

ژنگان‌شناسی از آزمایشگاه تا مزرعه: تولید نژادگان‌های گندم پرمحصول و متحمل به تنش‌های محیطی^۱

سید ابوالقاسم محمدی^۲ و میرعبداله محمدی اقدم^۳

چکیده

برای تولید نژادگان‌های^۴ گندم پرمحصول و متحمل به تنش‌های محیطی، ژن‌های کنترل‌کننده^۵ صفت‌های مختلف مکان‌یابی شدند و تنوع نوکلئوتیدی ژن‌های مقاومت به زنگ‌های قهوه‌ای (Lr) و زرد (Yr) و آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری در رقم‌های مقاوم و حساس گندم نان و ژن‌های بهاره‌سازی در توده‌های بومی گندم ایران برای طراحی نشانگرهای چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی^۶ ارزیابی گردیدند. ساختار جمعیت توده‌های بومی گندم با استفاده از نشانگرهای اس. اس. آر^۷، نشانگرهای ژن‌های بهاره‌سازی، مقاومت به زنگ قهوه‌ای (Lr) و زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین بررسی شد. براساس مجموعه ژنی و نشانگری شناسایی شده و ارزش بهنژادی ژنگانی (ژنومی)، رگه‌های خویش‌آمیخته^۸ نو ترکیب ایزوژن برای ژن‌های کنترل‌کننده و نژادگان‌ها و رقم‌هایی با ژن‌ها و ژن‌های کنترل‌کننده چندگانه انتخاب و برای ایجاد جمعیت‌های چندوالدی تلاقی داده شدند. گزینش نژادگان‌های مطلوب براساس عملکرد دانه و اجزا آن، مقاومت به زنگ زرد، شکل و اندازه برگ پرچم از نسل سوم شروع شد. نژادگان‌های انتخابی در نسل‌های مختلف در شرایط آبیاری معمولی و بدون آبیاری کشت و ارزیابی شدند. در شرایط بدون آبیاری، نژادگان‌های انتخابی نسل پنجم دارای طول سنبله با دامنه ۱۰ تا ۱۹ و میانگین ۱۳/۸۷ سانتیمتر و تعداد دانه در سنبله با دامنه ۳۸ تا ۱۸۰ و میانگین ۹۴/۲۰ دانه بودند. در آبیاری عادی، طول سنبله و تعداد دانه در سنبله نژادگان‌های انتخابی به ترتیب از ۱۳ تا ۲۴ با میانگین ۱۶/۳۳ سانتیمتر و ۹۰ تا ۲۶۰ با میانگین ۱۲۸/۱۴ دانه متغیر بودند. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از روش‌های ژنگان‌شناسی (ژنومیک)^۹ در برنامه‌های بهنژادی می‌تواند کارآیی تولید رقم‌های پرمحصول و متحمل به تنش‌های محیطی را افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: ارزش بهنژادی ژنگانی، گزینش، نشانگر، گندم.

مقدمه

پیش‌بینی شده است که جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ به ۹/۸ و سال ۲۱۰۰ به ۱۱/۲ میلیارد نفر خواهد رسید. در نتیجه، برای تأمین غذای این جمعیت روزافزون و دستیابی به امنیت غذایی، باید تولید غذا در جهان تا ۷۰٪ افزایش یابد. این در حالی است که به علت تغییر شرایط اقلیمی جهان، تولید محصول‌های کشاورزی زیر تاثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند بیماری‌ها،

۱- تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۸

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۳۰

۲- نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mohammadi@tabrizu.ac.ir

۳- به ترتیب استاد دانشگاه تبریز و پژوهشگر شرکت بذر زیست فناور آرتا.

4. Genotypes

5. Quantitative trait locus (QTL)

6. Single nucleotide polymorphism (SNP)

7. Microsatellites or single sequence repeats (SSRs)

8. Inbred lines

9. Genomics

خشکی، شوری و دمای بالا بوده و کاهش می‌یابد (۱). امروزه بیش از ۹۹/۹٪ غذای بشر در جهان از زمین حاصل می‌شود (۲). این در حالی است که در جهان، سرانه هر نفر برای زمین‌های کشاورزی برابر ۰/۲۳ هکتار و در ایران برابر ۰/۲۲ هکتار است (جمعیت کشور در سال ۲۰۱۴ برابر ۷۹ میلیون نفر و مساحت زمین‌های کشاورزی برابر ۱۷/۷ میلیون هکتار بود (۳). با توجه به عوامل محدودکننده ناشی از تغییر اقلیم و افزایش جمعیت، در آینده سرانه زمین برای هر نفر به مراتب کمتر از این مقدار خواهد شد. از طرفی در حال حاضر حدود ۱/۰۲ میلیارد نفر در جهان با مشکل سوءتغذیه مواجه هستند (۴). گرسنگی و سوءتغذیه دلیل مرگ‌ومیر نیمی از کودکان (برابر شش میلیون کودک در سال در جهان) بوده و یکی از دلایل اصلی مرگ‌ومیر در جهان است (۵). بنابراین، عقیده بر این است که در سال‌های آینده غذا و آب در نقش ابزارهای راهبردی در تغییر نظام‌های سیاسی و خط‌های جغرافیایی کشورها نقش مهمی خواهند داشت.

گندم یکی از مهمترین گیاهان زراعی دنیا است که با تأمین ۴۰٪ انرژی روزانه و ۵۰٪ پروتئین، نقش مهمی در تأمین غذا و سلامت جسمی و روانی جوامع بشری دارد. در ایران نیز ۴۹٪ انرژی غذایی روزانه مردم به طور مستقیم از طریق مصرف غلات تأمین می‌شود، بنابراین بر اساس این تقاضا، در کشور سالیانه در میانگین، ۳۶٪ از زمین‌های کشور به کشت گندم اختصاص داده می‌شود (۳). آمارها نشان می‌دهند که به دلیل تنش‌های زیستی و غیرزیستی، میانگین عملکرد جهانی گندم کمتر از ۳ تن در هکتار است، در حالی که پتانسیل عملکرد آن بیش از ۱۰ تن در هکتار پیش‌بینی شده است (۶، ۷).

به دلیل تغییر اقلیم و سخت شدن شرایط تولید، روند افزایش تولیدهای کشاورزی با رقم‌ها و نژادگان‌های فعلی در آینده جوابگوی نیازهای جمعیت روزافزون دنیا نخواهند بود (۸). در این راستا، در کنار کاربرد پیشرفت‌های حاصل شده در ژنتیک، زیست‌فناوری در برنامه‌های به‌نژادی گیاهی، استفاده از پتانسیل ذخیره‌های ژنتیکی موجود در جهت شناسایی ژن‌ها و آلل‌های مطلوب برای استفاده در برنامه‌های تولید رقم‌های جدید با پتانسیل عملکرد بالا، متحمل به تنش‌های محیطی و سازگار به شرایط سخت تولید بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف تولید نژادگان‌های پرمحصول گندم با تأکید بر افزایش پتانسیل فتوسنتزی از طریق تغییر ساختار سایه‌سار^۱ و افزایش سطح برگ، تحمل به سرما و خشکی، مقاومت به زنگ زرد و افزایش شاخص برداشت برای بهبود بهره‌وری تولید، پژوهشی در ۱۳ سال اخیر با استفاده از روش‌های کلاسیک به‌نژادی و روش‌ها و ابزارهای ژنگان‌شناسی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده شامل هفت رقم گندم با تیپ رشدی و تحمل به سرمای متفاوت و یک جمعیت دو والدی برای شناسایی ناحیه‌های ژنگانی درگیر در تحمل به یخ‌زدگی و سرمای زمستانه، ۷۰ رقم، رگه و نژادگان مورد استفاده در برنامه‌های اصلاح به مقاومت به زنگ زرد و یک جمعیت دو والدی به منظور مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به زنگ زرد، دو جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب برای بررسی‌های تحمل به تنش کم‌آبی و ۳۹۵ توده بومی گندم بهاره و پاییزه نان برای شناسایی ژن‌های مطلوب برای تولید نژادگان‌های جدید بود.

مراحل اجرا

پژوهش حاضر در دو مرحله انجام شد. مرحله اول، شامل مکان‌یابی آلل‌ها و ژن‌های کنترل‌کننده صفت‌های در حال ارزیابی در جمعیت‌های مورد مطالعه و شناسایی نشانگرهای پیوسته یا مرتبط با این آلل‌ها و ژن‌ها برای استفاده در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر جهت انتخاب رقم‌ها، رگه و نژادگان‌های مطلوب بر مبنای ارزش به‌نژادی ژنگانی آن‌ها برای ایجاد جمعیت‌های چند والدی در مرحله دوم پژوهش بود. هدف مرحله دوم پژوهش، تولید جمعیت‌های چند والدی با تلاقی والدی با

ویژگی‌های مطلوب مکمل و استفاده از نوترکیبی بین ژنگان‌های مختلف به منظور بهره‌برداری از بیشینه پتانسیل ژنگان گندم برای تولید نژادگان‌های جدید پرمحصول متحمل به تنش‌های محیطی و سازگار با شرایط سخت تولید بود. در این راستا، آزمایش‌های زیر طراحی و انجام گردید.

تحمل به سرما و یخ‌زدگی

برای شناسایی ژن‌های درگیر در تحمل به یخ‌زدگی و سرما و تعیین نشانگرهای پیوسته با آن‌ها جهت استفاده در برنامه‌های اصلاح برای تحمل به یخ‌زدگی و سرما، ابتدا تجزیه دی‌آلل با استفاده از هفت رقم شامل سه رقم پاییزه با تحمل بالا به یخ‌زدگی، و سه رقم بهاره و حساس به سرما و یک رقم میانی انجام و ۲۱ دورگه حاصل به همراه والدین در شرایط کنترل‌شده در فریز دارای قابلیت برنامه‌ریزی در دمای ۳- تا ۲۳- با فاصله دمایی ۲- درجه سلسیوس بررسی شدند (۹، ۱۰). افزون بر این، چند شکلی والدین با استفاده از ۱۰۳ جفت آغازگر اس.اس.آر جهت شناسای نشانگرهای مرتبط با تحمل به یخ‌زدگی بررسی شدند و اثر افزایشی و درجه غالبیت نواحی کروموزومی حامل نشانگرهای مثبت برآورد گردید (۱۱). براساس نتایج تجزیه دی‌آلل و داده‌های مولکولی، یک رقم پاییزه با بیشترین تحمل به سرما و یک رقم بهاره حساس به سرما با بیشترین قابلیت ترکیب پذیری خصوصی انتخاب شدند. افزون بر این، والد متحمل به سرما، حساس به خشکی و زنگ زرد اما والد حساس به سرما، مقاوم به زنگ و متحمل به خشکی نیز بودند. برای مکان‌یابی ناحیه‌های ژنگانی درگیر در تحمل به یخ‌زدگی ۲۸۰ خانواده F_{2:3} و ۱۸۰ رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب^۱ حاصل از تلاقی دو والد انتخابی زیر دمای یاد شده از نظر تحمل به یخ‌زدگی در فریزر با قابلیت برنامه‌ریزی ارزیابی شدند. افزون بر آزمون یخ‌زدگی، جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب در شرایط مزرعه‌ای دو سال در ایران و دو سال در دانشگاه ارزروم کشور ترکیه بررسی شد. نقشه ژنتیکی جمعیت با استفاده از نشانگرهای اس.اس.آر تشکیل و تجزیه ژن کنترل‌کننده با روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب انجام شد.

مقاومت به زنگ

برای مکان‌یابی ژن‌های مقاومت به زنگ زرد و شناسایی نژادگان‌ها و رگه‌های نوترکیب با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به زنگ، ۷۰ رقم، رگه بهنژادی و نژادگان از منابع ژنتیکی داخلی و خارجی و مواد بهنژادی سیمیت^۲ در آلودگی مصنوعی در گلخانه و مزرعه ارزیابی شد. ساختار ژنتیکی جمعیت با استفاده از ۸۰ نشانگر اس.اس.آر (۱۲) بررسی و تجزیه ارتباط برای شناسایی ناحیه‌های ژنگانی درگیر در مقاومت به زنگ زرد انجام گردید. افزون بر این، تجزیه ژن کنترل‌کننده با استفاده از جمعیت حاصل از تلاقی رقم 'MV17' در جایگاه مقاوم‌ترین و 'بولانی' رقم محلی از سیستان و بلوچستان در جایگاه حساس‌ترین رقم به زنگ زرد صورت گرفت. برای بررسی تنوع نوکلئوتیدی ژن‌های مقاومت به زنگ *Lr1*, *Lr10*, *Lr21*, *Lr29*, *Lr35*, *Lr39*, *Lr47*, *Lr50*, *Lr51*, *Yr5*, *Yr10* و *Beta1 proteasom* طراحی نشانگرهای چندشکلی تک نوکلئوتیدی، این ژن‌ها از هفت نژادگان 'بولانی'، 'بولوئیکا'، 'MKH3'، 'MKH4'، 'پیشتاز'، 'MV-17' و 'مغان ۳' با پاسخ متفاوت به زنگ زرد و قهوه‌ای، جداسازی، همسانه‌سازی و توالی‌یابی شدند. همچنین با استفاده از سه روش NBS-profiling، Motif directed profiling و Homology-based degenerate primers، آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری^۳ در هفت نژادگان یاد شده و ۴۲ رگه خویش‌آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی 'MV-17' و 'بولانی' شناسایی گردید. با استفاده از نشانگرهای اس.اس.آر پیوسته با ژن‌های مقاومت به زنگ زرد، چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی و ژن‌های مقاومت به بیماری نژادگان‌ها و رگه‌های نوترکیب مطلوب به صورت منبع ژن‌های مقاومت به زنگ برای ایجاد جمعیت‌هایی برای تولید رقم‌های جدید گزینش شدند.

تحمل به تنش کم‌آبی

به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن(های) کنترل‌کننده صفت‌های درگیر در تحمل به تنش کم‌آبی، جمعیت

1. Recombinant inbred line (RIL)
3. Repressor of ga1-3 (RGA)

2. CIMMYT (The International Maize and Wheat Improvement Center)

رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی رقم 'Yecora Rojo' (زودرس و پاکوتاه با منشأ آمریکا؛ والد پدری) و نژادگان بومی شماره ۴۹ (دیررس، پابلند و دارای نظام ریشه‌ای عمیق با منشأ سیستان و بلوچستان؛ والد مادری) در شش محیط آبیاری معمولی و آبیاری محدود پس از سنبله‌دهی در تبریز، میان‌دوآب و مهاباد در دو سال ارزیابی شدند. افزون بر این، صفت‌های ریشه‌ای نیز در جمعیت در سه آزمایش بررسی شدند. نقشه ژنتیکی اولیه جمعیت با استفاده از ۲۰۲ نشانگر اس.اس.آر و رتروترانسپوزونی^۱ تشکیل و مکان‌یابی ژن کنترل کننده برای صفت‌های زراعی، ریخت‌شناختی و ویژگی‌های ریشه انجام شد. در مطالعه دیگر، ۱۴۲ رگه خویش‌آمیخته نوترکیب نسل F₈ حاصل از تلاقی رقم‌های گندم 'آذر ۲' (زمستانی و متحمل به خشکی که برای کاشت در دیمزارهای مناطق سردسیر و معتدل سرد کشور معرفی شده است) و '87Zhong291' (با تیپ رشدی میانی و منشأ چین، که یکی از رقم‌های پرمحصول برای اقلیم معتدل دیم است) در شرایط دیم و آبیاری تکمیلی از نظر صفت‌های زراعی و ریخت‌شناختی ارزیابی شدند. افراد جمعیت با استفاده از نشانگرهای اس.اس.آر، AFLP و ISSR و براساس نقشه ژنتیکی حاصل و داده‌های پدیدگانی (فنوتیپی)، ژن‌های کنترل کننده صفت‌های مورد مطالعه مکان‌یابی شدند.

توده‌های بومی گندم

به منظور بهره‌برداری از پتانسیل ژنتیکی توده‌های بومی گندم ایران در برنامه‌های بهنژادی، ساختار ژنتیکی و تنوع آلی ۳۹۵ توده بومی گندم نان متشکل از ۱۵۴ نژادگان بهاره، ۱۹۳ نژادگان پاییزه، ۴۶ نژادگان با عادت رشدی ناشناخته و دو نژادگان با عادت رشدی میانی به همراه دو نژادگان استاندارد 'Chinese Spring' و 'Thatcher' ارزیابی نژادگانی و پدیدگانی شدند. ساختار جمعیت با استفاده از ۵۰ نشانگر اس.اس.آر مطالعه شد و برای شناسایی ژن‌های سودمند بالقوه در این مجموعه، تنوع آلی ژن‌های بهاره‌سازی با استفاده از ۱۰ ترکیب آغازگری، هشت ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای (Lr) و ژن‌های رمزکننده گلوتین با وزن مولکولی پایین با استفاده از شش ترکیب آغازگری بررسی شد. افزون بر این، این نژادگان‌ها در دو فصل در دوره‌های مختلف از نظر مقاومت به زنگ زرد در شرایط آلودگی طبیعی و برخی صفت‌های ریخت‌شناسی ارزیابی شدند.

تولید و ارزیابی جمعیت‌های چندوالدی

برای تولید جمعیت‌های چندوالدی، رقم‌ها، نژادگان‌ها، توده‌های بومی و رگه‌های نوترکیب انتخاب شده از بررسی‌های قبلی براساس ویژگی‌های ژنگانی به صورت دوره‌ای تلاقی داده شدند. نسل اول حاصل از تلاقی‌ها برای تولید نسل دوم استفاده شدند. در نسل سوم، گزینش نژادگان‌های مطلوب براساس عملکرد دانه، اجزا عملکرد (طول سنبله، تعداد دانه در سنبله، وزن هزار دانه و تعداد پنجه بارور)، مقاومت به زنگ زرد در شرایط آلودگی طبیعی، شکل و اندازه برگ‌ها بخصوص برگ پرچم انجام گردید. نژادگان‌های نسل چهارم، دو جمعیت چندوالدی در دو ایستگاه به ترتیب با میزان بارندگی ۲۴۰ و ۲۵۰ میلی‌متر و یک جمعیت با آبیاری معمولی کشت شدند. نژادگان‌های انتخابی نسل پنجم در سال زراعی ۹۵ تا ۹۶ به صورت بوته به ردیف زیر شرایط آبیاری معمولی و بدون آبیاری کشت و در طول فصل، ارزیابی براساس ویژگی‌هایی مانند طول و وزن سنبله، ارتفاع بوته، تعداد پنجه انجام و نژادگان‌های مطلوب برای تولید بذر نسل ششم انتخاب شدند. نژادگان‌های انتخابی در سال زراعی ۹۶ تا ۹۷ برای تولید بذر نسل هفتم و نیز جهت ثبت کشت خواهند شد.

نتایج

تحمل به سرما و یخ‌زدگی

برای شناسایی ناحیه‌های کروموزومی درگیر در تحمل به یخ‌زدگی، رقم‌های 'نورستار'، 'مورگان'، 'کپل دسپرز'، 'دسکانسوئید'، 'سرداری'، 'کوهدشت' و 'زاگرس' و ۲۱ دوره حاصل از تلاقی آن‌ها در شرایط کنترل شده در فریزر با قابلیت برنامه‌ریزی در دمای ۳- تا ۲۳- با فاصله دمایی ۲- درجه سلسیوس ارزیابی شدند. نتایج تجزیه دی‌آلل نشان دهنده نقش اثر

افزایشی ژن‌ها در کنترل تحمل به یخ‌زدگی بود. وراثت‌پذیری خصوصی بالا (۰/۸۷/۰۸) و درجه غالبیت پایین (۰/۲۸) نیز نشان دهنده نقش کم اثر غالبیت در کنترل این صفت بود. در بین رقم‌ها، 'نورستار' با بیشترین قابلیت ترکیب‌پذیری عمومی و میانگین درصد زنده ماندن، متحمل‌ترین رقم و 'زاگرس' با کمترین مقدارهای این پارامترها، حساس‌ترین رقم به یخ‌زدگی بودند. دورگه 'نورستار' × 'زاگرس' نیز با LT₅₀ و ترکیب خصوصی بالا متحمل‌ترین ترکیب شناخته شد. در بررسی چندشکلی والدین با استفاده از ۱۰۳ جفت آغازگر ریزماهواره، ۴۵۵ آلل چندشکل با دامنه ۲ تا ۸ و میانگین ۴/۰۶ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر شد. یازده نشانگر ارتباط معنی‌دار با تحمل به یخ‌زدگی داشتند. برآورد اثر افزایشی و درجه غالبیت ناحیه‌های کروموزومی حامل نشانگرهای مثبت نشان‌دهنده نقش بالای عمل افزایشی ژنی در تحمل به یخ‌زدگی بود (جدول ۱). براساس نتایج این مطالعه، دو رقم 'زاگرس' و 'نورستار' به ترتیب با بیشترین حساسیت و تحمل به یخ‌زدگی برای تولید جمعیت در حال تفرق انتخاب شدند.

جدول ۱- جایگاه کروموزومی، تعداد آلل، محتوای اطلاعات چندشکلی^۱، اثر افزایشی و درجه غالبیت نشانگرهای اس.اس.آر مرتبط با تحمل به یخ‌زدگی در گندم نان.

نشانگر	کروموزوم	تعداد آلل	محتوای اطلاعات چندشکلی	اثر افزایشی	درجه غالبیت
Xgwm357	1A	۴	۰/۶۸	۳/۱۳	۰/۲۲
Xgwm382	2A/2B/2D	۵	۰/۷۰	۲/۶۸	۰/۳۹
Xgwm149	4B	۵	۰/۶۸	۴/۰۶	۰/۵۴
Xgwm99	2A/2B	۶	۰/۷۷	۳/۰۱	۰/۵۹
Xgwm526	1A	۵	۰/۶۳	۱/۹۴	۰/۴۰
Xgwm610	4A	۳	۰/۵۳	۱/۲۴	۰/۴۳
Xgwm58	6B	۳	۰/۵۰	۲/۹۶	۰/۲۸
Xgwm63	7A	۴	۰/۶۸	۳/۶۸	۰/۵۱
Xgwm44	7D	۵	۰/۷۴	۳/۰۰	۰/۴۸
Xgwm2	3A/3D	۴	۰/۶۱	۲/۵۶	۰/۵۴
Xbarc286	5D	۵	۰/۷۰	۲/۷۷	۰/۲۵

برای تجزیه ژن کنترل کننده، ۲۸۰ خانواده F_{2:3} حاصل از تلاقی 'نورستار' و 'زاگرس' در شرایط مزرعه‌ای و آزمون انجماد مورد ارزیابی شدند. افزون براین، برخی صفت‌های فیزیولوژیک نیز در جمعیت اندازه‌گیری گردید. تهیه نقشه ژنتیکی جمعیت براساس نشانگرهای اس.اس.آر انجام شد و تجزیه ژن کنترل کننده با استفاده از داده‌های پدیدگانی و نژادگانی برای شناسایی ناحیه‌های ژنگانی درگیر در LT₅₀ و صفت‌های زراعی منجر به شناسایی ۳، ۳، ۳ و ۷ ژن کنترل کننده با مجموع درجه تبیین پدیدگانی ۲۵، ۱۷، ۲۱ و ۲۷ درصدی به ترتیب برای رسیدگی فیزیولوژیک، ارتفاع بوته، طول دم‌گل‌آذین^۲ و LT₅₀ گردید (جدول ۲). شناسایی دو ژن کنترل کننده مشترک برای تحمل به یخ‌زدگی و زمان رسیدگی فیزیولوژیکی نشان دهنده نقش مرحله و زمان تکوین گیاه در بروز تحمل به یخ‌زدگی است. دو تا از سه ژن کنترل کننده شناسایی شده برای ارتفاع بوته و طول دم‌گل‌آذین مشترک بودند. ژن کنترل کننده شناسایی شده در کروموزوم 1A در مجاورت نشانگر Xgwm357، برای اولین بار در این مطالعه گزارش شد. تجزیه میانگین نسل‌ها با استفاده از هفت نسل نشان داد که انواع اثرهای ژنی از جمله اثرهای افزایشی، غالبیت و برهمکنش غیرآلی^۳ در کنترل تحمل به یخ‌زدگی مؤثر بودند. در ضمن برآورد بالایی برای وراثت‌پذیری عمومی و

خصوصی بالایی برای تحمل به یخزدگی به ترتیب با مقادیرهای ۸۰/۱۰ و ۶۵/۹۸٪ به دست آمد.

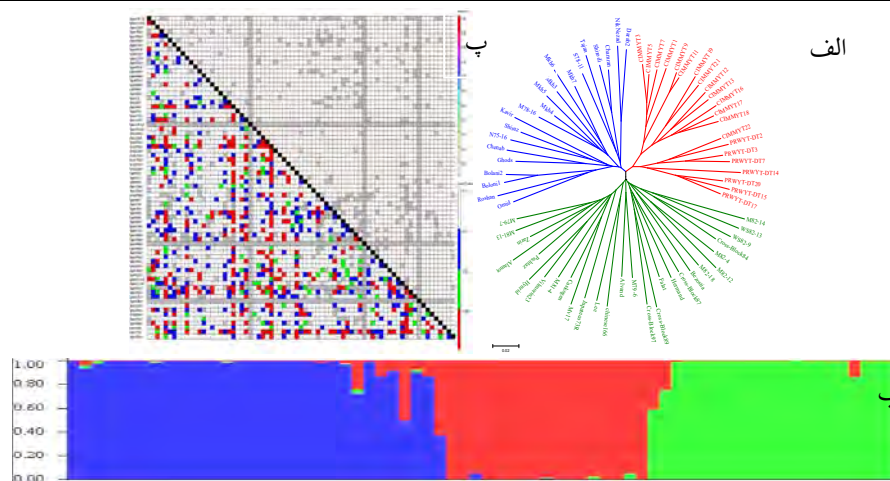
مقاومت به زنگ

برای شناسایی ناحیه‌های ژنگانی مرتبط با مقاومت به زنگ زرد، ۷۰ رگه و رقم از منابع داخلی و خارجی با استفاده از ۷۱ نشانگر ریزماهواره بررسی شدند. در مجموع ۵۹۲ آلل با میانگین ۸/۵۳ آلل به ازای هر جایگاه و دامنه ۲ تا ۱۸ آلل تکثیر شدند. متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی برای نشانگرهای مورد بررسی از ۰/۱۶۶ تا ۰/۹۰۲ با میانگین $۰/۷۰۹ \pm ۰/۰۱۸$ متغیر بود. گروه‌بندی نژادگان‌ها با استفاده از روش‌های تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر فاصله و مدل، آن‌ها را به سه گروه به طور کامل متمایز وابسته کرد که با پاسخ به زنگ آن‌ها مطابقت داشت (شکل ۱-الف و ب) (۱۲). در این گروه‌بندی، رگه‌های سیمیت و رگه‌های پیشرفته به‌نژادی در گروه‌های مجزا قرار گرفته و از رقم‌های تجاری تفکیک شدند. برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفت‌های

جدول ۲- نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفت‌های مرتبط با تحمل به سرما در جمعیت حاصل از تلاقی رقم‌های

نورستار و زاگرس؛

صفت	نشانگر	کروموزوم	درصد تبیین پدیدگانی	اثر افزایشی	اثر غالبیت	درجه غالبیت
رسیدگی	Xgwm666	5A	۵	۱/۰۳	۱/۳۰	۱/۲۶
فیزیولوژیک	Xgwm344	7B	۵	۳/۱۰	۳/۱۰	۵/۸۵
	Xgwm148	2B	۱۵	-۱/۲۰	-۱/۲۰	۱/۱۴
	Xgwm5	3A	۷	-۶/۵۸	۱/۰۰	۰/۱۵
ارتفاع بوته	Xgwm319	5B	۵	-۰/۹۹	۵/۳۰	۵/۳۵
	Xgwm165	5D	۵	-۲/۴۲	۳/۷۰	۱/۵۲
	Xgwm319	5A	۶	-۰/۱۶	۳/۲۱	۲۰/۰۰
طول	Xgwm165	5D	۹	-۲/۳۵	-۰/۲۰	-۰/۰۸
دم‌گل‌آذین	Xgwm286	5D	۶	-۱/۹۶	۱/۰۰	۰/۵۱
	Xgwm357	1A	۵	۰/۰۱	-۰/۰۱	-۱۰/۰۰
	Xgwm666	5A	۲	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۲۵
	Xcfa2190	5A	۳	۰/۰۶	۰/۰۱	۰/۱۶
	Xgwm148	2B	۴	۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۲۵
LT ₅₀	Xgwm499	5B	۷	۰/۰۳	۰/۱۰	۳/۳۳
	Xgwm292	5D	۳	-۰/۰۱	۰/۰۱	۱/۰۰
	Xgwm174	5D	۳	۰/۰۲	-۰/۰۱	-۰/۵۰



شکل ۱- گروه‌بندی نژادگان‌های مورد مطالعه براساس داده‌های اس.اس.آر با استفاده از تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر فاصله (الف) و مدل (ب) و نقشه عدم تعادل پیوستگی نشانگرهای اس.اس.آر در نژادگان‌های گندم (پ).

مرتبط با مقاومت به زنگ، ابتدا نقشه عدم تعادل پیوستگی^۱ نشانگرهای اس.اس.آر تهیه شد (شکل ۱ ج) که نشانگرهای پیوسته در مقایسه با نشانگرهای غیرپیوسته دارای عدم تعادل پیوستگی بالاتر و معنی‌دار بودند. تجزیه ارتباط منجر به شناسایی ۸، ۱۰ و ۱۰ نشانگر مرتبط با ژن‌های کنترل‌کننده سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری^۲، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری نسبی^۳ و میانگین ضریب آلودگی^۴ در ارزیابی مزرعه‌ای و ۱۳ و ۹ نشانگر برای دوره کمون^۵ و تیپ آلودگی^۶ شد. برای شناسایی مکان‌های ژنی کمی پایدار کنترل‌کننده مقاومت به زنگ زرد، ۳۲۹ خانواده F_{2:3} و F_{2:4} حاصل از تلاقی رقم 'MV-17' به منزله بسیار مقاوم و 'بولانی' به منزله والد بسیار حساس به زنگ زرد، برای مقاومت در مرحله بلوغ به نژاد 134E134A⁺ قاچ *Puccinia striiformis* در شرایط مزرعه‌ای با آلودگی مصنوعی در دو سال ارزیابی شدند. براساس پاسخ به زنگ نژادگان، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری محاسبه شد. بر اساس مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، به ترتیب ۱۵، ۹ و ۱۰ ژن کنترل‌کننده در کروموزوم‌ها ۹، ۷ و ۶ در نسل‌های سوم، چهارم و میانگین نسل‌ها مکان‌یابی شد. بیشتر ژن‌های کنترل‌کننده شناسایی شده در نسل‌های سوم و چهارم پایدار بودند. درصد تبیین واریانس پدیدگانی کل ژن‌های کنترل‌کننده شناسایی شده به ترتیب در نسل‌های سوم و چهارم و میانگین نسل‌های برابر با ۶۳/۰۰، ۱۵/۶۴ و ۲۱/۷٪ بود (جدول ۳). وجود و نبود بافت سوختگی نوک برگ نیز به صورت نشانگر ریخت‌شناختی غالب در تشکیل گروه‌های پیوستگی مورد استفاده قرار گرفت. این نشانگر در کروموزوم 7D با نشانگر Xbarc352 پیوسته بود. افزون بر ارزیابی مقاومت به زنگ زرد، صفت‌های زراعی روز تا گلدهی، روز تا رسیدگی، ارتفاع بوته، تعداد سنبله، طول سنبله و طول دم‌گل‌آذین نیز در نسل‌های سوم و چهارم در ۱۰ بوته از هر خانواده اندازه‌گیری شدند. بر اساس تجزیه فاصله‌ای مرکب، ۱۲ ژن کنترل‌کننده برای این صفت‌ها به جزء طول سنبله، روی کروموزوم‌های 3A، 2A، 3B، 2B، 3A، 2D، 6B و 7D مکان‌یابی گردید. برخی از ژن‌های کنترل‌کننده شناسایی شده برای صفت‌های زراعی و مقاومت به بیماری مشترک بودند، که نشان‌دهنده پیوستگی آن‌ها یا اثر پلیوتروپیک^۷ بود.

1. Linkage Disequilibrium (LD)

3. Relative Area under disease progress curve (rAUDPC)

5. LP

6. IT

2. Area under disease progress curve (AUDPC)

4. Autologous chondrocyte implantation (ACI)

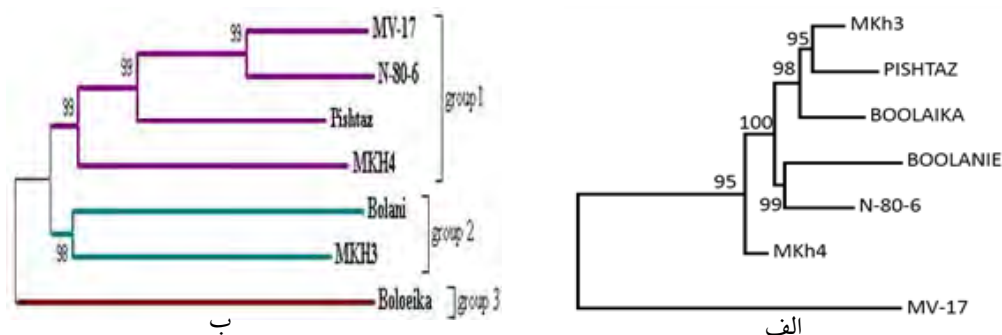
7. Peliotropic

جدول ۳- مکان کروموزومی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به زنگ زرد، اثرهای غالبیت و افزایشی و میزان

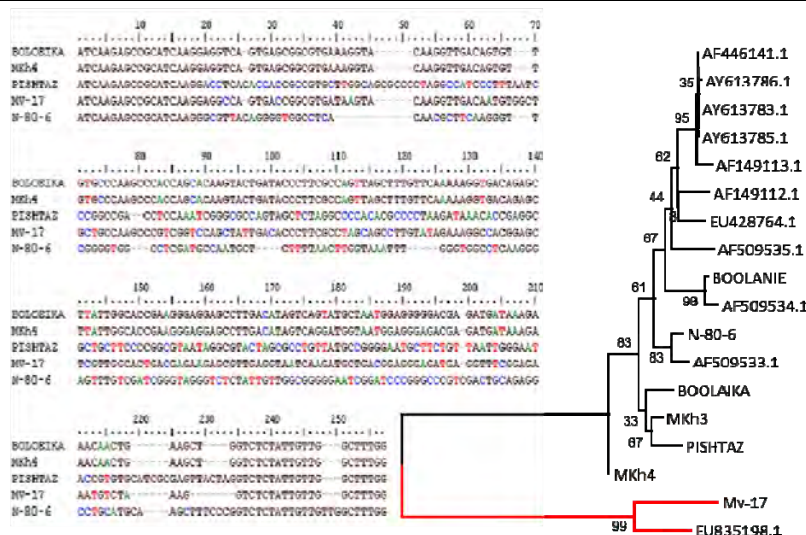
تبیین واریانس پدیدگانی در میانگین نسل‌های سوم و چهارم

نشانگر	کروموزوم	درصد تبیین واریانس	اثر افزایشی	اثر غالبیت
Xbarc352	7D	۵	-۲۰/۵۷	۱۱۸/۷۳
Xbarc70	7D	۵	-۶۷/۴۶	۳۱/۱۰
Xgwm389	3B	۵	-۴۵/۸۶	۸۳/۳۰
Xgwm181	3B	۷	-۱۰۶/۹۹	-۲۱/۳۰
Xgwm169	6A	۵	-۵۴/۳۳	-۵۶/۴۷
Xgwm47	2B	۷	-۷۱/۷۸	۷۳/۳۸
Xwmc417	6B	۷	-۱۰۸/۹۷	-۲۱/۷۴

بررسی تنوع نوکلئوتیدی ژن‌های مقاومت به زنگ‌های قهوه‌ای و زرد *Lr1*, *Lr10*, *Lr21*, *Lr29*, *Lr35*, *Lr39*, *Lr47* و *Yr10*, *Yr5*, *Lr51*, *Lr50* و *Betal proteasom* در نژادگان‌های 'بولانی'، 'بولوئیکا'، 'MKH3'، 'MKH4'، 'پیش‌تاز'، 'MV-17' و 'مغان ۳' با پاسخ متفاوت به زنگ زرد و قهوه‌ای، به منظور طراحی نشانگرهای چندشکلی تک نوکلئوتیدی انجام شد. بررسی جهش‌های نقطه‌ای مشاهده شده در توالی ژن‌ها بین نژادگان‌های حساس و مقاوم به بیماری بیانگر وجود جایگزینی‌های همسان و غیرهمسان بود. حذف و اضافه‌شدگی در برخی از توالی‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود و جزو جهش‌های تأثیرگذار در تفاوت بین نژادگان‌ها شناسایی گردید. بررسی توالی آمینواسیدهای حاصل از ترجمه توالی‌های نوکلئوتیدی نیز تفاوت در تعداد جایگاه‌های دارای تغییرهای همسان و غیر همسان را نشان داد. بر اساس پارامتر D مشاهده شد که تغییرهای غیرهمسان در برخی از توالی‌ها زیر تأثیر گزینش واقع شده بودند. در برخی از ژن‌ها مطابق آنچه به طور معمول در ژن‌های مقاومت و در ناحیه‌های غیر LRR رخ می‌دهد، Ks بیش از Ka بود که این ناحیه‌های زیر تأثیر گزینش مثبت یا گزینش در جهت ایجاد تنوع واقع شده بودند. گروه‌بندی نژادگان‌ها با استفاده از توالی‌های ژن‌های *Lr* و *Yr* مطابق با پاسخ آن‌ها به زنگ‌های زرد و قهوه‌ای بود (شکل ۲). هم‌ردیفی قطعه‌های تک‌تیری با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI، شباهت زیاد آن‌ها را با توالی ژن‌های مقاومت از جمله ژن‌های NBS-LRR و ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها نشان داد. شکل ۳ هم‌ردیفی توالی ژن *Yr10* در نژادگان‌ها و گروه‌بندی اختصاصی رقم 'MV-17' را نشان می‌دهد. بر مبنای جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی توالی‌های ژن‌های بین نژادگان‌های مقاوم و حساس به زنگ زرد و قهوه‌ای، نشانگرهای چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی جهت استفاده در برنامه‌های به‌نژادی طراحی شد.

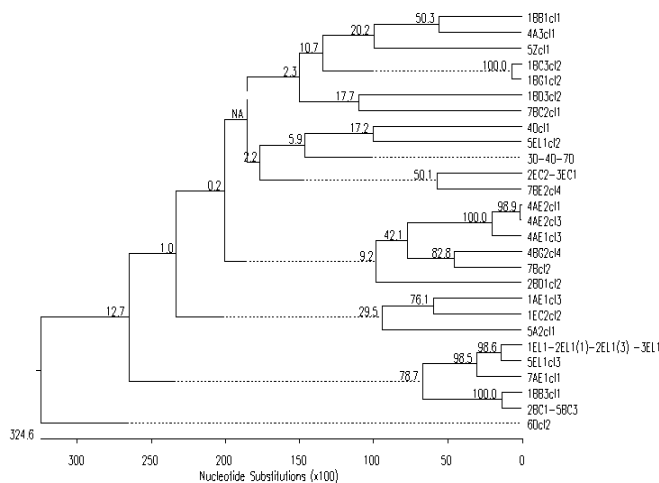


شکل ۲- گروه‌بندی نژادگان‌های گندم مورد مطالعه براساس توالی ژن‌های (الف) *Yr* و (ب) *Lr*.



شکل ۳- توالی همردیف شده ژن *Yr10* در نژادگان‌های گندم مورد مطالعه. رنگ آبی جایگاه‌های چندشکل را نشان می‌دهند.

برای جداسازی و توالی‌یابی آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری، از ۶۵ ترکیب آغازگری ساختار زوده که در هفت نژادگان آمده است، استفاده شد. از بین قطعه‌های تکثیرشده توسط ۲۰ ترکیب آغازگری، ۷۲۱ همسانه تهیه شد و ۴۶۰ همسانه قابل اعتماد توالی‌یابی گردید که ۴۱۹ توالی معتبر و قابل خواندن بودند. توالی‌های معتبر با استفاده از برنامه‌های blastx و tblastx با توالی‌های نوکلئیک اسید و پروتئینی موجود در پایگاه داده NCBI همردیف شدند که ۳۴ توالی با ژن‌های مقاومت به بیماری همولوژی نشان داده و گروه‌بندی شدند (شکل ۴). با استفاده از روش Motif directed profiling، ۱۳ آغازگر ژن مقاومت به بیماری از موتیف‌های P-loop، Kin-2a، GLPL site دامنه NBS و دامنه TIR و پروتئین کینازی طراحی شدند که برای غربال دو رگه والدی 'بولانی' و 'MV-17' و ۴۶ فرد از جمعیت نسل دوم حاصل از تلاقی آن‌ها و هشت نژادگان بسیار مقاوم و هشت نژادگان بسیار حساس از این جمعیت استفاده شدند. در مجموع با استفاده از این روش، ۲۷ نوار چندشکل تکثیر شد که ۲۳ نوار از ژل‌های Li-Cor جداسازی و توالی‌یابی شد. هفده نوار دارای توالی معتبر قابل خواندن بودند که ۱۱ توالی از آن‌ها با ژن‌های مقاومت به بیماری همولوژی نشان دادند.

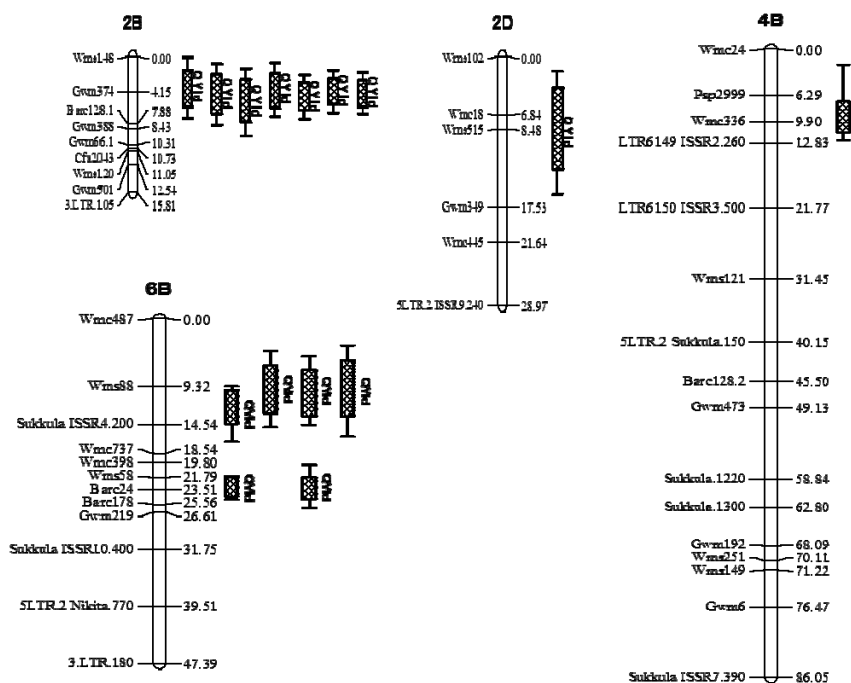


شکل ۴- رابطه‌های تبارزایی^۱ توالی‌های ژن مقاومت به بیماری گندم براساس سطح نوکلئوتیدی.

1. Phylogeny

تحمل به تنش کم آبی

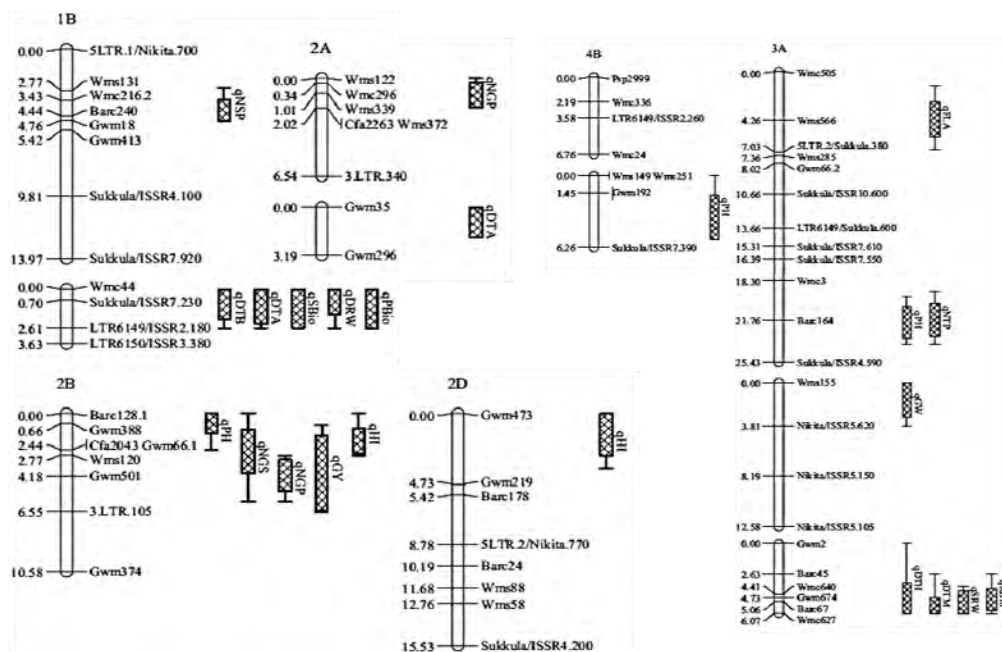
برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفتهای مرتبط با تحمل به تنش کم آبی در گندم نان بهاره، ۱۴۹ رگه خویش‌آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی نژادگان No. 49 و رقم 'Yecora Rojo' زیر شرایط آبیاری عادی و تنش کمبود آب در مرحله زایشی در دو سال در تبریز، مهاباد و میاندوآب ارزیابی شدند و ۴۶ ژن کنترل‌کننده برای صفتهای عملکرد دانه، عملکرد کاه، شاخص برداشت، ارتفاع بوته، طول سنبله، تعداد سنبله در متر مربع، تعداد دانه در سنبله، وزن هزار دانه، روز تا ظهور سنبله و سطح برگ پرچم مکان‌یابی شدند. ژن کنترل‌کننده شناسایی شده در کروموزوم 2B برای عملکرد دانه، تعداد سنبله در متر مربع و تعداد دانه در سنبله مشترک بود. همچنین در کروموزوم 6B، برای عملکرد دانه و وزن هزار دانه ژن‌های کنترل‌کننده مشترک شناسایی شد. اثر افزایش مثبت و منفی ژن‌های کنترل‌کننده مکان‌یابی شده برای کلیه صفتهای مورد مطالعه به غیر از ارتفاع بوته نشان دهنده نقش هر دو والد در انتقال آلل‌های مطلوب به نتاج بود. برای ارتفاع بوته، آلل‌های والد No. 49 در جایگاه‌های شناسایی شده در مقایسه با آلل‌های والد دیگر نقش بیشتری در افزایش ارتفاع بوته نتاج داشتند. در مجموع، ۲۵ اثر برهمکنش غیرآلی افزایشی × افزایشی بین ژن‌های کنترل‌کننده صفتهای مورد ارزیابی به غیر از سطح برگ پرچم برآورد شدند. شکل ۵، جایگاه کروموزومی ژن‌های کنترل‌کننده مکان‌یابی برای عملکرد دانه را در جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب نشان می‌دهد.



شکل ۵- جایگاه کروموزومی و حدود اطمینان ۹۵ و ۹۹٪ ژن‌های کنترل‌کننده مکان‌یابی شده برای عملکرد دانه در جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب گندم حاصل از تلاقی 'Yecora Rojo' و 'No. 49'.

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده برای صفتهای ریشه‌ای در مراحل پنجه‌دهی و رسیدگی زیر آبیاری عادی در این جمعیت منجر به شناسایی ۱۸ ژن کنترل‌کننده با دامنه تبیین تغییرهای پدیدگانی ۶/۴۵ تا ۲۹/۴۹٪ برای صفتهای ریشه در مرحله پنجه‌دهی شد. این ژن‌های کنترل‌کننده در کروموزوم‌های 1B، 2A، 2D، 4B، 6B، 7A و 7D شناسایی گردیدند. افزون بر صفتهای ریشه‌ای، سه ژن کنترل‌کننده، qPH-2A1، qPH-2A2 و qPH-4B با مجموع درجه تبیین پدیدگانی ۳۳/۱٪ نیز برای ارتفاع بوته در این مرحله مکان‌یابی شدند. در مرحله رسیدگی، ۳۹ ژن کنترل‌کننده با دامنه تبیین تغییرهای پدیدگانی ۷/۶۹ تا ۲۷/۸۹٪ در کروموزوم‌های 2A، 2D، 3A، 4A، 4B، 5B، 6A، 6B و 7B برای صفتهای مورد مطالعه شناسایی شدند. کروموزوم‌های

2D، 4A، 6A و 6B دارای بیشترین تعداد ژن‌های کنترل‌کننده شناسایی شده برای صفت‌های ریشه‌ای در دو مرحله رشدی بودند. شکل ۶ جایگاه کروموزومی ژن‌های کنترل‌کننده مکان‌یابی شده برای صفت‌های ریشه‌ای را در مرحله رسیدگی نشان می‌دهد (۱۴).



شکل ۶- جایگاه کروموزومی ژن‌های کنترل‌کننده مکان‌یابی شده برای صفت‌های ریشه‌ای در مرحله رسیدگی در جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب گندم حاصل از تلاقی 'Yecora Rojo' و 'No 49'.

با استفاده از جمعیت حاصل از تلاقی رقم‌های 'آذر ۲' و '87Zhong291'، ۶ و ۷ ژن کنترل‌کننده برای عملکرد دانه و ۳ و ۲ ژن کنترل‌کننده برای وزن ۱۰۰۰ دانه به ترتیب زیر شرایط دیم و آبیاری تکمیلی شناسایی شد. ژن کنترل‌کننده پیوسته با نشانگر Xwms95 در شرایط دیم با تبیین ۱۸/۲۶٪ و ژن کنترل‌کننده پیوسته با نشانگر CFA2257 در شرایط آبیاری تکمیلی با تبیین ۴۰/۴۶٪ تغییرهای عملکرد دانه ژن‌های کنترل‌کننده بزرگ اثر بودند. برای وزن ۱۰۰۰ دانه نیز دو ژن کنترل‌کننده پیوسته با نشانگرهای Barc113 و Xwmc14 به ترتیب با ۱۷/۷۵٪ و ۲۹/۷۹٪ تبیین پدیدگانی در شرایط دیم و ژن‌های کنترل‌کننده پیوسته با نشانگرهای Xwmc14 و Xwmc44 به ترتیب با ۴۱/۹۱٪ و ۴۳/۶۴٪ تبیین پدیدگانی، ژن‌های کنترل‌کننده بزرگ اثر برای وزن ۱۰۰۰ دانه بودند. ژن کنترل‌کننده پیوسته با نشانگر Xwmc14 در هر دو شرایط شناسایی گردید (جدول ۴).

برای ارتفاع بوته ۱ و ۴، طول برگ پرچم ۴ و ۱، تعداد سنبلچه ۵ و ۹ و طول سنبله ۵ و ۲ ژن کنترل‌کننده به ترتیب در شرایط دیم و آبیاری تکمیلی، مکان‌یابی گردید. افزون بر این، ۷، ۸ و ۹ ژن کنترل‌کننده به ترتیب برای عرض برگ پرچم، طول برگ دوم و عرض برگ دوم فقط در شرایط دیم شناسایی شد. برای رطوبت نسبی برگ یک ژن کنترل‌کننده، برای مقاومت روزنه‌ای برگ ۲ و برای دمای برگ ۱۱ ژن کنترل‌کننده در آبیاری تکمیلی مکان‌یابی گردید. شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده مشترک برای دمای برگ، تعداد سنبلچه در سنبله، وزن ۱۰۰۰ دانه و عملکرد دانه نشان‌دهنده پیوستگی ژنی یا اثر چندنمودی^۱ بود.

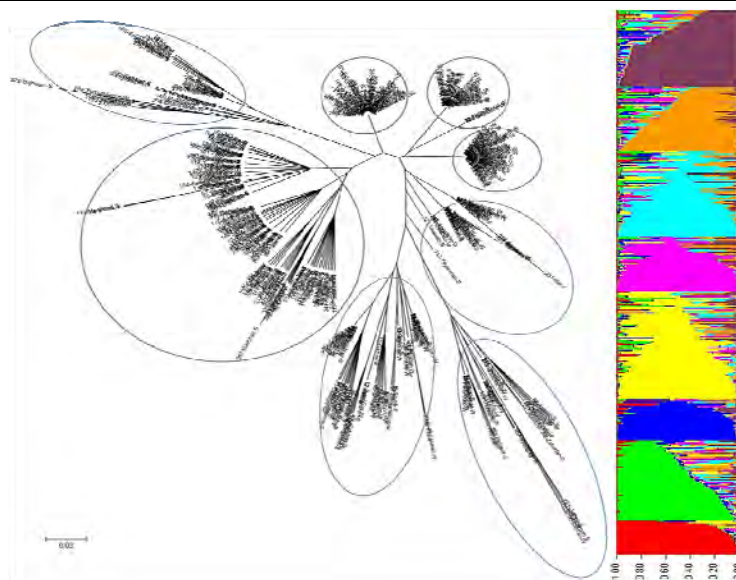
توده‌های بومی گندم

ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی ۱۵۴ نژادگان بهاره، ۱۹۳ نژادگان پاییزه، ۲ نژادگان میانی و ۴۶ نژادگان با عادت رشدی

ناشناخته گندم بومی ایران با استفاده از ۵۰ نشانگر اس.اس.آر منجر به تکثیر ۳۱۲ آلل چندشکل با تعداد آلل ۲ تا ۱۸ و میانگین ۵/۸۹ آلل به ازای هر جایگاه شد. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی در محدوده ۰/۱۵ تا ۰/۸۶ با میانگین ۰/۶ برآورد شد. توده‌های بومی با داده‌های اس.اس.آر و بر اساس تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر مدل و فاصله به هشت زیر جمعیت تفکیک شدند (شکل ۷). در این گروه‌بندی، نژادگان‌های بهاره و پاییزه به طور کامل از هم تفکیک نشدند اما گروه‌بندی حاصل با منشأ جغرافیایی و ویژگی‌های بوم‌شناختی مناطق جمع‌آوری مطابقت نشان داد. هتروزیگوتی مورد انتظار برای هشت زیر جمعیت برابر با ۰/۴۰، ۰/۵۷، ۰/۴۷، ۰/۶۱، ۰/۴۲، ۰/۵۷، ۰/۵۸ و ۰/۴۹ بود و بیشترین میانگین فاصله بین افراد در زیر جمعیت چهارم و کمترین فاصله بین افراد در زیر جمعیت اول مشاهده شد. فاصله نوکلئوتیدی خالص برای زیر جمعیت‌ها بین ۰/۰۶ (۲، ۶) و ۰/۳۱ (۱، ۵) متغیر بود. تفاوت در فاصله نوکلئوتیدی نشان‌دهنده ساختار مناسب جمعیت و گروه‌بندی درست آن است. عدم تعادل پیوستگی در ۱۲ تا ۱۳٪ از جفت نشانگرهای اس.اس.آر (۱۶۶ جفت) با $t^2 \geq 0.1$ و برای شش جفت نشانگر با $t^2 \geq 0.05$ با $P \leq 0.001$ معنی‌دار بود. میزان عدم تعادل پیوستگی در فاصله ژنتیکی ۲۰ تا ۴۰ سانتی‌مورگان در محدوده $t^2 \sim 0.05$ به دست آمد (۱۴).

جدول ۴- نشانگرهای احاطه کننده، اثر افزایشی و میزان تبیین پدیدگانی ژن‌های کنترل‌کننده مکان‌یابی شده برای عملکرد دانه و وزن هزار دانه زیر شرایط دیم و آبیاری تکمیلی.

صفت	نشانگرهای احاطه کننده	فاصله از نشانگر چپ (سانتی‌مورگان)	اثر افزایشی	درصد تبیین پدیدگانی
دیم				
عملکرد دانه	Xgwm389-pactMacc1	۳/۲	-۰/۷۳	۰/۴۶
	Xbarc113-PactMaca5	۳/۸	-۰/۷۶	۰/۳۷
	pacMaca5-Xwms95	۳/۹	-۰/۸۳	۱۸/۲۶
	Xgwm666-Issr25_2	۱/۸	۰/۰۹	۰/۷۰
	Issr25_2-CFA2257	۸/۷	-۰/۱۵	۲/۹۰
	0-PactMgaa2	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۸۶
	Xwmc24-Xwmc44_2	۴/۰	۰/۰۱	۰/۶۵
وزن دانه	ISSR27_2-Barc113	۶/۸	۱/۴۲	۱۸/۷۵
	Barc113- PactMaca5	۱۵/۸	۱/۷۹	۵/۷۶
	Xwmc14_2- ISSR27_3	۱۰/۰	۳/۷۱	۲۵/۷۹
آبیاری تکمیلی				
عملکرد دانه	PactMaca5-Xwms95	۳/۹	-۰/۰۳	۵/۴۰
	ISSR27_3-Xgwm666	۱۱/۱	۰/۱۴	۱/۹۰
	ISSR25_2-CFA2257	۱/۷	-۰/۰۵	۴۰/۴۶
	CFA2257-PacgMccg	۱/۹	-۰/۱۸	۲/۷۰
	CFA2257- PacgMccg	۲۱/۹	-۰/۱۳	۴/۵۰
	CFA2185-PaccMagc4	۳/۳	۰/۰۵	۱/۵۳
وزن دانه	Xwmc14_2- ISSR27_3	۱۰/۰	۵/۴۲	۴۱/۹۱
	PacMatcc2-Xwmc44_1	۱۰/۰	۵/۵۷	۴۳/۶۴



شکل ۷- گروه‌بندی توده‌های بومی گندم ایران براساس داده‌های اس.اس.آر با استفاده از الگوریتم‌های تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر مدل بیز و تجزیه خوشه‌بندی مبتنی بر فاصله ژنتیکی.

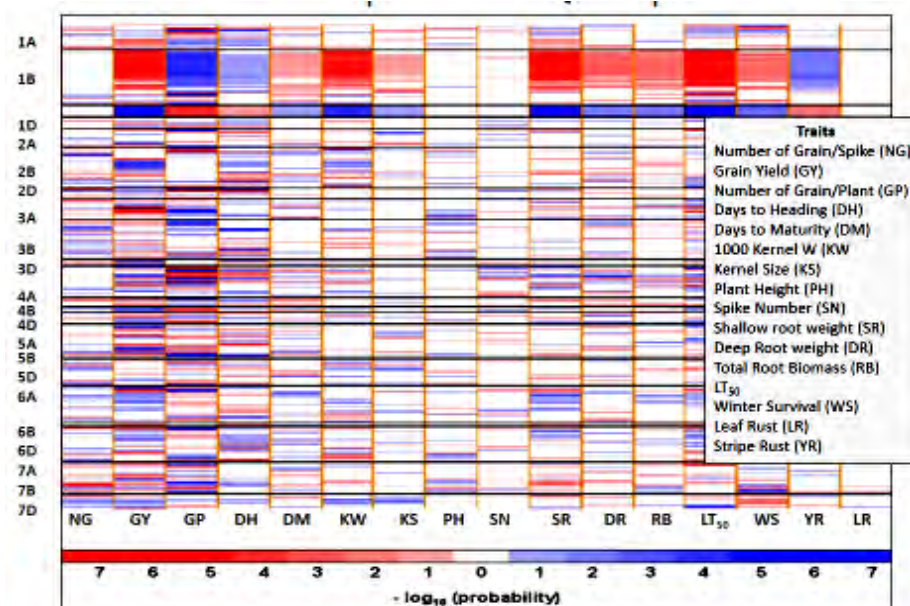
تنوع آلی ژن‌های بهاره‌سازی در ۳۹۵ توده بومی و رقم‌های 'Chinese Spring' و 'Thatcher' با استفاده از ۱۲ جفت آغازگر ژن‌های *VRN* بررسی شد. بررسی توالی قطعه ۶۵۰ بازی حاصل از جفت آغازگر *VRN1A-F&R*، نشان دهنده تنوع نوکلئوتیدی ۷۱٪ بین نژادگان بهاره و پاییزه بود. برای قطعه ۹۸۰ جفت بازی تکثیری توسط جفت آغازگر *VRN1B-F&R*، فقط در رقم 'Chinese Spring' یک چارچوب خواندن آزاد به طول ۳۱۱ جفت باز مشاهده شد. نژادگان‌های بهاره و پاییزه مورد مطالعه از نظر توالی قطعه‌های ۱۵۲ و ۴۰۰ جفت بازی حاصل از جفت آغازگر *API_ProDel_F1&R1* شباهت زیادی نشان دادند. در توالی هر دو قطعه، ناحیه حفاظت شده با ضریب حفاظت شدگی یک مشاهده شد. توسط جفت آغازگر *VRN4-B-NOINS-F&R* که برای تکثیر آلل مغلوب ژن *vrn-B3* طراحی شده است، سه قطعه ۱۱۴۰، ۱۳۰۰ و ۲۰۰۰ جفت بازی در نژادگان‌های مورد مطالعه تکثیر شدند. بلاست توالی قطعه‌های ۱۱۴۰ و ۱۳۰۰ جفت بازی با توالی‌های موجود در داده پایگاه NCBI نشان دهنده شباهت بالا با توالی ژن *vrn-B3* در رقم‌های 'Chinese Spring' و 'Copia' بود. نژادگان بهاره و پاییزه مورد مطالعه از نظر توالی قطعه ۷۱۰ جفت بازی تکثیر شده توسط جفت آغازگر *Intr1/A/F2&R3* شباهت ۹۸٪ نشان دادند. به طوری که در طول این دو توالی فقط چهار چندشکلی تک نوکلئوتیدی مشاهده شد. با استفاده از جفت آغازگر *Intr1/B/F&R3*، قطعه ۷۰۹ جفت بازی در ۱۵۲ نژادگان شامل ۶۳ نژادگان بهاره و ۶۹ نژادگان پاییزه تکثیر شد. تجزیه توالی این قطعه وجود هفت چندشکلی تک نوکلئوتیدی بین نژادگان‌های میانی و پاییزه را نشان داد. یک ناحیه حفاظت شده به طول ۵۷۷ جفت باز با ضریب حفاظت شدگی یک در بین توالی قطعه‌های تکثیری توسط این جفت آغازگر مشاهده شد. توالی قطعه ۱۶۷۱ جفت بازی تکثیر شده توسط جفت آغازگر *Intr1/D/F&R3* و قطعه ۹۹۷ جفت بازی تکثیر شده توسط جفت آغازگر *Intr1/D/F&R4* با توالی ژن *VRN-D1* نژادگان‌های مختلف موجود در داده پایگاه NCBI شباهت بالایی نشان داد.

در مجموع ۱۳، ۲ و ۱۰ آلل در مکان‌های *Glu-A3*، *Glu-B3* و *Glu-D3* در گندم‌های بومی ایران تکثیر شدند. برای مکان ژنی *Glu-A3*، با استفاده از دو جفت آغازگر *Glu3-A.2* و *Glu3A.3* به ترتیب ژن‌های زیرگروه رمزکننده پروتئین‌هایی با توالی انتهای آمینی MDTSCIP- و METSCIP- تکثیر شدند. قطعه ۷۰۰ جفت بازی با ۴۶/۶٪ و قطعه ۷۴۲ جفت بازی با ۰/۲٪ بیشترین و کمترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. در مکان ژنی *Glu-B3*، با استفاده از جفت آغازگر *Glu3B.2* طراحی شده بر

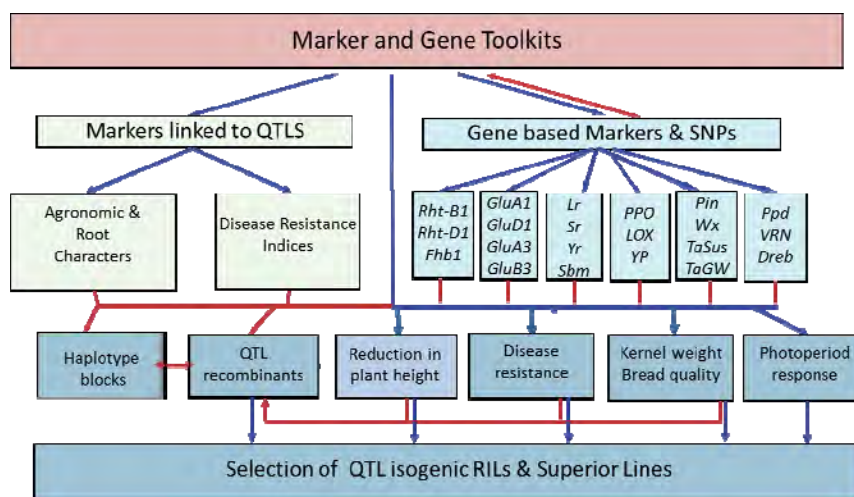
اساس ژن‌های زیرگروه رمزکننده پروتئین‌هایی با توالی انتهایی آمینی -METSHIPG، دو قطعه ۴۴۰ و ۴۲۱ جفت بازی به ترتیب با فراوانی ۷۲/۵ و ۲۷/۵٪ تکثیر گردید. جفت آغازگرهای Glu3D.2، Glu3D.3 و Glu3D.4 به ترتیب طراحی شده بر اساس ژن‌های زیرگروه رمزکننده پروتئین‌هایی با توالی انتهایی آمینی -METSRRV، -METCIP و -METSCIP برای تکثیر مکان *Glu-D3* استفاده شد. در مجموع ۱۰ آلل تکثیر شد و آلل ۷۰۰ جفت بازی با ۳۴/۹٪ و آلل ۵۷۸ جفت بازی با ۰/۳٪ بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند. محتوای اطلاعات چندشکلی از ۰/۱۳ تا ۰/۷۶ با میانگین ۰/۴۲ متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های ژن‌های مورد مطالعه، نژادگان‌های بومی گندم ایران را به سه گروه وابسته کرد.

تولید ابزارهای گزینشی مولکولی براساس نتایج بررسی‌های مکان‌یابی ژنی

براساس نتایج بررسی‌های مکان‌یابی ژن کنترل کننده برای صفتهای مرتبط با تحمل به سرما، خشکی و مقاومت به زنگ و نشانگرهای پیوسته با این ژن‌های کنترل کننده و چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی‌های مربوط به ژن‌های مختلف، ابتدا نقشه ژن کنترل کننده و ژن برای صفتهای مورد مطالعه در ژنگان گندم طراحی گردید. در شکل ۸، جایگاه کروموزومی ژن‌های کنترل کننده صفتهای مورد مطالعه در کروموزوم‌های گندم آورده شده است. برای استفاده در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر، بر مبنای این نقشه و اطلاعات نشانگری، نشانگرهای عملکردی برای صفتهای مختلف طراحی شد (شکل ۹) و با استفاده از این نشانگرهای عملکردی و نشانگرهای اس.اس.آر، رتروترانسپوزونی و چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی و مدل‌های آماری ایجاد شده، ارزش بهنژادی ژنگان‌شناسی^۱ رقم‌ها، رگه‌ها، رگه‌های خویش‌آمیخته نو ترکیب و توده‌های بومی مورد استفاده در بررسی‌های یاد شده برآورد گردید. در نهایت براساس ارزش بهنژادی ژنگانی، رگه‌های خویش‌آمیخته نو ترکیب ایزوژن برای صفتهای تحمل به سرما، خشکی و مقاوم به زنگ و رگه‌ها و رقم‌های با ویژگی‌های تکمیل کننده برای تولید جمعیت‌های چندوالدی برای تولید نژادگان‌های پرمحصول، متحمل به تنش‌های محیطی و سازگار به شرایط سخت انتخاب شدند.



شکل ۸- ناحیه‌های کروموزومی ژن‌ها و ژن‌های کنترل کننده صفتهای تعداد دانه در سنبله (NG)، عملکرد دانه (GY)، تعداد دانه در بوته (GP)، روز تا رسیدگی (DM)، وزن ۱۰۰ دانه (KW)، اندازه دانه (KS)، ارتفاع بوته (PH)، تعداد سنبله (SN)، وزن ریشه‌های سطحی (SR)، وزن ریشه‌های عمیق (DR)، زیست‌توده کل ریشه (RB)، LT₅₀، زمستان‌گذرانی (WS)، زنگ قهوه‌ای (LR) و زنگ زرد (YR) در گندم.

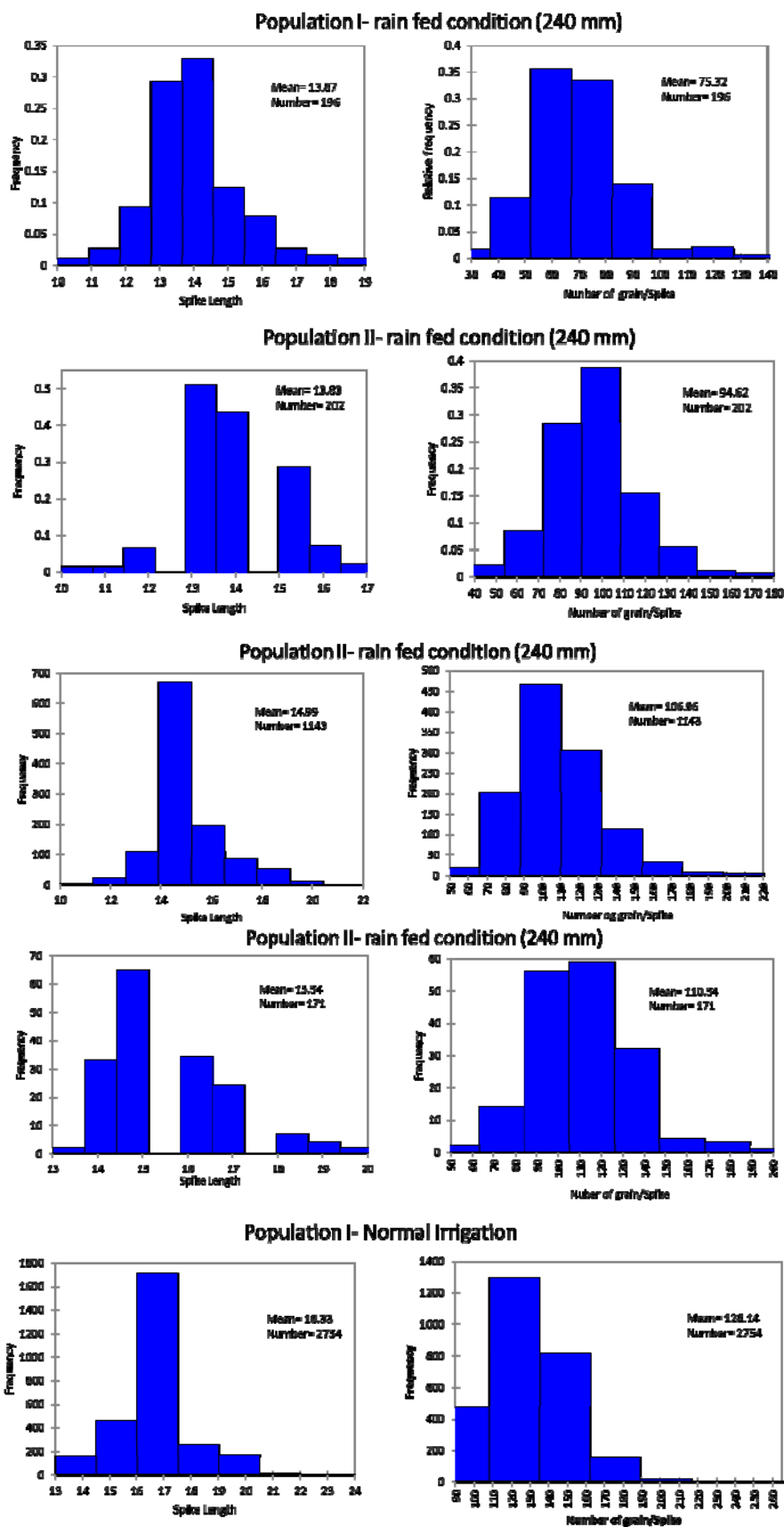


شکل ۹- نشانگرهای عملکردی تهیه شده برای صفتهای مد نظر برای استفاده در برنامه‌های گزینش به وسیله نشانگر.

تولید و ارزیابی جمعیت‌های چندوالدی برای تولید رقم‌های جدید

برای تولید جمعیت، رقم‌ها، نژادگان‌ها و رگه‌های نوترکیب انتخاب شده در قالب سه جمعیت چندوالدی تلاقی داده شدند و جمعیت‌های حاصل در شرایط مزرعه‌ای کشت داده شد. بذر هر بوته نسل دوم در چند ردیف برای تولید خانواده‌های نسل سوم کشت و در نسل سوم، گزینش نژادگان‌های مطلوب براساس عملکرد دانه، اجزا عملکرد (طول سنبله، تعداد دانه در سنبله، وزن هزار دانه، تعداد پنجه بارور)، مقاومت به زنگ زرد در شرایط آلودگی طبیعی، شکل و اندازه برگ‌ها به ویژه برگ پرچم انجام شد. نژادگان‌های نسل چهارم دو جمعیت چندوالدی در دو ایستگاه به ترتیب با میزان بارندگی ۲۴۰ و ۲۵۰ میلی‌متر و یک جمعیت با آبیاری معمولی کشت شدند. از جمعیت اول و دوم در ایستگاه اول به ترتیب ۱۹۶ و ۲۰۲ نژادگان و ایستگاه دوم به ترتیب ۱۱۴۳ و ۱۷۱ نژادگان و از جمعیت با آبیاری معمولی ۲۷۵۴ نژادگان برداشت شد. شکل ۱۰، دامنه و میانگین طول سنبله و تعداد دانه در سنبله نژادگان‌های انتخابی را نشان می‌دهد. این نژادگان‌ها در شرایط بدون آبیاری دارای طول سنبله با دامنه ۱۰ تا ۱۹ و میانگین ۱۳/۸۷ سانتیمتر و تعداد دانه در سنبله با دامنه ۳۸ تا ۱۸۰ و میانگین ۹۴/۲۰ دانه بود. در شرایط آبیاری عادی نیز طول سنبله و تعداد دانه در سنبله نژادگان‌های انتخابی به ترتیب در دامنه ۱۳ تا ۲۴ با میانگین ۱۶/۳۳ سانتیمتر و ۹۰ تا ۲۶۰ با میانگین ۱۲۸/۱۴ دانه قرار داشت. این نژادگان‌ها در سال زراعی ۹۵ تا ۹۶ کشت و در طول فصل ارزیابی، براساس ویژگی‌هایی مانند طول و وزن سنبله، ارتفاع بوته، تعداد پنجه انجام و نژادگان‌های مطلوب برای تولید و بذر نسل ششم انتخاب شدند. نژادگان‌های انتخابی در سال زراعی ۹۶ تا ۹۷ برای تولید بذر نسل هفتم و نیز جهت ثبت کشت خواهند شد. این پژوهش گامی در جهت کاربردی کردن نتایج روش‌های ژنگان‌شناسی در اصلاح گیاهان و تولید رقم‌های پرمحصول و رساندن نتایج به دست آمده به کشاورزان است.

نژادگان‌های انتخابی نسل پنجم در سال زراعی ۹۴ تا ۹۵ به صورت بوته به ردیف زیر شرایط آبیاری معمولی و بدون آبیاری کشت شدند. در طول فصل ارزیابی، براساس ویژگی‌هایی مانند طول و وزن سنبله، ارتفاع بوته، تعداد پنجه انجام نژادگان‌های مطلوب برای تولید و بذر نسل ششم انتخاب شدند. نژادگان‌های انتخابی در سال زراعی ۹۶ تا ۹۷ برای تولید بذر نسل هفتم و نیز برای ثبت کشت خواهند شد. شکل‌های بالا نمونه‌ای از نژادگان‌های تولید شده و ویژگی‌های آن‌ها را در سال زراعی ۹۴ تا ۹۵ نشان می‌دهد. این پژوهش گامی در جهت کاربردی کردن نتایج روش‌های ژنگان‌شناسی در اصلاح گیاهان و تولید رقم‌های پرمحصول و رساندن نتایج به دست آمده به کشاورزان است.



شکل ۱۰- دامنه و میانگین طول سنبله و تعداد در سنبله برای نژادگان‌های انتخابی زیر شرایط بدون آبیاری و آبیاری عادی.

برنامه آینده

اگرچه روش‌های سنتی به‌نژادی نقش زیادی در افزایش کمیت و کیفیت محصول گندم ایفا کرده است اما پایین بودن چشمگیر عملکرد گندم از پتانسیل واقعی آن، استفاده از روش‌های نوین ژنگان‌شناسی را در برنامه‌های اصلاح گندم اجتناب ناپذیر کرده است. در این راستا، امروزه با پیشرفت ابزارهای توالی‌یابی ژنگان و کاهش هزینه‌ها، ارزیابی نژادگانی به کمک توالی‌یابی (GBS) در نقش یکی از ابزارهای کارا در اصلاح گیاهان مختلف است و گزینش ژنگانی براساس نشانگرهای چندشکلی تک نوکلئوتیدی توزیع شده در کل ژنگان، برآورد دقیق ارزش به‌نژادی ژنگانی رقم‌ها و نژادگان‌ها را امکان‌پذیر کرده است. در مطالعه حاضر، نیز با استفاده از روش GBS حدود ۱۰۰۰۰۰ نشانگر چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در ۳۹۵ نژادگان گندم بومی ایران تولید شده است که در گام بعدی برای مکان‌یابی دقیق ژن‌ها و ژن‌های کنترل‌کننده صفات‌های زراعی و فیزیولوژیکی با استفاده از روش کاوش سراسری ژنگان استفاده خواهد شد. افزون بر این، نقشه ژنتیکی دقیق جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب گندم حاصل از تلاقی رقم 'Yecora Rojo' و نژادگان بومی شماره ۴۹ بر مبنای ۱۰۰۰۰ نشانگر چندشکلی تک نوکلئوتیدی تهیه شده است که برای شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفات‌های درگیر در تحمل به تنش کم‌آبی و صفات‌های ریشه استفاده خواهند شد. امید است در آینده با وجود ژرم‌پلاسِم بسیار غنی تولیدی در این مطالعه و بهره‌مندی از ابزارهای ژنگان‌شناسی پیشرفته بتوان گام موثری را در افزایش تولید و بهره‌وری گندم در کشور برداشت.

منابع

1. Lobell, D.B. and S.M. Gourdji. 2012. The influence of climate change on global crop productivity. *Plant Physiol.* 160:1686-1697.
2. FAO. 2013. Food balance sheets. A handbook, food balance sheets. Rome: FAO.
3. FAOSTAT. 2015. Retrieved from <http://faostat3.fao.org/download/E/EF/E>.
4. FAO. 2009. The state of food insecurity in the world. Economic crises impacts and lessons learned. Rome: FAO.
5. Naha, S.L. and C.F. Chaua. 2010. Issues and challenges in defeating world hunger. *Trends Food Sci. Technol.* 21:544-557.
6. Tester, M. and P. Langridge. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327:818. doi: 10.1126/science.1183700.
7. Curtis, T. and N.G. Halford. 2014. Food security: The challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Ann. Appl. Biol.* 164:354-372.
8. Ray, D.K., N.D. Mueller, P.C. West and J.A. Foley. 2013. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLOS ONE* 8(6):e66428.
9. Sofalian, O., S.A. Mohammadi, S. Aharizad, M. Moghaddam and M.R. Shakiba. 2005. Inheritance of cold tolerance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Turk. J. Agr. For.* 30: 399-405.
10. Limin, A.E. and D.B. Fowler. 1993. Inheritance of cold hardiness in *Triticum aestivum* x synthetic hexaploid wheat crosses. *Plant Breed.* 110:103-108.
11. Mohammadi, S.A., B.M. Prasanna, C. Sudan and N.N. Singh. 2002. A microsatellite marker based study of chromosomal regions and gene effects on yield and yield components in maize. *Cell. Mol. Biol.* 7:599-606.
12. Mohammadi, S.A., M. Khodarahmi, S. Jamalirad and M.R. Jalal Kamali. 2009. Genetic diversity in a collection of old and new bread wheat cultivars from Iran as revealed by simple sequence repeat-based analysis. *Ann. Appl. Biol.* 154:67-76.
13. Ehdai, B., S.A. Mohammadi, M. Nouraein, H. Bektas and J.G. Waines. 2016. QTLs for root traits at mid-tillering and for root and shoot traits at maturity in a RIL population of spring bread wheat grown under well-watered conditions. *Euphytica* 211:39-39.
14. Zarei Abbasabad, E., S.A. Mohammadi, M. Moghaddam and M.R. Jalal Kamali. 2016. Analysis of genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium in Iranian wheat landraces using SSR markers. *Plant Genet. Resour.* doi:10.1017/S1479262115000684.

Genomics from Laboratory to Field: Production of High Yielding and Environmental Stresses Tolerant Wheat Genotypes

S.A. Mohammadi¹ and M.A. Mohammadi Aghadam²

To develop high yielding and environmental stresses tolerant wheat genotypes, quantitative trait loci (QTL) were mapped for various traits and nucleotide diversity of yellow (*Yr*) and leaf (*Lr*) rusts genes and resistance gene analogues in resistance and susceptible wheat cultivars and vernalization genes in Iranian wheat landraces were evaluated for development of SNP markers. Population structure of wheat landraces were assessed using microsatellites, vernalization, leaf rust resistance and low molecular glutamine subunits genes. Based on the identified genes and markers toolkit and genomic breeding values, QTL isogenic recombinant inbred lines and genotypes and varieties with multiple genes and QTLs were selected and crossed for development of multi-parental population. Selection of desirable genotypes was started from F₃ generation based on grain yield and its components, yellow rust resistance under natural infection, shape and size of flag leaf. The selected genotypes at different generations were evaluated under normal irrigation and rainfed conditions. Under rainfed condition, in the selected F₅ genotypes, length of spike varied from 10 to 19 with an average of 13.78 cm and number of grain per spike ranged from 38 to 180 with a mean of 94.20 grain. Under normal irrigation, length of spike and number of grain per spike of the selected genotypes varied from 13 to 24 with a mean of 16.33 cm and 20 to 90 with a mean of 128.14 grain, respectively. The results of this project indicated that application of genomics methods and techniques could increase the efficiency of development of high yielding and environmental stresses tolerant cultivars.

Key words: Genomic breeding selection, Marker, Selection, Wheat.

1. Corresponding author, email: mohammadi@tabrizu.ac.ir

2. Professor of University of Tabriz and Researcher of Arta Seed Biotech Company, respectively.