

ارزیابی ارتباط بین مقاومت به یخ‌زدگی با نشانگرهای پروتئین‌های ذخیره‌ای و برخی صفات فیزیولوژی در جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.)

مریم بهی^۱، امید سفالیان^{۲*}، مجید شکرپور^۳، علی اصغری^۴، سعید خماری^۵ و بهنام فیروزی^۶

(E-mail: sofalian@gmail.com)

(تاریخ وصول: ۹۱/۰۹/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۴/۰۵)

چکیده

به منظور بررسی ارتباط بین نشانگرهای پروتئینی و صفات تغییرات میزان پرولین، راندمان کوانتومی فتوسنتز II، دمای ۵۰ درصد کشتندگی و شاخص زنده‌مانی مزرعه، ۲۰ ژنوتیپ و لاین پیشرفته جو در یک آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی ارزیابی شدند. در این آزمایش، پس از خوگیری گیاهان به سرما در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت سه هفته، تیمار یخ‌زدگی در دماهای ۴-، ۷-، ۱۰-، ۱۳- و ۱۶- اعمال شد و دمای ۵۰ درصد کشتندگی (LT_{50}) آن‌ها با تبدیل پروبیت تعیین شد. قبل و بعد از مرحله خوگیری نمونه برگ‌گی برداشته شد و میزان پرولین، قند محلول، کلروفیل و همچنین راندمان کوانتومی فتوسنتز II (Fv/Fm) اندازه‌گیری شد. به منظور برآورد شاخص FSI، ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی در آزمایش در مزرعه نیز کشت شدند. به منظور بررسی ارتباط بین نشانگرهای پروتئینی با مقاومت به یخ‌زدگی در جو، پروتئین‌های گلیادین بذر با استفاده از تکنیک A-PAGE بررسی شدند. نتایج به دست آمده در مجموع نشان‌دهنده وجود روندی کاهشی در راندمان کوانتومی فتوسنتز II و روندی افزایشی در میزان قند محلول و میزان پرولین در طول دوره خوگیری به سرما بود. در بررسی همبستگی بین صفات، بین شاخص زنده‌مانی مزرعه و LT_{50} (-۰/۶۰۱) همبستگی منفی و معنی‌داری به دست آمد. بین برخی صفات مورفوفیزیولوژیک با شاخص FSI و LT_{50} نیز همبستگی وجود داشت. در تجزیه خوشه‌ای، که بر مبنای صفات فیزیولوژیک انجام شد، ژنوتیپ‌های F-A1-1، F-A1-2، F-A2-11، F-GRB-85-5 و F-A2-11 و ارقام صحرا، سهند، دشت و ماکوئی در یک گروه قرار گرفتند که شاخص FSI و LT_{50} بالایی داشتند. در این پژوهش ها رقم ماکوئی، با داشتن $LT_{50} = -17/66$ و بالاترین درصد زنده‌مانی در مزرعه، مقاوم‌ترین رقم شناخته شد. در تجزیه رگرسیون نیز ارتباط چهار نشانگر با صفت LT_{50} به دست آمد.

واژگان کلیدی: پرولین، تجزیه رگرسیون، A-PAGE، FSI، LT_{50} .

۱. کارشناس ارشد رشته اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل - ایران

۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل - ایران (نویسنده مسئول مکاتبات)*

۳. استادیار گروه باغبانی دانشکده کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج - ایران

۴. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل - ایران

۵. دانشجوی دکتری رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل - ایران

۶. دانشجوی دکتری رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل - ایران

مقدمه

تولید محصولات کشاورزی تحت تأثیر تنش‌های گوناگون زیستی و غیرزیستی کاهش می‌یابد؛ بنابراین، به حداقل رساندن خسارت‌ها هدف اصلی پژوهشگران در جهت تأمین نیازهای غذایی مردم است. تولید ارقام متحمل به تنش یکی از راه‌های رسیدن به این هدف است. سرما، شوری و خشکی از جمله تنش‌های غیرزیستی مهم‌اند که روی رشد و تولید گیاهان اثر نامطلوبی می‌گذارند (۱۲). جو از نظر تولید جهانی بعد از گندم، برنج و ذرت چهارمین غله است. هر ساله بیش از ۱۳۶ میلیون تن جو در جهان تولید می‌شود که به‌طور عمده در تغذیه دام، طیور و صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرد. عملکرد ارقام پاییزه در جو به‌طور معنی‌داری بیشتر از ارقام بهاره است. برای اجتناب از تنش گرما و خشکی آخر فصل لازم است ارقام بهاره نیز زودتر کشت شوند. بنابراین، تولید ارقام مقاوم به سرما یکی از هدف‌های اصلی اصلاح جو در اغلب کشورهای جهان است (۹). تعیین LT_{50} طوقه بهترین روش برآورد ماندگاری در مزرعه است، زیرا طوقه گیاه در غلات حساس‌ترین قسمت گیاه است و در رشد دوباره پس از تنش یخزدگی نقش حیاتی دارد (۶). مقاومت یخزدگی و بقا در زمستان صفت پیچیده‌ای است که به عوامل متعددی مانند ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، ژنوتیپ گیاه، وضعیت خاک و نوسانات آب و هوایی بستگی دارد. درحقیقت چندین کروموزوم در مقاومت یخزدگی نقش دارند و گفته می‌شود که این صفت تحت کنترل ژن‌های گوناگون است (۱۷ و ۲۴). پژوهشگران اصلاح نباتات همیشه در پی یافتن نشانگرهای ژنتیکی‌اند که با این صفات پیوستگی نشان دهند تا بتوان از این نشانگرها به‌مثابه معیارهای غیرمستقیم انتخاب کارآمد استفاده کرد. نشانگرهای بیوشیمیایی شامل نشانگرهای پروتئینی مانند پروتئین‌های ذخیره‌ای و آیزوزایم‌های هستند (۷). به‌علت چندشکلی بیش از اندازه در گل‌باین‌ها، همچنین به دلیل ترکیب ساده و مونومر، سهولت استخراج، پایداری و ظهور تقریباً ثابت آن‌ها در شرایط محیطی گوناگون، برای تعیین یکنواختی ارقام، شناسایی وارته و شناسایی شجره‌ها به‌طور وسیع از الگوهای گل‌باینی استفاده می‌شود (۱۵). تجمع اجزای تشکیل‌دهنده قندها مانند ساکارز، رافینوز، سوربیتول و فروکتان طی دوره‌ی خوشگیری گیاه بارها مشاهده شده است. تعدادی از این ترکیبات طی شرایط آب‌کشی‌دگی در اثر یخزدگی یا خشکی موجب ثبات غشاها و پروتئین‌ها می‌شوند (۳). کاهش مقدار کلروفیل در اثر تنش به‌دلیل تغییر در متابولیسم نیتروژن و ساخت ترکیباتی نظیر پرولین است که در تنظیم اسمزی نقش دارد (۲۱). اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل براساس

اندازه‌گیری فیزیولوژیکی پایه‌ریزی شده است که کارایی اخذ و جذب نور را در رابطه با مجموعه سیستم نوری II برگ اندازه می‌گیرد (۲۰). نسبت Fv/Fm بیانگر حداکثر عملکرد کوانتومی واکنش فتوشیمیایی فتوسیستم II و شاخصی مهم برای تعیین وضعیت دستگاه فتوسنتزی است. تنش‌های محیطی با تأثیر در کارآیی فتوسیستم II سبب کاهش نسبت Fv/Fm می‌شوند (۱۰). پرولین آزاد در گیاهان آلی به‌طور گسترده وجود دارد و معمولاً به مقادیر زیاد در واکنش به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابد. پرولین، علاوه بر نقشش در تنظیم اسمزی، در تثبیت ساختارهای درون‌سلولی (مانند غشا و پروتئین‌ها) و برای پتانسیل احیاکنندگی سلولی تحت شرایط تنش در نقش بافر مشارکت می‌کند. برای رهایی از تنش، پرولین سریع تجزیه می‌شود و مواد احیاکننده قوی را تولید می‌کند تا فسفوریله‌شدن اکسیداتیو میتو‌کندری و تولید ATP برای بازبایی و ترمیم آسیب‌های حاصل از تنش انجام شود (۱).

بیشتر صفات گیاهی که دارای اهمیت اقتصادی فراوانی‌اند به‌صورت کمی به ارث می‌رسند. این صفات وراثت‌پذیری نسبتاً پایینی دارند و گزینش مستقیم در مزرعه با مشکلاتی همراه است. همچنین انجام دادن عملیات اصلاحی در ارتباط با این صفات مشکل است. پژوهشگران اصلاح نباتات همیشه در پی یافتن نشانگرهای ژنتیکی و بیوشیمیایی‌اند که با این صفات پیوستگی داشته باشند تا بتوان از این نشانگرها به‌مثابه معیارهای غیرمستقیم گزینش استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۰ ژنوتیپ جو (جدول ۱) انتخاب و در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلدان کاشته شد.

بعد از مرحله چهاربرگی (دو تا سه هفته بعد از کاشت) گلدان‌ها از گلخانه به اتاقک رشد منتقل و به‌مدت سه هفته در دمای \pm چهار درجه سانتی‌گراد عادت‌دهی شدند. سپس آزمون انجام‌داد، مطابق روش‌های لیمین و فولر و محفوظی و همکاران، با استفاده از فریزر قابل برنامهریزی انجام گرفت (۱۱ و ۱۳). برای انجام‌دادن این آزمون پس از جدا کردن برگ‌ها و ریشه‌ها (سه سانتی‌متری بالای طوقه و یک سانتی‌متری زیر طوقه)، طوقه‌ها در ظرف‌های آلومینیومی قرار گرفتند و با ماسه بادی نمدار پوشانده شدند. پس از اعمال تیمارهای دمایی (در پنج سطح دمایی ۴-، ۷-، ۱۰-، ۱۳- و ۱۶- درجه سانتی‌گراد)، به‌مدت ۲۴

جدول ۱. ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی در ارزیابی ارتباط گلیادین‌ها و مقاومت به پیخ‌زدگی

شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ
۱	F-A1-1	۱۱	GLORIA-BAR/COPAL//BEN.4D/3/S.P-B/4/ DC-B/SEN/5/CONGONA
۲	F-A1-2	۱۲	STIPA/PETUNIA1//KOLLA/BBSC (a)
۳	F-A2-11	۱۳	CHAMICO/TOCTE//CONGONA (a)
۴	F-GRB-84-11	۱۴	PALLIDUM48//NORDIC/563.6.5/3/CEL-B...2/ MZQ//CEL-B/5/LINO/6/CONGONA
۵	F-GRB-85-5	۱۵	CHAMICO/TOCTE//CONGONA (d)
۶	PETUNIA1/CHINIA(a)	۱۶	لیسیوی
۷	CONGONA/BORR	۱۷	صحرا
۸	STIPA/PETUNIA1//KOLLA/BBSC(b)	۱۸	سهند
۹	PETUNIA1/CHINA (c)	۱۹	دشت
۱۰	STIPA/PETUNIA1//KOLLA/BBSC (c)	۲۰	ماکوئی

در ثانیه ارزیابی شد. شاخص Fv/Fm از فرمول Fm-Fo/Fm به دست می‌آید که در این رابطه، Fm حداکثر فلورسانس کلروفیل بعد از تابیدن یک پالس نور اشباع و Fo حداقل فلورسانس کلروفیل بعد از تاباندن یک پرتو ضعیف در برگ‌های خو گرفته به تاریکی است. تفاضل Fm و Fo فلورسانس متغیر یا Fv نامیده می‌شود. شاخص Fv/Fm نشان‌دهنده حداکثر راندمان کوانتومی فتوسیستم II در شرایطی است که تمام مراکز واکنش فتوسیستم II باز باشند (۱۴). اندازه‌گیری محتوای کلروفیل با استفاده از دستگاه SPAD-502 انجام گرفت. همچنین الکتروفورز پروتئین‌های گلیادین بر اساس روش متاکوفسکی و همکاران (۱۶) و با استفاده از روش A-PAGE انجام شد. برای تجزیه‌های آماری از نرم‌افزار SPSS Ver. 16 استفاده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. تجزیه داده‌های حاصل از استخراج پروتئین‌ها به مثابه نشانگرهای بیوشیمیایی با استفاده از نرم‌افزارهای PopGene 1.31 و NTSYSpc ver. 2.0 انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس LT₅₀ نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. همچنین نتایج تجزیه واریانس FSI حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین بلوک‌ها در سطح احتمال یک درصد (نشانگر بلوک‌بندی مزرعه در جهت مناسب) و میان

ساعت در انکوباتور چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و آماده کشت شدند. پس از دو هفته، بوته‌های زنده‌مانده ارزیابی و شمارش شدند. با استفاده از تجزیه پروبیت دمای ۵۰ درصد کشندگی (LT₅₀)^۱ تعیین شد. برای مطالعه مقاومت ژنوتیپ‌ها در مزرعه، گیاهان در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار در پاییز سال ۸۹ کشت شدند و پس از گذراندن زمستان، در اردیبهشت سال ۹۰، تعداد گیاهان زنده‌مانده شمارش شد و شاخص FSI (درصد زنده‌مانی ژنوتیپ‌ها در مزرعه) به دست آمد. غلظت پرولین در بافت‌های برگ‌های کاملاً گسترش یافته به روش بیتس و همکاران اندازه‌گیری شد (۲). با استفاده از محلول‌های استاندارد و رابطه رگرسیونی بین غلظت و مقدار جذب در ۵۲۰ نانومتر، غلظت پرولین هر نمونه برحسب میکروگرم پرولین در هر گرم وزن تر محاسبه شد. اندازه‌گیری قندهای محلول با روش ایریگوئن و همکاران و با استفاده از محلول استاندارد و رابطه رگرسیونی غلظت قند محلول صورت گرفت (۸). برای اندازه‌گیری میزان فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm) از دستگاه فلورومتر مدل (Optic Science- OS-30p USA) کمک گرفته شد. با استفاده از گیره‌های مخصوص، برگ گیاهان به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و سپس میزان فلورسانس سه گیاه از هر ژنوتیپ در شدت نور ۱۰۰۰ میکرومول (فوتون) بر مترمربع

1. Lethal Temperature 50 percent

2. Field Survival Index

یک درصد معنی‌دار شد. برای صفت فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm) اثر ساده دما و ژنوتیپ و برای صفت میزان کلروفیل اثر ژنوتیپ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال پنج درصد بود (جدول ۲). LT_{50} یک صفت مناسب برای ارزیابی مقاومت به یخزدگی عنوان شد (۴). برای صفت‌های پرولین و میزان قند محلول اثر متقابل دما و ژنوتیپ در سطح احتمال

جدول ۲. تجزیه واریانس FSI و LT_{50} برای ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه

منابع تغییر		درجه آزادی	میانگین مربعات
			LT_{50} FSI
تکرار		۲	۱۶۴۵/۸۶**
ژنوتیپ		۱۹	۲۶۲/۱۲*
خطا		۳۸	۱۱۳/۰۱
ضریب تغییرات (%)			۱۵/۴۴

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

جدول ۳. تجزیه واریانس صفت‌های فیزیولوژیک برای ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه

منابع تغییر		درجه آزادی	میانگین مربعات	
			Fv/Fm	میزان قند محلول
تکرار		۲	۰/۰۱۴*	۰/۱۱ ^{ns}
خوگیری		۱	۰/۲۴۷**	۱۷/۳۵**
ژنوتیپ		۱۹	۰/۰۱۱**	۰/۴۲**
خوگیری × ژنوتیپ		۱۹	۰/۰۰۴ ^{ns}	۰/۳۲**
خطا		۷۸	۰/۰۰۴	۰/۰۵
ضریب تغییرات (%)			۰/۷۸	۱۹/۱۸

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

شده است. میزان قند محلول در تمامی ژنوتیپ‌ها به جز ژنوتیپ F-A1-1 طی عادت‌دهی افزایش یافت. میزان قند محلول در ژنوتیپ STIPA/PETUNIA1... (b) تا حدودی هم قبل و هم بعد از عادت‌دهی کم بود، ولی در کل بین ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس روند خاصی مشاهده نشد. جدول مقایسه میانگین برای صفات Fv/Fm، میزان کلروفیل، FSI و LT_{50} در جدول ۶ آورده شده است. طبق نتایج به دست آمده رقم ماکوئی با داشتن بیشترین میزان LT_{50} (۱۷/۶۶-) مقاوم‌ترین ژنوتیپ و ژنوتیپ شماره ۸ با داشتن کمترین میزان LT_{50} (۵) حساس‌ترین ژنوتیپ به یخزدگی شناخته شد. رقم ماکوئی بیشترین میزان FSI را داشت. میزان Fv/Fm بعد از خوگیری کاهش نشان داد. در مطالعه حاضر روند مشخصی در میزان کلروفیل طی تنش دما به دست نیامد، اما می‌توان مشاهده کرد که ژنوتیپ‌های STIPA/PETUNIA1... (b)، STIPA/PETUNIA1... (c)،

مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و دما برای صفت میزان پرولین در جدول ۴ آورده شده است. میزان پرولین قبل و بعد از عادت‌دهی در رقم ماکوئی بیشترین میزان را داشت که دارای بیشترین درصد زنده‌مانی در مزرعه و کمترین میزان LT_{50} بود. کمترین میزان پرولین مربوط به ژنوتیپ STIPA/PETUNIA1... (c) قبل از عادت‌دهی بود که کمترین درصد زنده‌مانی در مزرعه را داشت. با توجه به شکل می‌توان گفت که در بیشتر ژنوتیپ‌ها میزان پرولین پس از عادت‌دهی افزایش یافته است. محتوای پرولین آزاد در گیاهان عادت‌دهی نشده خیلی کم است و بعد از دو هفته خوگیری در شرایط کنترل شده، این میزان در تمام ژنوتیپ‌های گندم افزایش می‌یابد (۱۸). در این آزمایش میزان تجمع پرولین در ژنوتیپ‌های مقاوم بیشتر از ژنوتیپ‌های حساس بود. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و دما برای صفت میزان قند محلول در جدول ۵ آورده

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ در دما برای صفت میزان پرولین

رقم	میزان پرولین بعد از عادت‌دهی	میزان پرولین قبل از عادت‌دهی
۱	۰/۹۱۱	۰/۸۱۴
۲	۱/۱۱۴	۰/۷۹۹
۳	۰/۵۳۱	۰/۵۰۱
۴	۰/۶۲۳	۰/۸۱۵
۵	۰/۷۱۹	۰/۳۲۸
۶	۰/۴۸۹	۰/۲۴۶
۷	۰/۷۱۱	۰/۳۲۰
۸	۰/۸۳۵	۰/۳۴۱
۹	۰/۹۲۳	۰/۶۸۱
۱۰	۰/۹۲۹	۰/۰۳۰
۱۱	۰/۸۸۰	۰/۶۶۶
۱۲	۰/۷۵۳	۰/۷۸۰
۱۳	۰/۶۶۳	۰/۲۲۳
۱۴	۰/۸۳۵	۰/۷۱۲
۱۵	۰/۸۲۶	۰/۸۲۰
۱۶	۱/۱۳۶	۰/۹۱۵
۱۷	۰/۹۰۶	۰/۹۱۵
۱۸	۰/۸۹۱	۰/۹۳۱
۱۹	۱/۰۱۵	۰/۹۸۰
۲۰	۱/۳۴۴	۱/۰۲۱
	% LSD	۰/۰۱۹

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ در دما برای صفت میزان قند محلول

رقم	میزان قند محلول بعد از عادت‌دهی	میزان قند محلول قبل از عادت‌دهی
۱	۰/۶۵۷	۰/۷۲۹
۲	۱/۰۰۹	۰/۶۵۷
۳	۲/۰۵۵	۰/۹۰۰
۴	۱/۲۵۲	۰/۶۵۷
۵	۲/۰۱۰	۱/۱۲۶
۶	۱/۳۶۹	۰/۶۶۶
۷	۱/۷۲۱	۰/۳۲۳
۸	۱/۱۸۰	۰/۳۳۲
۹	۱/۴۶۰	۰/۹۷۳
۱۰	۱/۱۴۴	۰/۸۴۶
۱۱	۲/۱۵۴	۰/۸۱۹
۱۲	۱/۸۹۲	۰/۸۳۷
۱۳	۱/۸۱۱	۱/۲۷۰
۱۴	۲/۰۲۸	۰/۵۵۸
۱۵	۲/۰۴۶	۰/۷۴۷
۱۶	۱/۴۹۶	۰/۷۹۲
۱۷	۱/۳۴۲	۱/۲۲۵
۱۸	۱/۲۹۷	۰/۶۰۳
۱۹	۱/۱۱۷	۱/۰۹۹
۲۰	۱/۸۴۷	۰/۶۰۳
	% LSD	۰/۰۸۶

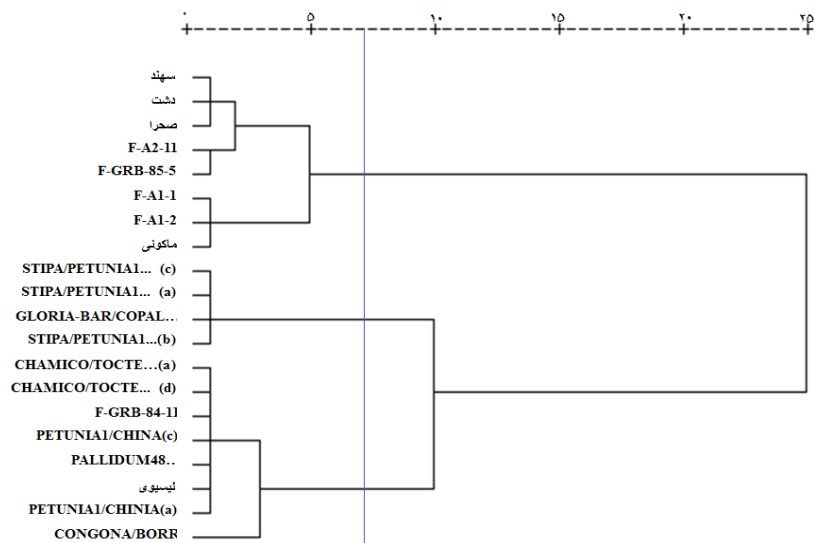
به طوری که ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند (شکل ۱). ژنوتیپ‌های ۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ در یک گروه قرار گرفتند که دارای کمترین میزان FSI و LT_{50} بودند و می‌توان از آن‌ها به مثابه ارقام حساس نام برد. ژنوتیپ‌های F-A1-1، F-A1-2، F-A2-11 و F-GRB-85-5 و ارقام صحرا، سهند، دشت و ماکوئی ارقام مقاوم شناخته شدند که در یک گروه قرار گرفتند و دارای بیشترین میزان FSI و تاحدودی دارای LT_{50} بیشتری بودند. در شکل ۲ نمونه‌ای از الکتروفورز A-PAGE ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد استفاده آورده شده است.

تجزیه خوشه‌ای پروتئین‌ها براساس ضریب تطابق ساده و به روش UPGMA انجام گرفت (شکل ۲). بر این اساس ژنوتیپ‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. در این تقسیم‌بندی رقم ماکوئی، که مقاوم‌ترین رقم شناخته شده بود، در یک گروه جداگانه قرار گرفت. تجزیه به مؤلفه‌های مختصات اصلی به مثابه روش مکمل تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی و بررسی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها انجام شد (شکل ۳).

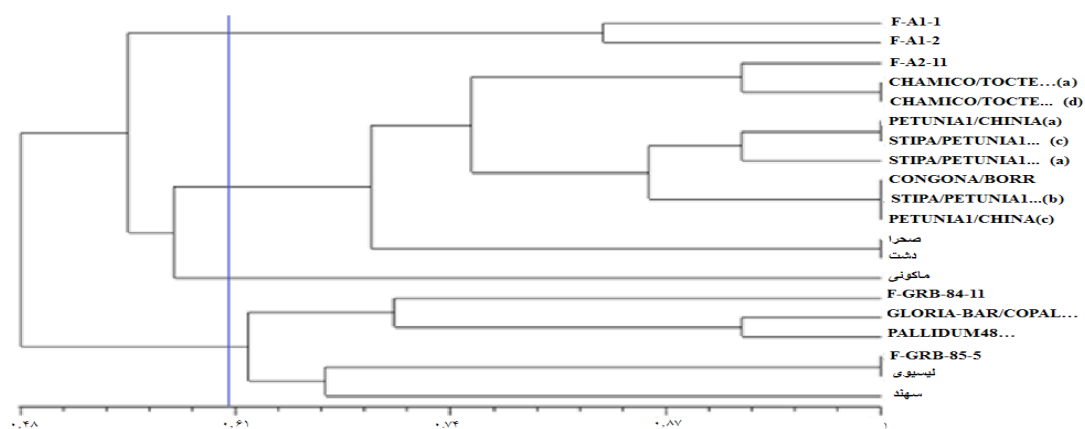
GLORIA-BAR/COPAL... و TIPA/PETUNIA1... (a) کمترین میزان کلروفیل را دارند که این ژنوتیپ‌ها تاحدودی کمترین میزان درصد زنده‌مانی در مزرعه و بیشترین میزان LT_{50} را داشتند. در تحقیق اسکینر و گارلند-کمپل (۲۲)، مقدار LT_{50} در گندم از ۹/۵ تا ۱۹/۵- درجه سانتی‌گراد متغیر بود. میزان LT_{50} را برای گندم زمستانه نورستار ۲۲/۳- درجه سانتی‌گراد و برای گندم بهاره زاگرس ۳/۵- درجه سانتی‌گراد گزارش کردند (۲۳). LT_{50} ، علاوه بر ژنوتیپ، به شرایط قبل از عادت‌دهی گیاه در آزمایش‌های کنترل‌شده نیز وابسته است (۱۹). پژوهشگران در بررسی اثر طول دوره‌ی خوگیری به سرما بر راندمان کوانتومی فتوسیستم II در گونه‌های بهاره و زمستانه یولاف دریافتند که با قرار گرفتن این گیاهان در شرایط عادت‌دهی، ابتدا میزان راندمان کوانتومی فتوسیستم II کاهش می‌یابد، ولی در ادامه افزایش می‌یابد و به سطح اولیه خود بازمی‌گردد (۲۰). تجزیه کلاستر به روش ward و براساس فاصله اقلیدسی با صفات میزان پرولین و Fv/Fm قبل و بعد از خوگیری، و FSI و LT_{50} انجام گرفت،

جدول ۶. مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه

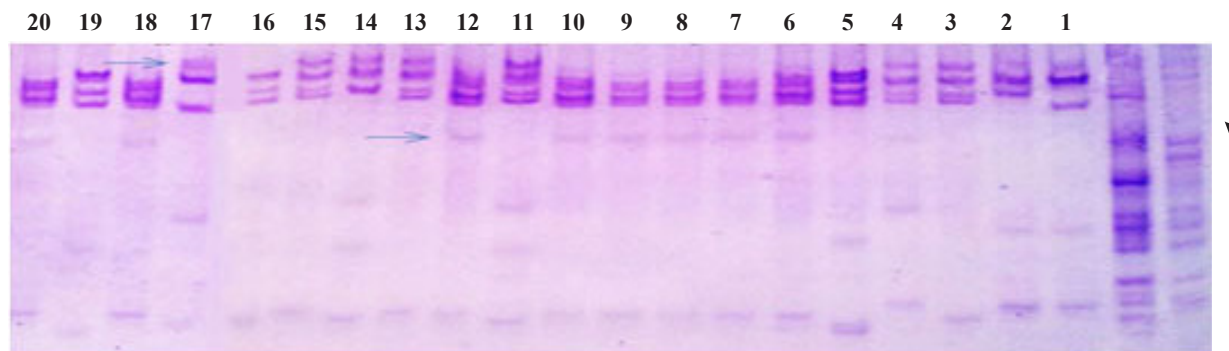
ژنوتیپ	Fv/Fm (میلی‌ثانیه)	کلروفیل (SPAD)	FSI (%)	LT_{50} (C°)
۱	۰/۸۲۷	۳۹/۸۵	۷۷/۳۵	-۱۴/۶۸
۲	۰/۸۱۷	۴۰/۴۳	۷۶/۸۵	-۱۵/۵۲
۳	۰/۸۲۴	۳۸/۶	۶۹/۵۵	-۱۲/۷۰
۴	۰/۸۱۶	۳۹/۱	۷۸/۵۷	-۸/۳۹
۵	۰/۸۲۲	۳۹/۶۷	۷۸/۹۴	-۱۳/۶۲
۶	۰/۸۲	۴۲/۰۸	۶۷/۳۴	-۷/۶۰
۷	۰/۸۱۹	۴۳/۰۵	۷۳/۴۴	-۵/۲۲
۸	۰/۸۱۳	۳۵/۷۸	۵۹/۴۴	-۴/۵۷
۹	۰/۸۱۸	۳۹/۸	۶۶/۳۹	-۸/۸۰
۱۰	۰/۸۱۱	۳۶/۲۵	۴۵/۸۳	-۷/۵۸
۱۱	۰/۸۲	۳۵/۵۲	۵۲/۱۸	-۸/۱۸
۱۲	۰/۸۱۹	۳۶/۸۵	۶۲/۲۲	-۶/۷۲
۱۳	۰/۸۲۳	۳۹/۹۷	۷۱/۸۶	-۷/۸۹
۱۴	۰/۸۲۶	۴۱/۳۷	۶۵/۱۴	-۹/۲۱
۱۵	۰/۸۱۸	۴۰/۲۷	۷۲/۲۲	-۸/۱۳
۱۶	۰/۸۱۳	۴۱/۱۳	۶۹/۹۲	-۹/۰۸
۱۷	۰/۸۲۴	۴۰/۳	۶۹/۳۰	-۱۰/۶۴
۱۸	۰/۸۱۸	۴۱/۲۵	۶۵/۲۵	-۱۱/۳۴
۱۹	۰/۸۲۲	۴۰/۸۳	۶۸/۵۷	-۱۱/۵
۲۰	۰/۸۲۳	۴۰/۳۳	۸۶/۴۲	-۱۷/۶۶
LSD (p</0.5)	۰/۰۱۵	۰/۷۱۷	۵/۰۱	۰/۹۸



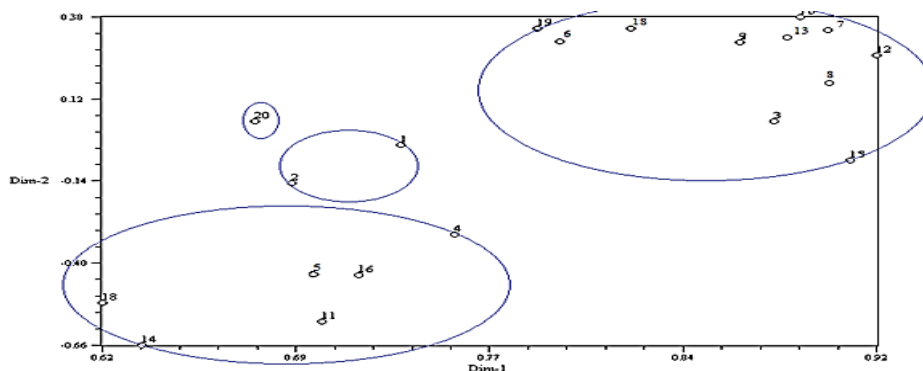
شکل 1. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو با استفاده از روش ward



شکل 2. نمونه ژل حاصل از الکتروفورز A-PAGE



شکل 3. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو براساس ضریب تطابق ساده و به روش UPGMA با استفاده از داده‌های نشانگرهای پروتئینی



شکل ۴. نمودار دوبعدی ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه براساس دو مؤلفه هماهنگ اول با استفاده از داده‌های الکتروفورز

A-PAGE

- (۱) F-A1-1 (۲) F-A1-2 (۳) F-A2-11 (۴) F-GRB-84-11 (۵) F-GRB-85-5 (۶) PETUNIA1/CHINIA(a) (۷) CONGONA/BORR (۸) STIPA/PETUNIA1...(b) (۹) PETUNIA1/CHINA (c) (۱۰) STIPA/PETUNIA1...(c) (۱۱) GLORIA-BAR/COPAL... (۱۲) STIPA/PETUNIA1...(a) (۱۳) CHAMICO/TOCTE...(a) (۱۴) CHAMICO/TOCTE...(d) (۱۵) PALLIDUM48... (۱۶) لیسوی، (۱۷) صحرا، (۱۸) سهند، (۱۹) دشت، (۲۰) ماکوئی

همبستگی بالایی دارد (۵). پتکو و تربنا (۱۸) همبستگی معنی داری (۰/۷۱) را بین درصد خسارت ناشی از سرما و محتوای پرولین گندم زمستانی بعد از دو هفته خوگیری در شرایط کنترل شده گزارش کردند. در تجزیه رگرسیون به روش گام‌به‌گام (Stepwise) برای نشانگرهای پروتئینی صفت‌های بررسی شده به‌مثابه متغیر تابع و داده‌های مولکولی (صفر و یک) به‌مثابه متغیر ثابت وارد مدل رگرسیونی شدند (جدول ۹). در این آزمایش، ارتباط چهار نشانگر با صفت LT_{50} به‌دست آمد. صفت LT_{50} دارای R^2 (ضریب تبیین) برابر با ۰/۷۹ بود و برای بقیه صفت‌ها میزان R^2 کم بود. نتایج فوق می‌تواند برای انجام دادن

میزان هتروزیگوسیتی نشانگرهای پروتئینی براساس فاصله ژنتیکی نی به‌دست آمد (جدول ۷). بیشترین میزان هتروزیگوسیتی (۴۸ درصد) به نشانگرهای ۱، ۵ و ۱۱ مربوط بود و می‌توان از این نشانگرها در شناسایی ارقام جو بیشتر استفاده کرد.

در بررسی همبستگی بین صفت‌ها، همبستگی مثبت و معنی داری (در سطح احتمال یک درصد) بین شاخص LT_{50} و Fv/Fm بعد از عادت‌دهی، پرولین قبل و بعد از عادت‌دهی (در سطح احتمال پنج درصد) به‌دست آمد (جدول ۸). با بررسی‌های انجام شده روی گندم اظهار شد که LT_{50} تکرارپذیر است و جدای از وراثت پذیری بالا (۹۱ درصد) با آزمایش‌های مزرعه‌ای نیز

جدول ۷. میزان هتروزیگوسیتی براساس فاصله ژنتیکی نی

نشانگر	میزان هتروزیگوسیتی
۱	۰/۴۸
۲	۰/۳۷۵
۳	۰/۴۵۵
۴	۰/۳۲
۵	۰/۴۸
۶	۰/۳۲
۷	۰/۱۸
۸	۰/۲۵۵
۹	۰/۴۲
۱۰	۰/۳۷۵
۱۱	۰/۴۸
۱۲	۰/۳۷۵
میانگین	۰/۳۷۶

جدول ۸. همبستگی صفت‌های اندازه‌گیری شده در گلخانه، شاخص LT_{50} و FSI در ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه

FSI	LT_{50}	میزان قند محلول بعد از خوگیری	میزان قند محلول قبل از خوگیری	میزان کلروفیل	میزان پرولین بعد از خوگیری	میزان پرولین قبل از خوگیری	Fv/Fm بعد از خوگیری	Fv/Fm قبل از خوگیری
							۱	Fv/Fm قبل از خوگیری
							۱	Fv/Fm بعد از خوگیری
						۱	۰/۲۸۳	۰/۱۳۶
					۱	۰/۵۶۵**	-۰/۰۸۳	-۰/۱۲۵
				۱	۰/۰۲۹	۰/۲۳۵	۰/۴۵۴*	۰/۱۳۷
			۱	-۰/۰۲۱	-۰/۰۶۵	۰/۰۱۴	۰/۳۷۴	۰/۱۴۷
		۱	۰/۱۱۶	-۰/۱۷۳	-۰/۲۳۳	-۰/۰۹۹	۰/۱۳۸	۰/۲۶
	۱	۰/۱۳۷	-۰/۲۰۲	-۰/۲۳۶	-۰/۴۹۳*	-۰/۴۷۲*	-۰/۵۰۴*	-۰/۲۹۷
۱	-۰/۶۰۱**	-۰/۰۱۷	۰/۰۰۱	۰/۵۹۹**	۰/۱۴۵	۰/۳۹۸	۰/۳۹۳	۰/۳۳۳

*، ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

جدول ۹. ضرایب رگرسیون و ضریب تبیین تصحیح شده در رگرسیون چندگانه بین کلیه صفت‌ها و داده‌های حاصل از الکتروفورز A-PAGE در ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه

LT_{50}	میزان قند محلول بعد از خوگیری	میزان قند محلول قبل از خوگیری	میزان کلروفیل	میزان پرولین بعد از خوگیری	میزان پرولین قبل از خوگیری	Fv/Fm بعد از خوگیری	نشانگر
۱۸/۸۴	۱/۴۵	۰/۵۷	۰/۹۶	۱/۰۵	۰/۵۷	۰/۸۲	عرض از مبدا
-۰/۴۷	۰/۴۲						۱
		۰/۵					۲
-۰/۵۶						-۰/۴۹	۳
-۰/۴۲			-۰/۴۸	-۰/۴۸			۴
-۰/۸							۵
	۰/۳۴						۹
	-۰/۶				۰/۴۵		۱۰
۰/۷۹	۰/۶۹	۰/۲۵	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۰	۰/۲۴	R ²

نتیجه‌گیری

در صفت‌های گلخانه‌ای برش نمودار درختی از مکانی صورت گرفت که ژنوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم شدند. ژنوتیپ‌های F-A1-1، F-A1-2، F-A2-11، F-GRB-85-5 و ارقام صحرا، سهند، دشت و ماکوئی در گروه اول قرار دارند که این ارقام برای صفت‌های میزان پرولین قبل و بعد از عادت‌دهی و میزان کلروفیل دارای میانگین بالا و برای شاخص LT_{50} دارای میانگین پایین بودند. می‌توان از این ژنوتیپ‌ها به مثابه ارقام مقاوم به یخ‌زدگی در آزمایش‌های گلخانه‌ای نام برد. میانگین میزان هتروزیگوسیتی نشانگرهای پروتئینی برای کلیه نشانگرها برابر با ۳۷ درصد بود و بیشترین میزان هتروزیگوسیتی (۴۸ درصد) به نشانگرهای یک، پنج و ۱۱ مربوط بود. از این نشانگرها نیز می‌توان در شناسایی ارقام جو بهره برد.

آزمایش‌های تکمیلی در خصوص کارایی مثبت نشانگرهای معرفی شده در برنامه‌های اصلاحی مقدمه‌ای به حساب آید و انجام دادن آزمون‌های آماری تکمیلی^۱ و یا طراحی پروژه‌های مکان‌یابی ژنومی^۲ برای حصول اطمینان توصیه می‌شود.

در واریته‌های گندم کشور فرانسه، بعضی از آلل‌های گل‌دین با مقاومت به سرما در ارتباط بودند (۱۵). در واریته‌های مقاوم به سرما، در مقایسه با واریته‌های حساس، فراوانی آلل‌های Gli-B11، Gli-A2r و Gli-D2g به‌طور معنی‌داری بالاتر و فراوانی آلل‌های Gli-D2g، Gli-A1a و Gli-B2c پایین‌تر بودند.

1. False Discovery Rate Test (FDR Test)

2. Genome mapping

منابع

- Ashraf M and Folad MR (2005) "Role of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance," *Env. Exper. Bot*, 59: 206216-.
- Bates LS, Waldren RP and Teare ID (1973) "Rapid determination of free prolin for water-stress studies," *Plant and Soil*, 39: 205207-.
- Breton G, Danyaluk J, Ouellet F, Sarhan F (2000) "Biotechnological application of plant freezing associated proteins. Biotechnol.," *Ann. Rev*, 6:5782-.
- Bridger GM, Falk DE, Mc Kersie BD and Smith DL (1996) "Crown freezing tolerance and field winter survival of winter cereals in Eastern Canada," *Crop Science*, 35: 150157-.
- Fowler DB, Gusta LV and Tyler NJ (1981) "Selection for winter hardiness in wheat. III," *Crop Science*. 21: 896900-.
- Gusta LV and Chen, THH (1987) "The physiology of water and temperature stress," In: E. G. Heyne (Ed), *Wheat and Wheat Improvement*, 115144-.
- Hames BD and Rikwood, D (1990) *Gel electrophoresis of proteins, a practical approach* (2ed), Oxford University Press. U.K.
- Irigoyen, JJ, Emerich DW, Sanchez-Diaz M (1992) "Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants," *Physiol. Plant*, 84: 5560-.
- Koti K, Karsai I, Szucs P, Horvath CS, Meszaros K, Kiss GB, Bedo Z and Heyes PM (2006) "Validation of the two-gene epistatic model for vernalization response in a winter × spring barley cross," *Euphytica*, 152: 1724-.
- Krause GH and Weis E (1991) "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. Annual Review of Plant Physiology," *Plant Molecular Biology*, 42: 313349-.
- Limin AE and Fowler DB (1988) "Cold hardiness expression in interspecific hybrids and amphiploids of the *Triticeae*," *genome*, 30: 361365-.
- Mahajan S and Tuteja N (2005) "Cold, salinity and drought. stresses: An overview," *Arch. Biochem. Bioph*, 444: 139- 158.
- Mahfoozi S, Limin AE and Flower DB (2001) "Influence of vernalization and photoperiod responses on cold hardiness in winter cereal," *Crop Science*, 41:10061011-.
- Maxwell K and Johnson GN (2000) "Chlorophyll fluorescence a practical guide," *J. Expt. Bot*, 51: 659- 668.
- Metakovsky EV and Branlard G (1997) "Genetic diversity of French common wheat germplasm based on gliadin alleles," *Theor. Appl. Genet*, 96: 206218-.
- Metakovsky EV and Novoselskaya AY (1991) "Gliadin allele identification in common wheat I. Metodological aspects of the analysis of gliadin patterns by one-dimensional polyacrylamid gel electrophorsis," *Genet. & Breed*, 45: 317324-.
- Naghavi A, Sofalian O, asghari A, Sedgi M (2010) "Relation between freezing tolerance and seed sstorage proteins in winter bread wheat (*Triticum aestivum* L.)," *Turkish Journal of Field Crop*, 15(2): 154158-.
- Petcu E and Terbea M (1995) "Prolin content and the conductivity test as screening methods for frost tolerance of winter wheat," *Plant Physiol*, 21:311-.
- Prasil IT, Prasilova P and Marik P (2007) "Comparative study of direct and indirect evaluations of frost tolerance in barley," *Field Crop Res*, 102: 18-.
- Rizza F, Pagani D, Stance AM and Cattivelli L (2001) "Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats," *Plant Breed*, 120: 389396-.
- Rosa-ibarr M, Maiti RK (1995) "Biochemical mechanism in glossy sorghum lines for resistance to salinity stress," *Plant Physiol*, 146: 515519-.
- Skinner DZ and Garland-Campbell KA (2008) "The relationship of LT50 to prolonged freezing survival in winter wheat," *Canadian Journal of Plant Science*, 88: 885889-.
- Sofalian O, mohammadi SA, Aharizad S, Moghaddam M and Shakiba MR (2006) "Inheritance of cold tolerance in common wheat (*Triticum aestivum* L.)," *Turkish Journal of Agric. Fores*, 30: 399405-.
- Thomashow MF (1998) "Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance," *Plant Physiol*, 118: 17-.