

ردیابی QTL های کنترل کننده صفات با تحمل به کمبود فسفر در لاین های خالص برنج (*Oryza sativa* L.) ایرانی در مرحله گیاهچه ای

شریفه محمدآلق^۱، حسین صبوری^{۲*}، علی ستاریان^۳، عباس بیابانی^۲، عبدالطیف قلی زاده^۴

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

۲. دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

۳. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

۴. استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۱/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۱۶

چکیده

برنج، در چرخه غذایی جهان نقش مهمی دارد به طوری که غذای اصلی بیش از ۵۰ درصد مردم جهان را تأمین می کند. به منظور مکان یابی QTL های مرتبط با تحمل به کمبود فسفر در مرحله گیاهچه ای ۹۶ لاین که از نسل هشتم تلاقی ارقام اهلمی طارم و ندا به دست آمده بودند در آزمایشگاه های گیاه شناسی و ژنتیک دانشگاه گنبدکاووس در سال ۱۳۹۳ تحت شرایط نرمال و تنش کمبود فسفر مورد مطالعه قرار گرفتند. صفات مورد بررسی عبارت بودند از محتوای کلروفیل برگ، تعداد ریشه، طول ساقه و ریشه، طول و عرض برگ بر حسب سانتی متر، حجم ریشه، وزن خشک ساقه و ریشه، میزان فسفر، سطح ریشه، سطح برگ، قطر ریشه و چگالی سطح ریشه و محاسبه شدند. نقشه پیوستگی تهیه شده بر اساس ۳۰ نشانگر SSR و ۶۰ آلل تکثیر شده چند شکل از ۱۵ نشانگر ISSR با استفاده از ۹۶ فرد جمعیت F8 اهلمی طارم و ندا، نشانگرها را به ۱۲ گروه پیوستگی متعلق به ۱۲ کروموزوم برنج با طول نقشه بر اساس تابع کوزامبی را برابر با ۱۴۱۱/۳ سانتی مورگان و فاصله در بین دو نشانگر مجاور برابر با ۱۵/۳۴ سانتی مورگان منتسب کرد. با توجه به نتایج حاصل از مکان یابی ژنی در شرایط نرمال در مجموع ۴۳ QTL برای صفات ارزیابی شده در شرایط نرمال شناسایی شد. qRW-5b، qRN-6b، qNP-6b و qLA-7، qRW-5c و به ترتیب در جهت افزایش تعداد ریشه، وزن ریشه، سطح برگ و میزان فسفر در شرایط نرمال بزرگ اثر بودند. در شرایط کمبود فسفر ۱۳ QTL مکان یابی شد. برای میزان فسفر در شرایط کمبود فسفر دو QTL روی کروموزوم های ۹ و ۱۰ شناسایی شدند. qCHL-2a و qCHL-2b در جهت افزایش کلروفیل در شرایط کمبود فسفر بزرگ اثر بودند. در این پژوهش QTL های بزرگ اثر مؤثر در بالا رفتن نمود گیاه در شرایط نرمال و کمبود فسفر ردیابی شد که پس از تعیین اعتبار می توان از نشانگرهای پیوسته مذکور می توان در برنامه های انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

واژه های کلیدی: QTL، تنش، ریشه، مکان یابی

مقدمه

برنج، در چرخه غذایی جهان نقش مهمی دارد به طوری که غذای اصلی بیش از ۵۰ درصد مردم جهان را تأمین می کند و تقریباً زنده ماندن سه چهارم فقیرترین مردم دنیا بستگی به تولید برنج دارد. برنج از گیاهان زراعی مهم در قاره آسیا است و بیش از ۹۰ درصد آن در آسیا تولید و مصرف می شود (Maclean and Hettel, 2007). گیاهان نیز مانند سایر موجودات زنده برای زنده ماندن نیاز به مواد غذایی دارند. عناصر غذایی مورد نیاز برای گیاهان نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، گوگرد، آهن، روی، منگنز، مس، بر، مولیبدن و کلر است که از مواد معدنی خاک یا با کودهای آلی و معدنی تأمین می شود (Silva and Uchida, 2000). بعد از ازت، فسفر عنصر مؤثر بعدی در رشد گیاهان در شرایط مزرعه

برنج، در چرخه غذایی جهان نقش مهمی دارد به طوری که غذای اصلی بیش از ۵۰ درصد مردم جهان را تأمین می کند و تقریباً زنده ماندن سه چهارم فقیرترین مردم دنیا بستگی به تولید برنج دارد. برنج از گیاهان زراعی مهم در قاره آسیا است و بیش از ۹۰ درصد آن در آسیا تولید و مصرف می شود (Maclean and Hettel, 2007). گیاهان نیز مانند سایر موجودات زنده برای زنده ماندن نیاز به مواد غذایی دارند. عناصر غذایی مورد نیاز برای گیاهان نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، گوگرد، آهن، روی، منگنز، مس، بر، مولیبدن و کلر است که از مواد معدنی خاک یا با کودهای آلی و معدنی تأمین می شود (Silva and Uchida, 2000). بعد از ازت، فسفر عنصر مؤثر بعدی در رشد گیاهان در شرایط مزرعه

همکاران (Wissuwa et al., 1998) به کمک ۹۸ لاین خویش آمیخته تلاقی برگشتی (BIL) حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های ژاپنی و هندی توانستند QTL‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به کمبود فسفر در برنج را به‌وسیله ۲۴۵ نشانگر RFLP شناسایی کنند. سه QTL برای وزن خشک و چهار QTL برای میزان جذب فسفر و دو QTL برای تعداد پنجه روی کروموزوم ۴ و ۱۲ مکان‌یابی کردند. پینگ و همکاران (Ping et al., 2008) QTL‌های مرتبط با صفات عملکرد برنج را در شرایط کمبود فسفر مکان‌یابی نمودند. این محققین از ۹۴ نشانگر RFLP و ۷۱ نشانگر SSR برای تهیه نقشه پیوستگی روی ۱۱۶ فرد هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی ارقام IRAT109 (متحمل به کمبود فسفر) و YUEFU (حساس به کمبود فسفر) استفاده کردند و توانستند در مجموع ۱۷ QTL برای صفات عملکرد و اجزا عملکرد (وزن هزار دانه، درصد تنظیم فسفر دانه، تعداد خوشه در بوته، تعداد دانه در خوشه) شناسایی کنند. ژنگ و همکاران (Zhang et al., 2009) QTL‌های مرتبط با رشد ریشه برنج در پاسخ به کمبود فسفر در مرحله گیاهچه‌ای با استفاده از لاین‌های خالص نوترکیب حاصل از تلاقی ارقام IR24 (حساس به طویل شدن ریشه در شرایط کمبود فسفر) و Asominori (متحمل به طویل شدن ریشه در شرایط کمبود فسفر) و ۳۷۵ نشانگر RFLP مکان‌یابی نمودند و توانستند سه QTL برای طول ریشه روی کروموزوم‌های ۷، ۱۱ و ۱۲ شناسایی کنند که به ترتیب ۱۳/۳، ۱۰/۷ و ۱۰/۳ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه کردند. یو و همکاران (Yu et al., 2009) برای شناسایی مکان‌های ژنی صفات کمی برنج در پاسخ به کمبود نیتروژن و فسفر از ۱۲۵ لاین CSSL استفاده نمودند و توانستند ۸ QTL برای تعداد خوشه روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۱ و ۱۸ QTL برای عملکرد دانه روی کروموزوم‌های ۱، ۲ (سه مورد)، ۳ (دو مورد)، ۴ (چهار مورد)، ۵ (دو مورد)، ۷ (سه مورد)، ۹، ۱۰ و ۱۱ در سه سطح کودی نرمال، نیتروژن کم و فسفر کم شناسایی کنند. نظر به اینکه تاکنون از جمعیت‌های برنج ایرانی جهت مکان‌یابی صفات مرتبط با تحمل به کمبود فسفر استفاده نشده است این تحقیق با اهداف مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به کمبود فسفر در مرحله گیاهچه‌ای برنج و معرفی نشانگرهای مولکولی پیوسته با QTL‌های مهم کنترل‌کننده صفات مورد مطالعه جهت استفاده در انتخاب به کمک نشانگر و ارزیابی لاین‌های مختلف

است. وجود فسفر در جذب سایر عناصر دیگر لازم است. ادامه فعالیت‌های حیاتی گیاه به فسفر وابسته بوده و کمبود فسفر حالت بحرانی در گیاه ایجاد می‌کند همچنین کمبود فسفر باعث به تأخیر افتادن ظهور خوشه در برنج شده و دیررسی محصول اتفاق می‌افتد. فسفر در گیاه نقش اساسی در فرایند انتقال انرژی دارد (Karimi Meridani, 2014).

در سال‌های گذشته سازگاری ژنتیکی گیاهان با محیط‌های مختلف رشد مورد توجه محققان بوده است. امروزه با طرح مباحث جدید پیرامون نقش ژنتیک در تغذیه گیاه و نیز امکان استفاده از فناوری زیستی و راهکارهای نوین اصلاح نباتات در جهت بهبود کمی و کیفی محصولات کشاورزی، علم تغذیه گیاهی بیش از گذشته مورد توجه قرار گرفته است. بررسی تفاوت ژنتیکی ارقام گیاهی از لحاظ جذب، انتقال و یا نحوه مصارف عناصر از مباحث نوین تغذیه گیاهی است (Nguyen and Bui, 2006) برای شناسایی QTL‌های مرتبط با تحمل به کمبود فسفر در برنج از لاین‌های BC₂F₃ حاصل از تلاقی OM2395 (پر محصول و حساس به کمبود فسفر) و AS996 (مقاوم به کمبود فسفر) استفاده نمودند. آن‌ها توانستند نقشه ژنتیکی ۱۱۶ نشانگر ریزوماواره که حدود ۲۹۰۵/۵ سانتی‌مورگان از کل ژنوم برنج را با متوسط فاصله ۲۳/۰۵ سانتی‌مورگان بین نشانگرها پوشش می‌داد، تهیه نمایند و QTL‌های مرتبط با صفات طول نسبی ساقه، وزن خشک نسبی ساقه و ریشه را مکان‌یابی نمایند. به‌طور کلی در این بررسی چهار QTL برای طول نسبی ساقه روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۵، ۹ و ۱۲ (دو مورد)، سه QTL برای طول نسبی ریشه روی کروموزوم‌های ۱ و ۲ و چهار QTL برای وزن خشک نسبی ساقه روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۵ و ۱۲ شناسایی شد. نی و همکاران (Ni et al., 1998) برای شناسایی ژن‌های تحمل به کمبود فسفر برنج از لاین‌های نوترکیب خالص حاصل از تلاقی IR20 و IR55178-3B-9-3 (به ترتیب به‌عنوان والد متحمل و حساس به کمبود فسفر) استفاده نمودند و نقشه پیوستگی جمعیت را با استفاده از ۲۱۷ نشانگر AFLP با طول ۱۳۷۱/۸ سانتی‌مورگان و فاصله متوسط نشانگری ۷/۶۲ سانتی‌مورگان تهیه کردند. آن‌ها توانستند سه QTL برای وزن خشک نسبی ریشه روی کروموزوم‌های ۱، ۶ و ۱۲، چهار QTL برای وزن خشک نسبی ساقه روی کروموزوم‌های ۱، ۶، ۹ و ۱۲ و سه QTL برای توانایی پنجه‌زنی روی کروموزوم‌های ۱، ۶ و ۱۲ شناسایی کنند. ویسو و

هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و صفات آن‌ها ثبت شد. جهت اندازه‌گیری محتوای کلروفیل برگ پرچم با استفاده از دستگاه کلروفیل متر دستی مدل (SPDD 502 Minolta) برای هر برگ در سه نقطه پهنک برگ (نوک، وسط و قاعده) در یک سوی رگبرگ اصلی قرائت شد. تعداد ریشه نیز شمارش و ثبت شد. صفات طول ساقه و ریشه، طول و عرض برگ پرچم با خط کش برحسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. با قرار دادن ریشه‌ها در یک استوانه مدرج ۲۵ میلی‌لیتری با حجم مشخص و اختلاف حجم آب قبل و بعد از قرار دادن ریشه، حجم ریشه اندازه‌گیری شد. سپس ریشه‌ها و ساقه‌های گیاهچه‌های مربوط به هر لاین، در هر تکرار، ابتدا با ترازو توزین شده و به طور مجزا در پاکت کاغذی بسته‌بندی شد و پس از آن در آن در دمای ۷۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. وزن خشک ساقه و ریشه نیز پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها و میزان فسفر با روش اولسون و فلیم فتومتری (Page et al., 1982) اندازه‌گیری شد. صفات سطح ریشه (Alizadeh, 2006)، سطح برگ (Yoshida et al., 1976)، قطر ریشه و چگالی سطح ریشه (Hajabbasi, 2001) با استفاده از روابط ۱ تا ۴ زیر محاسبه شدند.

$$[۱] \quad \text{طول ریشه} \times \pi \times \text{حجم ریشه} = ۲ \times \text{سطح ریشه}^{۱/۵}$$

$$[۲] \quad \text{طول برگ} \times \text{عرض برگ} \times ۰/۷۵ = \text{سطح برگ}$$

$$[۳] \quad \text{قطر ریشه} = ((\pi \times \text{طول ریشه}) \times \text{وزن تر ریشه} \times ۴)^{۱/۵}$$

$$[۴] \quad \text{چگالی سطح ریشه} = \pi \times \text{قطر ریشه} \times \text{طول ریشه}$$

برنج ایرانی از لحاظ تحمل به کمبود فسفر در مرحله گیاهچه‌ای اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت کشت هیدروپونیک در سال ۱۳۹۳ در اتاقک کشت آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه گنبدکاووس با دمای روز ۲۹ و شب ۲۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد و نور طبیعی (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) انجام شد. مواد گیاهی شامل ۹۶ لاین حاصل از تلاقی ارقام اهلمی طارم × ندا بود که به صورت آزمایش تجزیه مرکب در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. ابتدا بذور در پتری دیش جوانه‌دار شد سپس ۱۶ بذر جوانه‌دار شده از هر لاین به صفحه‌های یونولیتی (در زیر صفحه‌های یونولیتی صفحه‌ای از جنس پلاستیک با سوراخ‌های ریز جهت عبور ریشه‌چه‌ها دوخته شده بود) منتقل شد. صفحه‌های یونولیتی در ظروف پلاستیکی با ابعاد ۱۹ در ۳۲ سانتی‌متر که ۸ لیتر محلول غذایی یوشیدا در آن بود قرار داده شدند. برای اعمال تنش کمبود عنصر فسفر از یک‌دهم (Lian et al., 2008) غلظت نرمال محلول پایه $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Yoshida et al., 1976) استفاده شد (شکل ۱).

محلول غذایی هر هفته تعویض شد و pH محلول هفته ای سه بار کنترل شد و با محلول‌های هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید یک نرمال روی ۵/۵ به مدت یک ماه ثابت نگه داشته شد. در پایان این دوره ۶ گیاهچه از هر لاین برای



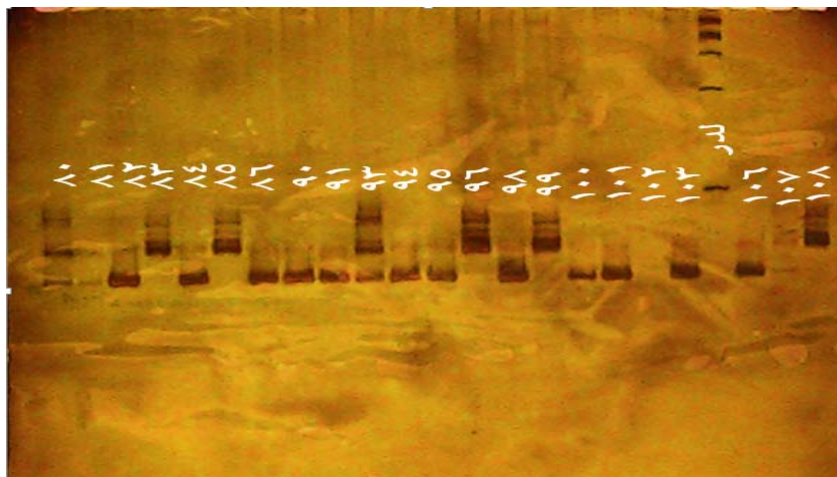
ب- گیاهچه‌ها تحت شرایط نرمال
B: Seedling under the condition of normal



الف- گیاهچه‌ها تحت شرایط کمبود فسفر
A: Seedling under the condition of phosphorus deficiency

شکل ۱. گیاهچه‌های برنج تحت شرایط تنش کمبود فسفر (الف) و نرمال (ب)

Fig. 1. Rice Seedling under the condition of phosphorus deficiency (A) and normal (B)



شکل ۲. الگوی نواری بندی باندها مربوط به برای نشانگر RM39

Fig. 2. Banding pattern related to RM39 markers

به ۱۲ گروه پیوستگی متعلق به ۱۲ کروموزوم برنج با طول نقشه بر اساس تابع کوزامبی (Kosambi, 1994) برابر با ۱۴۱۱/۳ سانتی مورگان و فاصله در بین دو نشانگر مجاور برابر با ۱۵/۳۴ سانتی مورگان منتسب کرد. نسبت‌های مندلی با استفاده از آزمون کای اسکور بر روی کلیه نشانگرهای مورد بررسی آزمون شد. کلیه نشانگرهای مورد بررسی توزیع ۱:۱ داشته و از توزیع مندلی تبعیت نمودند. با توجه به نتایج حاصل از مکان‌یابی ژنی در شرایط نرمال در مجموع ۴۳ فاصله واجد QTL برای صفات ارزیابی شده در شرایط نرمال شناسایی شد (جدول ۱) که از این تعداد دو QTL طول برگ، دو QTL وزن ساقه، یک QTL طول ریشه، ۱۴ QTL تعداد ریشه، دو QTL چگالی سطح ریشه، ۱۰ QTL وزن ریشه، یک QTL سطح برگ، یک QTL قطر ریشه و ده QTL میزان فسفر را کنترل کردند. در شرایط نرمال برای طول برگ دو QTL بر روی کروموزوم‌های ۳ و ۵ شناسایی شد. QTL‌های مکان‌یابی شده به ترتیب عبارت‌اند از: qLL-3 که روی کروموزوم ۳ در فاصله نشانگری 5-ISSR9-5-8-5 از مکان‌یابی گردید و با LOD برابر با ۲/۹۱ مقدار ۱۳/۱ درصد از واریانس فنوتیپی طول برگ را توجیه نمود. qLL-5، روی کروموزوم ۵ در فاصله نشانگری 2-ISSR5-5-194-194-194-194 شناسایی شد و با LOD برابر ۴/۲۱، به‌عنوان یک QTL بزرگ اثر به‌تنهایی توانست ۱۸/۳ درصد از تنوع فنوتیپی صفت

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگ به روش CTAB سقای معروف و همکاران (Saghi Maroof et al., 1994) در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه گنبدکاووس صورت گرفت. مطالعات ژنوتیپی برای تعیین ژنوتیپ افراد به‌منظور تهیه نقشه پیوستگی جمعیت ۹۶ لاین حاصل از تلاقی ارقام اهلمی طارم و ندا به همراه والدین با استفاده از نشانگرهای SSR و ISSR انجام شد. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید واسرشته‌ساز شش درصد تفکیک شدند. نمایان‌سازی باندها با روش موسوم به روش سریع رنگ‌آمیزی نقره^۱ (Bassam et al., 1991)، انجام شد (شکل ۲).

برای تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار Map Manager QTX 17 (Manly and Olson, 1999) استفاده شد. برای یافتن رابطه بین داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی و انجام تجزیه QTL، از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب استفاده شد. تجزیه QTL با استفاده از نرم‌افزار QTL Cartographer (Basten et al., 1997) انجام شد.

نتایج و بحث

بعد از تعیین ژنوتیپ افراد، داده‌های حاصل وارد نرم‌افزار MapManager QTX 17 گردید. نقشه پیوستگی تهیه‌شده بر اساس ۳۰ نشانگر SSR و ۱۵ نشانگر ISSR (با ۶۰ آلل تکثیرشده چند شکل) روی ۹۶ فرد جمعیت F₈، نشانگرها را

¹ Rapid Silver Staining

کروموزوم های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ (۳ مورد)، ۶ (دو مورد)، ۷ (چهار مورد) و ۸ شناسایی شد. QTL های qRN-1، qRN-3، qRN-5c و qRN-6b به ترتیب با ضریب تبیین برابر با ۱۸/۹، ۲۰، ۱۹/۱ و ۲۵ اثر نسبتاً بزرگی بر تعداد ریشه داشتند. به جز در QTL های qRN-3 و qRN-4 که آلل های اهلمی طارم باعث کاهش تعداد ریشه شدند در سایر QTL ها آلل های ندا باعث افزایش تعداد ریشه شدند. برای چگالی سطح ریشه دو QTL (qRSD-3 و qRSD-11) روی کروموزوم های ۳ و ۱۱ شناسایی شد و QTL های شناسایی شده به ترتیب بین نشانگرهای RM144-ISSR9-2 و ISSR9-5-RM143 قرار داشتند. اثر افزایشی این QTL ها به ترتیب در حدود ۰/۰۴- و ۰/۰۷- بود و در هر دو QTL آلل های والد ندا باعث کاهش میزان این صفت شد. این QTL ها مجموعاً ۲۳/۱ درصد از تغییرات فنوتیپی چگالی سطح ریشه را توجیه نمودند.

مذکور را توجیه کند. هر دو QTL دارای اثر افزایشی منفی بودند و آلل های کاهش دهنده از والد ندا منتقل شدند.

دو QTL شناسایی شده برای وزن ساقه روی کروموزوم های ۱۱ و ۱۲ قرار داشتند. اثر افزایشی این QTL ها به ترتیب برابر ۰/۱۰- و ۰/۰۸ گرم بود. در مورد qSW-11 آلل های والد ندا باعث کاهش وزن ساقه شد، در حالی که در خصوص qSW-12 آلل های اهلمی طارم باعث افزایش وزن ساقه شد. در مطالعه لیان و همکاران (Lian et al., 2005) برای وزن ساقه در شرایط نرمال ۶ QTL روی کروموزوم های ۱ (دو مورد)، ۵، ۶ (دو مورد) و ۱۱ شناسایی شد که QTL کروموزوم ۱۱ با QTL شناسایی شده در مطالعه حاضر نیز مطابقت داشت. برای صفت طول ریشه، یک QTL مکان یابی شد که بر روی کروموزوم ۳ در فاصله نشانگری RM504-ISSR4-4 قرار داشت. در این QTL آلل های والد اهلمی طارم باعث افزایش مقدار این صفت شد. برای تعداد ریشه ۱۵ QTL روی

جدول ۱. QTL های شناسایی شده برای صفات مرتبط با شرایط نرمال در برنج

Table 1. Identified QTL for traits related to normal condition in rice

صفت Trait	کیوتی ال QTLs	نشانگرهای مجاور* Flanking markers	کروموزوم Chr.	لود LOD	موقعیت		ضریب تبیین Coefficient of determination	اثر آلل Effects of alleles
					اثر افزایشی (سانتی مورگان) Position (cM)	Additive Effect		
طول برگ Leaf length	qLL-3	ISSR8-5- <u>ISSR9-5</u>	3	2.91	20	-1.31	13.1	ندا Neda
	qLL-5	<u>RM194</u> -ISSR5-2	5	4.21	62	-0.87	18.3	ندا Neda
وزن ساقه Stem weight	qSW-11	<u>RM181</u> -ISSR6-1	11	2.47	98	-0.10	11.2	ندا Neda
	qSW-12	ISSR14-4- <u>RM12</u>	12	2.43	38	-0.08	11	اهلمی طارم Ahlami Tarom
طول ریشه Root length	qRL-3	RM504- <u>ISSR4-4</u>	3	2.18	130	0.21	9	اهلمی طارم Ahlami Tarom
تعداد ریشه Root number	qRN-1	<u>ISSR13-2</u> -ISSR1-5	1	4.36	90	0.35	18.9	ندا Neda
	qRN-2	<u>ISSR8-2</u> -ISSR5-3	2	2.96	2	0.32	13	ندا Neda
	qRN-3	<u>ISSR11-2</u> -RM504	3	4.86	84	-0.29	20	اهلمی طارم Ahlami Tarom
	qRN-4	<u>ISSR8-3</u> -RM252	4	3	50	-0.43	13	اهلمی طارم Ahlami Tarom
	qRN-5a	<u>RM39</u> -RM194	5	2.10	54	0.25	9	ندا Neda
	qRN-5b	ISSR4-3- <u>ISSR9-4</u>	5	3.86	98	0.46	16	ندا Neda
	qRN-5c	RM538- <u>ISSR2-4</u>	5	4.13	130	0.40	19.1	ندا Neda
	qRN-6a	ISSR4-5- <u>RM111</u>	6	3.96	28	0.36	17	ندا Neda
	qRN-6b	ISSR9-1- <u>ISSR6-2</u>	6	6.02	100	1.31	25	ندا Neda
	qRN-7a	ISSR12-1- <u>ISSR2-2</u>	7	3.88	20	0.61	17	ندا Neda
	qRN-7b	<u>ISSR8-6</u> -RM248	7	3.57	54	0.44	15.8	ندا Neda
	qRN-7c	RM248- <u>ISSR5-4</u>	7	2.73	86	0.47	12.3	ندا Neda
	qRN-7d	<u>ISSR5-4</u> -ISSR4-7	7	4.02	110	0.80	17.6	ندا Neda
	qRN-8	<u>ISSR4-6</u> -ISSR13-3	8	3.11	12	0.45	13.9	ندا Neda

Table 1. Continued

جدول ۱. ادامه

صفت Trait	کیوتی‌ال QTLs	نشانه‌های مجاور* Flanking markers	کروموزوم Chr.	لود LOD	موقعیت (سانتی‌مورگان)		ضریب تبیین Coefficient of determination	اثر آلل Effects of alleles
					اثر افزایشی Additive Effect	Position (cM)		
چگالی سطح ریشه Root surface density	qRSD-11	RM144- <u>ISSR9-2</u>	11	3.09	54	-0.07	13.8	ندا Neda
	qRSD-3	ISSR9-5- <u>RM143</u>	3	2.02	36	-0.04	9.3	ندا Neda
وزن ریشه Root weight	qRW-2a	<u>ISSR1-1</u> - RM300	2	3.89	44	0.05	17	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
	qRW-2b	<u>ISSR5-1</u> - RM301	2	2.39	84	0.02	10.8	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
	qRW-5a	RM39- <u>RM194</u>	5	3.27	56	0.03	14.5	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
	qRW-5b	<u>ISSR5-2</u> - <u>ISSR10-2</u>	5	7.28	68	0.04	9.5	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
	qRW-5c	<u>ISSR10-2</u> - <u>ISSR4-3</u>	5	6.43	76	0.04	26.6	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
	qRW-6a	RM111- <u>ISSR8-4</u>	6	3.16	38	0.02	14.1	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
	qRW-6b	<u>ISSR9-1</u> - <u>ISSR6-2</u>	6	3.64	88	0.08	16.1	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
	qRW-7a	<u>ISSR12-1</u> - <u>ISSR2-2</u>	7	3.06	18	0.05	13.7	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
	qRW-7b	<u>ISSR5-4</u> - <u>ISSR4-7</u>	7	2.07	104	0.06	9.5	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
	qRW-8	<u>ISSR4-6</u> - <u>ISSR13-3</u>	8	4.04	14	0.05	17.6	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
سطح برگ Leaf area	qLA-7	<u>ISSR11-3</u> - <u>RM298</u>	7	4.59	10	3.11	19.8	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
قطر ریشه Root diameter	qRD-11	RM181- <u>ISSR6-1</u>	11	2.33	120	0.005	10.6	اهلمی طارم Ahلامي Tarom
	qNP-10	<u>ISSR14-3</u> -RM294	10	3.85	34	5.39	16.9	ندا Neda
میزان فسفر The amount of phosphorus	qNP-2	<u>ISSR1-1</u> - <u>RM300</u>	2	2.49	52	3.85	11.3	ندا Neda
	qNP-5a	RM39- <u>RM194</u>	5	2.27	58	2.39	10.4	ندا Neda
	qNP-5b	<u>ISSR10-2</u> - <u>ISSR4-3</u>	5	3.71	76	3.03	16.3	ندا Neda
	qNP-5c	<u>ISSR9-4</u> -RM538	5	2.06	112	2.41	9.4	ندا Neda
	qNP-5d	RM538- <u>ISSR2-4</u>	5	2.18	130	2.81	10	ندا Neda
	qNP-6a	<u>ISSR4-5</u> - <u>RM111</u>	6	3.24	32	2.72	14.4	ندا Neda
	qNP-6b	<u>ISSR9-1</u> - <u>ISSR6-2</u>	6	4.42	106	9.59	19.1	ندا Neda
	qNP-7a	<u>ISSR2-2</u> - <u>ISSR4-6</u>	7	3.82	30	2.37	16.7	ندا Neda
qNP-7b	<u>ISSR5-4</u> - <u>ISSR4-7</u>	7	2.37	116	5.34	10.7	ندا Neda	

*: نشانگرهایی که زیرشان خط کشیده شده به QTL مربوطه نزدیک‌تر هستند.

*Markers below the line drawn are closer to the QTL

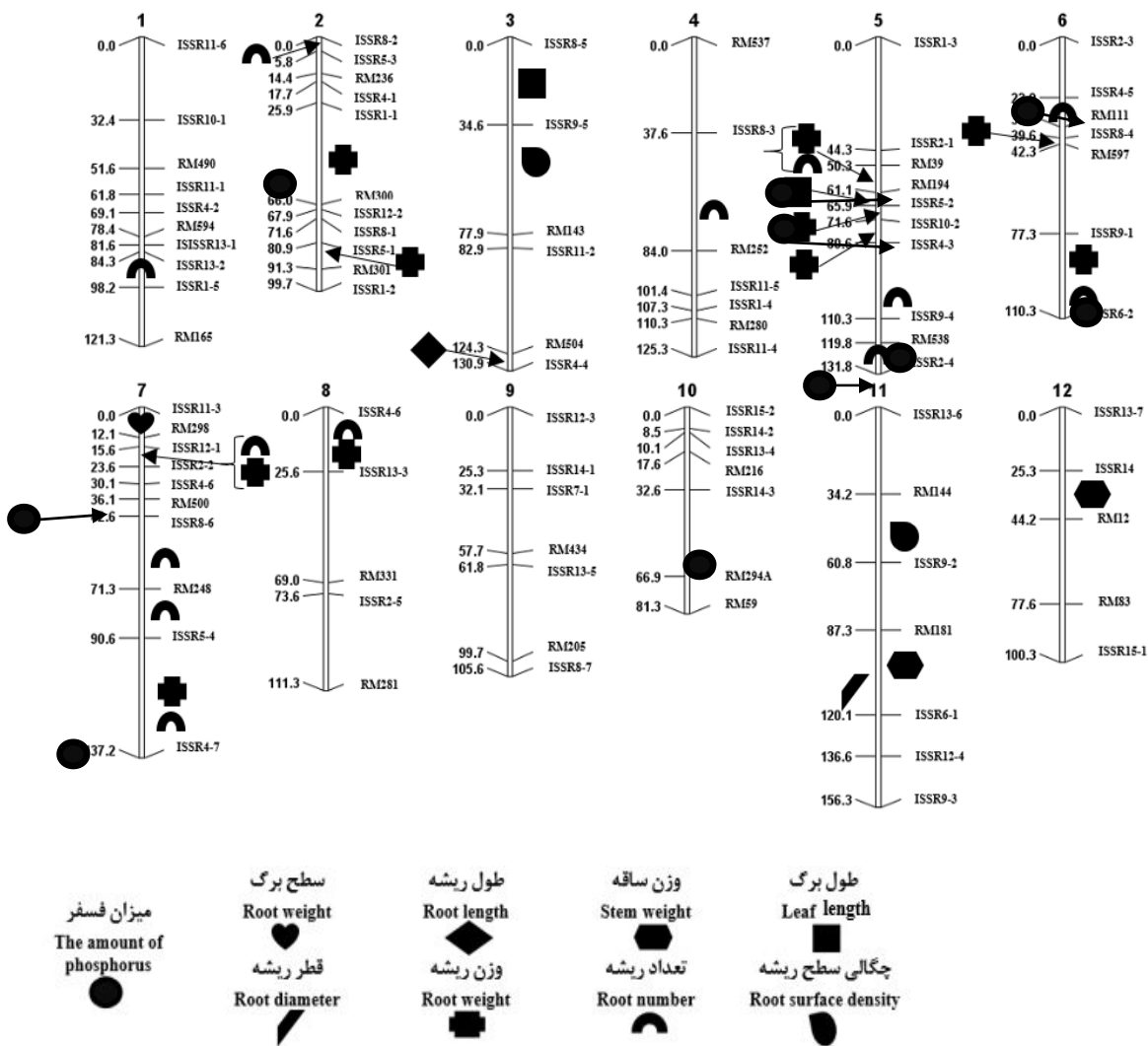
با تبیین ۲۹/۵ و ۲۶/۶ درصد از تنوع فنوتیپی بزرگ اثر برخوردار بودند. در مطالعه لیان و همکاران (Lian et al., 2005) پنج QTL کنترل‌کننده وزن ریشه تحت شرایط نرمال روی کروموزوم‌های ۲، ۵، ۷، ۱۱ و ۱۲ قرار داشتند.

ده QTL کنترل‌کننده وزن ریشه بر روی کروموزوم‌های ۲ (دو مورد)، ۵ (سه مورد)، ۶ (۲ مورد)، ۷ (دو مورد) و ۸ قرار داشتند. در همه این QTLها آلل‌های اهلمی طارم باعث افزایش وزن ریشه شدند. QTLهای qRW-5c و qRW-5b

ISSR6-1 قرار داشت. این QTL با LOD برابر ۲/۳۳، ۱۰/۶ درصد از تغییرات فنوتیپی قطر ریشه را تبیین نمود و در آن آلل های والد اهلمی طارم باعث افزایش این صفت شد. برای میزان فسفر ۱۰ QTL شناسایی شد که بر روی کروموزوم های ۲، ۵ (چهار مورد)، ۶ (دو مورد)، ۷ (دو مورد) و ۱۰ قرار داشتند. اثر افزایشی این مکان ها از ۲/۳۷ تا ۹/۵۹ متغیر بود (شکل ۳).

برای صفت سطح برگ، یک QTL بزرگ اثر روی کروموزوم ۷ (qLA-7) مکان یابی گردید که در فاصله نشانگری ISSR11-3-RM298 قرار داشت و با LOD برابر ۴/۵۹، ۱۹/۸ درصد از واریانس فنوتیپی سطح برگ را توجیه نمود. اثر افزایشی این QTL برابر ۳/۱۱ بود که جهت مثبت آن نشان می دهد که آلل های افزایش دهنده از والد اهلمی طارم به نتاج منتقل شد.

یک QTL برای صفت قطر ریشه روی کروموزوم ۱۱ شناسایی شد. qRD-11 در فاصله نشانگرهای RM181 و



شکل ۳. نقشه پیوستگی و موقعیت QTL های شناسایی شده در جمعیت برنج حاصل از تلاقی ارقام اهلمی طارم و ندا بر اساس ۳۰ نشانگر SSR و ۱۵ نشانگر ISSR در شرایط نرمال

Fig. 3. Linkage map and QTL positions identified in the rice populations obtained from the crossing of Ahlmai Tarom and Neda cultivars based on 30 SSR markers and 15 ISSR markers under normal condition

جدول ۲. QTL‌های کنترل‌کننده برای صفات مرتبط با کمبود فسفر در برنج

Table 2. Identified QTL for traits related to phosphorus deficiency condition in rice

صفت	کیوتی‌ال	نشانه‌های مجاور*	کروموزوم	لود	موقعیت (سانتی‌مورگان)	اثر افزایشی	ضریب تبیین	اثر آلل
Trait	QTLs	Flanking markers	Chr.	LOD	Position (cM)	Additive Effect	Coefficient of determination	Effects of alleles
محتوای کلروفیل Chlorophyll content	qCHL-2a	<u>ISSR5-3-RM236</u>	2	3.32	8	0.025	14.7	اهلمی طارم Ahlami Tarom
	qCHL-2b	<u>RM236-ISSR4-1</u>	2	2.30	16	0.016	10.5	اهلمی طارم Ahlami Tarom
وزن تر ریشه Root fresh weight	qRW-12	<u>RM83-ISSR15-1</u>	12	2.19	100	-0.012	10	اهلمی طارم Ahlami Tarom
وزن خشک ریشه Root dry weight	qRDW-12	<u>RM83-ISSR15-1</u>	12	3.02	98	-0.001	13.5	اهلمی طارم Ahlami Tarom
	qRDW-3	<u>ISSR9-5-RM143</u>	3	2.10	62	-0.001	9.6	اهلمی طارم Ahlami Tarom
وزن خشک ساقه Stem dry weight	qSDW-12	<u>RM83-ISSR15-1</u>	12	3.08	96	-0.01	13.7	اهلمی طارم Ahlami Tarom
حجم ریشه Root volume	qRV-10a	<u>ISSR14-3-RM294A</u>	10	2.09	42	0.017	9.6	اهلمی طارم Ahlami Tarom
	qRV-10b	<u>RM294A-RM59</u>	10	2.67	74	0.011	12.1	اهلمی طارم Ahlami Tarom
سطح ریشه Root level	qRL-7	<u>ISSR5-4-ISSR4-7</u>	7	2.08	136	0.053	9.35	اهلمی طارم Ahlami Tarom
عرض برگ Leaf width	qRW-2	<u>ISSR5-3-RM236</u>	2	2.29	10	0.03	10.4	اهلمی طارم Ahlami Tarom
طول ساقه Stem length	qSL-9	<u>ISSR14-1-ISSR7-1</u>	9	2.11	26	0.397	9.6	اهلمی طارم Ahlami Tarom
میزان فسفر The amount of phosphorus	qHP-10	<u>RM294A-RM59</u>	10	2.12	74	-5.70	9.7	اهلمی طارم Ahlami Tarom
	qHP-9	<u>RM205-ISSR8-7</u>	9	2.33	104	-4.81	10.6	اهلمی طارم Ahlami Tarom

* نشانگرهایی که زیرشان خط کشیده شده به QTL مربوطه نزدیک‌تر هستند

*Markers below the line drawn are closer to the QTL

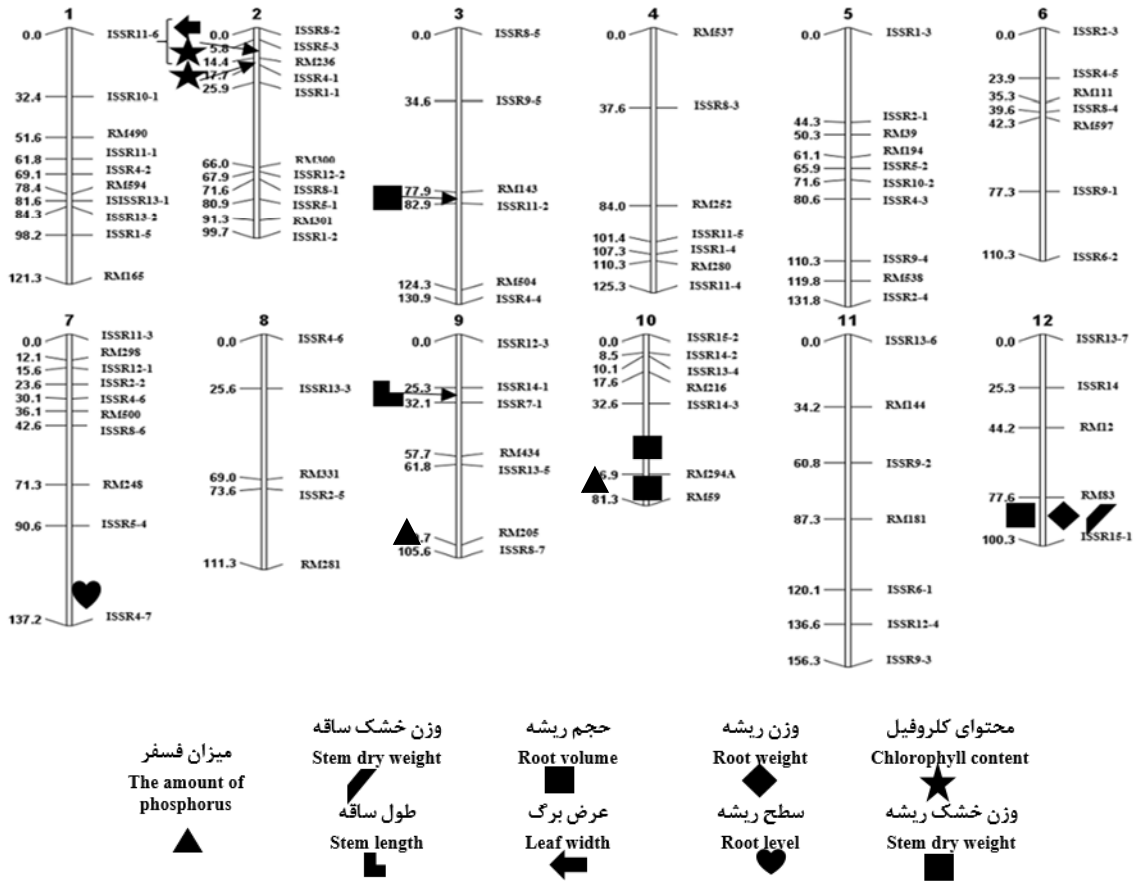
فنتیپی موجود را توجیه نمودند (شکل ۴). برای صفت وزن ریشه، QTL کنترل‌کننده روی کروموزوم ۱۲ در فاصله نشانگری RM83-ISSR15-1 شناسایی شد و اثر افزایشی و LOD آن به ترتیب برابر ۰/۱۲- و ۲/۱۹ بود. آلل‌های والد ندا در این مکان باعث کاهش وزن ریشه شدند. این مکان ژنی توانست ۱۰ درصد از تغییرات فنتیپی مربوط به وزن ریشه را توجیه کند.

برای وزن خشک ریشه، دو QTL روی کروموزوم‌های ۳ و ۱۲ مکان‌یابی شد. QTL‌های شناسایی‌شده به ترتیب عبارت بودند از qRDW-3 که روی کروموزوم ۳ در فاصله نشانگری ISSR9-5-RM143 مکان‌یابی گردید و با LOD برابر با ۲/۱۰ مقدار ۹/۶ درصد از واریانس فنتیپی وزن خشک ریشه

در شرایط کمبود فسفر دو QTL محتوای کلروفیل، یک QTL وزن ریشه، دو QTL وزن خشک ریشه، یک QTL وزن خشک ساقه، دو QTL حجم ریشه، یک QTL سطح ریشه، یک QTL عرض برگ و دو QTL میزان فسفر را کنترل نمودند (جدول ۲). برای محتوای کلروفیل دو QTL روی کروموزوم ۲ در فاصله‌های RM236-ISSR4-1 و RM236-ISSR4-1 شناسایی شدند. اثر افزایشی مکان‌های مربوط به محتوای کلروفیل از ۰/۱۶ تا ۰/۲۵ متغیر بود. در هر دو QTL آلل‌های اهلمی طارم باعث افزایش محتوای کلروفیل شدند. QTL‌های qCHL-2a و qCHL-2b به ترتیب با LOD برابر ۳/۳۲ و ۲/۳۰ اثر بزرگی بر محتوای کلروفیل داشتند و به ترتیب ۱۴/۷ و ۱۰/۵ درصد از تنوع

۲۰ درصد از تنوع فنوتیپی موجود در وزن خشک ریشه را توجیه نمودند. نی و همکاران (Ni et al., 1998) نیز توانستند سه QTL برای وزن خشک ریشه روی کروموزوم های ۱، ۶ و ۱۲ شناسایی کنند.

را توجیه نمود. qRDW-12 روی کروموزوم ۱۲ در فاصله نشانگرهای RM83 و ISSR15-1 شناسایی شد اثر افزایشی و LOD آن برابر ۰/۰۱- و ۳/۰۲ بود. اثر افزایشی در هر دو مکان شناسایی شده کاهش بود و آللهای والد ندا باعث کاهش وزن خشک ریشه شدند. این QTL ها مجموعاً بیش از



شکل ۴. نقشه پیوستگی و QTL های شناسایی شده در جمعیت برنج حاصل از تلاقی ارقام اهلمی طارم و ندا بر اساس ۳۰ نشانگر SSR و ۱۵ نشانگر ISSR در شرایط کمبود فسفر

Fig. 4. Linkage map and QTL positions identified in the rice populations obtained from the crossing of Ahlmai Taram and Neda cultivars based on 30 SSR markers and 15 ISSR markers under phosphorus deficiency condition

درصد از تغییرات این صفت را تبیین نمود. همچنین در مطالعه نگین و بو (Nguyen and Bui, 2006) نیز یک QTL برای وزن خشک ساقه روی کروموزوم ۱۲ مکان یابی شد. دو QTL برای صفت حجم ریشه (qRV-10a و qRV-10b) روی کروموزوم ۱۰ به ترتیب بین نشانگرهای RM294A-RM59 و ISSR14-3-RM294A قرار داشتند.

تنها یک QTL برای وزن خشک ساقه روی کروموزوم ۱۲ در فاصله نشانگرهای RM83-ISSR15-1 ردیابی شد. این QTL به تنهایی توانست ۱۳/۷ درصد از تغییرات وزن خشک ساقه را توجیه نماید. در مطالعه نی و همکاران (Ni et al., 1998) یک QTL برای وزن خشک ساقه روی کروموزوم ۱۲ در فاصله نشانگرهای RG9-RG241 شناسایی کنند که ۳۱

عرض برگ را توجیه نماید. اثر افزایشی این QTL ۰/۰۳ بود که آلل‌های افزایشی از آلل‌های والد اهلومی طارم منتقل شد. برای طول ساقه نیز یک QTL روی کروموزوم ۹ در حدفاصل نشانگرهای ISSR14-1 و ISSR7-1 شناسایی شد که با LOD برابر با ۱۱/۲، ۹/۶ درصد از کل تغییرات فنوتیپی این صفت را تبیین نمود. در این QTL والد اهلومی طارم باعث افزایش طول ساقه شد. نگین و بو (Nguyen and Bui, 2006) توانستند برای طول ساقه ۶ QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۵، ۹ و ۱۲ (دو مورد) شناسایی کنند. برای میزان فسفر دو QTL روی کروموزوم‌های ۹ و ۱۰ شناسایی شدند. اثر افزایشی هر دو QTL در جهت کاهش میزان فسفر بود که این آلل‌های کاهش‌دهنده از والد اهلومی طارم بود.

LOD این QTLها برابر ۲/۰۹ و ۲/۶۷ بود که مجموعاً بیش از ۲۱ درصد از تغییرات مربوط به حجم ریشه را کنترل نمودند. از بین QTLهای ردیابی شده qRV-10b، ۱۲/۱ درصد از تغییرات مرتبط با حجم ریشه را کنترل نمود که آلل‌های افزایش‌دهنده از والد اهلومی طارم باعث افزایش حجم ریشه شدند. برای سطح ریشه یک QTL روی کروموزوم ۷ در فاصله نشانگری ISSR5-4-ISSR4-7 شناسایی شد. اثر افزایشی و LOD آن برابر ۹/۳۵ و ۲/۰۸ بود و در آن آلل‌های والد اهلومی طارم باعث افزایش سطح ریشه شدند. برای صفت عرض برگ، مکان ژنی کنترل‌کننده روی کروموزوم ۲ در فاصله نشانگرهای ISSR5-3-RM236 قرار داشت این QTL توانست ۱۰/۴ درصد از تغییرات فنوتیپی

منابع

- Alizadeh, A. 2006. Crop-water relations. Astan Ghods Razavi Publication, Mashhad. 472pp.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M. 1991. Fast and Sentitive silver staining of DNA in polyacrilamid gels. Analytical Biochemistry. 196, 80-83.
- Basten, C.J., Weir, B.S., Zeng, Z.B. 1997. QTL Cartographer: A reference manual and tutorial for QTL mapping: North Carolina state university, USA. P. 163.
- Gholparvar, A.R., Ghanadha, M.R., Zali, A.A. Ahmadi, A. 2003. Evaluation of some morphological traits as selection criteria in breeding wheat. Iranian Journal of Crop Sciences. 4 (3), 202-208. (In Persian).
- Hajabbasi, M.A. 2001. Tillage effects on soil compactness and wheat root morphology. Journal of Agriculchral Science Technology. 3, 67-77.
- Karimi Meridani, M. 2014. The role of phosphorus in soil fertility. Quarterly Journal of Agricultural Engineering and Natural Resources Engineering. 11th year. No. 40.
- Khoshgoftarmanesh, H. 2011. Advanced topics in plant nutrition. Isfahan University of Technology Publication, 369 p.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Annuals of Eugene. 12, 172-175.
- Lian, X., Xing, Y., Yan, H., Xu, G., Li, X., Zhang Q. 2005. QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. Theoretical and Applied Genetics. 112, 85-96.
- Maclean, J., Hettel, G. 2007. Bringing hope improving lives. Rice Today. 6, 30-35.
- Manly, K.F., Olson, J.M. 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QTL. Mammalian Genom. 10:, 327-334.
- Nguyen, T.L., an Bui, C.B. 2006. Mapping QTLs for phosphorus deficiency toelrance in rice (*Oryza sativa*. L). Omonrice. 14, 1-9
- Ni, J.J., Wu, P., Senadhira, D., Huang, N. 1998. Mapping QTLs for phosphorus deficiency toelrance in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics. 97, 1361-1369.
- Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D. R. 1982. Methods of Soil Analysis, Part: 2: Chemical and biological properties 2nd ed., Soil. Sci. Soc. Am. Inc. Pub., USA.
- Ping, M.U., Chao, H., Jun-Xia, L., Li-Feng, L., Zi-Chao, L. 2008. Yield Trait Variation and QTL Mapping in a DH Population of Rice under Phosphorus Deficiency. Acta Agronomica Sinica. 34(7), 1137-1142.
- Saghi Maroof, M.A., Biyaoshev, R.M., Yang, G. P., Zhang, Q., Allard, R.W. 1994. Extra ordinarily polymorphic microsattellites DNA in barley species diversity, chromosomal location, and population dynamics. Processing of the academy of sciences, USA, 91: 4566-5570.
- Silva J.A. Uchida, R. 2000. Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa.

- Wissuwa, M., Yano, M., Ae, N. 1998. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 97,777-783.
- Yu, W., Yong-Jian, S., Deng-Yin C., Si-Bin, Y. 2009. Analysis of Quantitative Trait Loci in Response to Nitrogen and Phosphorus Deficiency in Rice Using Chromosomal Segment Substitution Lines. *Acta Agronomic Sinica*. 35(4), 580–587.
- Yoshida, S., Forno, D. A., Cock, J.H., Gomez, K.A. 1976. *Laboratory manual for physiological studies of rice* IRRI, Los Banos, Philippines.
- Zhang, Y.J., Dong, Y.J., Zhang, J.Z., Xiao, K., Xu, J.L., Terao, H. 2009. Mapping QTLs for deficiency phosphorus response to root-growth of rice seedling. *Rice Genetics Newsletter* Vol. 25.