مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۶، سال ۱۳۸۴ (۱۳۵۳-۱۳۴۵)

رابطه بین پروتئینهای محلول و مقاومت به سرما در گندم با استفاده از رگه‌های جایگزین و تجزیه به عاملها

حسین دشتی[1]، بهمن یزدی صمدی[2] و محمدرضا قنادها[3]
۱، استادیاردانشگاه ولی عصر(عج) ۲، ۳، استادان، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۱۱/۲۱

خلاصه

تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی همیشه عامل کاهش کمیت و کیفیت محصولات زراعی می‌باشند. شناسائی ژنهای مقاومت به سرما در گندم و خویشاوندان آن دراصلاح برای مقاومت به سرمادراین گیاه حائز اهمیت است. برای بررسی رابطه بین باندهای پروتئین و مقاومت به سرما ابتدا با استفاده از رگه‌های جایگزین متقابل بین واریته‌های شاین و ویچیتا، کروموزمهای مؤثر در صفات مربوط به مقاومت به سرما تعیین شد. برای این منظور ۴۲ رگه جایگزین و والدین آنها در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو تکرار در مزرعه کشت شدند. و پس از ورنالیزاسیون، با انتقال طوقه از مزرعه به آزمایشگاه، صفات بقای طوقه، وزن‌تر طوقه و درصد آب طوقه اندازه-گیری شد و در یک آزمایش جداگانه رگه‌های جایگزین در گلدان کشت و جهت ورنالیزاسیون به مدت ۷ هفته در دمای ۴°C قرار داده شدند و سپس پایداری غشاء در دمای ۱۳°C- اندازه‌گیری شد. پروتئینهای محلول در برگ رگه‌های جایگزین شاین در ویچیتا در شرایط ورنالیزه، استخراج و پس از الکتروفورز به روش SDS-PAGE ، شدت باندهای پروتئین از طریق دانسیتومتری اندازه‌گیری شد. ضرایب همبستگی و تجزیه به عاملها نشان داده که کروموزمهای 3B، 5D و 6A از ویچیتا بیشترین حساسیت را در شاین، و متقابلاً کروموزومهای 5D، 5A، 4D و 4A از شاین به ترتیب بیشترین مقاومت را در ویچیتا ایجاد کرده‌اند و باندهای پروتئینی ۳۲ و ۴۲ کیلودالتن همبستگی معنی‌داری با مقاومت به سرما نشان دادند و روش تجزیه به عاملها نشان دادکه کارائی زیادی در تعیین کروموزمهای مؤثر در یک صفت کمی توسط رگه‌های جایگزین دارد.

واژه‌های کلیدی: رگه جایگزین، ورنالیراسیون، پروتئینهای محلول، SDS-PAGE، پایداری غشاء، دانسیتومتری

مقدمه

وقتی گیاه با تنش روبرو می‌شود، تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و مرفولوژیکی زیادی در آن در جهت سازگار شدن و تحمل تنش حاصل می‌شود (۱۹و۵). راهکارهای مختلف مقاومت و سازگاری گیاهان به تنش حاصل فعالیت تعداد زیادی از ژنها و اثر متقابل آنها با محیط است. در قرن اخیر مقاومت به سرما در محصولات زمستانه خصوصاً غلات یکی از دغدغه‌های اصلی متخصصین اصلاح نباتات و فیزیولوژی در نقاط سردسیر بوده است (۱۴). لذا تولید ارقام دارای مقاومت کافی به سرما برای مناطق سردسیر از برنامه‌های ضروری اصلاح نباتات است. گندم از غلاتی است که برنامه‌های اصلاحی آن جهت افزایش مقاومت به سرما از اهمیت زیادی برخوردار است. شناسایی ژنهای جدید و مفید در ژنوتیپهای مختلف گونه‌های زراعی و خویشاوندان آنها از اصول اساسی در تداوم برنامه‌های اصلاحی

مکاتبه کننده: حسین دشتی
e-mail: dashtihoss@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

یک گیاه محسوب می‌شود (۱۶). رگه‌های جایگزین[1] در شناسایی کروموزمهای حامل ژنهای مفید گندم بخصوص صفات کمی از جمله مقاومت به تنش‌های محیطی مثل مقاومت به سرما نقش قابل توجهی دارند و همچنین در دهه اخیر باعث تسریع در شناسایی ژنهای کنترل کننده این صفات و ترسیم نقشه QTL شده است (۱۰، ۱۱). برای بهبود مقاومت به سرما در واریته‌های حساس می‌توان از جایگزینی کروموزمی استفاده کرد (۲۰).

مطالعه سری کامل جایگزینی کروموزمهای واریته شاین[2] در چاینیز سپرینگ نشان داده است که کروموزمهای گروه ۵ شاین حامل ژنهای اصلی کنترل کننده مقاومت به سرما می‌باشند (۱۷). در آزمایش دیگری کروموزمهای 4B ، 2B و 7A شاین اثر معنی‌داری در بقاء چایینز سپرینگ درمقابل سرما نشان داده‌اند.

همچنین با استفاده از همین مواد معلوم شده است که کروموزمهای شاین در مقدار و فعالیت پروتئینهای ضدیخ (AFPS)[3] دخالت دارند و کروموزمهای 4A، 6A، 5B، 3D و 5D بیشتر از سایر کروموزمها در تجمع این پروتئینها در بافت موثر بوده‌اند و کروموزمهای 5B و 5D بیشترین اثر را در فعالیت این پروتئینها داشته‌اند (۲۰).

عکس‌العمل به ورنالیزاسیون و سازگار شدن به دمای پائین یکی از خصوصیات غلات زمستانه است و تحت کنترل ژنتیکی است (۱۲، ۱۷ ،۲۱). گندمهای زمستانه در حین عمل ورنالیزاسیون و رفع نیاز سرمائی سازگاری و مقاوم شدن به سرما نیز در آنها صورت می‌گیرد.هرچه گیاه به درجه اشباع نیاز سرمائی نزدیکتر می‌شود مقاومت به سرما در آن افزایش می‌یابد (۹). در طی ورنالیزاسیون تغییراتی در الگوی الکتروفورزی پروتئینهای محلول در برگ گندم حاصل می‌شود که نتیجه تظاهر ژنهای مقاومت به سرما است. در تحقیقات انجام شده ظهور باندهای پروتئینی زیادی در طول دورهٔ ورنالیزاسیون گزارش شده است. در تحقیقاتی که در این زمینه صورت گرفته است باندهای با اوزان ۲۰۰، ۱۸۰، ۶۶، ۵۰ و ۴۵ کیلودالتن (KD) مربوط به خانواده ژنی Wcs۱۲۰، در طول دورهٔ ورنالیزاسیون در دمای $4^{\circ}c$ تولید شده‌اند (۸).همچنین روش SDS-PAGE[4] این امکان را فراهم می‌سازد تا رابطه کمی بین باندهای پروتئینی و افزایش مقاومت به سرما در گندم مورد مطالعه قرار گیرد.

کلویتر ۱۹۸۳ از رگرسیون خطی و همبستگی ساده برای تشخیص رابطه بین شدت (مقدار) پروتئینهای باندهای پروتئین مقاومت به سر ما استفاده کرد. و از بین ۱۳ باند بدست آمده در الکتروفورز ۲ باند با وزنهای ملکولی ۴۶ و ۳۰ کیلو دالتن با مقاومت به سرما همبستگی معنی‌دار در سطح ۱٪ نشان دادند. افزایش پروتئینهای محلول، با افزایش ریبوزمها و mRNAهای خاصی همراه است که تعدادزیادی از ژنهای رمزگردان این پروتئینها و همچنین کروموزمهای مربوط به تولید آنها در گندم شناسایی شده است (۲۱).

اصولاً دو روش برای ارزیابی پتانسیل مقاومت به سرما در گندم وجود دارد. یکی اندازه‌گیری میزان بقاء در شرایط مزرعه می‌باشد که بعنوان آزمایش نهائی مقاومت یک واریته محسوب می‌شود. دوم استفاده از صفاتی است که با بقای در مزرعه همبستگی داشته و در آزمایشگاه اندازه‌گیری می‌شوند (۶). LT50 یعنی دمائی که در آن ۵۰٪ گیاهان تحت آزمایش در اثر یخزدگی از بین می‌روند و درصد بقای طوقه در دماهای یخزدگی در آزمایشگاه که باLT50و بقای مزرعه همبستگی دارند (۲، ۶).

در آزمایشات انجام شده طی ۳ سال؛ وزن تازه گیاه، محتوای آب طوقه با بقای مزرعه وLT50 همبستگی معنی‌داری داشته‌اند (۱۳).

پایداری غشاء[5] سیتوپلاسمی که از طریق اندازه‌گیری هدایت الکتریکی محلولی که بافت خسارت دیده در اثر یخزدگی در آن قرار گرفته است، بدست می‌آید و به آن تراوش الکترولیتی[6] گفته می‌شود، همبستگی بالائی با بقاء طوقه و LT50 نشان داده است. اندازه‌گیری این صفت تخریبی نیست و از آن می‌توان در

1. Substitution Lines
2. Cheyenne
3. Antifreeze Proteins
4. Sodium dodecyl sulfate polyacry lamide gelelectrophoresis
5. Membrane Stability
6. Electrolyte Leakage

Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب تک بوته در جمعیت F_2 برای مقاومت به سرما استفاده کرد (۱۵و۹).هدف از این مطالعه رابطه بین پروتئینهای محلول با مقاومت به سرمامیباشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت بیست و یک رگه جایگزین متقابل بین دو واریته شاین و ویچیتا[1] (مجموعاً ۴۲ رگه جایگزین) تولید شده در دانشگاه نبراسکا توسط موریس بودند (۲۲).برای بررسی رابطه بین پروتئینهای محلول در برگ با مقاومت به سرما ابتدا صفات مقاومت به سرما شامل؛ پایداری غشاء، بقاء گیاهچه، درصد آب طوقه، بقای طوقه و میزان رشد مجدد طوقه‌های باقیمانده بعنوان قدرت بازسازی طوقه اندازه‌گیری شد و کروموزمهای مؤثر در صفات فوق تعیین گردید. برای اندازه‌گیری پایداری غشاء فقط رگه‌های جایگزین ویچیتا در شاین (WI)/Cnn همراه با والدین (جمعاً ۲۳ ژنوتیپ). هر یک در ۲ گلدان کشت گردید و پس از سبز شدن جهت ورنالیزاسیون به مدت ۷ هفته در دمای ۴°C با فتوپرید ۱۶ ساعت قرار گرفتند. سپس دما به میزان ۲°C بر ساعت کاهش داده شده و در دمای ۱۳°C-گیاهان خارج و پایداری غشاء براساس برتین و همکاران (۱) اندازه‌گیری شد. برای این منظور از هر گلدان دو نمونه برگ در قطعات ۱ سانتیمتری تهیه و در دو ظرف حاوی ۲۰cm^3 آب مقطر انداخته شد و پس از ۱۵ ساعت هدایت الکتریکی اولیه هر نمونه قرائت گردید (EC_0). سپس نمونه‌های حاوی برگ در دمای ۹۰°C به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و مجدداً در دمای آزمایشگاه هدایت الکتریکی قرائت شد (Ectotal) و پایداری غشاء ازنسبت هدایت الکتریکی اولیه به هدایت الکتریکی نهائی براوردگردید.ارقامی که نسبت فوق در آنها کمتر است دارای پایداری غشاء بیشتر و در نتیجه مقاومت به سرمای بیشتری دارند. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و کروموزمهای مؤثردراین صفت تعیین گردید.

پس از نمونه‌برداری جهت اندازه‌گیری پایداری غشاء گلدانها به گلخانه منتقل و درصد بقای گیاهچه برای هر رگه جایگزین فقط در یک تکرار پس از ۱۰ روز تعیین شد. این صفت فقط در محاسبه همبستگی بین صفات استفاده شد.

برای اندازه‌گیری درصد اب طوقه و بقای طوقه و میزان رشد مجدد طوقه‌ها. رگه‌های جایگزین متقابل :WI/(Cnn) و Cnn/(WI) همراه با والدین و همچنین دو واریته قدس (بهاره و حساس به سرما) و سبلان (زمستانه و مقاوم به سرما)، بعنوان شاهد در طرح بلوک کامل تصادفی با دو تکراروهرکرت دارای۴ ردیف بافاصله۲۵سانتیمتروطول۵ متر,درمزرعه کشت شدند. و در هفتهٔ اول اسفندماه ۲۰ طوقه از هر ژنوتیپ در هر تکرار برداشته شد و پس از قطع کردن برگها و ریشه‌ها (سه سانتیمتری بالای طوقه و یک سانتیمتری زیر طوقه)، به آزمایشگاه منتقل و ۱۰ طوقه از هر تکرار برای تعیین بقای طوقه. به مدت ۱۲ ساعت در ۱- تا ۲- درجه قرار داده شد و بعد به تدریج دما کاهش داده شد (ساعت/۲°C) و در دمای ۱۴°C- طوقه‌ها از دستگاه خارج و به گلخانه منتقل و در گلدان نشاء شدند و آبیاری گردیدند و پس از ۱۰ روز طوقه‌های باقیمانده و رشد یافته در هر گلدان شمارش گردید و درصد طوقه‌های باقیمانده محاسبه شد و ۱۰ طوقه باقیمانده برای اندازه‌گیری درصد آب طوقه استفاده شد که برای این منظور طوقه‌های تر وزن و سپس در دمای ۷۰°C خشک و درصد آب طوقه محاسبه شد (۶). برای اندازه‌گیری رشد مجدد طوقه‌ها، برگ روئیده شده از طوقه‌های هر گلدان در گلخانه قطع و وزن گردید و با در نظر گرفتن درصد بقای طوقه در هر گلدان بعنوان کوواریت[2]، داده‌های حاصل از وزن برگ مورد تجزیه کوواریانس قرار گرفت تا اثر هر ژنوتیپ در بازسازی و بازیابی طوقه مشخص‌تر شود.جهت نرمال شدن توزیع صفات بقاءطوقه,وزن تر طوقه ووزن برگ مجددطوقه به ترتیب تبدیلهای ۰/۵+√x، log(x) و log(100x) انجام شد.

استخراج پروتئین محلول در برگ: دو واریته شاین و ویچیتا و ۲۱ رگه جایگزین شاین در ویچیتا در ۲۳ گلدان کشت و بعد از ورنالیزاسیون در دمای ۴°C به مدت ۷ هفته، پروتئین برگ بروش زیر استخراج شد. ۰/۵ گرم برگ از هر گلدان برداشت شد. و برگها با قیچی قطعه‌قطعه و با ازت مایع منجمد شد. و سپس

1. Wichita

2. Covariate

Archive of SID
www.SID.ir

به مدت ۳۰ ثانیه با ۲ میلی‌لیتر بافراستخراج(۰/۱M تریس HCl (PH=۸)، MgCl2۰/۰۱M ، ساکاروز ۱۸٪ (W/V)، باضافه ۴۰ میلی‌مول ۲- مرکاپتواتانول، به این بافر ۱mM (PMSF)[1] بعنوان آنتی‌پروتئاز اضافه شد) در هاون سائیده شدتا محلول هموژن بدست آید(۱۸). سپس بوسیله موسلین فیلتر شد و محلول صاف شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ شد.سپس محلول فوقانی به تیوب جدید منتقل گردید و غلظت پروتئین کل بوسیله اسپکتروفتومتر با استفاده از محلول استاندارد BSA بروش برادفورد ۱۹۷۶، اندازه‌گیر شد. پس از اندازه‌گیری غلظت پروتئین برای هر ژنوتیپ با استفاده از بافراستخراج بعلاوه ۲٪ SDS(W/V) و ۰/۰۰۲٪ بروموفنول آبی (W/V)،رقیق و نمونه‌هائی با غلظت مساوی ۲µg/µl تهیه گردید. برای تفکیک باندهای پروتئینی روش SDS-PAGE که ژل پائین ۱۵٪ و ژل بالا ۵٪ بوداستفاده شد. برای این منظور µl ۲۵ که دارای ۵۰µg پروتئین بودازهرژنوتیپ درهرچاهک بارگیری گردیدوباشدت جریان ۳۰mA به مدت ده ساعت و نیم الکتروفورزانجام شدو سپس رنگ‌آمیزی ژل توسط کوماسی بلو، و پس از رنگ‌بری ژلها، با دانسستومتری (شدت‌سنجی باندهای پروتئینی) مقدار پروتئینها تعیین گردید.

نتایج و بحث

کروموزم هاي مؤثر در مقاومت به سرما

نتایج مربوط به ارتباط کروموزومها در کنترل پایداری غشاء (تراوش الکترولیتی) در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که پایداری غشاء شاین (۰/۸۳۹) از ویچیتا (۰/۹۰۰) بیشتر و کروموزمهای ۶A، ۳B، ۵B و ۵D از ویچیتا در شاین باعث افزایش تراوش الکترولیتی و در نتیجه کاهش پایداری غشاء می‌شوند. تفاوت شاین و ویچیتا در صفات بقای طوقه، وزن تر طوقه، درصد آب طوقه و وزن برگ تولید شده ازطوقه-هامعنی‌داراست(جدول ۲). مقایسه میانگین رگه‌های جایگزین با والد دریافت کننده نشان داد که جایگزینی کروموزمهای ۶A، ۳B، ۴D، ۵D و ۶B از ویچیتا در شاین باعث افزایش آب طوقهٔ شاین و متقابلاً جایگزینی کروموزمهای ۱A، ۴A، ۵A، ۱B، ۳B ، ۵B، ۵D و ۶D از شاین در ویچیتا باعث کاهش آب طوقه می‌شوند و کروموزمهای ۶A، ۳B و ۵D وقتی از شاین در ویچیتا جایگزین شده‌اند باعث افزایش بقاء طوقه و متقابلاً همین کروموزمها از ویچیتا در شاین باعث کاهش بقاء طوقه شده-اند.جایگزینی کروموزومهای ۱A، ۴A، ۵A، ۳B، ۴D و ۵D ازشاین درویچیتاباعث کاهش وزن ترطوقه ویچیتاشده اند و متقابلا جایگزینیکروموزمهای ۴A، ۶A، ۱B، ۴D،۳B و۵D از ویچیتادرشاین باعث افزایش وزن ترطوقه شاین شده اندوجیگزینی کروموزمهای ۲A، ۶A، ۴B، ۵B، ۷B، ۱D، D ۴ و۶D ازشاین باعث افزایش وزن برگ روئیده شده ازطوقه در ویچیتا گردیده اندومتقابلاجایگزینی کروموزومهای ۶A، ۴B و ۷B از ویچیتادرشاین باعث کاهش وزن برگ روئیده شده ازطوقه درشاین گردیده اند(داده هاارائه نشده اند).

جدول ۱- تفاوت میانگین رگه‌های جایگزین کروموزمی ویچیتا در شاین **Cnn(WI)** نسبت به شاین

برای صفت تراوش الکترولیتی **(ELEC)** در دمای ۱۳°C-

رگه جایگزین	تفاوت از شاین	رگه جایگزین	تفاوت از شاین	رگه جایگزین	تفاوت از شاین
۱D	۰/۰۱۴	۱B	۰/۰۱	۱A	۰/۰۱۳
۲D	۰/۰۱	۲B	۰/۰۱۳	۲A	۰/۰۱۳
۳D	-۰/۰۰۴	۳B	۰/۰۶۱*	۳A	۰/۰۱۱
۴D	۰/۰۱۲	۴B	۰/۰۰۸	۴A	۰/۰۱۶
۵D	۰/۰۳۶*	۵B	۰/۰۵۳*	۵A	۰/۰۰۷
۶D	-۰/۰۰۷	۶B	-۰/۰۰۶	۶A	۰/۰۶۵*
۷D	۰/۰۰۹	۷B	۰/۰۲۵	۷A	۰/۰۱۶

* ۰/۰۶۱ شاین – ویچیتا

LSD %5= ۰/۰۲۶

× معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

جدول ۲-مقایسه میانگین والدین رگه‌های جایگزین و شاهد(ارقام قدس وسبلان) برای صفات موردمطالعه

ژنوتیپ	درصد آب طوقه	وزن تر طوقه+	بقای طوقه (-۱۴℃) +	وزن برگ مجدد طوقه+
ویچیتا	۷۷/۴۱c	۰/۴۰۴۸b	۰/۹۴۹b	۰/۹۰۹b
شاین	۷۴/۳۹a	۰/۱۸۳۰a	۱/۰۹۵a	۱/۲۵۷a
قدس	۸۱/۰۴d	۰/۶۹۲۹d	۰/۸۵۰c	۰/۷۶۹b
سبلان	۷۶/۱۳b	۰/۵۲۵۲c	۰/۹۴۳b	۰/۸۴۷b
LSD۰/۰۵	۱/۰۱۲	۰/۱۴۴۸	۰/۰۹۰	۰/۳۱۳

+ این صفات تبدیل شده اند

1. Phenylmethyl Sulphenyl fluoride

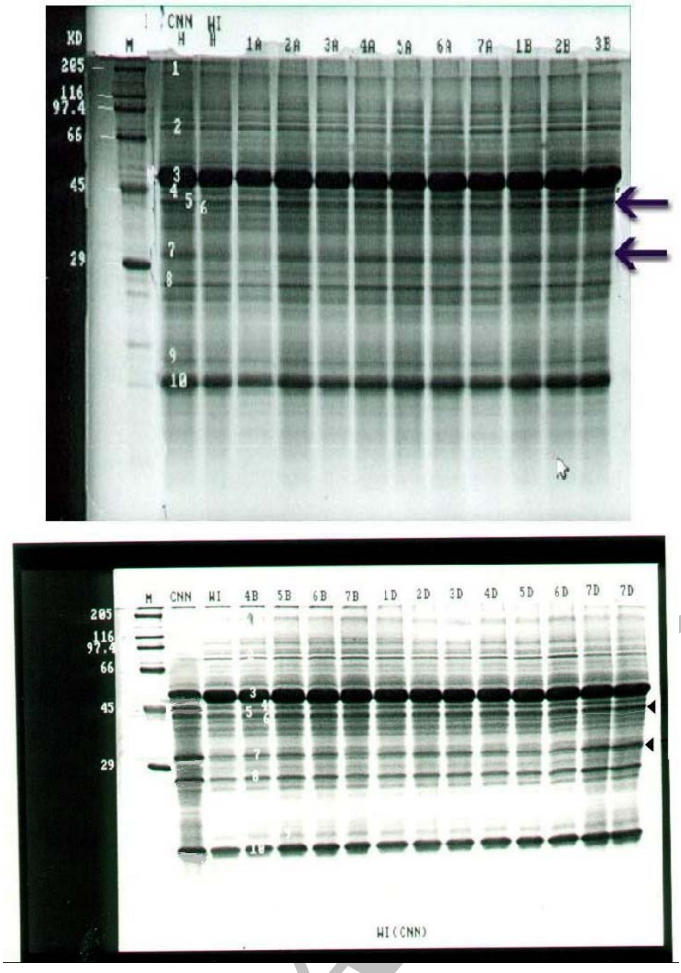
Archive of SID

www.SID.ir

بطور کلی در داخل گونه، محتوای آب بافت رابطهٔ منفی با مقاومت به سرما دارد(۱۴).ضرایب همبستگی بین صفات اندازه-گیری شده (جدول ۳) نشان می‌دهد که بقاء طوقه، بقای گیاهچه با تراوش الکترولیتی و درصد اب طوقه و وزن تر طوقه دارای همبستگی منفی و معنی‌دار می‌باشند که باسایر گزارشات هماهنگی دارد(۱۴و۶). درصد آب طوقه همبستگی مثبت و معنی‌دار با تراوش الکترولیتی و همبستگی منفی و معنی‌دار با برگ تولید شده توسط طوقه‌ها را نشان می‌دهد. میزان برگ مجدد توسط طوقه می‌تواند معرف قدرت بازسازی سلولهای طوقه باشد که بعد از یخزدگی زنده می‌مانند. لذا این صفت اهمیت زیادی بعد از گذشت زمستان در مزارع دارد و ارقامی که چنین قابلیتی داشته باشند می‌توانند با تولید ریشه و پنجه‌های جدید باعث جبران بوته‌های تلف شده شوند.

پروتئینهاي محلول در برگ

شکل۱ نشان می‌دهد که والدین (شاین و ویچیتا) از نظرانواع باند تفاوتی ندارند. شدت (سطح زیر منحنی) ۸ باند در جدول۴ برای والدین آمده است. در منابع پروتئینهای با وزن ۵۰،۱۸۰،۶۶،۲۰۰ و ۴۵ کیلو دالتن در گندم پائیزه گزارش شده است که در طول دورهٔ ورنالیزاسیون در ارقام مختلف بوجود می‌آیند که مربوط به خانوادهٔ ژنی Wcs۱۲۰ می‌باشند(۸) همچنین پروتئینهای ضدیخ با وزنهای ۳۵-۱۶ وجود دارند که در آپوپلاست سلول تجمع پیدا می‌کنند (۳). در این بررسی پروتئینهای با اوزان مشابه مثلاً ۴۵،۶۷،۲۰۰ و ۳۲ مشاهده می-شوند که ممکن است پروتئینهایی که در اثر سازگاری به سرما بوجود می‌آیند در آنها وجود داشته باشند. همبستگی بین شدت باندهای پروتئنی با بقاء طوقه (جدول ۵) نشان می‌دهد همبستگی بین باندهای ۳۲ و۴۲ کیلودالتن و بقاء طوقه مثبت و معنی‌دار است، ولی سایر باندها با بقاء طوقه همبستگی نشان نداده‌اند. در آزمایشی که برروی ۶ رقم گندم زمستانه انجام شده، باندهایی به وزن ۴۶ و ۳۰ کیلودالتن را بر روی SDS-PAGE جدا نموده‌اند که با مقاومت به سرما همبستگی قوی داشته‌اند(۴).



شکل۱- الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) رگه‌های جایگزین WI/(CNN)ووالدین.

جدول ۳- ضرایب همبستگی **(r)** بین صفات مورد مطالعه مرتبط به مقاومت به سرمادرگندم

	بقای طوقه	بقای گیاهچه	وزن تر طوقه	درصد آب طوقه	وزن برگ مجدد طوقه	تراوش الکترولیتی
تراوش الکترولیتی (پایداری غشاء)						۱
وزن برگ مجد طوقه +					۱	-۰/۲۱۶
درصد آب طوقه				۱	۰/۴۱۰**	۰/۴۰۶*
وزن تر طوقه			۱	۰/۴۴۶**	۰/۰۵۲	-۰/۳۶۷
بقای گیاهچه		۱	-۰/۴۶۸	-۰/۵۴۶**	۰/۱۵۴	-۰/۶۷۵**
بقای طوقه	۱	۰/۶۸۹**	-۰/۴۱۵**	-۰/۴۲۹**	۰/۱۷۳	-۰/۷۰۰**

۱- درجه آزادی برای همبستگی بین بقاء گیاهچه در دمای ۱۳°c- و پایداری غشاء با سایر صفات برابر ۲۱ و بقیه حالات مساوی ۴۲ است.
*، **به ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ + ، از میانگین‌های تصحیح شده این صفت استفاده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۴- سطح نسبی حاصل از دانسیتومتری نوارهای پروتئینی برای والدین رگه‌های جایگزین در شرایط ورنالیزاسیون

شماره نوار روی ژل	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
وزن نوار (KD)	۲۰۰	۶۷	۴۸	۴۵	۴۲	۳۹	۳۲	۲۵	۹	۵
شاین	-	۸/۳۱	۲۶/۱۶	۶/۱۳	۱۲/۸	-	۱۴/۶۴	۶/۳۰	۳/۸۰	۱۸/۴
ویچیتا	-	۸/۲۵	۲۲/۹۶	۴/۰۹	۸/۵	-	۵/۸۶	۶/۴۱	۳/۲۱	۱۶/۶۸

KD وزن ملکولی نوار بر حسب کیلو دالتن و خط تیره داخل جدول نشان دهنده ضعیف بودن نوار است که دستگاه قرائت نکرده است.

جدول۵- همبستگی (r) بین نوارهای پروتئینی و بقاء طوقه در آزمایشگاه

KD	۶۷	۴۸	۴۵	۴۲	۳۲	۲۵	۹	۵
بقاء	۰/۱۶۷	-۰/۳۴۹	۰/۰۰۱	۰/۶۸۱*	۰/۸۹**	۰/۰۱	۰/۰۸۹	-۰/۰۱۲

*، ** معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

بطور کلی ویچیتا و شاین در SDS-PAGE تفاوتی از نظرتعداد و نوع باند نشان ندادند و این مسئله خلاف انتظار نیست چون اولاً هر دو پائیزه‌اند و ثانیاً شاین از واریته کریمین انتخاب شده و ویچیتا نیز درشجرهٔ خود یک تلاقی باکریمین دارد(۲۳). ولی این دو رقم در شدت باندهای ۴۲و۳۲ کیلودالتن تفاوت زیادی دارند که احتمالاً این پروتیئنها یا دارای زیرواحدهائی هستند که در سلول یا نقش حفاظتی آنزیمها را دارند و یا خود دارای فعالیت آنزیمی‌اند که باعث مقاومتر شدن گیاه به سرما می‌شوند.

همانطوریکه ملاحظه می‌شود، صفات زیادی در مقاومت به سرما دخالت دارند و کروموزمهای زیادی با صفات مختلف درگیرند. بنابراین برای معرفی کروموزمهایی که بیشترین تأثیر را در مقاومت به سرما دارند، باید بنحوی منطقی از طریق تجزیه به عاملها[1]، تعداد صفات را کاهش داده و براساس آن نتیجه-گیری کرد.

نتیجه تجزیه به عاملها برای رگه‌های جایگزین ویچیتا در شاین (جدول ۶) و برای رگه‌های جاگیزین شاین در ویچیتا (جدول ۷) آمده است.در رگه‌های جایگزین ویچیتا در شاین از بین ۶ صفت مقاومت به سرما ۲ عامل که دارای مقادیر ویژه بیش از ۱ بوده‌اند استخراج شد که ۷۲٪ واریانس موجود در کل متغییرها را توجیه می‌کنند. عامل اول که ۵۱٪ واریانس را توجیه می‌کند دارای ضرائب معنی‌دار و منفی در سطح ۰/۰۱ با صفات وزن تر طوقه و تراوش الکترولیتی (پایداری غشاء) و درصد آب طوقه می‌باشد. این عامل کاهش بقاء را توأم با افزایش وزن تر طوقه، تراوش الکترولیتی و درصد آب طوقه را به ما معرفی می‌کند که مفهوم آن افزایش حساسیت است. پس از این عامل را حساسیت می‌نامیم.

عامل دوم که ۲۱٪ از واریانس را توجیه می‌کند. دارای ضریب منفی و معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ با وزن تر طوقه و ضریب مثبت و معنی‌دار با رشد مجدد برگ می‌باشد. این عامل کاهش وزن طوقه را توأم با افزایش رشد مجدد به ما معرفی می‌کند. لذا این عامل را می‌توان عامل بازسازی و قدرت رویش طوقه نامید. براساس این دو عامل مستقل به جدول ۸ (مقدار عاملها برای هر رگه) مراجعه و کروموزمهایی که از ویچیتا (والد حساستر) در شاین جایگزین شده و باعث حساسیت آن شده‌اند تعیین می-کنیم. شاین دارای مقدار ۱/۰۸- و ویچیتا دارای مقدار ۲/۳۷ برای عامل اول نشان می‌دهد که ویچیتا دارای حساسیت زیاد و شاین دارای حساسیت خیلی پائین‌تر از آن است و اختلاف آنها براساس مقادیر عامل اول برابر ۳/۴۵ خواهد بود. چون اعداد عاملها برای ژنوتیپها دارای میانگین صفر و انحراف معیار ۱ می‌باشند، می‌توان گفت که این تفاوت ۳/۴۵ برابر انحراف معیار داخل عامل است. و همین‌طور برای سهولت در تصمیم‌گیری اگر تفاوت مقدار عددی عامل اول برای هر کرموزوم جایگزین شده را با والد دریافت کننده (شاین) محاسبه کرده و تفاوت بیش از دو برابر انحراف معیار (۲σ=۲) را یک تفاوت معنی‌دار فرض کنیم می‌توانیم بگوئیم که جایگزینی کروموزمهای 3B، 5D و A 6 از ویچیتا در شاین به ترتیب بیشترین حساسیت را به شاین القاء کرده‌اند. که در آزمایشات کروموزمی نیز همین کروموزمها معرفی شدند. مقادیر عامل دوم (بازسازی و رشد مجدد) نشـــان

1. Factor analysis

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶- نتایج تجزیه به عاملها برای رگه‌های جایگزین Cnn(WI) و والدین

عامل	ضرایب عاملها برای صفات مختلف						واریانس	درصد
	درصد آب طوقه	تراوش الکترولیتی	وزن برگ مجدد	وزن تر طوقه	بقای طوقه	بقای گیاهچه	عامل	توجیه
اول	۰/۷۹	۰/۸۲۱**	-۰/۰۰۷۱۷	۰/۶۰۰**	-۰/۷۹۹**	-۰/۸۷۶**	۳/۰۵۷	۵۰/۹۵
دوم	-۰/۳	۰/۰۸۳	۰/۹۱۷**	-۰/۵۰۲**	۰/۱۱۷	۰/۰۹۷	۱/۲۴۷	۲۰/۷۹
کل	-	-	-	-	-	-	۴/۳۰۴	۷۱/۷۳

** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

جدول۷- نتایج تجزیه به عاملها برای رگه‌های جایگزین WI(Cnn) و والدین

عامل	ضرایب عاملها برای صفات مختلف						واریانس	درصد
	P ۳۲ KD	P۴۲KD	درصد آب طوقه	وزن برگ مجدد	وزن تر طوقه	بقای طوقه	عامل	توجیه
اول	۰/۹۴۷**	۰/۶۷۵**	-۰/۶۹۴**	۰/۰۳۴	-۰/۷۰۷**	۰/۹۰۰**	۳/۱۴۵	۵۲/۴۸
دوم	۰/۲۹۹	-۰/۱۰۳	-۰/۰۰۷۲	۰/۹۶۲**	۰/۳۴	۰/۲۹۴	۱/۲۲۷	۲۰/۴۶
کل	-	-	-	-	-	-	۴/۳۷۲	۷۲/۹۴

** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

جدول۸- مقادیر عددی عاملها برای رگه‌های جایگزین متقابل و والدین

رگه جایگزین	Cnn (WI)		رگه جایگزین	WI (Cnn)	
	عامل اول (حساسیت)	عامل دوم بازسازی و رشدمجدد		عامل اول (مقاومت)	عامل دوم بازسازی و رشدمجدد
۱A	-۰/۸۶۲۶	۰/۴۹۴۴	۱A	-۰/۶۹۹	-۱/۳۹۳۶
۲A	-۰/۷۹۸۷	-۰/۱۳۶۳۸	۲A	۰/۵۷۰۹	-۰/۶۲۳۲
۳A	۰/۰۴۳۵	-۰/۸۳۷۷*	۳A	-۰/۱۴۰۸	-۰/۸۷۰۳
۴A	-۰/۰۸۴۲	-۰/۸۶۶۲*	۴A	۰/۷۸۶۳*	۰/۶۷۱۱
۵A	-۰/۳۷۲۳	۰/۸۵۵۵	۵A	۱/۱۶۴۳*	-۱/۲۴۱۸
۶A	۰/۹۳۳۳*	۰/۷۷۵۸	۶A	-۰/۹۴۸۵	۰/۵۹۷۳
۷A	-۰/۹۸۳۶	۰/۵۸۵۴	۷A	-۰/۷۸۱۲	۰/۱۰۳۹
۱B	۰/۲۲۸۵	۰/۳۵۰۳	۱B	۰/۱۷۳۲	-۰/۹۲۶۹
۲B	۰/۷۷۶۵	۱/۲۶۲۷	۲B	۰/۲۱۲۷	۱/۳۱۶۰*
۳B	۲/۵۳۶۹*	۰/۵۲۱۷	۳B	۰/۱۹۷۰	۰/۲۹۳۳
۴B	-۱/۱۳۰۴	-۲/۴۲۹۳*	۴B	-۱/۹۱۶۶	-۰/۲۴۳۷
۵B	۰/۲۵۰۳	-۰/۵۸۴۸*	۵B	-۰/۱۱۰۳۲	۲/۲۰۴۳*
۶B	-۰/۶۶۶۴	۰/۷۳۰۴	۶B	۰/۳۳۴۹	۰/۶۹۷۰
۷B	۰/۴۷۴۰	-۰/۲۷۵۸	۷B	-۰/۵۰۴۴	-۰/۷۸۵۴
۱D	-۰/۵۰۸۱	-۱/۰۷۵۱*	۱D	-۱/۵۰۶۷	۱/۴۳۳۴*
۲D	-۰/۹۰۲۶	۰/۰۷۳۹	۲D	-۱/۲۳۴۶	۰/۱۱۷۴
۳D	-۰/۱۷۸۱	۰/۳۸۷۵	۳D	۰/۱۲۸۵	-۰/۲۰۵۴
۴D	-۰/۲۱۳۴	-۱/۵۵۰۸*	۴D	۰/۹۶۶۵*	۱/۱۵۸۵*
۵D	۱/۰۵۴۳*	۰/۵۶۶۶	۵D	۲/۴۱۸۴*	-۰/۵۲۱۴
۶D	-۰/۶۱۵۱	-۰/۱۵۲۹	۶D	-۰/۱۸۸۸	۰/۰۹۶۰
۷D	۰/۲۶۴۴	۱/۰۴۴۴	۷D	۰/۵۷۹۹	۰/۹۵۱۵
ویچیتا	۲/۳۷۵۲	-۱/۳۸۲۹	ویچیتا	-۱/۲۹۸۷	-۱/۲۶۹۲
شاین	-۱/۰۸۲۲	۱/۶۴۳۳	شاین	۱/۱۶۰۷۴	۱/۲۶۶۱

Archive of SID

www.SID.ir

می‌دهد که شاین دارای قدرت بازسازی بیشتر (۱/۶۴) و ویچیتا دارای قدرت کمتر (۱/۳۸-) می‌باشد. که تفاوت آنها برابر (۳/۰۲) خواهد بود. و براساس منطق فوق کروموزمهای 4B، 4D، 1D، 4A، 3A و 5B به ترتیب بیشترین تأثیر را در کاهش قدرت بازسازی شاین داشته‌اند (جدول ۸).

براساس جدول۷ تجزیه به عاملها برای رگه‌های شاین در ویچیتا، از بین ۶ صفت (۴ صفت مربوط به مقاومت به سرما و ۲ باند پروتئینی ۳۲و۴۲ کیلودالتن) ۲ عامل که در مجموع ۷۳٪ از واریانس موجود را توجیه می‌کنند استخراج شد.

عامل اول که ۵۲٪ واریانس را توجیه می‌کند با توجه به ضرایب مثبت و معنی‌دار با بقاء طوقه و باندهای پروتئینی ۴۲و ۳۲ کیلودالتن و ضرایب منفی و معنی‌دار با صفات وزن تر طوقه و درصد آب طوقه، عامل مقاومت نامیده می‌شود. و عامل دوم که ۲۰٪ از واریانس را توجیه می‌کند و با وزن برگ مجدد دارای همبستگی بالا می‌باشد، عامل بازسازی و رشد نامیده می‌شود. براساس این دو عامل و مراجعه به جدول ۸ ملاحظه می‌شود که شاین با مقدار (۱/۱۶) برای عامل اول دارای مقاومت بیشتر از ویچیتا با مقدار (۱/۲۹-) می‌باشد و تفاوت این دو مقدار ۲/۴۵ خواهد بود که براساس منطقی که در مورد رگه‌های جایگزین ویچیتا در شاین بکار برده شد یک تفاوت معنی‌دار است. بر این اساس جایگزینی کروموزمهای 5D، 5A، 4D و 4A از شاین در ویچیتا به ترتیب بیشترین مقاومت را به ویچیتا القاء کرده‌اند. مقادیر عامل دوم (بازسازی و رشد) نشان می‌دهد که شاین دارای قدرت بازسازی بیشتر از ویچیتا می‌باشد که تفاوت بین دو والد از نظر این عامل ۲/۵۳ خواهد بود و کروموزمهای 5B، 1D، 2B و 4D به ترتیب بیشترین تأثیر را در افزایش قدرت بازسازی و رشد ویچیتا داشته‌اند. نهایتاً ضرایب همبستگی و تجزیه به عاملها نشان داد که حضور باندهای۴۲و۳۲کیلودالتن‌بدست آمده از SDS-PAGE در عامل مقاومت، نشان دهندهٔ همبستگی زیاد این پروتئینها با مقاومت به سرما می‌باشد و روش استفاده از تجزیه به عاملها در تعیین کروموزمهای مؤثر در صفات کمی دارای کارآیی بالایی است.

REFERENCES

1. Bertin, P., J. Bouharmont & J.M.Kinet.1996.Somaclonal variation and improvement in chilling tolerance in rice. Plant Breeding 115:268-273
2. Chen, T.H., J.V.Gusta & D.B.Fowler 1983. Tolerance to cold stress. The importance of roots and crowns. University of Saskatchewan. Canada.
3. Chun, V., X.M. YU & M.Griffith.1998.Gentic studies on antifreeze proteins and their correlation with winter survival in wheat.Euphytica.102:210-226
4. Cloutier, Y .1983.Changes in the electrophoretic pattern of soluble proteins of winter wheat and rye following cold acclimation and desiccation stress. Plant Physiol 71:400-403.
5. Ehdaie, B., A. E. Hall, G. D. Farquhar, H. T. Ngvyens & J. G.Waines. 1991.Water use efficiency and carbon isotope discrimination in wheat. Crop.Sci 31:1282-88
6. Fowler, D.B.1981.Selection for winter hardiness in wheat II. Variation within field trials.Crop.Sci 19:773-775
7. Fowler, D. B., A. E. Limin, Shi-ying Wang, & R. W. Ward. 1995 Relationship between low temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. Can.J.Plants.Sci 79:37-42
8. Fowler, D. B., L. P. Chaving, A. E.Limin, & F. Sarhan. 1996. The regulatory role of vernalization in the expression of low-temperature-induced genes in wheat and rye Theor.Apll.Genet 93:554-559
9. Gilmour, SJ., K. Ravindra & F. Thomashow. 1980.Cold acclimation in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol 87:745-750
10. Hyne, V., M. J. Kearse., O. Martinez & W. Gang. 1994. A.Partial genome assay for quantitative trait loci in wheat using different and analytical techniques Theor.Appl.Genet 89:733-741
11. Low, C.N. 1967.The location of genetic factors controlling a number of quantitative characters in wheat. Genetics 59.445-461

Archive of SID

www.SID.ir

12. Li, D. H. & A. Sakai. 1982 Plant cold hardiness and freezing stress mechanisms and crop implications.Acadmic Press. New York.
13. Mc Intyre, B. L., T. H. H. Chen, & M. F. Mederick. 1988.Physiological traits associated with winter survival of winter wheat and winter triticales in Alberta. Can.J. Plant .Sci.68 (2)361-366
14. Mckersie, D. D. & Yacov Leshem. 1994.Stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers.
15. Palta, J.P. & T.C. Osborn. 1993.Invitro freezing tolerance in relation to winter survival of rapeseed cutivar.Crop.Sci.33:103-108
16. Poehlman, M. & D.A. Sleper. 1996. Breeding Field Crops. Panima publishing corporation / New Delhi / Bangalore.
17. Poysa, V.W. 1984.The genetic control of low temperature, ice-encasement and flooding tolerance by chromosome 5A, 5B.and 5D in wheat. Cereal Res.Comm.12:3-4:135-141
18. Scopes, R.K.1993.Protein purification: Principles and practice. Springer-Verlag. Publisher.3rd-Ed
19. Semikhodski. A. G., S. A. Qurrie., & T. W. Snape 1997.Mapping quantitative trait loci for salinity responses in wheat. Proceedings: Drought and Plant Production pp.83-92.John Innes Center VK.
20. Sutka, J.1994. Geneyic control of cold tolerance in wheat.Euphytica.77;277-282
21. Thomasho, M. F. 1998.Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. Plant Physiol 118(1-7)
22. Zemetra, R. S., R. Morris & J. W. Schmidt. 1986.Gene location for heading date using reciprocal chromosome substitutions in winter wheat Crop.Sci.26:531-533
23. Zemetra, R. S. & R. Moris. 1988.Effects of an intercultivaral chromosome substitution on winter hardiness and vernalization in wheat. Genetics.119:453-456

Archive of SID

www.SID.ir