

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات فیزیولوژیک آفتابگردان تحت شرایط تنش شوری

فریبا مرسلی آقاجری^۱، رضا درویش‌زاده^{۲*}، ناصر عباسپور^۳

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه

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

۳. دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه، ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۳۰)

Mapping QTLs controlling physiological traits of sunflower under salinity stress

Fariba Morsali Aghajari¹, Reza Darvishzadeh^{2*}, Naser Abbaspour³

1. M.Sc. in Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. 2. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. 3. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: May 30, 2015 - Accepted: Sep. 21, 2015)

Abstract

In order to study the effect of salinity on yield and physiological traits of sunflower and genetic analysis of these traits under salinity conditions, a factorial experiment based on completely randomized design with three replications were performed outside the greenhouse in an open air area under natural environmental conditions. The studied factors were included 2 salinity stress levels (normal and 6 dS/m) and sunflower recombinant inbred lines (102 lines derived from the cross PAC2 × RHA266 together with parental lines). Traits such as grain yield per plant, chlorophyll content, net photosynthetic rate, leaf relative water content, Na⁺ and K⁺ concentrations were measured after flowering. The effect of salinity was significant on grain yield, leaf relative water content, Na⁺ and K⁺ concentrations as well as on Na⁺/K⁺ and K⁺/Na⁺ ratios. For all traits, significant differences were observed between the genotypes studied. Genetic analysis of studied traits was done using a linkage map comprising 221 molecular markers (210 SSR/11 SNP) with an average distance of 7.44 cM between markers via composite interval mapping (CIM) procedure. Totally, 10 and 8 QTLs were detected for studied traits under normal and salt stress conditions, respectively. The phenotypic variance explained by QTLs (R²) ranged from 10.4%- 34.4%. The results showed the existence of co-localized QTLs for some of the studied traits under normal and salt stress conditions including Na⁺.S.4.1 with Na⁺/K⁺.S.4.1, Chl.NS.6.1 with K⁺.S.6.1. Using co-localized QTLs in different environmental conditions and different years could enhance the efficiency of marker-assisted selection in plant breeding programs.

Keywords: Oily sunflower, QTL analysis, Salt tolerance.

چکیده

به منظور بررسی تأثیر تنش شوری بر عملکرد و صفات فیزیولوژیک آفتابگردان و تجزیه ژنتیکی صفات در شرایط تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلدانی در فضای باز انجام گرفت. عوامل مورد بررسی شامل سطوح مختلف تنش شوری (نرمال و تنش ناشی از ۶ دسی‌زیمنس برمتر) و لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب آفتابگردان (۱۰۲ لاین حاصل از تلاقی بین دو لاین RHA266 و PAC2 به همراه والدین) بودند. صفات مورد مطالعه شامل عملکرد دانه، محتوای کلروفیل، میزان فتوسنتز خالص، محتوای نسبی آب برگ، غلظت عناصر Na⁺ و K⁺ بود که در مرحله بعد از گلدهی کامل اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که اثر تنش شوری روی عملکرد دانه، Na⁺، K⁺ و نسبت‌های K⁺/Na⁺، Na⁺/K⁺ و محتوای نسبی آب برگ معنی‌دار می‌باشد. از نظر تمامی صفات مورد مطالعه بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. تجزیه ژنتیکی صفات مورد مطالعه با استفاده از نقشه پیوستگی تهیه شده با ۲۲۱ نشانگر مولکولی (۲۱۰SSR/۱۱SNP) با متوسط فاصله ۷/۴۴ سانتی‌مورگان بین نشانگرها به روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) انجام گرفت. در مجموع برای ۸ صفت مورد مطالعه ۸ QTL در شرایط تنش و ۱۰ QTL در شرایط نرمال شناسایی شد. درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط QTLها بین ۱۰/۴٪ تا ۳۴/۴٪ متغیر بود. با بررسی مکان‌های ژنی شناسایی شده تحت شرایط نرمال و تنش شوری مشخص شد QTLهای Na⁺.S.4.1 با Na⁺/K⁺.S.4.1 و Chl.NS.6.1 با K⁺.S.6.1 هم‌مکان هستند. استفاده از QTLهای هم‌مکان در شرایط مختلف محیطی می‌تواند موجب افزایش کارایی انتخاب به کمک نشانگر و پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی گیاهی شود.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان روغنی، تجزیه QTL، تحمل به شوری.

مقدمه

آفتابگردان با نام علمی *Helianthus annuus* L. گیاهی دو لپه، یک‌ساله، یک‌پایه، دگرگرده‌افشان و بومی آمریکای شمالی می‌باشد (Muller et al., 2009). این گیاه به طیف وسیعی از شرایط خاک سازگار است ولی بهترین رشد آن در خاک با زهکشی خوب، ظرفیت نگهداری بالای آب و pH خنثی (۵/۷-۵/۶) صورت می‌گیرد، متحمل به خشکی و تا حدودی حساس به شوری می‌باشد (Gonzalez et al., 1977; Mass & Huffman, 2007). روغن آفتابگردان به دلیل داشتن رنگ زرد روشن، طعم مطلوب و نیز داشتن نسبت بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع لینولئیک و اولئیک اسید بسیار مورد توجه است. اسید چرب لینولئیک در سنتز هورمونی به نام پروستاگلاندین که بر عضلات صاف قلب اثر مثبت دارد، نقش مهمی دارد. در این گیاه میزان اسیدهای چرب اشباع مثل اسید استئاریک و اسید پالمیتیک بسیار کم است (Hu et al., 2010; Murphy, 1994). روغن آفتابگردان حاوی ترکیبی به نام توکوفرول می‌باشد که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی است و از اکسیده شدن لیپید در مواد غذایی و سیستم‌های بیولوژی ممانعت می‌کند. قسمتی از برنامه‌های تولید آفتابگردان به استخراج توکوفرول و استفاده از آن به‌عنوان منبع ویتامین E اختصاص یافته است (Warner et al., 2008). آفتابگردان همچنین به عنوان یک گیاه دارویی مطرح است و از جمله خواص دارویی آن می‌توان به کاهش علائم آسم، آرتروز، نارسایی روده، کاهش عوارض دیابت، دافع سنگ کلیه، تقویت معده و کاهش فشار خون اشاره کرد (Warner et al., 2008).

گیاهان به‌عنوان موجودات زنده، به صورت اجتناب‌ناپذیر با یکسری تنش‌های زنده و غیر زنده از جمله تنش خشکی، شوری، حرارت شدید، مسمومیت با فلزات سنگین، اشعه ماورای بنفش (UVB) مواجه بوده که به عنوان چالش جدی برای رشد، سوخت و

ساز و بهره‌وری گیاهان مطرح هستند (Hasanuzzaman et al., 2013, 2014). از میان تنش‌های مذکور شوری پس از خشکی مهم‌ترین تنش غیر زنده محیطی است (Matsui et al., 2008). از ۲۳۰ میلیون هکتار زمین‌های کشاورزی آبی و ۱۵۰۰ میلیون هکتار دیم در جهان، به ترتیب ۴۵٪ و ۳۲٪ (۲٪) تحت تأثیر شوری هستند (Roy Choudhury et al., 2011). از جمله اثرات اولیه تنش شوری می‌توان به کمبود آب و عدم توازن میزان یون‌ها و از اثرات ثانویه آن به کاهش رشد، کاهش میزان فتوسنتز، تولید رادیکال‌های آزاد، اختلال در عمل غشاهای، کاهش فعالیت آنزیم‌ها و فعالیت متابولیسمی سلول اشاره کرد. تنش اسمزی به‌صورت سریع در فاز اولیه تنش رخ می‌دهد و تنش یونی به‌صورت کند و در فاز دوم تنش رخ می‌دهد که در سطوح بالای تنش شوری باعث مرگ سلول‌های گیاهی می‌گردند (Munns & Tester, 2008; Horie et al., 2012). تجمع نمک در محیط ریشه، پتانسیل آب خاک را به‌شدت منفی می‌کند در نتیجه باعث کاهش جذب آب توسط گیاه می‌گردد (Tester & Devenport, 2003) که در کوتاه مدت پژمردگی گیاه را به دنبال دارد و در طولانی مدت به تقسیم و بزرگ شدن سلول‌ها صدمه‌زده و عامل ایجاد کننده بسیاری از اثرهای ثانویه شوری است. از طرف دیگر، گیاه برای افزایش جذب آب و فائق آمدن بر پژمردگی، ناگزیر به جذب یون‌های سمی می‌گردد. این امر انباشتگی یون‌های سدیم و کلر در آپوپلاست و به‌هم خوردن توازن اسمزی و بار الکتریکی طرفین این غشاهای را به دنبال دارد. بخش زیادی از سمیت متابولیسمی یون سدیم نتیجه توانایی سدیم در رقابت با پتاسیم برای جایگاه‌های پیوند در فرآیندهای سلولی به‌ویژه فرآیندهای آنزیمی است بنابراین

از DNA است که بخشی از تغییرات صفت کمی را کنترل می‌کند (Rabiei & Sabouri, 2008). تاکنون مطالعاتی در مورد شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده تحمل به شوری در سویا (Chen *et al.*, 2009)، برنج (Sabouri *et al.*, 2009)، جو (Zhou *et al.*, 2012) صورت گرفته است. بررسی منابع نشان می‌دهد که در زمینه تجزیه ژنتیکی تحمل به شوری در آفتابگردان از طریق روش‌های کلاسیک نظیر تلاقی‌های دی‌آل و تجزیه میانگین نسل‌ها و نیز روش‌هایی مانند تجزیه QTL گزارشات محدودی وجود دارد (Lexer *et al.*, 2003). مطالعه حاضر به منظور بررسی تأثیر تنش شوری بر عملکرد و صفات فیزیولوژیک آفتابگردان و نیز شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات مورد مطالعه با استفاده از جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نو ترکیب حاصل از تلاقی PAC2 × RHA266 انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در بهار و تابستان سال ۱۳۹۲ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، واقع در منطقه نازلو انجام گرفت. عرض جغرافیایی محل ۳۳° ۳۷' شمالی و طول جغرافیایی آن ۴۵° ۵' شرقی و ارتفاع از سطح دریای آزاد آن ۱۳۱۳ متر می‌باشد. در این مطالعه، ۱۰۲ لاین خویش‌آمیخته نو ترکیب (نسل F_۲) آفتابگردان حاصل از تلاقی دو لاین (♂) RHA266 و (♀) PAC2 به همراه والدین، تحت دو تیمار تنش شوری (نرمال و تنش شوری ناشی از ۶ دسی‌زیمنس بر متر) اعمال شده با NaCl، به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شدند. جمعیت لاین‌ها با استفاده از روش بالک تک‌بذری و توسط انستیتو ملی تحقیقات آگرونومی (INRA) فرانسه تهیه شده بود

کاهش جذب پتاسیم و نسبت K⁺/Na⁺ در گیاهان تحت تیمار شوری اثرهای زیانباری را به دنبال دارد. احتمالاً مهم‌ترین اثر شوری در گیاهان، کاهش سنتز پروتئین‌ها در نتیجه غلظت بالای یون سدیم (Na⁺) باشد (Tester & Devenport, 2003).

اولین تحقیقات ژنتیکی در زمینه تحمل به شوری، به صورت کاربردی توسط Epstein و همکاران در سال ۱۹۸۰ آغاز شد و از آن زمان تاکنون گزارش‌ها و مطالعات متعددی برای بررسی و تولید محصولات متحمل به شوری صورت گرفته است (Ashraf *et al.*, 2008; Ashraf and Akram, 2009; Azzedine *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2011; Ashraf & Foolad, 2013). اکثر صفات با اهمیت اقتصادی بالا به صورت کمی کنترل می‌شوند. یکی از عواملی که پیشرفت اصلاح گیاهان را محدود می‌کند نبود اطلاعات کافی در مورد ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی می‌باشد. مکان‌یابی جایگاه ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی^۱ یکی از روش‌هایی است که برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی مورد استفاده قرار گرفته است (Collard & Mackill, 2008). با شناسایی و تعیین نواحی ژنومی کنترل‌کننده صفات کمی، سهم هر یک از این نواحی در ایجاد تنوع مشخص شده، کارایی برنامه‌های به‌نژادی افزایش یافته و با اطمینان بیشتری اصلاح گیاهان قابل انجام است (Rabiei & Sabouri, 2008). در این روش، با مطالعه تفرق همزمان صفت کمی و نشانگرهای مولکولی، تعداد QTL، مکان آن‌ها روی ژنوم، نوع عمل آن‌ها و میزان اثر فنوتیپی هر یک برآورد می‌شود (Liu, 1998). اگر محل QTL در روی نقشه کروموزومی تعیین شود و پیوستگی آنها با نشانگرهای مولکولی به اثبات برسد، در این صورت می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی انتخاب را بر اساس نشانگرها انجام داد (Collard *et al.*, 2005). QTL در حقیقت قطعه‌ای

2. Recombinant Inbred Line (RIL)

1. Quantitative Trait Loci (QTL)

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ

از هر تکرار در هر لاین یک برگ تازه با توسعه کامل انتخاب و در داخل نایلون فریزر قرار داده شد. نمونه برگ داخل نایلون در داخل یونولیت، روی یخ (جهت جلوگیری از پژمردگی نمونه‌ها) قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید. از نمونه‌های برگ توسط موکت‌بر ظریف دیسک‌هایی با سطحی به اندازه یک سکه تهیه گردید و بلافاصله وزن تر نمونه‌ها توسط ترازوی حساس اندازه‌گیری و یادداشت گردید. دیسک‌های برگ در داخل ظروف یک‌بار مصرف حاوی آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (در حدود 25°C) قرار داده شد. بعد از طی زمان مذکور ابتدا آب اضافی نمونه‌ها توسط دستمال کاغذی گرفته شد و سپس وزن اشباع آن‌ها اندازه‌گیری و یادداشت شد. در مرحله آخر جهت به‌دست آوردن وزن خشک^۵، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس با استفاده از معادله زیر محتوای نسبی آب برگ‌ها محاسبه شد (Silveira et al., 2003).

$$RWC(\%) = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100$$

در این فرمول وزن تر برگ (FW)، وزن اشباع برگ (TW) و وزن خشک برگ (DW) می‌باشد.

اندازه‌گیری میزان عناصر Na⁺ و K⁺

برای انجام این کار ابتدا نمونه‌ای از برگ تازه برای هر تکرار در هر لاین انتخاب و به مدت ۴۸ ساعت در داخل آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از خشک شدن، نمونه در داخل هاون چینی ساییده و از الک ۰/۵ میلی‌متری (۳۵ مش) عبور داده شد. به اندازه ۰/۵ گرم از هر نمونه در داخل بوتله چینی ریخته و در داخل کوره با دمای ۵۴۰ درجه

(Gentzittel et al., 1995). از هر لاین تعداد ۶ گلدان بزرگ ۱۰ کیلویی (ارتفاع و قطر به ترتیب ۲۵ و ۲۶ سانتی‌متر) کشت و در محوطه باز چیده شدند. فاصله دو ردیف گلدان از هم ۵۰ سانتی‌متر و فاصله گلدان‌ها از هم در روی ردیف ۳۰ سانتی‌متر بود. برای هر گلدان از مخلوط پیت ماس + خاک زراعی به نسبت ۱ به ۳ استفاده شد. از ۶ گلدان مربوط به هر لاین به سه گلدان، شوری ۶ دسی‌زیمنس برمتر اعمال و به سه گلدان شوری اعمال نگردید. 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. جهت جلوگیری از تنش اسمزی، 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. کنترل مقدار شوری خاک گلدان‌ها به وسیله دستگاه EC^۱ سنج انجام می‌گرفت. برای انجام آبیاری از سیستم آبیاری قطره‌ای استفاده شد. در موقع آبیاری دقت می‌شد تا آب از زهکش گلدان‌ها خارج نشود. کوددهی در چندین نوبت در طول دوره رشد رویشی گیاه انجام گرفت. تاریخ کشت بذرها اوایل خرداد ماه ۱۳۹۲ و طول دوره رشد گیاه تا آخر شهریور ماه همان سال به طول انجامید. بعد از مرحله گلدهی صفات مختلف از قبیل عملکرد تک بوته (برحسب گرم)، محتوای کلروفیل با استفاده از دستگاه اسپد^۲، فتوستنتر خالص (بر حسب میکرومول بر مترمربع در ثانیه)، محتوای نسبی آب و نیز میزان عناصر Na⁺، K⁺، نسبت $\frac{Na^+}{K^+}$ و $\frac{K^+}{Na^+}$ اندازه‌گیری شدند.

3. Relative Water Component (RWC)

4. Fresh Weight (FW)

5. Dry Weight (DW)

1. Electrical Conductivity (EC)

2. SPAD-502 (Minolta, Japan)

طرح پایه کاملاً تصادفی با استفاده از مدل خطی عمومی (GLM) انجام گرفت. میانگین جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب و والدین آن‌ها برای صفات مورد نظر با استفاده از آزمون LSD مقایسه شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS 9.2 و Minitab 16 انجام گرفت. با مقایسه میانگین ۱۰٪ از بهترین نتاج برای هر یک از صفات با میانگین والدین آن‌ها، بازده ژنتیکی^۴ ($\text{GG10\%} = \bar{X}_P - \bar{X}_{10\% \text{best RILs}}$) محاسبه گردید (Falconer & Mackay, 1996; Poormohammad Kaini *et al.*, 2007a, b, 2009). شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مورد مطالعه با استفاده از نقشه پیوستگی توسعه یافته توسط Amouzadeh و همکاران (۲۰۱۵) و روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب^۵ (CIM) در نرم‌افزار QGene انجام گرفت. نقشه ژنتیکی گزارش شده، از ۲۲۱ نشانگر SSR و SNP با میانگین تراکم ۷/۴۴ سانتی‌مورگان بین نشانگرها تشکیل یافته است. سطح آستانه یا LOD برای شناسایی QTL‌های معنی‌دار از طریق آزمون جایگشت ($n=1000$) توسط نرم‌افزار تعیین شد (Churchill & Doerge, 1994). از موقعیت پیک QTL جهت تخمین درصد واریانس فنوتیپی توجیه شده توسط آن (R^2) استفاده شد (Basten *et al.*, 2002). نام‌گذاری QTL‌ها به صورت (سطح شوری + Salt + صفت + گروه پیوستگی + شماره QTL) انجام گرفت و اگر بیش از یک QTL در یک گروه پیوستگی شناسایی شود به ترتیب با شماره‌های یک، دو و غیره نشان داده شدند.

نتایج و بحث

ارزیابی فنوتیپی عملکرد و صفات فیزیولوژیک جدول تجزیه‌ی واریانس نشان داد اثر شوری برای

سانتی‌گراد جهت خاکستر شدن قرار گرفت. باید توجه شود که خاکستر به رنگ سفید در آمده باشد در غیر این صورت پروسه سوختن کامل نشده است. در مرحله بعد نمونه نیم ساعت در داخل کلریدریک ۶ مولار قرار گرفت و عصاره آن از داخل کاغذ صافی عبور داده شده و با آب مقطر به حجم ۵۰ سی‌سی رسانده شد (Ryan *et al.*, 2001). جهت قرائت میزان عناصر از دستگاه فلیم فتومتر استفاده گردید.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل برگ‌ها و فتوستنز خالص

در مرحله پر شدن دانه‌ها، در صبح زود و با ایجاد اندکی سایه بر روی دستگاه کلروفیل‌متر، محتوای کلروفیل برگ‌ها اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فتوستنز با استفاده از دستگاه HCM-1000 ساخت شرکت WALZ (آلمان) انجام گرفت. در طول اندازه‌گیری، شدت نور و دمای محفظه‌ای که برگ داخل آن قرار می‌گرفت ثابت بوده و بر اساس دستورالعمل دستگاه به ترتیب $1500 \mu\text{mol/m}^2$ و $33-30$ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. اندازه‌گیری بین ساعت ۹ الی ۱۴ بود. یکی از برگ‌ها که در همه گلدان‌ها در یک موقعیت قرار داشت، زیر چمبر در دستگاه قرار داده شد. سطح برگ داخل محفظه چمبر ۵ سانتی‌متر مربع بود. مقادیر فتوستنز خالص ثبت و داده‌های حاصل به کامپیوتر منتقل و در فایل‌های Notepad ذخیره و مورد بررسی قرار گرفت (Tezara *et al.*, 2002).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال بودن توزیع اشتباهات آزمایشی مطابق با روش Shapiro & Wilk و وجود داده‌(های) پرت با تحلیل باقی‌مانده‌ها (Kaps and Miroslav, 2004) بررسی شد. تجزیه واریانس داده‌ها به صورت فاکتوریل بر پایه

4. Genetic Gain
5. Composite Interval Mapping

1. Flame photometer, Fater 405 Model b, Iran
2. Cuvette
3. Chamber

نسبی آب برگ و بیشترین مقدار مربوط به صفت Na^+/K^+ می‌باشد (جدول ۱). Nooryazdan و همکاران (۲۰۱۰) بیشترین مقدار ضریب تغییرات را برای صفات وزن دانه (عملکرد دانه)، طول دم‌برگ و قطر ساقه در آفتابگردان روغنی گزارش نمودند. ضریب تغییرات دقت آزمایش را نشان می‌دهد. مقادیر کمتر از ۳۰ درصد حاکی از دقت بالای آزمایش است ولی اگر ضریب تغییرات بیش از ۳۰ درصد باشد نشان می‌دهد آزمایش لازم است تکرار شود (Jayaraman, 1999). البته در مواقعی اگر آماره F تیمار معنی‌دار باشد لازم به تکرار آزمایش نیست. اعتقاد بر این است در چنین مواقعی اختلاف بین تیمارها به حدی است که با وجود بالا بودن ضریب تغییرات (بالا بودن واریانس اشتباه آزمایشی) باز اختلافات خود را نشان داده‌اند و این مورد در چندین آثار پژوهشی گزارش شده است (Xu et al., 2000; Zarei et al., 2007, Darvishzadeh et al., 2010).

تمامی صفات مورد مطالعه به جز فتوسنتز خالص و محتوای کلروفیل و اثر ژنوتیپ برای تمامی صفات مورد مطالعه معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). اثر متقابل شوری \times ژنوتیپ (RIL \times Salt) برای محتوای K^+ ، Na^+ و نسبت Na^+/K^+ معنی‌دار بود. برای اثرات متقابل معنی‌دار، برش‌دهی اثر متقابل صورت گرفت (جدول ۱). معنی‌دار بودن فاکتورهای مورد مطالعه بیانگر وجود تنوع ژنتیکی برای تحمل به تنش شوری در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. در آزمایش Shahbaz و همکاران (۲۰۱۱) نیز ارقام آفتابگردان در شرایط تنش شوری از نظر ارتفاع، وزن خشک و غلظت پتاسیم و سدیم با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند. نظیر چنین تنوعی توسط Hussain و همکاران (۲۰۱۱) نیز برای صفات مرتبط با تحمل به تنش شوری در آفتابگردان گزارش شده است. مقادیر ضریب تغییرات بین ۱۰/۵۱ درصد تا ۸۷/۶۶ درصد متغیر بود. کمترین CV مربوط به صفت محتوای

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در لاین‌های خویش‌آمیخته نو ترکیب آفتابگردان تحت شرایط نرمال و تنش شوری

منابع تغییرات	درجه آزادی								میانگین مربعات							
	GYP	K^+	Na^+	Na^+/K^+	K^+/Na^+	NP	Chl	RWC	GYP	K^+	Na^+	Na^+/K^+	K^+/Na^+	NP	Chl	RWC
Salt شوری	1	1	1	1	1	1	1	1	298.95*	100.09***	1.14***	0.234***	248.43***	32.49 ^{ns}	4.58 ^{ns}	378.36**
RIL لاین	101	79	79	79	79	96	102	101	175.01***	2.36***	0.02***	0.005*	4.19***	20.04***	142.53***	184.84***
RIL \times Salt	95	79	79	79	79	94	102	99	27.33 ^{ns}	1.91***	0.01*	0.005*	2.48 ^{ns}	7.52 ^{ns}	43.43 ^{ns}	62.36 ^{ns}
Error خطا	288	276	276	276	257	174	393	332	35.62	1.23	0.009	0.003	2.30	11.14	35.38	56.88

منابع تغییرات	درجه آزادی								میانگین مربعات							
	GYP	K^+	Na^+	Na^+/K^+	K^+/Na^+	NP	Chl	RWC	GYP	K^+	Na^+	Na^+/K^+	K^+/Na^+	NP	Chl	RWC
6 ds/m نرمال	-	79	79	79	-	-	-	-	-	1.41 ^{ns}	0.023***	0.006***	-	-	-	-
نرمال	-	79	79	79	-	-	-	-	-	2.95***	0.01 ^{ns}	0.003 ^{ns}	-	-	-	-
CV									52.94	29.34	47.05	87.66	32.77	31.52	16.96	10.51

^{ns} غیر معنی‌دار؛ *، ** و *** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱. GYP: عملکرد تک بوته (برحسب گرم). Chl: میزان نسبی کلروفیل بر اساس قرائت SPAD. RWC: محتوای نسبی آب برگ (بر حسب درصد). NP: میزان فتوسنتز خالص ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

لاین‌ها در شرایط تنش شوری نسبت به شرایط عادی، برای صفات عملکرد دانه، محتوای کلروفیل، فتوسنتز

نتایج مربوط به بررسی اختلاف میانگین لاین‌ها در ۲ شرایط مورد مطالعه (جدول ۲) نشان داد که میانگین

خالص و محتوای نسبی آب برگ کاهش یافته است. کاهش عملکرد دانه، محتوای کلروفیل، فتوسنتز خالص و محتوای نسبی آب برگ تحت شرایط تنش شوری در مطالعات قبلی (Lu *et al.*, 2009; Liu & Shi, 2010; Lu *et al.*, 2009; Karimi *et al.*, 2012) نیز مشاهده شده است. نشان داده‌اند تنش شوری عمدتاً روی فرآیند فتوسنتز اثر می‌گذارد. مهار ظرفیت فتوسنتزی تحت شرایط تنش شوری ممکن است به علت بسته شدن روزنه‌ها باشد که مانع از تثبیت CO₂ فتوسنتزی می‌شود (Yang & Lu, 2010). یافته‌های Lu (2005; Hayat *et al.*, 2010). همکاران (۲۰۰۹) نشان داده است تنش شوری سبب کاهش معنی‌دار در میزان فتوسنتز خالص شده و کاهش فتوسنتز خالص به‌طور مستقیم با کاهش هدایت روزنه‌ای و نسبت تعرق در ارتباط است. کاهش فتوسنتز نه‌تنها متأثر از فعالیت‌های روزنه‌ای و انتقال CO₂ می‌باشد، بلکه از طریق عوامل غیر روزنه‌ای مثل کاهش سطح برگ و رنگدانه‌های سبزیگی نیز ناشی می‌شود (Misra *et al.*, 1997).

جدول ۲. پارامترها و بازده ژنتیکی برای صفات فیزیولوژیک در لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب آفتابگردان و والدین آن‌ها تحت شرایط نرمال و تنش شوری

شرایط آزمایش	پارامترها	صفات								
		GYP	Na ⁺	K ⁺	Na ⁺ /K ⁺	K ⁺ /Na ⁺	Chl	NP	RWC	
شرایط نرمال	PAC2 (P1) (والد پک ۲)	4.07	0.11	4.03	0.02	38.43	37.06	5.75	70.38	
	RHA266 (P2) (والد آر هاش آ ۲۶۶)	2.94	0.19	4.35	0.04	24.18	30.5	12.82	76.07	
	P1-P2 (اختلاف والدین)	1.12	-0.07	-0.32	-0.01	14.25*	6.56	-7.07*	-5.69	
	\bar{X}_p (میانگین والدین)	3.51	0.15	4.19	0.03	31.30	33.78	9.28	73.22	
	Max (بیشترین مقدار)	30.41	0.32	7.22	0.11	72.13	52.63	18.38	92.45	
	Min (کمترین مقدار)	0.62	0.03	0.87	0.008	7.47	18.5	3.21	55.39	
	\bar{X}_{RIL} (میانگین لاین‌ها)	12.33	0.16	4.29	0.04	33.23	35.20	10.84	72.64	
	$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	8.82	0.007	0.1	0.008	1.93	1.42	1.56	-0.57	
	$\bar{X}_{10\%bestRIL}$ (میانگین ۱۰ از بهترین لاین‌ها)	22.94	0.26	5.55	0.08	50.98	45.24	14.18	84.38	
	GG10% = $\bar{X}_{10\%bestRIL} - \bar{X}_P$ (بازده ژنتیکی)	19.42*	0.10	1.39	0.04	19.68*	11.46*	4.9	7.48	
	STDEV (انحراف استاندارد)	7.11	0.006	1.05	0.03	16.15	6.37	2.7	11.16	
	تنش شوری	PAC2 (P1) (والد پک ۲)	2.10	0.269	2.47	0.11	9.96	36.06	7.37	70.97
		RHA266 (P2) (والد آر هاش آ ۲۶۶)	2.82	0.37	2.9	0.13	7.81	34.2	10.56	70.58
P1-P2 (اختلاف والدین)		-0.72	-0.10	-0.43	-0.01	2.15	1.86	-3.19	0.39	
\bar{X}_p (میانگین والدین)		2.46	0.31	2.68	0.12	8.88	35.13	8.96	70.58	
Max (بیشترین مقدار)		28.73	0.48	6.19	0.33	63.48	47.66	14.45	83.01	
Min (کمترین مقدار)		0.59	0.06	1.71	0.01	5.03	19.83	1.12	52.59	
\bar{X}_{RIL} (میانگین لاین‌ها)		10.67	0.26	3.33	0.09	17.52	35.01	10.24	70.65	
$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$		8.21	-0.05	0.65	-0.03	8.64*	-0.11	1.28	-0.12	
$\bar{X}_{10\%bestRIL}$ (میانگین ۱۰ از بهترین لاین‌ها)		21.91	0.38	4.51	0.16	38.99	39.31	13.38	78.64	
GG10% = $\bar{X}_{10\%bestRIL} - \bar{X}_P$ (بازده ژنتیکی)		3.78	0.07	1.83*	0.04	30.11*	4.18	4.42	7.85	
STDEV (انحراف استاندارد)		6.25	0.09	0.74	0.04	10.75	4.94	2.86	6.55	
LSD (0.05%)		9.55	0.15	1.77	0.12	2.42	9.51	6.54	12.06	

GYP: عملکرد تک بوته (برحسب گرم)، Chl: میزان نسبی کلروفیل بر اساس قرائت SPAD. RWC: محتوای نسبی آب برگ (بر حسب درصد)، NP: میزان فتوسنتز خالص ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

در خاک‌های شور دارای نسبت پتاسیم به سدیم و کلسیم به سدیم بیشتری می‌باشند (Eker, 2006). بنابراین لاین‌های C138، LR64، C150، C139، C88، LR18b و C121 با دارا بودن بیشترین محتوای K^+ و نسبت K^+/Na^+ به عنوان لاین‌های بالقوه متحمل معرفی می‌شوند. بر اساس جدول ۲، با اعمال تنش شوری میزان عناصر Na^+ و نسبت Na^+/K^+ در شرایط تنش نسبت به شرایط عادی افزایش پیدا کرده است ولی میزان عملکرد دانه، غلظت K^+ و نسبت K^+/Na^+ کاهش یافته‌اند. کاتیون غالب در شرایط شور Na^+ است که نقش اصلی را در ایجاد مسمومیت ایفا می‌کند و دلیل آن سرعت جذب بالا توسط سلول‌های ریشه گیاهان گزارش شده است (Hasegawa, 2013). این عنصر در فعالیت‌های سیتوپلاسمی تأثیر گذاشته (Parvaiz & Satyawati, 2008) و منجر به کاهش جذب پتاسیم می‌شود که در واقع عنصر K^+ به عنوان یک عنصر فعال و ضروری برای فعالیت آنزیم‌ها و نیز حفظ هموستازی یونی در سیتوزول مطرح می‌باشد (Szczerba, 2009; Okhovatian Ardakani *et al.*, 2010, Lenis, 2013; Kanwal, 2011). غلظت زیاد سدیم، غشاهای سلولی ریشه را تخریب و توان آن‌ها را در ورود انتخابی یون‌ها تغییر می‌دهد و به این ترتیب جذب عناصر ضروری گیاه، از جمله پتاسیم، دچار اختلال می‌شود (Ashraf *et al.*, 2004). مقادیر بیش از حد یون‌های سمی مثل Na^+ و Cl^- باعث ایجاد عدم تعادل یونی با کاهش جذب یون‌هایی مانند Ca^{+2} و Mn^{+2} نیز می‌شوند (Hajiboland *et al.*, 2010).

بررسی‌ها نشان داده است که افزایش پتاسیم در محیط رشد ریشه، سبب افزایش تحمل به شوری و افزایش عملکرد آفتابگردان می‌گردد (Delgado *et al.*, 1999). Lexer و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند تحمل به شوری در آفتابگردان از طریق افزایش جذب Ca^{+2} و ممانعت از جذب Na^+ صورت

در مطالعه Omami (۲۰۰۵) روی گیاه زلف عروسان (Amaranth) با افزایش میزان سطوح شوری (صفر، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۲ دسی‌زیمنس برمتر) علاوه بر صفات ارتفاع گیاه، سطح برگ و تعداد برگ، سرعت فتوسنتز خالص نیز کاهش یافت. در آزمایش Shi و Liu (۲۰۱۰) با افزایش شوری از سطح صفر به ۱۰ دسی‌زیمنس برمتر، سرعت فتوسنتز خالص، هدایت روزنه‌ای و محتوای کلروفیل a و b در آفتابگردان روند کاهشی داشت. کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش شوری به دلیل فعالیت بیشتر آنزیم کلروفیل‌از گزارش شده است (Reddy *et al.*, 2005). بعضی از مواد تنظیم‌کننده رشد نظیر آبسزیک اسید و اتیلن موجب تحریک فعالیت این آنزیم می‌شوند. افزایش تولید پرولین تحت شرایط تنش موجب می‌شود تا گلوتامات که پیش ماده ساخت کلروفیل و پرولین است کمتر در مسیر بیوسنتز کلروفیل شرکت داشته باشد (Drazkiewicz, 2000). تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش محتوای گونه‌های فعال اکسیژن نیز بر ساختار کلروپلاست آسیب می‌رساند و باعث کاهش غلظت کلروفیل می‌شود (Desingh *et al.*, 2007). روند کاهش سطح برگ و به تبع آن کاهش محتوای کلروفیل برگ آفتابگردان، با افزایش شوری در مطالعاتی از جمله (Shahbaz *et al.*, 2011; Anwar Ul Haq *et al.*, 2013) گزارش شده است.

در شرایط تنش شوری بازده ژنتیکی که حاصل تفاوت بین میانگین ۱۰ درصد از بهترین لاین‌های انتخابی و میانگین والدین است (Falconer & Mackay, 1996; Poormohammad Kaini *et al.*, 2009a, b, 2007)، برای محتوای K^+ و نسبت K^+/Na^+ معنی‌دار بود. بر اساس یافته‌های محققین غلظت پتاسیم و نسبت K^+/Na^+ به عنوان یکی از معیارهای مهم برای تعیین تحمل به شوری در گیاهان عالی است (Akram *et al.*, 2010; Summart *et al.*, 2010). گیاهان متحمل به شوری

می‌گیرد. افزایش غلظت سدیم و کاهش غلظت پتاسیم در اثر شوری در یونجه (Rabbi *et al.*, 2007)، نخود فرنگی (Nenova, 2008)، گندم (Wong, 2009; Azizpour *et al.*, 2010) و کلزا (Bybordi *et al.*, 2010) گزارش شده است. نتیجه مشابهی در آفتابگردان مبنی بر کاهش غلظت پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم و همچنین افزایش غلظت سدیم در اثر تنش شوری گزارش شده است (Shahbaz *et al.*, 2011) که در توافق با یافته‌های این پژوهش می‌باشد.

شناسائی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده عملکرد و صفات فیزیولوژیک

در مکان‌یابی QTL، وجود اختلاف بین والدین از لحاظ فنوتیپی، برای شناسایی QTL ضروری نیست. در مواقعی که بین والدین تفاوت فنوتیپی وجود نداشته باشد، نیز می‌توان برای صفات مورد مطالعه QTL شناسایی نمود که این امر می‌تواند ناشی از الگوی تکمیل‌کنندگی اثرات آلی مثبت و منفی باشد (Xu, 2002). در مجموع، ۱۸ QTL برای ۸ صفت مربوط به عملکرد و صفات فیزیولوژیک شناسایی شد که از این تعداد، ۸ QTL در شرایط تنش شوری و ۱۰ QTL در شرایط نرمال (فاقد تنش شوری) دخیل می‌باشند (جدول ۳). برای هر یک از صفات عملکرد دانه، فتوستتز خالص، محتوای کلروفیل، غلظت عناصر Na^+ ، K^+ و نسبت Na^+/K^+ در مجموع ۲ شرایط، ۲ QTL و برای نسبت K^+/Na^+ و محتوای نسبی آب برگ (RWC) ۳ QTL شناسایی شد. مقدار LOD برای شناسایی QTL‌های دخیل در کنترل صفات مورد مطالعه بین ۱/۶۸ تا ۵/۹۴ و درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط QTL‌های شناسایی شده بین ۱۰/۴ تا ۳۴/۴٪ متغیر بود (جدول ۴ و شکل ۱).

از مجموع ۱۰ QTL شناسایی شده در شرایط نرمال، یک QTL مربوط به هر یک از صفات عملکرد دانه، محتوای کلروفیل و فتوستتز خالص

می‌باشد و درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط آنها به ترتیب ۱۲/۸٪، ۱۶/۱٪ و ۱۴/۱٪ می‌باشد. این QTL‌ها به ترتیب روی گروه‌های ۱۰، ۶ و ۱۴ مکان‌یابی شدند. با توجه به علامت منفی اثرات افزایشی QTL‌های شناسایی شده، آلل مطلوب از طریق والد مادری PAC2 منتقل شده است. در مطالعه Abdi و همکاران (۲۰۱۲) برای عملکرد دانه آفتابگردان در شرایط مطلوب آبیاری ۵ QTL با استفاده از همین جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب شناسایی شد. یکی از QTL‌های شناسایی شده روی گروه ۱۴ با R^2 ۱۵٪ مشابه با QTL شناسایی شده در این مطالعه می‌باشد. در مطالعه Herve و همکاران (۲۰۰۱) روی گیاه آفتابگردان، برای صفات محتوای کلروفیل و فتوستتز خالص به ترتیب ۴ و ۳ مکان ژنی شناسایی شد. درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط QTL‌ها بین ۹/۹٪ تا ۱۷٪ متغیر بود. در مطالعه ایشان QTL شناسایی شده برای فتوستتز خالص روی گروه ۱۴ در توافق با QTL شناسایی شده برای فتوستتز خالص (NP.NS.14.1) در این مطالعه می‌باشد. ۲ مکان ژنی برای محتوای نسبی آب برگ (RWC)، در گروه‌های ۸ و ۱۲ شناسایی شد. مقدار LOD برای شناسایی QTL‌ها به ترتیب ۲/۸۳ و ۴/۳۲ و درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط آنها به ترتیب ۱۶/۴ و ۲۳/۹٪ بود. آلل‌های مطلوب با توجه به علامت منفی اثرات افزایشی از طریق والد مادری PAC2 منتقل شده‌اند. در مطالعه صورت گرفته توسط Abdi و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از همین جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب آفتابگردان، یک QTL برای محتوای نسبی آب برگ در گروه ۱۲ (RWC.NS.12.2) شناسایی شد که در توافق با QTL مربوطه در این تحقیق می‌باشد. در شرایط نرمال برای هر یک از صفات محتوای K^+ ، Na^+ و نسبت Na^+/K^+ یک QTL به ترتیب روی گروه‌های پیوستگی ۱۶، ۱۱ و ۵ شناسایی شد. درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط QTL‌ها به ترتیب

والد مادری منتقل شده‌اند. بیشترین درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده (۳۴/۴٪) در شرایط نرمال، مربوط به QTL دخیل در کنترل نسبت K^+/Na^+ در اطراف نشانگر ORS878 ($K^+/Na^+.NS.10.1$) می‌باشد.

۱۵/۵٪، ۱۲/۱٪ و ۱۳/۸٪ و آل‌های مطلوب با توجه به علامت مثبت اثرات افزایشی از طریق والد پدری RHA266 منتقل شده‌اند. برای نسبت K^+/Na^+ ۲ QTL روی گروه‌های ۱۰ و ۱۶ شناسایی شد. آل‌های مطلوب با توجه به علامت منفی اثرات افزایشی از

جدول ۳. QTL‌های کنترل‌کننده صفات فیزیولوژیک در لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب آفتابگردان تحت شرایط نرمال و تنش شوری

شرایط آزمایش	صفات	QTL	گروه لینکازی	موقعیت (cM)	LOD	نشانگرها	اثرات افزایشی	R ² (%)
شرایط نرمال	عملکرد دانه	GYP.NS.10.1	10	114	1.95	ORS613- ORS112	-1.71	12.8
	محتوای کلروفیل برگ	Chl.NS.6.1	6	46	2.81	ORS1256- SSL66-1	-3.04	16.1
	فتوسنتز خالص	NP.NS.14.1	14	70	2.34	ORS391	-0.12	14.1
	محتوای نسبی آب	RWC.NS.8.1	8	14	4.32	HA3278	-3.41	23.9
		RWC.NS.12.2	12	32	2.83	HA3555	-2.98	16.4
	K^+	$K^+.NS.16.1$	16	58	2.89	SSL22-3- ORS5-2	0.05	15.5
	Na^+	$Na^+.NS.11.1$	11	108	1.68	HA3448- ORS733-2	0.04	12.1
	K^+/Na^+	$K^+/Na^+.NS.10.1$	10	8	5.94	ORS878	-10.57	34.4
		$K^+/Na^+.NS.16.2$	16	52	2.81	ORS126	-1.93	19.4
	Na^+/K^+	$Na^+/K^+.NS.5.1$	5	38	1.93	ORS1159	0.009	13.8
تنش شوری	عملکرد دانه	GYP.S.14.1	14	28	2.57	ORS1043- HA3513	0.08	15.8
	محتوای کلروفیل برگ	Chl.S.6.1	6	10	4.03	ORS649- HA4103	-3.12	22.2
	فتوسنتز خالص	NP.S.13.1	13	78	2.51	ORS3630	0.43	15
	محتوای نسبی آب	RWC.S.1.1	1	78	1.72	ORS959	2.33	10.4
		K^+	$K^+.S.6.1$	6	56	2.76	ORS1256- SSL66-1	0.37
	Na^+	$Na^+.S.4.1$	4	0	3.52	ORS620	-0.04	23.7
	K^+/Na^+	$K^+/Na^+.S.7.1$	7	32	2.9	ORS1041	4.68	20
		Na^+/K^+	$Na^+/K^+.S.4.1$	4	4	4.16	ORS620- HA991	-0.01

R²: درصد واریانس فنوتیپی بیان شده بوسیله QTL‌ها. علامت منفی در اثرات افزایشی نشان دهنده نقش والد مادری (PAC2) در افزایش صفت و علامت مثبت در اثرات افزایشی نشان‌دهنده نقش والد پدری (RHA266) در افزایش صفت است. xM: سانتی مورگان، محاسبه شده از طریق فرمول کوسامبی که فاصله از بالای گروه پیوستگی را نشان می‌دهد. سطح آستانه یا LOD برای شناسایی QTL‌های معنی‌دار از طریق آزمون جایگشت (n=1000) توسط نرم‌افزار تعیین شد (Churchill & Doerge, 1994).

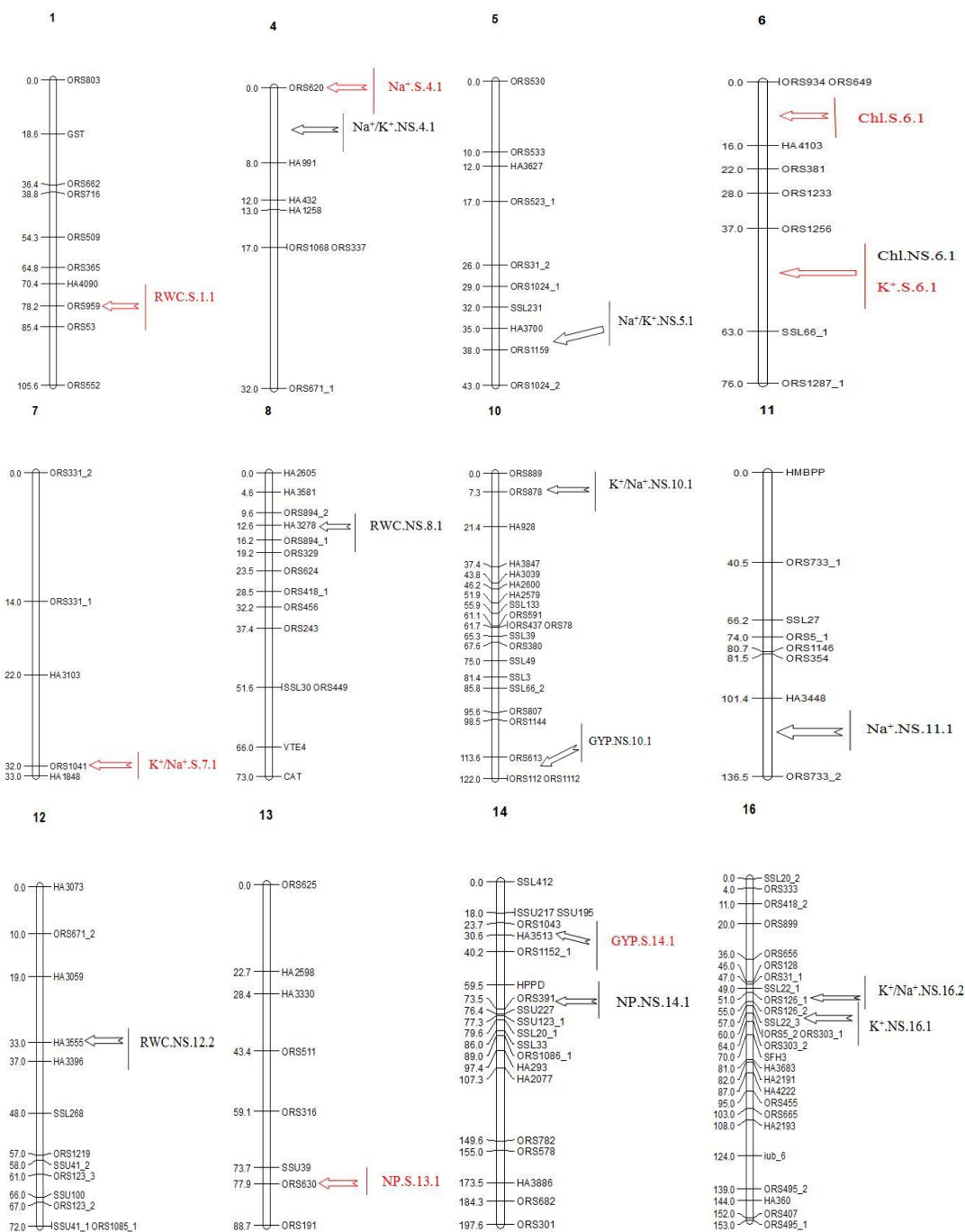
LOD: log10 likelihood ratio (likelihood that the effect occurs by linkage/likelihood that the effect occurs by chance). QTL: quantitative trait loci.

صفات محتوای کلروفیل و غلظت K^+ یک QTL هر ۲ روی گروه پیوستگی ۶ و در فاصله‌های ۱۰ و ۵۶ سانتی‌مورگان از ابتدای نقشه شناسایی شد. واریانس فنوتیپی توجیه شده توسط QTL‌ها به ترتیب برابر ۲۲/۲٪ و ۱۹/۱٪ بود و آل مطلوب برای QTL شناسایی شده برای محتوای کلروفیل از والد مادری PAC2 و برای QTL دخیل در کنترل غلظت K^+ از والد

در شرایط تنش شوری، در مجموع ۸ QTL برای صفات مورد مطالعه در گروه‌های ۱، ۴، ۶، ۷، ۱۰ و ۱۳ شناسایی شد. برای عملکرد دانه یک QTL ($GYP.S.10.1$)، با مقدار $LOD=2.57$ ، در گروه پیوستگی ۱۰ شناسایی شد. درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط QTL ۱۵/۸٪ و آل مطلوب از طریق والد پدری RHA266 منتقل شده است. برای هر یک از

پدري RHA266 منتقل شده است. برای هر یک از صفات محتوای Na^+ و نسبت Na^+/K^+ یک QTL هر ۲ روی گروه پیوستگی ۴ به ترتیب در ابتدا و ۴ ساتی‌مورگانی از ابتدای نقشه شناسایی شد. در شرایط تنش شوری بیشترین درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده ($R^2 = 27.3\%$) مربوط به QTL دخیل در کنترل نسبت Na^+/K^+ ($\text{Na}^+/\text{K}^+.\text{S.4.1}$) می‌باشد که در حد واسط دو نشانگر ORS620-HA991 واقع شده و آل مطلوب QTL از طریق والد مادری PAC2 منتقل شده است. برای هر یک از صفات محتوای کلروفیل برگ، نسبت K^+/Na^+ و فنوستنز خالص یک QTL به ترتیب روی گروه‌های پیوستگی ۱، ۷ و ۱۳ شناسایی شد. درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط QTL‌ها به ترتیب برابر ۱۰/۴٪، ۲۰٪ و ۱۵٪ بود. در مطالعه Lexer و همکاران (۲۰۰۳) ۱۴ QTL برای صفات مربوط به تجمع عناصر در آفتابگردان تحت شرایط تنش شوری شناسایی شد. از مجموع ۱۴ QTL، ۲ QTL مربوط به K^+ و ۴ QTL مربوط به Na^+ بود و QTL‌های مکان‌یابی شده روی گروه‌های پیوستگی ۴ و ۱۱ با QTL‌های شناسایی شده در مطالعه ما مطابقت داشت. Fotokian و Ahmadi (۲۰۱۱)، ۱۴ QTL برای تجمع عناصر Na^+ ، K^+ و Na^+/K^+ در ریشه و ساقه برنج، روی گروه‌های مختلف پیوستگی شناسایی کردند که از میان آن‌ها QTL 1.2، QKr برای K^+ ریشه روی گروه پیوستگی شماره ۱، با درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده ۳۰٪ به عنوان امیدبخش‌ترین QTL برای اصلاح تحمل به شوری در برنج معرفی گردید. با بررسی مکان‌های ژنی شناسایی شده تحت شرایط نرمال و تنش شوری مشخص شد در گروه‌های ۴، ۶ و ۱۶ چندین QTL هم‌مکان وجود دارند. از ابتدا تا ۸ ساتی‌مورگانی گروه پیوستگی ۴، QTL‌های: $\text{Na}^+.\text{S.4.1}$ و $\text{Na}^+/\text{K}^+.\text{S.4.1}$ ، در فاصله ۳۷ تا ۶۳ ساتی‌مورگان از ابتدای گروه ۶ QTL‌های: Chl.NS.6.1 و $\text{K}^+.\text{S.6.1}$ و در فاصله ۵۱ تا ۵۵ ساتی‌مورگان از ابتدای گروه ۱۶، دو QTL

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها برای صفات مورد مطالعه تحت شرایط تنش شوری وجود دارد، این روند بیانگر وجود تنوع ژنتیکی برای تحمل به شوری در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد که از این تنوع می‌توان برای اهداف مختلف به‌نژادی استفاده کرد. چندین QTL برای صفات مرتبط با تحمل به تنش شناسایی شدند. البته لازم است نشانگرهای شناسایی شده در چنین مطالعاتی در جمعیت‌های بزرگ نیز مورد بررسی قرار گیرند تا از ارتباط آن‌ها با صفات مورد مطالعه اطمینان حاصل شود و بدین ترتیب کارایی کاربرد این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی افزایش یابد. با توالی‌یابی QTL‌های دارای R^2 بالا می‌توان به یافتن ژن‌های کدکننده این صفات و همچنین نشانگرهایی که دارای ارتباط بیشتری با آن‌ها هستند، جهت اشیاع نقشه‌های پیوستگی امیدوار بود. در صورت امکان در گام بعدی می‌توان بر ای مکان یابی دقیق از روش پروفیل‌یابی ظهور ژن استفاده کرد. پروفیل‌یابی ظهور ژن به عنوان مناسب‌ترین روش برای یافتن QTL‌های مربوط به تحمل به تنش‌های زیستی مثل آفات و امراض و تنش‌های غیرزیستی مثل تحمل به خشکی، شوری و ... مطرح است. در این روش برای یافتن گروهی از ژن‌ها که دارای الگوی ظهور مشابهی هستند از تجزیه خوشه‌ای و از تجزیه به مولفه‌های اصلی استفاده می‌شود. در همین راستا یکسری مطالعات بر پایه پروفیل‌یابی ظهور ژن‌ها تحت تنش شوری (Wang et al., 2007; Walia et al., 2011) و یا ترکیبی از نقشه‌یابی ژنتیکی و پروفیل‌یابی ظهور ژن در مطالعات (Marino et al., 2010; Pandit et al., 2009) برای شناسایی ژن‌های دخیل در تنش شوری انجام شده است.



شکل ۱. گروه‌های پیوستگی و جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده صفات فیزیولوژیک در لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب آفتابگردان تحت شرایط نرمال و تنش شوری

در اختیار قرار دادن بذور جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سپاسگزاری

از انستیتو تحقیقات آگرونومی تولوز فرانسه به خاطر

REFERENCES

- 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.
- Ahmadi J, Fotokian MH (2011) Identification and mapping of quantitative trait loci associated with salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*) using SSR markers. *Iran J. Biotech*. 9: 21-30.
- Akram M, Ashraf MY, Ahmad R, Waraich EA, Iqbal J, Mohsan M (2010) Screening for salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) hybrids at an early seedling stage. *Pak. J. Bot*. 42: 141-154.
- Amouzadeh M, Darvishzadeh R, Davar R, Abdollahi Mandoulakani B, Haddadi P, Basirnia A (2015) Quantitative trait loci associated with isolate specific & isolate non-specific partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *J. Agric. Sci. Technol*. 17: 213-226.
- Anwar Ul Haq M, Akram S, Akhtar J, Saqib M, Saqib ZA, Jan M (2013) Morphophysiological characterization of sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.) under salin condition. *Pak. J. Agri. Sci*. 50: 49-54.
- Ashraf M, Harris PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *J. Plant Sci*. 166: 3-16.
- Ashraf M, Athar HR, Harris PJC, Kwon TR (2008) Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Adv Agron*. 97: 45-110.
- Ashraf M, Akram NA (2009) Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. *Biotechnol Adv*. 27: 744-752.
- Ashraf M, Foolad MR (2013) Crop breeding for salt tolerance in the era of molecular markers and marker-assisted selection. *Plant Breeding*. 132: 10-20.
- Azizpour K, Shakiba MR, Khosh Kholgh Sima NA, Alyari H, Moghaddam M, Esfandiari E, Pessarakli M (2010) Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. *J. Plant Nutr*. 33: 859-873.
- Azzedine F, Gherroucha H, Baka M (2011) Improvement of salt tolerance in durum wheat by ascorbic acid application. *J. Stress Physiol. Biochem*. 7: 27-37.
- Basten CJ, Weir BS, Zeng ZB (2002) QTL Cartographer, version 1.16: Program in Statistical Genetics. Raleigh, NC, USA: North Carolina State University.
- Bybordi A, Tabatabaei SJ, Ahmady A (2010) NaCl salinity effect on qualitative, quantitative and physiological attributes of winter canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Journal of Water and Soil*. 24: 334-346.
- Chen M, Kang Y, Wan S, Liu S (2009) Drip irrigation with saline water for oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Agr. Water Manage*. 96: 1766-1772.
- Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*. 138: 963-971.
- Collard BCY, Mackill DJ (2008) Marker assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty first century. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 363: 557-572.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 142: 169-196.
- Darvishzadeh R, Pirzad A, Hatami Maleki H, Poormohammad Kiani S, Sarrafi A (2010) Evaluation of the reaction of sunflower inbred lines and their F1 hybrids to drought conditions using various stress tolerance indices. *Span. J. Agric. Res*. 8: 1037-1046.
- Delgado IC, Sanchez Raya AJ (1999) Physiological response of seedling sunflower to salinity and K sources. *Commun. Soil Sci. Plant Anal*. 30: 773-783.
- Desingh R, Kanagaraj G (2007) Influence of salinity stress on photosynthesis and antioxidative systems in two cotton varieties. *Gen. Appl. Plant Physiol*. 33: 221-234.

- Drazkiewicz M (2000) Chlorophyllase: occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors. *Photosynthesis*. 30: 321-331.
- Eker S, Comertpay G, Kdnuskan O (2006) Effects of salinity stress on dry matter production and accumulation in hybrid maize varieties. *Turk. J. Agric. For.* 30: 365-373.
- Epstein E, Norlyn JD, Rush DW, Kingsbury RW, Kelley DB, Cunningham GA, Wrona AF (1980) Saline culture of crops: a genetic approach. *Science*. 210: 399-404.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.
- Gentzbittel L, Vear F, Zhang Y X, Berville A, Nicolas P (1995) Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 90: 1079-1086.
- Gonzalez S, Vereijken P, Vereijken JM (2007) Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *J. Sci. Food Agri.* 87: 2173-2191.
- Hajiboland R, Aliasgharzadeh A, Laiegh SF, Poschenrieder C (2010) Colonization with Arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Plant Soil.* 331: 313-327.
- Hasanuzzaman M, Fujita M (2013) Exogenous sodium nitroprusside alleviates arsenic-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by enhancing antioxidant defense and glyoxalase system. *Ecotoxicology*. 22: 584-596.
- Hasanuzzaman M, Mahabub Alam M, Nahar K, Al-Mahmud J, Ahamed K, Fujita M (2014) Exogenous salicylic acid alleviates salt stress-induced oxidative damage in *Brassica napus* by enhancing the antioxidant defense and glyoxalase systems. *Australian Journal of Crop Science*. 8: 631-639.
- Hasegawa PM (2013) Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environ. Exp. Bot.* 92: 19-31.
- Hayat S, Hasan SA, Yusuf M, Hayat Q, Ahmad A (2010) Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environ. Exp. Bot.* 69: 105-112.
- Herve D, Fabre F, Leroux N, Al Chaarani G, Planchon C, Sarrafi A, Gentzbittel L (2001) QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under greenhouse conditions. *J. Exp. Bot.* 52: 1857-1864
- Horie T, Karahara I, Katsuhara M (2012) Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: an overview with the central focus on rice plants. *Rice*. 5: 11-29.
- Hu J, Seiler G, Kole C (2010) *Genetics, genomics and breeding of sunflower*. Routledge, USA. pp: 342.
- Hussain SA, Akhtar J, Anwar-ul-haq M, Ahmad R (2011) Growth, yield and ionic concentration of two sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes exposed to brackish water irrigation. *Soil Environ.* 30: 58-65.
- Jayaraman K (1999) *A Statistical Manual for Forestry Research, Food and agricultural organization of the united nations regional office for Asia and the pacific Bangkok*, 234 Pp.
- Kanwal H, Ashraf M, Hameed M (2013) Water relations and ionic composition in the seedlings of some newly developed and candidate cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions. *Pak. J. Bot.* 45: 1221-1227.
- Kaps M, Lamberson WR (2004) *Biostatistics for Animal Science: an introductory text*. 2nd Edition. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK, 504p.
- Karimi H, Abasspour N, Mahmoodzadeh H (2012) Effect of salinity on some physiological attributes of four grape cultivars in vineyards of Uremia in Iran. *Seed and Plant Production Journal*. 28: 113-119.
- Lenis JM, Eilersieck M, Blevins DG, Slepser DA, Nguyen HT, Dunn D, Lee JD Shannon JG (2011) Differences in ion accumulation and salt tolerance among glycine accessions. *J. Agron. Crop Sci.* 197: 302-310.
- Lexer C, Welch ME, Durphy JL, Rieseberg LH (2003) Natural selection for salt tolerance quantitative trait loci (QTLs) in wild sunflower hybrids: implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *Mol. Ecol.* 12: 1225-1235.

- Liu BH (1998) Statistical Genomics; Linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press. LLC. USA.
- Liu J, Shi DC (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.
- Lu KX, Cao BH, Feng XP, He Y, Jiang DA (2009) Photosynthetic response of salt tolerant and sensitive soybean varieties. *Photosynthetica*. 47: 381-387.
- Marino R, Ponnaiah M, Krajewski P, Fropa C, Gianfranceschi L, Pe EM Gorla SM (2009) Addressing drought tolerance in maize by transcriptional profiling and mapping. *Mol. Genet. Genomics*. 218: 163-179.
- Mass EV, Hoffman GJ (1977) Crop Salt Tolerance Current Assessment, Journal of Irrigation & Drainage Division. Association for the Study of the Cuban Economy. 103: 115-134.
- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M, Satou M, Kim JM, Kobayashi N, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M (2008) Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol*. 49: 1135-1149.
- Misra AN, Sahu SM, Misra M, Singh P, Meera I, Das N, Kar M, Shau P (1997) Sodium chloride induced changes in leaf growth, and pigment and protein contents in two rice cultivars. *Biol. Plantarum*. 39: 257-262.
- Muller MH, Delieux F, Fernandez-Martinez JM, 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. *Genet. Resour. Crop Evol*. 56: 869-877.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol*. 59: 651-681.
- Murphy DJ (1994) Designer Oil Crops: Breeding, Processing and Biotechnology, VCH Weinheim-New York. *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 157: 397-398.
- Nenova V (2008) Growth and mineral concentrations of pea plants under different salinity levels and iron supply. *Plant Physiol*. 34: 189-202.
- Nooryazdan H, Serieys H, Bacilieri R, David J, Berville A (2010) Structure of wild annual sunflower (*Helianthus annuus* L.) accessions based on agro-morphological traits. *Genet. Resour. Crop Evol*. 57: 27-39.
- Okhovatian Ardakani AR, Mehrabani M, Dehghani F, Ak-barzadeh A (2010) Salt tolerance evaluation and relative comparison in cuttings of different pomegranate cultivars. *Plant Soil Environ*. 56: 176-185.
- Omami EN (2005) Response of amaranth to salinity. Ph.D. Thesis Horticulture. Faculty of natural and agriculture science, The University of Pretoria.
- Pandit A, Rai V, Bal S, Sinha S, Kumar V, Chauhan M, Gautam RK, Singh R, Sharma PC, Singh AK, Gaikwad K, Sharma TR, Mohapatra T, Singh NK (2010) Combining QTL mapping and transcriptome profiling of bulked RILs for identification of functional polymorphism for salt tolerance genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Genet. Genomics*. 284: 121-136.
- Parvaiz A, Satyawati S (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants a review. *Plant Soil Environ*. 54: 89-99.
- Poormohammad Kiani S, Talia P, Maury P, Grieu P, Heinz R, Perrault A, Nishinakamasu V, Hopp E, Gentzbittel L, Panieg N, Sarrafi A (2007a) Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci*. 172: 773-787.
- Poormohammad Kiani S, Grieu P, Maury P, Hewezi T, Gentzbittel L, Sarrafi A (2007b) Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet*. 114: 193-207.
- Poormohammad Kiani S, Maury P, Nouri L, Ykhlef N, Grieu P, Sarrafi A (2009) QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding*. 128: 363-373.
- Rabbi M, Barhouni Z, Ksouri R, Abdely C, Gharsalli M (2007) Interactive effects of salinity and iron deficiency in *Medicago*

- ciliaris*. Comptes Rendus Biologies. 330: 779-788.
- Rabiei B, Sabouri H (2008) Mapping genes controlling quantitative traits. University of Guilan Press. 193 Pp. (In Farsi).
- Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan AK (2011) Developing stress tolerant plants through in vitro selection— an overview of the recent progress. Environ. Exp. Bot. 71: 89-98.
- Reddy MP, Vora AB (2005) Salinity induced changes in pigment composition and chlorophyllase activity of chelidonium. Indian J. Plant Physiol. 29: 331-334.
- Roy Choudhury A, Datta K, Datta SK (2011) Abiotic stress in plants: from genomics to metabolomics. In: Tuteja N, Gill SS, Tuteja R, editors. Omics and plant abiotic stress tolerance, Bentham Science Publishers, pp. 91-120.
- Ryan J, Estefan G, Rashid A (2001) Soil and plant analysis: Laboratory Manual, interaction center for agricultural reseach in the dry areas (ICARDA) 2nd. Aleppo, Syrian, pp: 1-18.
- Sabouri A (2009) QTLs mapping of physiological traits related to salt tolerance in young rice seedlings. Biol. Plantarum. 53: 657-662.
- Shahbaz M, Ashraf M, Akram N, Hanif A, Hameed S, Joham S, Rehman R (2011) Saltinduced modulation in growth, photosynthetic capacity, proline content and ion accumulation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Acta Physiol. Plant. 33: 1113-1122.
- Silveira JA, Viegas Rde A, Rocha IM, Moreira AC, Moreira Rde A, Oliveira JT (2003) Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. J. Plant Physiol. 160: 115-123.
- Summart J, Thanonkeo P, Panichajakul S, Prathepha P, McManus MT (2010) Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. Afr. J. Biotechnol. 9: 145-152.
- Szczerba MW, Britto DT, Kronzucker HJ (2009) K⁺ transport in plants: Physiology and molecular biology. J. Plant Physiol. 166: 447-466.
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll SP, Lawlor W (2002) Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. J. Exp. Bot. 53: 1781-1791.
- Tester M, Devenport R (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. Ann. Bot. 91: 1-25.
- Walia H, Wilson C, Zeng L, Ismail AM, Condamine P, Close TJ (2007) Genome-wide transcriptional analysis of salinity stressed japonica and *indica* rice genotypes during panicle initiation stage. Plant Mol. Biol. 63: 609-623.
- Wang ZJ, Wang YB, Wu Y Zhang H (2011) Quantitative trait loci controlling rice seed germination under salt stress. Euphytica. 178: 297-307.
- Warner K, Miller JF, Demurin Y (2008) Oxidative stability of crude mid-oleic sunflower oils from seeds with high gamma and delta tocopherol levels. J. Am. Oil Chem. Soc. 85: 529-533.
- Wong HM (2009) Probing the interactions between iron nutrition, salinity and ultraviolet-B radiation on the physiological responses of wheat (*Triticum aestivum* L.). Master of Applied Science Thesis, Lincoln University.
- Xu Y (2002) Global view of QTL: rice as a model. In: Kang MS, editor. Quantitative genetics, genomics and plant breeding. Wallingford (UK): CAB International, 109-134.
- Xu W, Subudhi PK, Crasta OR, Rosenow DT, Mullet JE, Nguyen HT (2000) Molecular mapping of QTLs conferring stay-green in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Genome. 43: 461-469.
- Yang XH, Lu CM (2005) Photosynthesis is improved by exogenous glycinebetaine in salt stressed mize plants. Physiol. Plant. 124: 343-352.
- Zarei L, Farshadfar E, Haghparast R, Rajabi R, Mohammadi Sarab Badiéh M (2007) Evaluation of some indirect traits and indices to identify drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Asian Journal of Plant Sciences 6: 1204-1210.
- Zhou G, Johnson P, Ryan PR, Delhaize E, Zhou M (2012) Quantitative trait loci for salinity tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). Mol. Breed. 29: 427-43.