



مکان‌یابی ژن‌های کمی کنترل‌کننده متابولیت‌ها در گیاهچه‌های برنج تحت تنش شوری

فهیمه حسینی‌راد^{۱*}، عیسی جرجانی^۲، حسین صبوری^۲، ابراهیم غلامعلی‌پور علمداری^۴

۱. دانشجوی سابق زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس

۲. گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه، فنی مهندسی دانشگاه گنبد کاووس

۳. دانشیار دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

۴. استادیار دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۱۶

چکیده

برنج یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است و شوری یک محدودیت عمده در توسعه کشت آن است. بهبود بخشیدن به تحمل به شوری در برنج از نظر ژنتیکی، یک مسئله بسیار مهم در برنامه‌های تولید برنج است. این پژوهش به منظور بررسی ۹۶ لاین F8 حاصل از تلاقی رقم اهلمی طارم (مقاوم به تنش شوری) و رقم ندا (حساس به تنش شوری) به تنش شوری در دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبد کاووس در سال ۱۳۹۳ به صورت هیدروپونیک انجام شد. نقشه پیوستگی مبتنی بر ۹۶ فرد F8 با استفاده از ۳۰ نشانگر SSR و ۱۵ نشانگر ISSR تهیه شد که ۱۴۱۱/۳ سانتی مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد. میانگین فاصله بین دو نشانگر مجاور ۱۵/۲۴ سانتی مورگان بود. برای درجه تحمل به شوری یک QTL روی کروموزوم ۷ ردیابی شد که توانست ۹/۳ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را توجیه کند. برای میزان نشاسته یک مکان ژنی روی کروموزوم ۴ شناسایی شد که دارای LOD برابر با ۲/۷۹۹ بود. اثر افزایشی برای این QTL برابر با ۶/۵۷۶ بود و ۱۲/۶ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را توجیه کرد. برای میزان فنل یک مکان ژنی روی کروموزوم ۷ ردیابی شد که ۱۵/۲ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه کرد و به ترتیب دارای اثر افزایشی و LOD برابر با ۲/۷۲۸ و ۳/۴۲۸ بود. آلل‌های والد اهلمی طارم باعث افزایش این صفت شدند. برای میزان کلروفیل یک QTL روی کروموزوم ۵ ردیابی شد که LOD آن برابر با ۲/۰۲ بود. این QTL به ترتیب دارای اثر افزایشی و ضریب تبیین ۹/۷ و ۹/۲ بود بنابراین می‌توان QTL‌های شناسایی شده را بعد از تعیین اعتبار ژنوتیپ‌های برتر از نظر صفات بررسی شده برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: نقشه پیوستگی، نشاسته، فنل، پرولین، QTL

مقدمه

کشت برنج در ایران جایگاه ویژه‌ای دارد، ولی اخیراً بروز کم‌آبی، کشت این گیاه را در ایران و جهان در معرض خطر قرار داده است. با وقوع کم‌آبی نه تنها حجم آب، کم می‌شود بلکه کیفیت آن نیز تغییر یافته و شورتر می‌شود (DuNing et al., 2007). افزایش تحمل به تنش شوری و معرفی واریته‌های متحمل از طریق تنش‌های اصلاحی، راه‌حلی اقتصادی برای غلبه بر کمبود غذا در آینده محسوب می‌شود (Haq et al., 2008). تنش شوری منجر به کاهش نسبت

تنش شوری از مهم‌ترین عوامل محدودکننده‌ی رشد و تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود. برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در جهان است و غذای بیش از ۳ میلیارد نفر از مردم جهان را تأمین می‌کند (Bao et al., 2019). این در حالی است که حدود ۹۰ درصد شالیزارهای جهان به‌نوعی تحت تأثیر شوری هستند (Ansari et al., 2001).

۳، ۴، ۵ و ۶ با یک QTL بزرگ اثر روی کروموزوم ۵ ردیابی نمود.

هدف از انجام این پژوهش، بررسی میزان متابولیت‌های فنل، کلروفیل، نشاسته و پرولین در شرایط تنش شوری و تعیین اهمیت نسبی آن‌ها در ارتباط با کد ژنتیکی، شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به شوری و همچنین شناسایی QTL‌های مرتبط با کنترل میزان این متابولیت‌ها در گیاهچه‌های برنج است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در پژوهش حاضر ۹۶ لاین حاصل از جمعیت لاین‌های نوترکیب نسل هشتم ارقام ندا (حساس به تنش شوری) و اهلمی طارم (مقاوم به تنش شوری) بود (Sabouri, 2008) که برای بررسی تحمل به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای و در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبد کاووس در سال ۱۳۹۳ به صورت هیدروپونیک کشت شدند.

کشت بر اساس دستورالعمل موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (Gregorio, 1997)، با استفاده از صفحات یونولیت با ابعاد $25 \times 1/25 \times 28$ و ظروف پلاستیکی ۸ لیتری ضد عفونی شده، انجام شد. ابتدا بذور با هیپوکلرید سدیم دو درصد ضد عفونی گردیدند و به مدت چهار روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد مدل SP ۱۶۰۰ (ساخت شرکت WEISS TECHNIK) جوانه‌دار شدند. بذره‌های جوانه‌زده در روز پنجم به داخل ظروف پلاستیکی حاوی محلول یوشیدا، انتقال داده شدند. سینی‌های مربوطه در اتاق کشت آزمایشگاه گیاه‌شناسی با دمای روز و شب $29/21$ و رطوبت نسبی ۷۰ درصد و نور طبیعی (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرار داده شدند. محلول غذایی هر هفت روز تعویض شد و pH محلول هفته‌ای سه بار، کنترل و به وسیله HCl و NaOH یک نرمال روی ۵/۵ ثابت نگه داشته شد. سپس تنش شوری با افزودن NaCl، به محلول یوشیدا اعمال گردید. گیاهچه‌ها ابتدا به مدت ۷ روز، به وسیله دستگاه EC متر مدل (WWTLF92) تحت تنش ۶ دسی‌زیمنس بر متر و سپس به مدت ۷ روز نیز تحت هدایت الکتریکی ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر قرار گرفتند. میزان کلروفیل برگ‌ها، با دستگاه کلروفیل متر دستی (SPDD Minolta502) اندازه‌گیری شد. بعد از اعمال تنش شوری، واکنش لاین‌ها ارزیابی و سپس درجه

فتوسنتز، محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم روبیسکو می‌شود (Singh et al., 2007). برخی گیاهان قادرند به کمک سنتز و افزایش میزان مواد محلول در سلول‌های خود و یا از طریق کاهش میزان آب موجود در سلول‌ها، در واکنش نسبت به کاهش پتانسیل آب محیط خارج از سلول، پتانسیل اسمزی سلول‌ها را کاهش داده و موجب آماس سلولی شوند. این فرایند به تنظیم اسمزی معروف است و حساسیت گیاهان به آن با تغییر غلظت نمک، تغییر می‌کند (Shannon et al., 1987). کومار و همکاران (Kumar et al., 2007) با مطالعه عکس‌العمل ارقام برنج ایندیکا نشان دادند که در تنش شوری، درصد جوانه‌زنی، رشد گیاه و مقدار رنگیزه کلروفیل کاهش پیدا می‌کند، در حالی که سطوح پرولین و پراکسید لیپیدها افزایش می‌یابد.

تحمل به شوری یک صفت پیچیده‌ی ژنتیکی و فیزیولوژیکی است. بیشتر فرایندهای گیاهی که در تحمل به شوری مهم هستند، دارای توارث کمی بوده و تنوع پیوسته نشان می‌دهند و تحت تأثیر شرایط محیطی نیز هستند (Koyama et al., 2001). مکان‌یابی QTL‌ها ابزار مفید و قابل دسترسی برای به‌نژادگران گیاهی در زمینه روشن شدن اساس ژنتیکی صفات مرتبط با تحمل به تنش محسوب می‌شود (Rabiei et al., 2014). QTL‌های مرتبط با صفات تحمل به شوری در برنج، در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در پژوهش بائو و همکاران (Bao et al., 2003)، یک جمعیت اینبرد لاین نوترکیب شامل ۱۰۷ لاین حاصل از تلاقی برنج ایندیکا و ژاپونیکا برای بررسی فاکتورهای ژنتیکی مؤثر بر پارامترهای کیفی نشاسته استفاده شد. چهل و چهار QTL روی کروموزوم‌های ۶، ۸، ۹ و ۱۱ برای ۲۲ صفت، با حداقل، یک و حداکثر، چهار QTL برای هر صفت ردیابی شد و نتایج، منجر به شناسایی دو گروه عمده از ژن‌ها که مسئول اکثر ویژگی‌های مرتبط با نشاسته هستند، گردید. در بررسی تامسون و همکاران (Thomson et al., 2010)، سه QTL برای محتوای کلروفیل روی کروموزوم‌های ۲، ۳ و ۴ با مقادیر LOD برابر با $11/3$ ، $3/1$ و $3/9$ مکان‌یابی شد که به ترتیب، ۵۶، ۱۳ و ۲۵ درصد از واریانس فنوتیپی صفت مذکور را توجیه نمایند. در پژوهش سید و همکاران (Sayed et al., 2012)، آنالیز بک کراس پیشرفته لوکوس صفت کمی، برای روشن کردن مکانیسم‌های ژنتیکی کنترل‌کننده تجمع پرولین و پژمردگی برگ در جو تحت شرایط تنش خشکی انجام شد. آنالیز، چهار QTL، برای محتوای پرولین روی کروموزوم‌های

تحمل به شوری بر اساس روش (Gregorio, 1997) مطابق جدول (۱) برای هر لاین در ۳ تکرار تعیین شد. همچنین صفات میزان فنل کل (Malik and Singh, 1980)، میزان پرولین (Bates et al., 1973) و میزان نشاسته (Thayumanavan and Sadasivam, 1984) روی هر لاین اندازه‌گیری شدند.

جدول ۱. نحوه کدبندی ژنوتیپ‌ها بر شرایط شوری (Gregorio, 1997).

Table 1. How to encode genotypes on salinity (Gregorio, 1997).

Reaction	Damage	Score
واکنش		امتیاز آسیب
Highly tolerant	Normal growth, no leaf symptoms	1
بسیار متحمل	رشد نرمال، برگ بدون علائم	
Tolerant	Nearly normal growth, but leaf tips or few leaves whitish and rolled	3
متحمل	رشد تقریباً نرمال، نوک برگ‌ها سفید شده و تعداد کمی از برگ‌ها سفید و لوله شده‌اند	
Moderately Tolerant	Growth severely retarded, most leaves rolled, only a few are elongating	5
نسبتاً متحمل	رشد عقب‌افتاده، بسیاری از برگ‌ها لوله شده و تعدادی از آن‌ها بلندتر از حد طبیعی‌اند	
Susceptible	Complete cessation of growth, most leaves dry, some plants dying	7
حساس	رشد متوقف، بسیاری از برگ‌ها خشک و تعدادی از گیاهان مرده‌اند	
Highly Susceptible	Almost all plants dead or dying	9
بسیار حساس	همه گیاهان مرده و خشک شده‌اند	

الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد تفکیک شدند و رنگ-آمیزی ژل‌ها با استفاده از روش سریع نیترا نقره صورت گرفت (An et al., 2009).

برای تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار Map Manager (Manly and Olson, 1999) و از نرم‌افزار Qgene (Nelson, 1997) برای مکان‌یابی QTL‌ها استفاده شد. نام‌گذاری QTL‌ها نیز بر اساس روش مک کوچ و همکاران (McCouch et al., 1997) صورت گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات موردبررسی مطابق جدول ۴ نشان داد که اختلاف بین ژنوتیپ‌ها از نظر همه صفات در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود که این بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بین گیاهچه‌های برنج مورد مطالعه در شرایط تنش است و عمل انتخاب را می‌توان برای صفات مرتبط با تنش شوری، فراهم ساخت. بیشترین ضریب تغییرات مربوط به صفت میزان کلروفیل و کمترین ضریب متعلق به میزان فنل بود. محتوی کلروفیل برگ یک فاکتور مهم در تعیین ظرفیت فتوسنتزی برگ است (Jiang and Huang, 2001)؛ بنابراین ژنوتیپ‌ها از نظر میزان کلروفیل بیشترین تنوع را دارا هستند و در شرایط شوری، برای افزایش تحمل به تنش در ژنوتیپ‌های برنج می‌توان به این صفت توجه کرد.

به‌منظور استخراج DNA ژنومی از روش CTAB (Saghi Maroof et al., 1994) استفاده شد. برای تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج‌شده از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. به این صورت که با استفاده از الکتروفورز افقی مدل Bioneer، هر کدام از نمونه‌ها در طی الکتروفورز بر روی ژل نوارهایی تشکیل دادند که با استفاده از آن‌ها کیفیت DNA هر کدام از نمونه‌ها بررسی شد. واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز با استفاده از ۳۰ نشانگر SSR و ۱۵ نشانگر ISSR در حجم ۱۰ میکرولیتر برای هر نمونه DNA انجام شد (جدول ۲). به این ترتیب که ابتدا به میزان ۲/۵ میکرولیتر DNA ژنومی رقیق‌شده، در هر تیوپ PCR تقسیم شد، سپس ۷/۵ میکرولیتر از محلول PCR (غیر از DNA ژنومی) به هر تیوپ اضافه شد. قابل توجه است که برای تهیه مخلوط واکنش در یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری به ترتیب آب دو بار تقطیر، محلول مادری (با ترکیب Taq DNA Polymerase با غلظت ۰/۰۴ واحد بر میکرولیتر، بافر PCR، $MgCl_2$ با غلظت ۳ میلی‌مولار، dNTPs، هر کدام با غلظت ۰/۰۴ میلی‌مولار)، آغازگر مستقیم و آغازگر معکوس به میزان ۰/۷۵ میکرولیتر برای نشانگرهای SSR و ۱/۵ میکرولیتر برای نشانگرهای ISSR اضافه شد (جدول ۳). سپس مخلوط واکنش با دور ۱۰۰۰ سانتیفریوژ و در تیوپ‌های PCR حاوی DNA تقسیم شد. فراورده‌های واکنش زنجیره پلی‌مراز با استفاده از جدول ۲. توالی آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Table 2. Sequence of studied primers in this research

SSR			
نشانهگر Primer	کروموزوم Chromosome	توالی مستقیم Forward Sequence	توالی معکوس Reverse Sequence
RM111	6	CACAACCTTTGAGCACCGGTC	ACGCCTGCAGCTTGATCACCGG
RM144	11	TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC	GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG
RM143	3	GTCCCGAACCTAGCCCGAGGG	AGAGGCCCTCCACATGGCGACC
RM194	5	GCCCTGCTTCTTGCCACCACC	TCCAGGGAGGGCAAGGCTGAGC
RM205	9	CTGGTCTGTATGGGAGCAG	CTGGCCCTTCACGTTTCAGTG
RM216	10	GCATGGCCGATGGTAAAG	TGTATAAAACACACACGGCCA
RM236	2	GCGCTGGTGGAAAATGAG	GGCATCCCTCTTTGATTCCCTC
RM248	7	TCCTTGAAAATCTGGTCCC	GTAGCCTAGCATGGTGCATG
RM252	4	TTCGCTGACGTGATAGGTTG	ATGACTTGATCCCGAGAACG
RM280	4	ACACGATCCACTTTGCGC	TGTGCTTGAGCAGCCAGG
RM281	8	ACCAAGCATCCAGTGACCAG	GTTCTTCATACAGTCCACATG
RM300	2	GCTTAAGGACTTCTGCGAACC	CAACAGCGATCCACATCATC
RM301	2	TTACTCTTTGTGTGTGTGAG	CTACGACACGTCATAGATGACC
RM331	5	GAACCAGAGGACAAAAATGC	CATCATACATTTGCAGCCAG
RM39	5	GCCTCTCTCGTCTCCTTCT	AATTCAAACCTGCGGTGGC
RM434	9	GCCTCATCCCTCTAACCCCTC	CAAGAAAAGATCAGTGCGTGG
RM490	1	ATCTGCACACTGCAAACACC	AGCAAAGCAGTGCTTTACAGAG
RM500	7	GAGCTTGCCAGAGTGGAAAG	GTTACACCGAGAGCCAGCTC
RM504	3	TCTATAATGTAGCCCCCCC	TTTCAGGGGCTTCTACCAAC
RM537	4	CCGTCCTCTCTCTCTTTC	ACAGGGAAACCATCCTCCTC
RM538	5	GGTCGTTGAAGCTTACCAGC	ACAAGCTCTCAAACCTCGCC
RM594	1	GCCACCAGTAAAAGCAATAC	TTGATCTGCTAGTGAGACCC
RM597	6	CCTGATGCACAAGTGCCTAC	TCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
RM83	12	ACTCGATGACAAGTTGAGG	CACCTAGACACGATCGAG
RM165	1	CCGAACGCCTAGAAGCGCGTCC	CGGCGAGGTTTGCTAATGGCGG
RM181	11	ACGGGAGCTTCTCCGACAGCGC	TATGCTTTTGCCGTGTGCCGCG
RM298	7	CTGATCACTGGATCGATCATG	CATGCCAAGATGCAACAG
RM294A	1	TTGGCCTAGTGCCCTCAATC	GAGGGTACAACCTTAGGACGCA
ISSR			
نشانهگر Primer	توالی Sequence		
ISSR -1	cagcagcagcagcag		
ISSR -2	gaatgaatgaatgaat		
ISSR -3	cctacctacctaccta		
ISSR -4	ctctctctctctctct		
ISSR -5	ccaccaccaccacca		
ISSR -6	atgatgatgatgatg		
ISSR -7	caacaacaacaaca		
ISSR -8	ctctctctctctctcta		
ISSR -9	actgactgactgactg		
ISSR -10	Gtgtgtgtgtgtcc		

تهیه نقشه پیوستگی

بعد از تعیین ژنوتیپ افراد، داده‌های حاصل وارد نرم‌افزار (MapManager QTX 17 (Manly and Olson, 1999) گردید و نقشه پیوستگی بر اساس ۳۰ نشانهگر SSR، ۱۵ نشانهگر ISSR روی ۹۶ فرد جمعیت F8، نشانهگرها را به ۱۲ گروه پیوستگی متعلق به ۱۲ کروموزوم برنج با طول نقشه بر اساس تابع کوزامبی (Kosambi, 1994) برابر با ۱۴۱۱/۳ سانتی‌مورگان و فاصله بین دو نشانهگر مجاور برابر با ۱۵/۳۴ سانتی‌مورگان منتسب کرد.

مکان‌یابی QTLها

در جدول ۵، QTLهای مکان‌یابی شده برای صفات مرتبط با تحمل به شوری در جمعیت مورد مطالعه، به همراه موقعیت QTLها در کروموزوم، LOD، نسبت واریانس فنوتیپی و اثر افزایشی ارائه شده است. به دلیل خالص بودن جمعیت، همه این QTLها دارای اثر افزایشی و فاقد اثر غالبیت هستند. در مجموع، برای ۵ صفت مورد بررسی، چهار QTL شناسایی شد (جدول ۵).

جدول ۳. برنامه حرارتی برای تکثیر جایگاه‌های SSR و ISSR

Table 3. Program thermal touch down for amplification of SSR and ISSR markers

Stage	مرحله	SSR					
		درجه حرارت (سانتی‌گراد) Temperature (C°)		زمان (ثانیه) Time (S)		تعداد دور Number of rounds	
		SSR	ISSR	SSR	ISSR	SSR	ISSR
Initial denaturation	واسرشته‌سازی اولیه	94	95	240	5	1	1
denaturation	واسرشته‌سازی	94	95	45	4'		
Annealing	اتصال آغازگر	65	-	45	45	10	10
Extension	بسط آغازگر	72	72	60	45		
denaturation	واسرشته‌سازی	94	95	45	45		
Annealing	اتصال آغازگر	55	-	45	45'	26	25
Extension	بسط آغازگر	72	72	25	45		
Final Extension	بسط نهایی	72	72	300	5	1	1

جدول ۴. تجزیه واریانس صفات موردبررسی در شرایط تنش شوری.

Table 4. Analysis of the variance of the studied traits in salt stress conditions

منابع تغییر Sources change	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS				
		درجه تحمل به شوری Salt tolerance score	فنل Phenol	نشاسته Starch	پرولین Proline	کلروفیل Chlorophyll content
تیمار Treatment	95	9.65**	18.97**	2072.62**	789.38**	0.16**
خطای آزمایش Error	192	0.63	0.0009	7.07	46.5	0.02
ضریب تغییرات C.V%		15.22	0.72	1.21	4.13	33.07

* و ** به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

* , ** Probability levels at 0.05 and 0.01, respectively

به شوری روی کروموزوم‌های ۱ و ۳ مکان‌یابی کنند. qST1 با داشتن اثر بزرگ‌تر در دو سطح شوری توانست ۲۶/۴ و ۲۷/۸ درصد از کل تغییرات فنوتیپی را توجیه کند و در هر دو سطح شوری این QTL در فاصله‌ی نشانگری RZ596A-EST2 شناسایی شد. تامسون و همکاران (Thomson et al., 2010) با استفاده از ۱۰۰ نشانگر SSR توانستند QTL های تحمل به شوری را در ۲ شرایط شوری ۱۲ و ۱۸ دسی‌زیمنس بر متر ردیابی نمایند. دو QTL برای این صفت روی کروموزوم‌های ۴ و ۹ در شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و سه QTL روی کروموزوم‌های ۳ و ۱۴ در شوری ۱۸ دسی‌زیمنس بر متر مکان‌یابی شدند. ژانگ و همکاران (Zhang et al., 1995) با استفاده از ۸۵ فرد از جمعیت F2 حاصل از تلاقی بین رقم موتانت M-20 و ۷۷-۱۷۰A۱، یک QTL روی

یک QTL برای درجه تحمل به شوری شناسایی شد که بر روی کروموزوم ۷ و در فاصله نشانگری RM500-ISSR8-6 قرار داشت. اثر افزایشی این QTL، 16/0 بود و آل‌های والد اهلمی طارم باعث کاهش این صفت شد. این QTL، 3/9 درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه نمود. زنگ و همکاران (Zang et al., 2008) توانستند سه QTL برای درجه تحمل به شوری روی کروموزوم‌های ۲، ۳ و ۸ با اثرات افزایشی ۰/۸۴، -۱/۷۸ و -۰/۶۴ در مرحله گیاهچه‌ای در برنج شناسایی نمایند. در مطالعه شهید مسعود و همکاران (Shahid-Masood et al., 2004) یک QTL برای درجه تحمل به شوری روی کروموزوم ۱۰ با تبیین ۵/۶ درصد از توزیع فراوانی این صفت مکان‌یابی شد. لی و همکاران (Lee et al., 2007) توانستند دو QTL برای درجه تحمل

ISSR8-3 و با LOD برابر با ۲/۷۹۹ و اثر افزایشی ۶/۵۷۶، میزان ۱۲/۶ درصد از واریانس فنوتیپی صفت مذکور را توجیه نمود. آلل‌های والد ندا در جهت افزایش صفت عمل می‌کنند.

کروموزوم ۷ و در فاصله ۷ سانتی مورگان از RG4 شناسایی نمودند. نتایج بررسی ژانگ و همکاران (Zhang et al., 1995) با نتیجه پژوهش حاضر مطابقت داشت.

برای میزان نشاسته، یک QTL بر روی کروموزوم ۴ شناسایی شد. این QTL، در فاصله نشانگری -RM537

جدول ۵- QTL های مکان‌یابی شده در شرایط تنش شوری در گیاهچه‌های جمعیت F₈ حاصل از تلاقی اهلمی طارم × ندا.

Table 4- QTLs identified under salt stress conditions of the in seedling stage the F₈ population derived from AHM × NAD.

Trait	QTL	نشانگرهای مجاور*	کروموزوم	LOD	اثر افزایشی Additive effect	ضریب تبیین R ²	جهت آلل Direction of ph
درجه تحمل به شوری Salt tolerance score	qSTS-7	<u>RM500-<u>ISSR8-6</u></u>	7	2.038	0.16	9.3	AHM
نشاسته starch	qSTR-4	<u>RM537-<u>ISSR8-3</u></u>	4	2.799	6.576	12.6	NAD
فنل Phenol	qPHO-7	<u>RM248-<u>ISSR5-4</u></u>	7	3.438	2.728	15.2	AHM
محتوای کلروفیل Chlorophyll content	qCHLA-5	<u>ISSR1-3-<u>ISSR2-1</u></u>	5	2.02	0.097	9.2	AHM

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

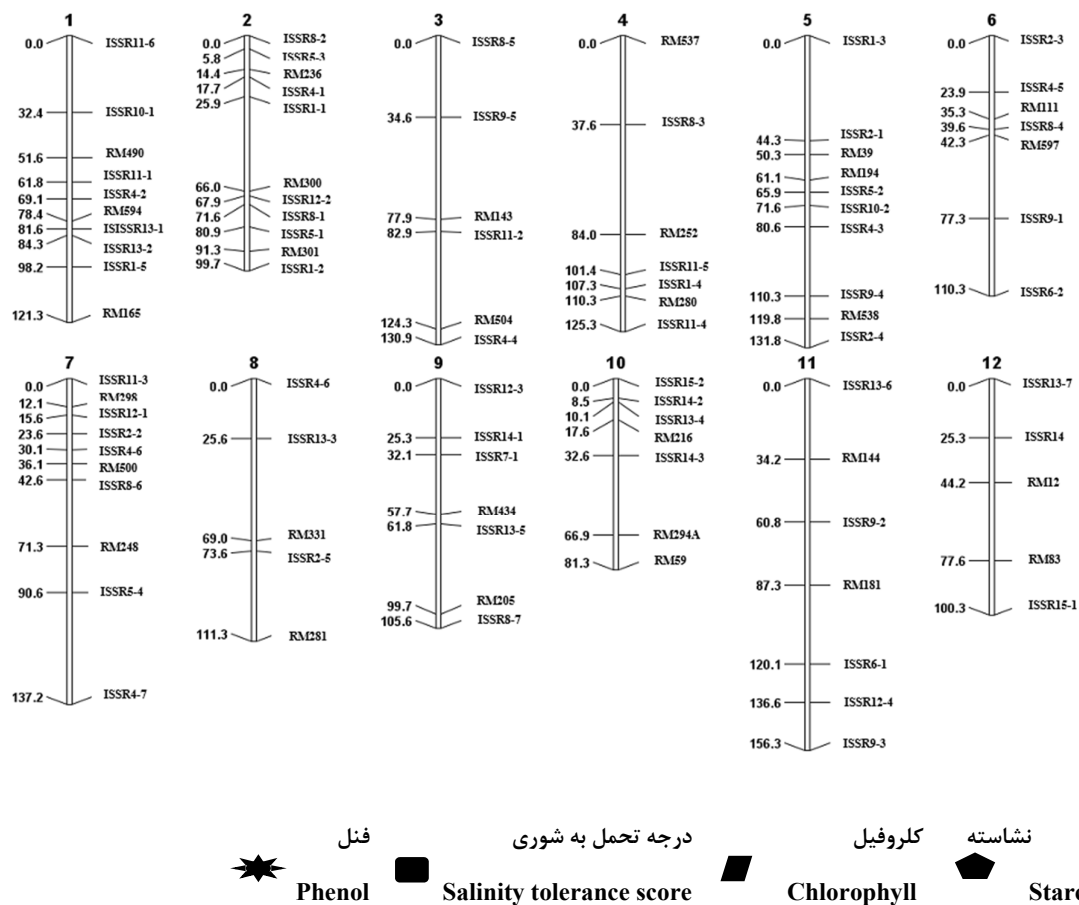
*Markers lined up are closer to the respective QTL

۲، ۳ و ۴ با مقادیر LOD برابر با ۱۱/۳، ۳/۱ و ۳/۹ مکان‌یابی شد که به ترتیب، ۵۶، ۱۳ و ۲۵ درصد از واریانس فنوتیپی صفت مذکور را توجیه نمایند. همچنین صبوری و صبوری (Sabouri and Sabouri, 2008) یک QTL برای این صفت، روی کروموزوم ۳ شناسایی نمودند. اثر افزایش این QTL، ۱/۵- بود و آلل‌های والد خزر باعث کاهش این صفت شدند. همچنین QTL شناسایی شده برای محتوای کلروفیل در مطالعه فنگ و همکاران (Feng et al., 2010) روی کروموزوم ۳ قرار داشت. فوکودا و ترا (Fukuda and Terao, 2015) توانستند یک مکان ژنی برای محتوای کلروفیل روی کروموزوم ۱ شناسایی کنند. این QTL با LOD برابر با ۵/۸۵ توانست ۲۱/۱ درصد از تغییرات محتوای کلروفیل را توجیه کند. در پژوهش حاضر، هیچ‌یک از QTL های مذکور شناسایی نشد. در مجموع، عدم انطباق بین نتایج پژوهش‌های مختلف، برای کلیه صفات مرتبط با تحمل به شوری را می‌توان به دلایل مختلفی از جمله استفاده از جمعیت‌های مختلف با زمینه ژنتیکی متفاوت، نوع نشانگرها و تراکم و توزیع آن‌ها در ژنوم، نسبت داد.

در پژوهش بائو و همکاران (Bao et al., 2003)، یک جمعیت اینبرد لاین نوترکیب شامل ۱۰۷ لاین حاصل از تلاقی برنج ایندیکا و ژاپونیکا برای بررسی فاکتورهای ژنتیکی مؤثر بر پارامترهای کیفی نشاسته استفاده شد. چهل‌وچهار QTL روی کروموزوم‌های ۶، ۸، ۹ و ۱۱ برای ۲۲ صفت، با حداقل، یک و حداکثر، چهار QTL برای هر صفت ردیابی شد و نتایج، منجر به شناسایی دو گروه عمده از ژن‌ها که مسئول اکثر ویژگی‌های مرتبط با نشاسته هستند، گردید. در پژوهش حاضر، هیچ‌یک از QTL های مذکور شناسایی نشد.

برای میزان فنل، یک QTL روی کروموزوم ۷ مکان‌یابی شد که آلل والد اهلمی باعث افزایش صفت شد. qPHO-7 در بین QTL های کشف‌شده، بزرگ‌ترین اثر را داشت و توانست ۱۵/۲ درصد از تنوع فنوتیپی صفت میزان فنل را توجیه کند. یک QTL برای صفت محتوای کلروفیل شناسایی شد که بر روی کروموزوم ۵ و در فاصله نشانگری -ISSR1-3-ISSR2-1 قرار داشت. اثر افزایشی این QTL، 097/0 بود و آلل‌های والد اهلمی طارم باعث افزایش این صفت شد. این QTL، 2/9 درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه نمود.

در بررسی تامسون و همکاران (Thomson et al., 2010)، سه QTL برای محتوای کلروفیل روی کروموزوم‌های



شکل ۱- نقشه ژنتیکی QTL‌های شناسایی‌شده تحت شرایط تنش شوری در گیاهچه‌های جمعیت F_8 حاصل از تلاقی اهلی طارم \times ندا.
Figure 1- Genetic linkage maps QTLs identified under salt stress conditions of the in seedling stage the F_8 population derived from AHM \times NAD

به ترتیب یک QTL روی کروموزوم‌های ۷، ۴، ۷ و ۵ شناسایی شد. میزان LOD برای این مکان‌های ژنی به ترتیب برابر با ۲/۰۳۸، ۲/۷۹۹، ۳/۴۳۸ و ۲/۰۲ بود. $qPHO-7$ توانست ۱۵/۲ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مذکور را توجیه کند. نتایج نشان می‌دهد که نشانگر RM248، روی کروموزوم ۷، احتمالاً می‌تواند به‌عنوان نشانگر پیوسته با صفت محتوای فنل، جهت انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های به نژادی مورد استفاده قرار گیرند. سایر نشانگرها به دلیل عدم پیوستگی و توجیه پایین میزان تغییرات، قابلیت استفاده در برنامه‌های به نژادی انتخاب به کمک نشانگر را ندارند.

نتیجه‌گیری نهایی

نقشه پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار Map Manager QTX ۱۷ و ۳۰ نشانگر SSR و ۱۵ نشانگر ISSR تهیه شد. طول نقشه حاصل، بر اساس تابع کوزامبی، ۱۴۱۱/۳ سانتی مورگان و متوسط فاصله بین نشانگرهای مجاور، ۱۵/۳۴ سانتی مورگان بود. تجزیه QTL با روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب در مجموع، باعث شناسایی چهار QTL برای پنج صفت فیزیولوژیک (درجه تحمل به شوری، محتوای فنل، نشاسته، پروتئین و محتوای کلروفیل) شد. برای هر یک از صفات درجه تحمل به شوری، محتوای نشاسته، فنل و محتوای کلروفیل

منابع

- An, Z.W., Xie, L.L., Cheng, H., Zhou, Y., Zhang, Q., He, X.G., 2009. A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Analytical Biochemistry*. 391, 77-79.
- Ansari, R., Shereen, A., Flowers, T.J., Yeo, A. R., 2001. Identification rice lines for improved salt tolerance from a mapping population. In: Peng, S., Hardy, B. (eds.), *Rice Research for Food Security and Poverty Alleviation. Proceeding of the International Rice Research Conference*, 31 March- 3 April 2000, Los Banos, Philippines. pp: 285-291.
- Bao, J.S. Corke, H. Ping, H., Li-Huang, Z., 2003. Analysis of QTL for starch properties of rice based on an RIL population. *Acta Botanica Sinica*. 45(8), 986-994.
- Bao, Y., Huang, L., Li, Y., Wang, M., Liang, Z., 2019. How different Nitrogen application rates affect yield composition and Nitrogen uptake of rice (*Oryza sativa* L.) in saline-sodic paddy field. *Polish Journal Environmental Studies*. 28, 553-564.
- Bates, L. S., Waldren, S. P., Teare, I. D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plants and Soil*. 39, 205-207.
- DuNing, X., Lix, Y., Song, D., Yang, G., 2007. Temporal and spatial dynamical simulation of groundwater characteristics in Minqin Oasis. *Science China Ser D-Earth Science*. 2, 261-273.
- Feng, Y. Cao, L.Y. Wu, W.M. Shen, X.H. Zhan, X.D. Zhai, R.R. Wang, R.C. Chen, D.B., Cheng, S.H., 2010. Mapping QTLs for nitrogen-deficiency tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding*. 129, 652-656.
- Fukuda, A., Terao, T., 2015. QTLs for shoot and chlorophyll content of rice seedling grown under low-temperature conditions, using a cross between Indica and Japonica cultivars. *Plant Production Science*. 18, 128-136.
- Gregorio, G.B., 1997. Tagging salinity tolerance genes in rice using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). PhD thesis. University of Philippines, Los Banos.
- Haq, T. U., Akhtar, J., Gorham, J., Khalid, M., 2008. Genetic mapping of QTLs, controlling shoot fresh and dry weight under salt stress in rice cross between CO39×Moroberekan. *Pakistan Journal of Botanical*. 40, 2369-2381.
- Kosambi, D.D., 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugene*. 12, 172-175.
- Koyama, M. L., Levesley, A., Koebner, R. M. D., Flowers, T. J., Yeo, A. R., 2001. Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. *Plant Physiology*. 125, 406-422.
- Kumar, V., Shiram, V., Jawali, N., Shitole, M. G., 2007. Differential response of indica rice genotypes to NaCl stress in relation to physiological and biochemical parameters. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 48, 339-344.
- Lee, S.Y., Ahn, J.H., Cha, Y.S., Yun, D.W., Lee, M.C., Ko, J.C., Lee, K.S. Eun, M.Y., 2007. Mapping QTLs related to salinity tolerance of rice at the young seedling stage. *Plant Breeding*. 126, 43-46.
- Malik, C.P., Singh, M. B., 1980. *Plant Enzymology and Histoenzymology*. Kalyani Publishers. New Dehli. 286p.
- Manly, K.F., Olson, J.M., 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mammalian Genome*. 10, 327-334.
- McCouch, S. R., Cho, Y. G., Yano, M., Paul, E., Blinstrub, M., 1997. Report on QTL nomenclature. *Rice Genetic Newsletter*. 14, 11-13.
- Nelson, J.C., 1997. QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Molecular Breeding*. 3, 239-245.
- Rabiei, B., Mardani, K.H, Sabouri, H., Sabouri, A., 2014. The effect of rice chromosome 1 on traits associated with drought and salinity tolerance at germination and seedling stages. *Seed and Plant Improve Journal*. 30, 1-16. [In Persian with English Summary].
- Sabouri, H., 2008. Evaluation of genetic variety of Iranian rice germplasma plants for tolerance to salinity and location of related QTL. PhD. thesis. Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. [In Persian with English Summary].
- Sabouri, H., Sabouri, A., 2008. New evidence of QTLs attributed to salinity tolerance in rice.

- African Journal of Biotechnology 7, 4376-4383.
- Saghi Maroof, M.A., Biyaoshev, R.M., Yang, G. P., Zhang, Q., Allard, R.W., 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barley species diversity, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 91, 4566-5570.
- Sayed, M.A., Schumann, H., Pillen, K., Naz, A.A., Leon, J., 2012. AB-QTL analysis reveals new alleles associated to proline accumulation and leaf wilting under drought stress conditions in barley. BMC Genetics 13, 61-72.
- Shahid-Masood, M., Seiji, Y., Shinwari, Z.K. Anwar, R., 2004. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance in rice using RFLP. Pakistan Journal of Botany. 36(4), 825-834.
- Shannon, M.C., Gronwald, J.W., TAL, M., 1987. Effect of salinity on growth and accumulation of organic and inorganic ions in cultivated and wild tomato species. Journal of American Horticulture Science. 112, 516-523.
- Singh, M.P., Singh, D.K., Rai, M., 2007. Assessment of growth, physiological and biochemical parameters and activities of antioxidant enzymes in salinity tolerant and sensitive basmati rice varieties. Journal of Agronomy and Crop Science. 193, 398-412.
- Thayumanavan, B., Sadasivam, S., 1984. Physicochemical basis for the preferential uses of certain rice varieties Plant Foods Human Nutrition. 34, 235-259.
- Thomson, M.J., Ocampo, M.D., Egdane, J., Rahman, M.A., Sajise, A.G., Adorada, D.L., Tumimbang-Raiz, E., Blumwald, E., Seraj, Z.I., Singh, R.K., Gregorio, G.B., Ismail, A.M., 2010. Characterizing the saltol QTL for salinity tolerance in rice. Rice. 3, 148-160.
- Zang, J., Sun, Y., Wang, Y., Yang, J., Li, F., Zhou, Y., Zhu, L., Reys, J., Fotokian, M., Xu, J., Li, Z., 2008. Dissection of genetic overlap of salt tolerance QTL at the seedling and tillering stage using backcross lines in rice. Science in China Series. 51, 583-591.
- Zhang, G.Y., Gua, Y., Lin, C.s., Chen, S.Y., 1995. RFLP tagging of a salt tolerance gene in rice. Plant Science. 110, 227-234.
- Jiang, Y., Huang, B. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrass in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. Crop Science. 41, 463-442.



Original article

Detection of quantitative genes controlling of metabolic in rice seedling under salinity stress

F. Hosseinirad¹, E. Jorjani^{2*}, H. Sabouri³, E. Gholamalipour Alamdari⁴

1. Former MSc student of Cell and Molecular Biology, College of Biology Gonbad Kaous University, Iran

2. Department of Biology, College of Science, Gonbad Kavous University, Iran

3. Associate Prof. College of Agriculture Science and Natural Resource, Gonbad Kaous University, Iran

4. Assistant Prof. College of Agriculture Science and Natural Resource, Gonbad Kaous University, Iran

Received 15 March 2019; Accepted 6 May 2019

Abstract

Rice is one of the most important cereal and salinity is a major limitation in the development of rice cultivation. Genetically improving salt tolerance of rice is a highly important objective of rice breeding programs. This study was conducted to evaluate 96 lines F8 derived from Ahlemi Tarom (salt-tolerant) and Neda (salt-sensitive) to salinity stress in hydroponic in the Faculty of Agriculture, Gonbad Kavous University in 2015. Genetic linkage maps were prepared using 30 SSR markers and 15 ISSR markers covering 1411.3 cM from the rice genome. The average distance between two adjacent markers was 15.34 cM. For genotyping code, a QTL was detected on chromosome 7, justified 9.3% of phenotypic changes in the trait. For starch content, a gene locus was identified on chromosome 4, which had a LOD of 2.799. The additive effect of this QTL was 6.756 and justified, 12.6% of the phenotypic changes in this trait. For the phenol content, a gene location was detected on chromosome 7, which explained 15.2% of the phenotypic variance of the trait, and had LOD and additive effect of 2.728 and 3.4338, respectively. The alleles of the parents of Ahlemi-Tarom increased phenol content. One QTL was detected on chromosome 5, with an LOD of 2.2 for chlorophyll content. This QTL had additive effect and R^2 of 0.097 and 9.2, respectively. The results of this study can identify the better genotypes in term of studied traits for marker selection programs.

Keywords: Genetic linkage maps, Phenol, Proline, QTL, Starch

*Correspondent author: Eisa Jorjani; E-Mail: eisa_jorjani@yahoo.com.