

نقشه‌یابی ارتباطی گسترده ژنوم برای نسبت پتاسیم به سدیم در ارتباط با تحمل به تنش شوری در لاین های اینبرد ذرت

سرور ارژنگ^۱، رضا درویش‌زاده^۲، هادی علی‌پور^۳

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

sorour.arzhang@gmail.com

چکیده

تنش شوری به طور قابل توجهی رشد و عملکرد گیاهان را محدود می‌کند. ذرت گیاهی نسبتاً حساس به تنش شوری است، بنابراین شوری خاک تهدیدی جدی برای تولید آن در سراسر جهان می‌باشد. شناسایی ژن‌های کنترل کننده تحمل به تنش شوری می‌تواند به‌نژادگران را برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل یاری نموده و پروسه به‌نژادی را تسریع کند. در پژوهش حاضر، نقشه‌یابی ارتباطی صفات نسبت پتاسیم به سدیم و عملکرد دانه در ۹۳ لاین اینبرد ذرت با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی انجام گرفت. ماتریس روابط خویشاوندی، لاین‌ها را در دو گروه اصلی طبقه‌بندی نمود. برای صفت نسبت K^+/Na^+ در شرایط نرمال هشت SNP و در شرایط تنش دو SNP بسیار معنی‌دار شناسایی شد ($P < 0.0001$). در رابطه با صفت عملکرد دانه، تعداد چهار SNP در شرایط نرمال و دو SNP در شرایط تنش ارتباط بسیار معنی‌داری نشان دادند. کشف این SNP‌ها می‌تواند زمینه‌ای را برای کلونینگ مبتنی بر نقشه ژن‌های مرتبط با تحمل به تنش شوری مهیا ساخته و امکان گزینش به کمک نشانگر را برای تولید واریته‌های ذرت متحمل به تنش شوری در برنامه‌های به‌نژادی فراهم نماید.

کلمات کلیدی: عدم تعادل پیوستگی، مدل خطی مخلوط، نشانگر SNP، نسبت پتاسیم به سدیم، عملکرد دانه

مقدمه

شوری یکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی می‌باشد که رشد و نمو گیاهان و عملکرد آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌ها در سراسر جهان (حدود ۶٪)، و تقریباً ۲۸۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی (حدود ۲۰٪) تحت تاثیر تنش شوری قرار دارند (۱۰). بر اساس پیش‌بینی‌های انجام گرفته تا سال ۲۰۵۰، افزایش ۵۰ درصدی تنش شوری در زمین‌های کشاورزی به علت مدیریت سنتی و غیرعلمی آبیاری (۵) از سویی، و افزایش ۳۳ درصدی تقاضا برای ذرت، برنج و گندم (۳) از سوی دیگر، افزایش میزان تولید این محصولات را به یک چالش ضروری تبدیل کرده است. ذرت، یک گیاه مدل دگرگرده افشان با ژنومی پیچیده می‌باشد که در رده گیاهان نیمه حساس به شوری طبقه‌بندی می‌شود. آستانه حساسیت این گیاه نسبت به شوری آب و خاک به ترتیب ۱/۷ و ۱/۱ دسی زیمنس بر متر بوده و میزان کاهش محصول دانه به ازای هر واحد افزایش شوری خاک، معادل ۱۲٪ می‌باشد (۱). واکنش گیاهان به تنش شوری، خصوصیت ژنتیکی و فیزیولوژیکی پیچیده‌ای می‌باشد که توسط چندین مکان ژنی کنترل می‌شود (۵). این واکنش را می‌توان به دو مرحله تفکیک نمود: در مرحله اول، تنش اسمزی باعث کاهش جذب آب از طریق ریشه شده و در نتیجه رشد و توسعه گیاه کاهش می‌یابد، در مرحله دوم، تجمع بالای یون‌ها در بافت برگ، باعث ایجاد سمیت یونی شده و به علت کاهش میزان فتوسنتز مرگ آنها را به دنبال خواهد داشت (۱۰). در بسیاری از گونه‌ها، بیشترین سمیت یونی ناشی از تجمع بیش از اندازه یون سدیم (Na^+) می‌باشد که باعث بی‌ثبات نمودن غشاهای سلولی و پروتئین‌ها شده و بسیاری از فرآیندهای سلولی و فیزیولوژیکی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. کاهش میزان یون پتاسیم (K^+) در داخل سلول و عدم تعادل نسبت پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+) ناشی از تجمع بیش از اندازه Na^+ ، به طور بسیار معنی‌داری با حساسیت گیاهان به تنش شوری ارتباط دارد. تنظیم تجمع Na^+ و حفظ نسبت بالای K^+/Na^+ خصوصاً در اندام‌های هوایی گیاهان، برای اصلاح مقاومت به شوری در گیاهان بسیار ضروری است (۶). از

داده‌های عملکرد جمع‌آوری شده در شرایط مزرعه‌ای، به دلایلی از جمله وجود طیف وسیعی از اثرات متقابل بین Na^+ متغیر در پروفایل خاک، و نیز پاسخ‌های متفاوت به شوری مرتبط با نوع ژنوتیپ، مرحله رشدی، میزان pH و خشکی، نمی‌توان به تنهایی به عنوان شاخص تحمل به شوری استفاده کرد (۹). نقشه‌یابی پیوستگی با استفاده از جمعیت‌های دو والدی، برای شناسایی QTLها و ژن‌های کاندید دخیل در مقاومت به تنش شوری مورد استفاده قرار گرفته است. اما این جمعیت نقشه‌یابی دارای معایبی از جمله پایین بودن وضوح نقشه QTLهای شناسایی شده و کوچک بودن اندازه جمعیت می‌باشد. همچنین تنها بخش کوچکی از تنوع ژنتیکی به عنوان مثال در تلاقی‌های دو والدی با والدین خالص تنها دو الل، و در تلاقی‌های با والدین کاملاً هتروزیگوت تا چهار الل، قابل تشخیص می‌باشد (۱۱). اخیراً، با توسعه سریع تکنولوژی توالی‌یابی با توان بالا، مطالعه ارتباطی ژنوم گسترده‌مبنتی بر عدم تعادل پیوستگی^۲ تحت عنوان نقشه‌یابی ارتباطی^۳ به عنوان روش اصلی نقشه‌یابی ژنی در گیاهان مطرح شده است. نامتعادلی لینکاژی، پیوستگی غیرتصادفی الل‌ها باهم می‌باشد که این الل‌ها در لوکوس‌های متفاوت بر روی یک کروموزوم یا دو کروموزوم متفاوت قرار دارند. نقشه‌یابی ارتباطی، با دارا بودن مزیت تنوع فنوتیپی و نوترکیبی تاریخی در جمعیت‌های طبیعی با اندازه بزرگتر، دارای وضوح نقشه بهتری می‌باشد. همچنین در مقایسه با نقشه‌یابی پیوستگی، این روش از غنای آلی بیشتری بهره برده و روش بهتری برای پر کردن شکاف بین تغییرات فنوتیپی و فاکتورهای ژنتیکی می‌باشد (۴). Cui و همکاران (۲۰۱۵) تعداد نه QTL ایستاتیک مرتبط با تحمل به شوری را بر روی کروموزوم‌های ۱، ۳ و ۵، با استفاده از نشانگرهای SNP در مرحله گیاهچه‌ای ذرت کشف کردند که سه تا از آنها بیش از ۲۰٪ از تغییرات فنوتیپی را توجیه می‌نمود (۲). Kumar و همکاران (۲۰۱۵) نقشه‌یابی ارتباطی برای تحمل به شوری را در برنج انجام دادند و تعداد ۲۰ SNP معنی‌دار مرتبط با نسبت Na^+/K^+ را شناسایی کردند (۷). Long و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی مشابه بر روی جو، دو QTL اصلی کنترل‌کننده تحمل به تنش شوری و همئوستازی یونی را شناسایی نمودند (۸). پژوهش حاضر، از GWAS برای شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل به تنش شوری، از طریق تجزیه ارتباط اطلاعات ژنتیکی بدست آمده از ژنوتیپ‌سنجی با استفاده از نشانگر SNP، با اطلاعات فنوتیپی ۹۳ لاین خالص ذرت مشتمل بر صفات نسبت K^+/Na^+ و عملکرد دانه استفاده کرده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۹۳ لاین خالص ذرت تهیه شده از دانشگاه رازی کرمانشاه، مرکز تحقیقات کشاورزی خراسان رضوی و موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، در شرایط گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تحت شرایط نرمال و تنش شوری به صورت مجزا کشت گردید. در مرحله گیاهچه‌ای، به گلدان‌های سری تنش EC معادل ۸ ds/m اعمال گردید. در مرحله تاسل‌دهی، برگ پرچم هر دو سری آزمایش نرمال و تنش را قطع نموده در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه خشک کرده، سپس با استفاده از آسیاب آنها را پودر نموده و برای هر نمونه، مقدار نیم گرم از پودر حاصله را در کوره به مدت پنج ساعت در دمای ۵۰۰ درجه سوزانده و خاکستر بدست آمده را با استفاده از اسید HCl رقیق هضم نموده و از عصاره حاصل برای اندازه‌گیری مقدار سدیم و پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم فوتومتر^۴ استفاده گردید. در مرحله رسیدگی، عملکرد دانه تک‌بوته اندازه‌گیری شد. توالی‌یابی DNA لاین‌های ذرت با استفاده از آرایه ژنوتیپ‌سنجی Affymetrix® Maize 600K در شرکت TraitGenetics آلمان انجام گرفت. تجزیه ارتباط با استفاده از بسته GAPIT در نرم‌افزار R به روش مدل خطی مخلوط (MLM) (PCA+Kinship) انجام شد که در این روش از سه مولفه اول به عنوان کوواریانس برای تصحیح ساختار جمعیت استفاده شد.

^۱Genome-Wide Association Study (GWAS)

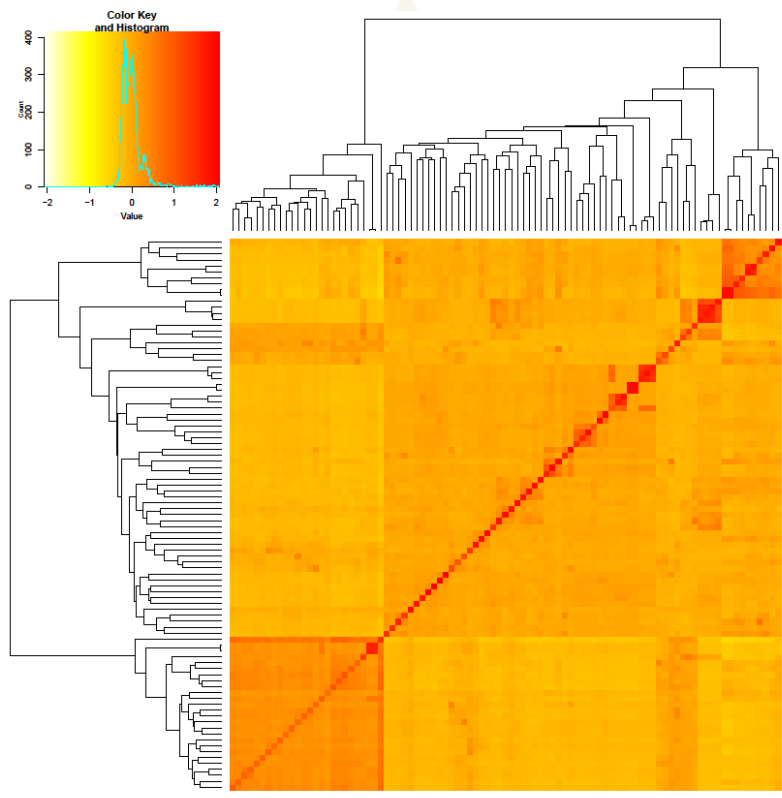
^۲Linkage Disequilibrium (LD)

^۳Association Mapping (AM)

^۴Flame photometer

نتایج و بحث

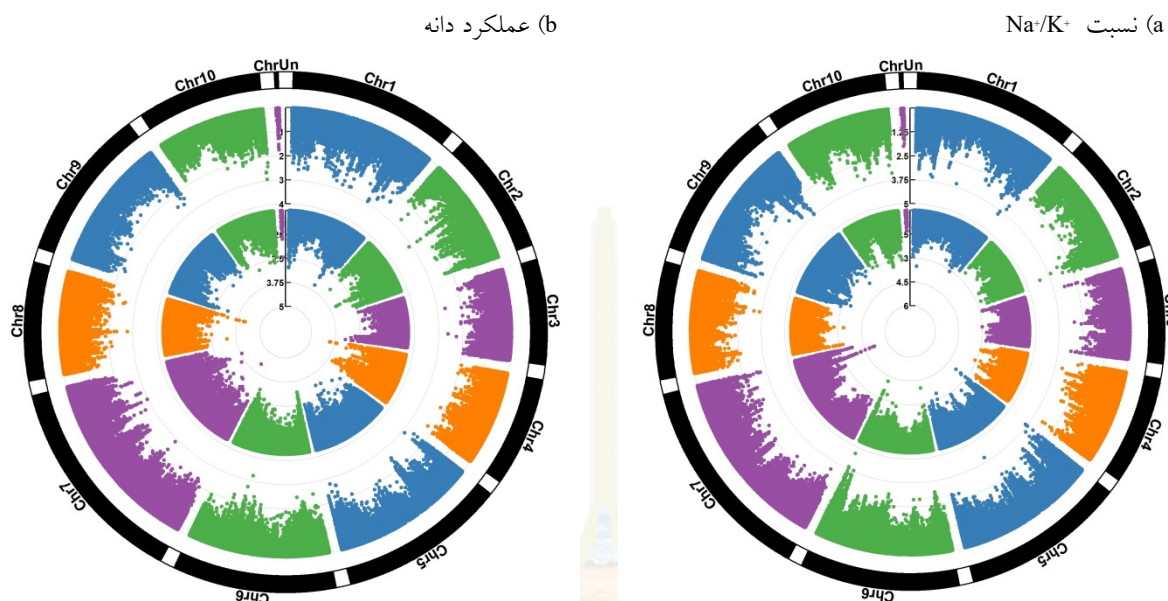
بر اساس پلات Heat-map بدست آمده از روابط خویشاوندی، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در دو گروه اصلی گروه‌بندی شدند (شکل ۱). گروه اول که شامل ۲۶ لاین بود شامل اکثر لاین‌های تهیه شده از کرج بود، بنابراین در برنامه اصلاحی برای تولید بذر هیبرید بایستی با لاین‌های گروه دوم، که شامل ۶۷ لاین است و خویشاوندی کمتری با لاین‌های گروه اول دارند، تلاقی داده شوند تا هتروزیس بالاتری بدست آید.



شکل ۱- پلات Heatmap ماتریس روابط خویشاوندی ۹۳ لاین ذرت بر اساس داده‌های SNP

تجزیه ارتباط بر اساس ۴۴۹،۹۲۹ نشانگر SNP چندشکل در ۹۳ لاین ذرت برای صفات نسبت K^+/Na^+ و عملکرد دانه انجام گرفت (شکل ۲). تعداد هشت SNP (مکان) بر روی کروموزوم‌های ۷ و ۶ که به طور بسیار معنی‌داری ($P\text{-value} < 0.0001$) با K^+/Na^+ در شرایط نرمال مرتبط بودند شناسایی گردید (AX-90715795، AX-91499830، AX-90715808، AX-90715665، AX-90715768، AX-90715605، AX-90715777 و AX-91595712)، در حالی که در شرایط تنش دو SNP متفاوت بر روی کروموزوم‌های ۶ و ۲ بدست آمدند (به ترتیب AX-91427574 و AX-90573644). هر یک از این مکان‌ها به طور متوسط حدود ۲۵٪ از تغییرات فنوتیپی را تشریح می‌کرد. برای عملکرد دانه، تعداد چهار SNP بسیار معنی‌دار ($P\text{-value} < 0.0001$) مرتبط با این صفت بر روی کروموزوم‌های ۷، ۸ و ۴ در شرایط نرمال شناسایی گردید (AX-90665303، AX-91711197، AX-91019889 و AX-91118583)، در صورتی که در شرایط تنش دو SNP بر روی کروموزوم‌های ۶ و ۲ شناسایی شدند که ارتباط معنی‌داری ($P\text{-value} < 0.001$) با عملکرد دانه نشان دادند (به ترتیب AX-91581989 و AX-91759960). این مکان‌ها هر کدام حدود ۴۴٪ از تغییرات فنوتیپی را توجیه می‌نمود.





شکل ۲- پلات منهن (Manhattan) نقشه‌یابی ارتباطی برای هر یک از صفات (a) نسبت Na^+/K^+ و (b) عملکرد دانه در ۹۳ لاین ذرت (پلات درونی مربوط به شرایط نرمال و پلات بیرونی مربوط به شرایط تنش می‌باشد).

با توجه به اینکه تاکنون نقشه‌یابی ارتباطی در رابطه با تحمل به تنش شوری برای این صفات در ذرت انجام نگرفته است، می‌توان از نتایج پژوهش حاضر به عنوان منبعی از ژن‌های تازه شناخته شده درگیر در تحمل به تنش شوری استفاده نمود.

منابع

1. Alizadeh, A., 2004. Quality of irrigation water. Astan Quds Razavi Publisher, Mashhad, Iran, p. 96 (in Persian).
2. Cui, D. Z., Wu, D. D., Somarathna, Y., Xu, C. Y., Li, S., Li, P., et al., 2015. QTL mapping for salt tolerance based on SNP markers at the seedling stage in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 203: 273-283.
3. FAO, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Save and grow in practice maize, rice, wheat: A guide to sustainable cereal production.
4. Flint-Garcia, S. A., Thornsberry, J. M., Buckler, E. S., 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54: 357-374.
5. Flowers, T. J., 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
6. Horie, T., Karahara, I., Katsuhara, M., 2012. Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice* 5: 11-18.
7. Kumar, V., Singh, A., Mithra, S. V., Krishnamurthy, S. L., Parida, S. K., Jain, S., Tiwari, K. K., Kumar, P., Rao, A. R., Sharma, S. K., Khurana, J. P., Singh, N. K., Mohapatra, T., 2015. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). *DNA Res.* 22(2):133-45.
8. Long, N. V., Dolstra, O., Malosetti, M., Kilian, B., Graner, A., Visser, R. G., van der Linden, C. G., 2013. Association mapping of salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet.* 126(9): 2335-51.
9. Munns, R., James, R. A., Lauchli, A., 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57: 1025-1043.
10. Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol.* 9(1): 651-681.
11. Xing, Y., Frei, U., Schejbel, B., Asp, T., Lubberstedt, T., 2007. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in 11 expressed resistance candidate genes in *Lolium perenne*. *Bmc Plant Biol.* 7: 43.



Genome-wide association mapping of potassium/sodium ratio related to salinity tolerance in maize inbred lines

Sorour Arzhang, Reza Darvishzadeh, Hadi Alipour

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University
sorour.arzhang@gmail.com

Abstract

Salt stress significantly restricts plant growth and production. Maize is moderately sensitive to salt stress; therefore, soil salinity is a serious threat to maize production worldwide. Identification of genes controlling salt tolerance could speed up breeding processes and help breeders to select salt tolerant genotypes. In the present study, association mapping were performed for potassium/sodium ratio and grain yield in 93 inbred maize lines using Affymetrix® Maize 600K array. The kinship matrix were grouped the lines into two groups. For the K^+/Na^+ ratio, eight and two highly significant ($P < 0.0001$) SNPs were detected under normal and salt stress conditions, respectively. For grain yield, four and two highly significant SNPs were identified under normal and salt stress conditions, respectively. Identifying these SNPs establishes the basis for the map-based cloning of genes associated with salt tolerance and provides a potential target for marker assisted selection in developing new tolerant maize varieties salt stress.

Key words: Linkage Disequilibrium (LD), Mixed Linear Model (MLM), SNP Marker, Potassium to Sodium Ratio, Grain Yield

