^{ns}	1

Ys: عملکرد در محیط تنش‌دار، Yp: عملکرد در محیط بدون تنش، TOL: شاخص تحمل، MP: میانگین بهره‌روی، GMP: میانگین هندسی بهره‌وری، HM: میانگین هارمونیک، STI: شاخص تحمل تنش، YSI: شاخص پایداری عملکرد، ^{ns}، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

Yield in salt stress conditions (Ys), Yield in normal or potential conditions (Yp), Tolerance index (TOL), Mean productivity (MP), Geometric mean productivity (GMP), Harmonic mean (HM), Stress tolerance index (STI), Yield stability index (YSI). ns, * and **: non significant, significant at (P<0.05) and (P<0.01), respectively.



شکل ۲. نمودار سه بعدی پراکنش لاین‌های خویش آمیخته نمودار سه بعدی پراکنش لاین‌های خویش آمیخته نمودار سه بعدی پراکنش لاین‌های خویش آمیخته
نوترکیب آفتابگردان بر اساس عملکرد در شرایط نرمال و تنش شوری و شاخص‌های GMP، MP و HM

Fig. 2. Tree dimension scheme of sunflower recombinant inbred lines based on potential yield (Yp), yield under salt stress conditions (Ys) and geometric mean productivity (GMP), harmonic mean (HM), and mean productivity (MP).

نشانی‌های مولکولی مرتبط با شاخص‌های تحمل به

شوری

نتایج مربوط به مکان‌یابی نشانگرهای مرتبط با شاخص‌های تحمل به شوری در جدول ۳ نشان داده شده است. اسامی QTL‌ها با استفاده از مخفف اسم لاتین شاخص‌های تحمل همراه با شماره گروه پیوستگی و شماره QTL در گروه مربوطه مشخص گردیده است. سطح آستانه یا LOD برای شناسایی QTL‌های معنی‌دار از طریق آزمون جایگشت (Churchill and Doerge, 1994) تعیین شد ($n=1000$). در ابتدا به طور تجربی برای تصمیم‌گیری در رابطه با معنی دار بودن QTL‌های شناسایی شده، سطح آستانه (LOD) ۳ یا حتی ۲ (Singh and Singh, 2015) در نظر گرفته می‌شد؛ اما بعدها بر اساس پیشنهاد (Churchill and Doerge, 1994) از آزمون جایگشت برای تعیین سطح آستانه (LOD) استفاده شد. مطابق با نتایج ما در مطالعه (Javed et al., 2015) برای اکثر QTL‌ها سطح آستانه (LOD) کمتر از ۳ می‌باشد. در مجموع ۵ QTL برای شاخص‌های تحمل و عملکرد در شرایط نرمال و تنش شوری در گروه‌های پیوستگی ۱۳ و ۱۴ شناسایی شدند (جدول ۳ و شکل ۳). دامنه واریانس فنوتیپی توجیه شده توسط QTL‌ها بین ۲۰/۱٪ تا ۲۹/۱٪ متغیر بود. برای سه شاخص تحمل

GMP، HM و MP و عملکرد در شرایط تنش و بدون تنش، یک QTL شناسایی گردید. برای عملکرد در شرایط تنش ۱ QTL در گروه ۱۴ شناسایی گردید. علامت مثبت اثرات افزایشی نشان‌دهنده انتقال آلل مثبت از والد پدری (RHA266) است. QTL مربوط به عملکرد در شرایط بدون تنش روی گروه پیوستگی ۱۳ قرار داشت و آلل مطلوب از والد پدری (RHA266) منتقل شده بود. تک QTL‌های شناسایی شده برای شاخص‌های GMP، HM و MP روی گروه پیوستگی ۱۴ نزد یک نشانگرهای SSU217 و SSU195 با ORS1043 شناسایی گردیدند و آلل‌های مطلوب برای این QTL‌ها از طریق والد RHA266 منتقل شده بودند. نتایج مربوط به جدول ۳ و شکل ۳ نشان می‌دهد چهار QTL شامل Ys.14.1، HM.14.1، MP.14.1 و GMP.14.1 روی گروه پیوستگی ۱۴ در فاصله ۱۸ تا ۲۳/۷ سانتی مورگان از ابتدای گروه پیوستگی با یکدیگر هم‌مکان می‌باشند که این نتایج، مؤید نتایج تجزیه همبستگی فنوتیپی بین شاخص‌های مذکور با عملکرد می‌باشد. زمانی که QTL‌های هم‌جایگاه به صورت دقیق مکان‌یابی شوند در انتخاب لاین‌های مناسب می‌توانند مفید واقع شوند و با وجود نشانگرهای مولکولی مناسب، گزینش بر اساس نشانگر امکان‌پذیر خواهد شد.

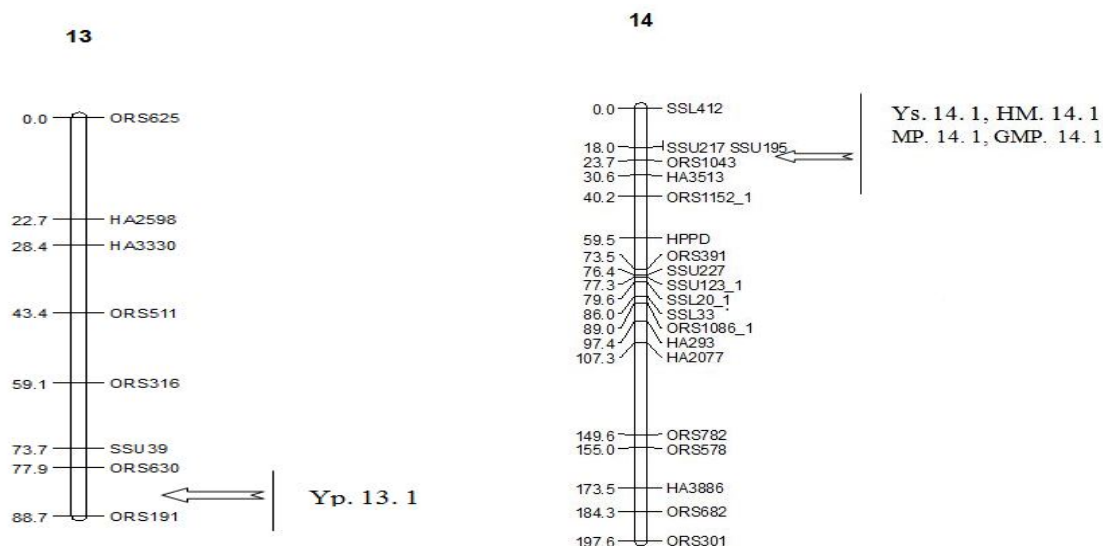
جدول ۳. موقعیت و اثر QTL‌های شناسایی شده برای شاخص‌های تحمل به شوری و عملکرد در شرایط نرمال و تنش شوری

Table 3. Map positions and genetic effect of putative QTLs detected for salt tolerance indices and yield under non-stress and salt stress conditions.

شاخص (Index)	QTL	گروه پیوستگی (Linkage group)	موقعیت QTL (QTL position)	LOD	فاصله نشانگری (Marker intervals)	اثر افزایشی (Additive effects)	R ²
Ys	Ys.14.1	14	20	2.84	SSU.17, SSU195- ORS1043	3.47	29.1
Yp	Yp.13.1	13	84	1.91	ORS191- ORS630	4.27	20.1
HM	HM.14.20	14	20	2.54	SSU.17, SSU195- ORS1043	4.04	26.5
MP	MP.14.1	14	22	2.42	SSU.17, SSU195- ORS1043	3.78	25.4
GMP	GMP.14.1	14	20	2.48	SSU.17, SSU195	3.91	26

R²: درصد واریانس فنوتیپی بیان شده به وسیله QTL. علامت منفی در اثرات افزایشی نشان‌دهنده نقش والد مادری (Pac2) در افزایش صفت و علامت مثبت در اثرات افزایشی نشان‌دهنده نقش والد پدری (RHA266) در افزایش صفت می‌باشد. موقعیت QTL: فاصله QTL از سر گروه پیوستگی بر حسب سانتی مورگان. LOD: لگاریتم بر پایه ۱۰ نسبت درست‌نمایی (نسبت درست‌نمایی که اثر بوسیله پیوستگی ایجاد می‌شود به درست‌نمایی که اثر بوسیله شانس و تصادف ایجاد می‌شود). QTL: مکان صفت کمی.

R²: percentage of phenotypic variance explained by the individual QTL. Negative sign in additive effect indicates that the positive allele comes from the maternal line (Pac2); a positive sign indicates that the resistant allele is from the paternal line (RHA266). QTL position: expressed in Kosambi cM, from the top of linkage group (LG). LOD: log₁₀ likelihood ratio (likelihood that the effect occurs by linkage/likelihood that the effect occurs by chance). QTL: quantitative trait loci.



شکل ۳. موقعیت QTL‌های شناسایی شده در نقشه پیوستگی آفتابگردان. تنها گروه‌های پیوستگی دارای QTL آورده شده است.
Fig. 3. Map positions of putative QTLs detected in sunflower linkage map. Only linkage groups comprising QTLs have been presented.

برای رسیدن به هموزیگوتی کراس‌ینگ‌اورهای فراوانی را تجربه می‌نمایند، بنابراین از مقدار همبستگی‌های ناشی از پیوستگی بین ژن‌ها کاسته شده و به احتمال زیاد همبستگی‌های قوی می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی باشند. بر اساس نتایج تجزیه همبستگی، بین شاخص‌های GMP، MP و HM باهم و با عملکرد دانه در شرایط نرمال و تنش همبستگی مثبت و معنی‌دار مشاهده شد. انتظار بر این است شاخص‌هایی که با هم همبستگی دارند، QTL‌های هم‌مکان برای آنها شناسایی شود (Rahimi et al., 2013). در سایر گیاهان زراعی نیز تحقیقات مختلفی در زمینه شاخص‌های تحمل انجام گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط Hatami Maleki et al., (2016) به منظور ارزیابی ۷۲ لاین آفتابگردان در شرایط تنش خشکی انجام گرفت، بین شاخص‌های GMP، MP، HM، YI و STI و عملکرد دانه آفتابگردان در هر دو شرایط آبیاری نرمال (Yp) و تنش خشکی (Ys) همبستگی مثبت و معنی‌دار مشاهده شد. در توتون ویرجینیا، حسنی و همکاران (Hasani et al., 2008) شاخص‌های STI، MP و GMP را به عنوان بهترین شاخص‌ها در تفکیک ارقام توتون متحمل به تنش خشکی معرفی کردند. در مطالعات مربوط به تنش شوری روی کلزا فرح‌بخش و شمس‌الدینی (Farahbakhsh and Shamseddin, 2008) روی برنج،

بحث

تنوع ژنتیکی، به‌نژادگران گیاهی را قادر می‌سازد تا به‌واسطه انتخاب و اصلاح، گیاهانی جدید و با عملکرد بیشتر تولید کنند که به تغییرات محیطی مانند شوری و غیره سازگار باشند (Faraghe et al., 2007). در این مطالعه لاین‌هایی که در کلاستر اول قرار گرفتند دارای عملکرد پایین در هر دو شرایط نرمال و تنش شوری هستند و در حقیقت جزو ژنوتیپ‌های گروه D بر مبنای تقسیم‌بندی فرناندز (Fernandez, 1992) قرار می‌گیرند. لاین‌های موجود در کلاستر سوم دارای عملکرد بالا در هر دو شرایط نرمال و تنش هستند و مطابق با تقسیم‌بندی فرناندز (Fernandez, 1992) به گروه A تعلق دارند. لاین‌های موجود در کلاستر دوم جزو گروه B، بر اساس تقسیم‌بندی فرناندز قرار می‌گیرند چرا که دارای عملکرد بالا فقط در شرایط نرمال هستند؛ بنابراین با توجه به فاصله زیاد بین ۲ خوشه ۱ و ۳ احتمالاً بیشترین موفقیت در تلاقی بین لاین‌های این دو گروه به‌دست خواهد آمد.

در تحقیق حاضر، همبستگی مشاهده شده بین عملکردهای محیطی (جدول ۲) می‌تواند به دلیل وجود پلیوتروپی یا پیوستگی نزدیک ژن‌ها باشد (Voorrips, 2002). از طرفی با توجه به اینکه لاین‌های خویش آمیخته

باشد. به عبارت بهتر، با محیط سازگاری بالایی از خود نشان دهد. دانشمندان برای انتخاب افراد با این خصوصیات شاخص‌های تحمل به تنش را معرفی کرده‌اند. برای محاسبه شاخص‌ها و بررسی سازگاری، تجزیه و تحلیل نتایج تحت هر دو شرایط تنش و بدون تنش ضروری به نظر می‌رسد. می‌توان با نشانگرهای مولکولی مرتبط با شاخص‌های تحمل به شوری در صورت تأیید، گزینش برای تحمل را در شرایط نرمال و مرحله گیاهچه انجام داد. در حقیقت می‌توان بجای ازریابی‌های مزرعه‌ای در سال‌ها و مکان‌های مختلف، از نشانگرهای مرتبط با شاخص‌ها (استراتژی گزینش به کمک نشانگر) در شرایط آزمایشگاهی استفاده نمود.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این مطالعه بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بین لاین‌های موجود در کلاسترهای ۱ با ۳ می‌باشد که به وسیله انتخاب و اصلاح می‌توان گیاهانی جدید و با عملکرد بیشتر را تولید کرد. در تجزیه QTL با استفاده از نقشه پیوستگی در مجموع ۵ نشانگر مولکولی پیوسته با شاخص‌های تحمل به شوری شناسایی گردید. نتایج نشان می‌دهد که QTL‌های شناسایی شده برای شاخص‌های GMP، MP و HM در گروه پیوستگی ۱۴، با QTL گزارش شده برای عملکرد دانه در شرایط تنش هم‌مکان هستند که این نتایج مؤید همبستگی فنوتیپی بین شاخص‌های مذکور با عملکرد دانه می‌باشد. مناطق ژنومی پیوسته با شاخص‌های مورد نظر بعد از اعتبارسنجی و نقشه‌یابی دقیق آن‌ها می‌توانند برای انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاح آفتابگردان روغنی استفاده شوند و از این طریق منجر به تسریع و کارایی بیشتر روش‌های سنتی اصلاحی شوند.

حسینی و همکاران (Hosseini et al., 2012) شاخص‌های GMP، Yp و MP را به عنوان بهترین شاخص‌ها جهت انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به شوری معرفی کردند که در توافق با شاخص‌های معرفی شده در این مطالعه می‌باشد.

در تحقیق حاضر، QTL‌های شناسایی شده برای شاخص‌های Ys، HM، MP و GMP در گروه پیوستگی ۱۴ (جدول ۳ و شکل ۳)، با QTL‌های گزارش شده توسط حاتمی ملکی و همکاران (Hatami Maleki et al., 2016) برای MP و GMP هم‌مکان می‌باشند. در پژوهش حاتمی ملکی و همکاران (Hatami Maleki et al., 2016) به منظور مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده شاخص‌های تحمل به خشکی با استفاده از ۷۲ لاین خویش آمیخته نو ترکیب آفتابگردان، QTL‌های مختلفی در تمام گروه‌های پیوستگی به جز گروه‌های ۴، ۷، ۸، ۹، ۱۱، ۱۲ و ۱۵ شناسایی گردید. در مطالعه‌ی مرسلی آقاجری و همکاران (Morasli Aghajari et al., 2015)، ۸ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفات فیزیولوژیک آفتابگردان تحت شرایط تنش شوری شناسایی کردند که QTL مربوط به عملکرد دانه در شرایط تنش شوری (GYP.S.14.1) با QTL‌های شناسایی شده در مطالعه حاضر (HM.14.1، Ys.14.1، MP.14.1 و GMP.14.1) روی گروه ۱۴ در فاصله ۱۸ تا ۲۸ سانتی‌مورگان هم‌مکان می‌باشد (جدول ۳ و شکل ۳) که این نتایج مؤید همبستگی فنوتیپی بین شاخص‌های مذکور با عملکرد دانه می‌باشد؛ بنابراین می‌توان شاخص‌های GMP، MP و HM را به عنوان مناسبترین شاخص‌های گزینشی برای انتخاب لاین‌های متحمل به شوری در نظر گرفت.

در بررسی برنامه‌های به نژادی به منظور گزینش مواد برتر، رقم ایده آل رقمی است که دارای عملکرد بالا و پایدار

منابع

- Abdi, N., Darvishzadeh, R., Hatami Maleki, H., Haddadi, P., Sarrafi, A., 2013. Identification of quantitative trait loci for relative water content and chlorophyll concentration traits in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. *Zemdirbyste-Agriculture*. 100, 159-166.
- Abdi, N., Darvishzadeh, R., Jafari, M., Pirzad, A., Haddadi, P., 2012. Genetic analysis and QTL mapping of agro-morphological traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under two contrasting water treatment conditions. *Plant OMICS Journal*. 5, 149- 158.
- Amouzadeh, M., Darvishzadeh, R., Davar, R., Abdollahi Maoulakani, B., Haddadi, P., Basirnia, A., 2015. Quantitative trait loci

- associated with isolate specific & isolate non-specific partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 17, 213-226.
- Bansal, K.C., Sinha, S.K., 1991. Assessment of drought resistance in 20 accessions of *Triticum aestivum* L. and related species. I. Total dry matter and grain yield stability. *Euphytica*. 56, 7-14.
- Basten, C.J., Weir, B.S., Zeng, Z.B., 2002. QTL Cartographer, version 1.16: Program in Statistical Genetics. Raleigh, NC, USA: North Carolina State University.
- Bousslama, M., Schapaugh, W.T., 1984. Stress tolerance in soybean. Part 1: Evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Science*. 24, 933-937.
- Churchill, G.A., Doerge, R.W., 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*. 138, 963-971.
- Davar, R., Darvishzadeh, R., Majd, A., Gousta, Y., Sarrafi, A., 2010. QTL mapping of partial resistance to basal stem rot in sunflower using recombinant inbred lines. *Phytopathologia Mediterranea*. 49, 330-341.
- Emam, Y. Pirasteh-Anosheh, H., 2014. Field and laboratory techniques in crop sciences: manual for agronomic physiological and biochemical measurements in crop plants. Jahad-e Daneshgahi Mashhad Press, pp. 108.
- Eyvaznegad, N., Darvishzadeh, R., Bernousi, I., Moghaddam, M., Hadi, H., Rahimi, M., 2013. Mapping genes controlling seed yield and traits associated with seed characteristics in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. *Agricultural Biotechnology*. 12, 63-73. [In Persian with English Summary].
- Faraghei, S.H., Farshadfar, M., Farshadfar, E. 2007. Study of chemical composition and nutrition value of perennial Lucerne (*Medicago sativa* L.) and genetic diversity based on SDS- PAGE marker. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*. 15, 196-210. [In Persian with English Summary].
- Fernandez, G.C.J., 1992. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In: *Proceedings of the International Symposium on 'Adaptation of vegetables and other food crops in temperature and water stresses*. pp. 257-27.
- Hassani, S., Pyrdashti, H.M., Mesbah, R.O., Babaian Jelodar, N.A., 2008. Evaluation of drought tolerance indices in the six cultivars Virginia (*Nicotinia tabacum* L). *Plants and Seeds Improvement Journal*. 24, 129-143 [In Persian with English Summary].
- Hatami Maleki, H., Abdi, N., Darvishzadeh, R., Jafari, M., 2016. Mapping QTLs controlling drought tolerance indices in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Crop Breeding*. 8(20), 228-235 [In Persian with English Summary].
- Hatami Maleki, H., Darvishzadeh, R., Sarrafi, A., 2014. Genetic linkage map and QTL analysis of partial resistance to black stem in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Australasian Plant Pathology*. 43, 205-213.
- Hosseini, J., Tahmasebi Sarvestani, Z., Pirdashti, H., 2012. Analysis of tolerance indices in some rice (*Oryza sativa* L.) genotypes at salt stress condition. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. 3, 1-10.
- Hu, J., Seiler, G., Kole, C., 2010. *Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower*. Routledge, USA. 342p.
- Jabbari, H., Akbari, A.A., Daneshian, J., Shahbazian, N., 2008. The index of drought tolerance in sunflower hybrids. *Journal of Crop Breeding*. 1, 1-17. [In Persian with English Summary].
- Jafari, A., Paknejad, F., Jami, M., Ahmadi, A.L., 2009. Evaluation of selection indices for drought tolerance of corn (*Zea mays* L.) hybrids. *International Journal of Plant Production*. 3, 33-38.
- Javed, N., Geng, J., Tahir, M., McVetty P.B.E., Li, G., Duncan, R.W., 2015. Identification of QTL influencing seed oil content, fatty acid profile and days to flowering in *Brassica napus* L. *Euphytica*. DOI 10.1007/s10681-015-1565-2.
- Khan, M.H., Panda, S.K., 2008. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 30, 89-91.
- Kristin, A.S., Serna, R.R., Perez, F.I., Enriquez, B.C., Gallegos, J.A.A., Vallejo, P.R., Wassimi, N., Kelley, J.D., 1997. Improving common bean performance under drought stress. *Crop Science*. 37, 43-50.

- Lander, E.S., Botstein, D., 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. 121, 185-199.
- Liu, J., Shi, D.C., 2010. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, inorganic ion and organic acid accumulations of sunflower in responses to salt and salt-alkaline mixed stress. *Photosynthetica*. 48, 127-134.
- Mass, E.V., Hoffman, G.J., 1977. Crop salt tolerance-current assessment. *J. Irrig. and Drainage Div., ASCE*. 103, 115-134.
- Mirmohammadi Meybodi, S.M., Qareyazi, B., 2002. Physiological aspects of salinity and plant breeding. Isfahan University of Technology Press. 245p. [In Persian].
- Morsali, F., Darvishzadeh, R., Abaspor, N., 2015. Mapping QTLs controlling physiological traits of sunflower under salinity stress. *Crop Biotechnology*. 5, 1-16. [In Persian with English Summary].
- Muller, M.H., Delieux, F., Fernandez-Martinez, J.M., Garric, B., Lecomte, V., Anglade, G., Leflon, M., Motard, C., Segura, R., 2009. Occurrence, distribution and distinctive morphological traits of weedy *Helianthus annuus* L. populations in Spain and France. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 56, 869- 877.
- Poormohammad Kiani, S., Grieu, P., Maury, P., Hewezi, T., Gentzbittel, L., Sarrafi, A., 2007. Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 114, 193-207.
- Rady, M.M., Sadak, M.S, El-Bassiouny, H.M.S., Abd El-Monem, A.A., 2011. Alleviation of the adverse effects of salinity stress in sunflower cultivars using nicotinamide and α -Tocopherol. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5, 342- 355.
- Rahimi, M., Rabiei, B., Dehghani, H., Tarang A.R., 2013. Mapping main and epistatic QTLs for drought tolerance indices in F5 population of rice. *Modern Genetics*. 8, 435-448. [In Persian with English Summary].
- Rezayi, M., Motamed, M.K., Yousefi Falkadeh, A.V., Amiri, A., 2010. Changes in the management of irrigation water and its impact on the performance of different rice varieties. *Water and Soil Science*. 24, 565- 573. [In Persian with English Summary].
- Rosielle, A.A., Hamblin, J., 1981. Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environment. *Crop Science* 21, 943-946.
- Shamseddin, M., Farahbakhsh, H., 2008. Investigation of quantitative and qualitative parameters of canola under salty conditions for determining the best tolerance index. *Water and Soil Science*. 12, 65- 78. [In Persian with English Summary].
- Singh, B.D., Singh A.K., 2015. *Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices*, Springer India, ISBN 978-81-322-2316-0, DOI 10.1007/978-81-322-2316-0-15.
- Tuteja, N., Gill, S.S., Tuteja, R., 2012. *Improving Crop Productivity in Sustainable Agriculture*. Wiley-Blackwell, Pp. 536.
- Voorrips, R.E., 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*. 93, 77-78.
- Zeng, Z.B., 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*. 136, 1457-1468.