مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 2، تابستان 1392)

تنوع آللی نشانگرهای ناحیه QTL کنترل کننده تحمل به شوری (*Saltol*) در مرحله گیاهچه‌ای در ارقام برنج ایرانی

رضیه زارع[1]، قاسم محمدی نژاد*[2]، حسین شاهسوند حسنی[2]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد بخش بیوتکنولوژی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.
[2]اعضای هیات علمی بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

تاریخ دریافت: 1391/3/11، تاریخ پذیرش: 1391/5/6

چکیده

با توجه به ضرورت تحمل به شوری در برنج و از طرفی وجود تحقیقات مختلف اصلاح نباتات مولکولی در شناسایی QTLهای بزرگ اثر کنترل کننده تحمل به شوری، ضرورت شناسایی حضور این QTLها در ارقام مختلف ایرانی و شناسایی تاثیرگذارترین QTLها در پیشبرد انتخاب در برنامه‌های اصلاحی بسیار مفید است. در این مطالعه، پاسخ به شوری 20 رقم مختلف برنج ایرانی و دو شاهد متحمل (Pokkali) و حساس (IR29) در مرحله گیاهچه‌ای در شرایط گلخانه ($EC=0$ ، 6 و 10 dsm^{-1}) با استفاده از 6 نشانگر چند شکل ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس اختلاف بسیار معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها از نظر صفات مختلف نشان داد. ژنوتیپ‌های برنج از نظر تحمل به شوری پاسخ متفاوتی در مرحله گیاهچه‌ای نشان دادند. دندروگرام به دست آمده از روش UPGMA (روش اتصال میانگین)، ارقام را به سه گروه طبقه‌بندی کرد. بیست رقم برنج بر اساس QTL بزرگ‌اثر ناحیه *Saltol* برای تحمل به شوری بر روی کروموزوم 1 در گروه های هاپلوتیپی جداگانه قرار گرفتند. نتایج نشان دهنده پتانسیل ژرم‌پلاسم برنج‌های ایرانی جهت یافتن ژن‌های جدید تحمل در القاء تحمل به شوری، به غیر از ناحیه *Saltol* در مرحله گیاهچه‌ای بود. همچنین ، نشانگرRM8094 در مرحله گیاهچه ای به عنوان مؤثرترین نشانگر جهت شناسایی ژنوتیپ های متحمل به شوری می‌باشد.

کلمات کلیدی: *برنج، تحمل شوری، تنوع هاپلوتایپی، ریز ماهواره.*

* نویسنده مسئول: قاسم محمدی نژاد تلفن: 09133415937 Email: Mohammadinejad@uk.ac.ir

مقدمه

برنج بعد از گندم غذای اصلی مردم ایران است و در سطحی معادل 600 هزار هکتار زراعت می‌شود (فتوکیان، 1383). 90 درصد شالیزارهای دنیا به نوعی تحت تاثیر شوری هستند (Ansari *et al*., 2001). شوری رشد گیاه برنج را در مراحل مختلف رشد از جوانه زنی تا رسیدن کامل به درجات مختلف تحت تاثیر قرار می‌دهد (Lang *et al*., 2001b). واکنش برنج به شوری در مراحل مختلف رشد متغیر است، در مرحله جوانه زنی به شوری نسبتاً متحمل، در اوایل دوره گیاهچه‌ای (3 برگی) خیلی حساس شده و مجدداً در مرحله رشد رویشی نسبتاً متحمل می‌گردد. در مرحله گرده افشانی و لقاح نیز به شوری حساس شده و در مرحله رسیدن دانه به طور فزاینده‌ای متحمل‌تر می‌گردد (Moradi, 2002; Lang *et al*., 2001a). اصلاح تحمل به شوری توسط محققان زیادی مطالعه شده است (Gregorio *et al*., 2002; Ponnamperuma, 1984; Shannon, 1984) موفقیت های بدست آمده در گذشته به دلیل پیچیدگی کار اصلاح برای تحمل به شوری، فقدان احساس ضرورت و فوریت واقعی برای اصلاح آن، تنوع ژنتیکی ناکافی برای تحمل به شوری، پیچیدگی اثرات متقابل شوری با عوامل محیطی و فقدان تکنیک های گزینشی کارا چندان قابل توجه نبوده است (Flowers & Yeo, 1995; Gregorio, 1997). طراحی استراتژی‌های اصلاحی پویا برای اصلاح تحمل به شوری در ارقام برنج نیازمند درک مکانیسم های تحمل به شوری است (Moradi, 2002). روش‌های مولکولی از طریق نشانمندکردن ژن‌ها و گزینش به کمک نشانگر باعث تسریع برنامه‌های اصلاحی شده است. شناسایی نشانگرهای مولکولی کاملاً پیوسته با ژن مورد نظر و مکان‌یابی آن یک هدف مهم در اصلاح برنج است که از این طریق می‌توان بر پیچیدگی‌های روش‌های اصلاحی متداول غلبه کرد (Flowers & Yeo, 1995). استفاده از نشانگرهای ریزماهواره درطی سال‌های اخیر جهت نقشه‌یابی QTLها در برنج مورد توجه فراوان قرار گرفته‌است (McCouch *et al*., 1997). در برنج به طور بالقوه 5700 تا 10000 توالی ریزماهواره با واحدهای تکراری 2، 3 و یا 4 نوکلئوتیدی متفاوت وجود دارد (Arif , 2002; McCouch *et al*., 1997) مک کوچ و همکاران (McCouch *et al*., 2002) نقشه ای شامل 2240 نشانگر ریزماهواره تهیه نمودند که تمام ژنوم برنج را پوشش داد. پس از آن نقشه ژنتیکی کامل‌تری توسط International Rice Genome Sequencing Project ارائه شد که تعداد 18828 نشانگر SSR (دو، سه و چهار نوکلئوتیدی) را شامل می‌شود (IRGSP، 2005). این نشانگرها در برنج قادرند چند شکلی را در بین واریته ها و یا درون واریته ها شناسایی نمایند (Olufowote *et al*., 1997; Yang *et al*., 1994). مکان کروموزومی بزرگ‌اثر *Saltol* واقع بر روی

کروموزوم 1، که در تنظیم جذب سدیم، پتاسیم، نسبت سدیم به پتاسیم و تحمل به شوری در مرحله گیاهچه در برنج مؤثر است، در سال 1997 توسط گریگوریو درنسل F_8 حاصل از تلاقی Pokkali×IR29 با استفاده از نشانگرهای ریز-ماهواره (SSR[1] و SSLP[2]) شناسائی گردید (Gregorio,1997). این نتیجه به وسیله محققین مختلفی تأیید گردیده است (Mohammadi-Nejad, 2008; Flowers *et al*., 2000; Niones, 2004). به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با ناحیه *Saltol* که به منظور اصلاح برای تحمل به شوری در برنامه های انتخاب به کمک نشانگر (MAS3) ضروری است، بونیلا و نیونس (Bonilla *et al*., 2002; Niones, 2004) نقشه این ناحیه کروموزومی را با استفاده از جوامع حاصل از تلاقی Pokkali×IR29 با نشانگرهای RFLP[4] و SSLP اشباع نمودند. در پژوهشی در کروموزوم یک برنج یک QTL اصلی برای تحمل به شوری گزارش دادند (Gong *et al*., 1999). در مطالعه دیگری نشانگرهای RFLP و SSR پیوسته‌ای با QTLهای صفاتی چون بقای گیاهچه در محلول شور، وزن خشک ریشه و جوانه، جذب سدیم و پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم روی کروموزوم‌های 1، 2، 3، 7، 9، 11 و12 با استفاده از 118 فرد جمعیت نسل هشتم RIL حاصل از تلاقی Tesnai2 و CB شناسایی نمودند(Lang *et al*, 2001) . با استفاده ازتجزیه نشانگر AFLP شانزده QTL مسئول جذب یون‌های سدیم و پتاسیم در جوانه‌های برنج گزارش شد (Flowers *et al*., 2000). در پژوهشی از 118 فرد نسل ششم جمعیت RIL حاصل از تلاقی IR4630-22-2-51-3/IR15324-117-3-2-2 برای مکان‌یابی صفات مرتبط با تحمل شوری استفاده نمودند. آنها تعداد 85 نشانگر AFLP و 27 نشانگر SSR چند شکل را در پژوهش خود به کار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه، 11 QTL روی کروموزوم های 1، 4، 6 و 9 برای صفات مختلف شناسایی نمود که تغییرات فنوتیپی از 6/4 تا 19/6 درصد را توجیه کردند (Koyama *et al*., 2001). در شرایط شوری صفات مرتبط با تحمل به شوری مثل طول اندام هوایی، مقدار کم یون سدیم و مقدار بیشتر یون پتاسیم در اندام هوایی، وزن خشک زیاد ریشه و اندام هوایی در گیاهچه‌های برنج مطالعه گردیدند و نشان داده شد که این صفات دارای آثار ژنتیکی افزایشی خیلی معنی‌دار می‌باشند، گر چه توارث‌پذیری آن‌ها کم است. از این صفات می‌توان به عنوان معیار با ارزش در گزینش لاین‌های متحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای استفاده کرد (Gregorio, 1997; Gregorio *et al*., 2002).) یک هاپلوتیپ، نشان دهنده‌ی توالی نوکلئوتیدهای ژنوم یک فرد بر روی تعدادی ازSNP است. ژنوم هر فرد ترکیبی از دو هاپلوتیپ به ارث رسیده از والدین است که این ترکیب را اصطلاحاً ژنوتیپ فرد می-

[1] -Simple Sequence Repeat
[2] - Simple Sequence Length Polymorphism
[3] - Marker Assisted Selection
[4]- Restriction Fragment Length Polymorphism

نامند. با ادغام هاپلوتیپ پدری و مادری ژنوتیپ فرد که شامل یک رشته 1،0و2 است ایجاد می‌گردد، اگر دو هاپلوتایپ مشابه باشند هوموزیگوس است که با 0 و 1 نشان داده می‌شود و در حالت هتروزیگوسیتی با 2 نشان داده می‌شود. به نظر می‌رسد تنوع هاپلوتیپ‌ها طی نسل‌های متوالی، در نواحی معینی از ژنوم بدون تغییر باقی می‌ماند. این نواحی، ژنوم را به مجموعه‌ای از بلوک‌های هاپلوتیپی افراز می‌کنند. بدین منوال حتی زمانی زمانی که ناحیه‌ای از کروموزوم‌ها بحث می‌گردد که براساس مکان‌یابی QTLها حاوی ژن‌های تاثیرگذار در کنترل صفتی می‌باشد، می‌توان بر مبنای مطابقت توالی ریز ماهواره‌های آن ناحیه مورد نظر در یک جمعیت با هاپلوتیپ والد دهنده به بررسی هاپلوتیپ‌های مختلف پرداخت و با بررسی فنوتیپی جمعیت تعیین نمود کدام هاپلوتیپ بیان بهتری از صفت مربوطه دارد و ضمن تعیین بهترین و موثرترین ترکیب آللی ناحیه QTL مورد نظر که برای انتخاب به کمک نشانگر بسیار ضروری و مفید می‌باشد، بر اساس سایر هاپلوتیپ‌ها که فنوتیپ متحملی دارند ولی از نظر مطابقت با والد دهنده QTL هیچگونه مطابقتی ندارند پی برد که ژرم پلاسم‌های مورد نظر می‌توانند حاوی لوکوس‌های جدیدی برای صفت مورد نظر باشند.

از آنجا که برنج به شوری حساس و نیمه حساس می‌باشد (Mass & Hafman, 1997) بررسی تنوع آللی نشانگرهای ناحیه QTL کنترل کننده تحمل به شوری و شناسائی موثرترین نشانگرهای این ناحیه از اهداف مهم این مطالعه می‌باشد. همچنین ارزیابی فنوتیپی صفات جهت بررسی و میزان الگوی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ ها، گروه‌بندی و ایجاد زمینه بهره برداری از این تنوع ژنتیکی از طریق روش‌های مرسوم و مولکولی از دیگر اهداف این پژوهش بودند.

مواد و روش‌ها

ارزیابی‌های فنوتیپی

روش غربال‌گری سریع 20 رقم برنج بومی و اصلاح‌شده ایرانی جهت ارزیابی پاسخ فنوتیپی آن‌ها به تنش شوری و شناسایی وضعیت *Saltol* در این ارقام در مرحله گیاهچه‌ای، طبق روش گریگوریو و همکاران (1997) انجام گرفت. در مرحله گیاهچه‌ای 14 روز پس از کشت، اعمال تنش در محلول غذایی یوشیدا با هدایت الکتریکی برابر با $10dsm^{-1}$ به مدت 21 روز تحت شرایط کنترل شده در فیتوترون در دمای $25^{\circ}C$ در روز و $21^{\circ}C$ در شب و رطوبت 70 درصد انجام شد و امتیاز تحمل به شوری ژنوتیپ ها با استفاده از سیستم نمره‌دهی 9-1 صورت پذیرفت (Gregorio *et al.*, 1997). ژنوتیپ‌ها در پنج گروه 1، 3، 5، 7 و 9 رتبه‌دهی شدند که متحمل ترین ژنوتیپ رتبه 1 و حساس ترین ژنوتیپ رتبه 9 را به خود اختصاص دادند.

آزمایش به‌صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو تکرار اجرا

شد. تیمارهای آزمایشی شامل دو سطح نرمال و شوری (با هدایت الکتریکی 6 و 10 دسی‌زیمنس بر متر) عامل اصلی و ارقام برنج ایرانی، که شامل ارقام گیل، ندا، نعمت، خزر، سپیدرود، عنبربو، بینام، شاه‌پسند، حسنی، قشنگه، غریب، طارم پاکوتاه، درفک، اهلمی طارم، صدری، طارم محلی، موسی طارم، دم‌سیاه، آمل و زاینده رود عامل فرعی بودند. صفات طول ریشه و ساقه، وزن خشک ریشه و ساقه، غلظت سدیم ، پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم به روش فلایم‌فتومتری برای گیاهان در مرحله 4 برگی اندازه گیری گردید.

ارزیابی ژنوتیپی

گیاهچه های 20 رقم برنج ایرانی و دو شاهد متحمل (Pokkali) و حساس (IR29) به شوری جهت استخراج DNA ژنومی طبق روش تغییر یافته دلاپورتا کشت گردیدند (Delaporta, 1983). از 6 نشانگر چند شکل ریزماهواره در مرحله گیاهچه ای مربوط به ناحیه *Saltol* واقع بر روی کروموزوم 1 برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf در حجم 10 µl انجام شد. مخلوط واکنش حاوی، PCR بافر یک برابر، MgCl2 1/5 میلی مولار، 1 میکرولیتر dNTPs، 0/5 میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت 5 میلی مولار، Taq پلیمراز یک واحد و 50 نانو گرم از DNA الگو بود. به منظور تکثیر قطعات DNA چرخه‌های PCR به شرح زیر انجام شد: بعد از 5 دقیقه واسرشت سازی در دمای 94°C سپس 35 چرخه شامل: 1 دقیقه در دمای 94 °C، 45 ثانیه در دمای اتصال 55 °C ، 1دقیقه در دمای 72 °C و بسط نهایی7 دقیقه در دمای 72 °C انجام شد. محصولات PCR در ژل پلی اکریل آمید 8% با ولتاژ 100در بافر TBE (1x) به مدت 2 ساعت تفکیک شدند. سپس در اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شدند و امتیازدهی باندها با استفاده از نرم افزار AlphaEaseFC4 انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های فنوتیپی

تجزیه واریانس برای صفات مختلف به صورت تجزیه مرکب در قالب طرح بلوک کامل تصادفی جهت برآورد تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌های ژنوتیپی

ترکیب آللی برای هر ژنوتیپ برای هر یک از مکان‌ها مشخص شد. جهت محاسبه فراوانی آللی هر لوکوس و هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای هر لوکوس از نرم افزار Power Marker Ver 3.25 (Liu & Muse, 2005)استفاده شد. محتوی اطلاعات چند شکلی(PIC) که نشان دهنده قدرت تمایز ژنوتیپ ها برای هر ترکیب پرایمری است ، طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^{n} p_{ij}^2$$

Pij فراوانی i امین آلل برای نشانگر i و n تعداد کل آلل های مشاهده شده برای لوکوس نشانگری است. همچنین با استفاده از این نرم افزار شاخص‌هایی نظیر تنوع ژنتیکی و تعداد آلل مشاهده شده در هر مکان ژنی نیز محاسبه گردید. ترسیم کلاستر با روش UPGMA با شاخص تشابه نئی و همکاران (1983) با استفاده از Power Marker Ver 3.25 انجام شد.

آنالیز داده‌های هاپلوتیپی

ارزیابی تنوع هاپلوتایپی بر مبنای مطابقت توالی میکروساتلایت های ناحیه سالتول در ارقام مورد مطالعه با ژنوتیپ رفرنس (Pokkali) صورت گرفت (McCartney *et al*, 2004; Liu & Anderson, 2003; Bai *et al* ., 2003; Yu *et al*., 2006; Mohammadinejad *et al*., 2010; Yu *et al*., 2010).

نتایج و بحث

نتایج ارزیابی فنوتیپی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اختلاف بسیار معنی‌داری ($p<0.01$) را بین ژنوتیپ‌ها از نظر تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای نشان داد که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی از نظر صفات اندازه‌گیری شده (طول ریشه، طول ساقه، وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه، وزن تر ریشه، وزن تر ساقه، نسبت وزن ساقه به ریشه، بیوماس، غلظت سدیم و پتاسیم، نسبت Na^+/K^+ و رتبه‌دهی تحمل به شوری) می‌باشد (جدول 1). وجود تنوع ژنتیکی موثر در تحمل به شوری برای انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به شوری با عملکرد بالا و درک بهتر سازوکارهای فیزیولوژیکی تحمل به شوری در برنج می‌تواند بسیار مفید باشد. اختلاف آماری معنی‌دار بین ارقام بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا بین مواد گیاهی مورد ارزیابی و احتمالاً مکانیسم‌های متفاوت بین آن‌ها در واکنش به تنش شوری است که می‌توانند در انتخاب ارقام مناسب و تولید جمعیت‌های در حال تفرق جهت مکان‌یابی ژنی مورد استفاده قرار گیرند. اثرات متقابل ژنوتیپ در شوری در شرایط تنش برای اکثر صفات معنی‌دار بود، که نشان دهنده واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها در پاسخ به تنش‌شوری می‌باشد.

نتایج ارزیابی ژنوتیپی

با افزایش تعداد آلل تکثیر شده در یک مکان، میزان اطلاع رسانی آن مکان برای تعیین تنوع ژنوتیپ‌ها افزایش می‌یابد. در مرحله گیاهچه‌ای تعداد 25 آلل در مطالعه به کمک 6 آغازگر ریز-ماهواره تکثیر شدند. بیشترین تعداد آلل، مربوط به جایگاه RM8094 و برابر 6 آلل و کمترین تعداد آلل (3) مربوط به نشانگر RM10890 بود. محتوی اطلاعات پلی مورفیسم هر نشانگر میزان تنوع آن نشانگر را نشان می‌دهد. در واقع PIC تخمینی از قدرت تمایز هر نشانگر با محاسبه تعداد آلل هایی

که بیان شده‌اند و همچنین فراوانی‌های مرتبط با آن آلل ها می‌باشد (Smith *et al.*, 2000). محتوی اطلاعات پلی مورفیک از 0/77 تا 0/54 متفاوت بود. بالاترین PIC متعلق به نشانگرهای RM8094 (0/77) و RM493 (0/74) بود در حالی‌که RM10890 کمترین میزان PIC (0/54) را نشان داد. نشانگرهای RM8094 و RM493 با داشتن بیشترین میزان PIC به عنوان بهترین نشانگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی نشانگرها در مرحله گیاهچه‌ای شناسایی شدند (جدول 2).

جدول 1- تجزیه واریانس صفات در دو شرایط شوری و نرمال.

Table 1- Analysis of variance of traits in salinity and normal conditions.

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی (df)	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
تکرار rep	1	0.53	2.5*	0.008	0.004	0.013	3×10^{-4}	0.008	1.15	0.001	0.06
تیمار treatment	2	110.6**	2260.6**	1.7**	118.7**	16.37**	10.18**	2.188**	10.29	4.47**	24.93**
خطای 1 Eror1	2	0.139	0.117	0.006	0.01	0.01**	0.001	0.006	1.38	0.002	0.17
ژنوتیپ genotype	19	4.29**	315.6**	0.12**	1.04**	0.417	0.085**	0.13**	16.13**	0.35**	8.69**
تیمارxژنوتیپ treatxgen	38	1.52	18.1**	0.019**	0.33**	0.12*	0.027**	0.02**	4.22**	0.08**	0.71**
خطای 2 Eror2	57	14.43	99.5	0.14	0.46	1.35	0.054	0.15	33.05	0.027	0.45

x1: طول ریشه، x2طول ساقه، x3: وزن خشک ساقه، x4: غلظت سدیم، x5: غلظت پتاسیم، x6: نسبت سدیم/پتاسیم، x7: بیوماس، x8: وزن ساقه به ریشه.

X1: root length, x2: shoot length, x3: shoot dry weight, X4: Na^+ concentration, X5: K^+ concentration, X6: Na^+/K^+ Ratio, X7: biomass, X8: shoot/root weight.

نتایج نشان داد که آنالیز ریز ماهواره سیستم نشانگری مفیدی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی است. اطلاع از شباهت‌های ژنتیکی می‌تواند جهت اجتناب از یکسان شدن ژرم پلاسم‌ها از لحاظ ژنتیکی مفید باشد. کارایی و سرعت برنامه‌های اصلاحی از طریق انتخاب به کمک نشانگر افزایش می‌یابد. اطلاعات بدست آمده از این بررسی می‌تواند در مطالعات نقشه‌یابی ژنومی و توسعه ژنوتیپ‌های برنج با زمینه ژنتیکی وسیع‌تر و متنوع‌تر جهت دستیابی به بهره‌وری بالاتر در پروژه های

نقشه یابی دقیق و انتخاب به کمک نشانگر مفید واقع شود.

تجزیه خوشه‌ای بر مبنای داده‌های ریزماهواره ژنوتیپ‌های برنج را در 3 گروه طبقه بندی کرد که در این گروه بندی ارقام حساس، متحمل و نیمه متحمل به طور مختلط قرار داشتند که به نوعی بیانگر زمینه ژنتیکی متفاوت ارقام متحمل ایرانی از نظر QTLهای دخیل در تحمل به شوری می باشد.

جدول 2- تعداد آلل و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) 6 نشانگر SSR.

Table 2- Allele number and Polymorphic Information Content (PIC) of 6 microsatellites markers.

نشانگر	فراوانی آلل غالب	تعداد آلل	PIC	دامنه اندازه تکثیر باند (bp)
Marker	Major.Allele.Frquency	Allele NO	PIC	Size band range (bp)
RM493	0.47	4	0.74	195 -250
RM8094	0.26	6	0.77	193 – 220
RM10890	0.05	3	0.54	203 -230
RM3412	0.31	4	0.69	225-258
RM10793	0.52	4	0.59	140-195
RM3252	0.36	4	0.65	172 -220

بررسی تنوع هاپلوتیپی QTL واقع بر روی کروموزوم 1 در مرحله گیاهچه‌ای

شش نشانگر چند شکل پیوسته به QTL مقاوم به شوری در مرحله گیاهچه‌ای واقع بر روی کروموزوم 1 (ناحیه کروموزومی *Saltol*) جهت بررسی تنوع هاپلوتیپی مورد استفاده قرار گرفتند (جدول 3)، که 20 ژنوتیپ از لحاظ مطابقت با نواحی ریز ماهواره Pokkali در 12 گروه هاپلوتیپی قرار گرفتند (جدول 3) هیچ یک از 20 ژنوتیپ هاپلوتیپی مشابه با Pokkali نداشتند. بعبارت دیگر هیچ یک از ژنوتیپ‌های استفاده شده ترکیب دقیقاً یکسان آللی از نظر همه نشانگرهای ریز ماهواره متعلق به Pokkali را نداشتند. محمدی نژاد و همکاران در بررسی تحمل به شوری ژنوتیپ‌های برنج، 30 ژنوتیپ را بر اساس QTL ناحیه *saltol* در 16 گروه هاپلوتیپی قرار دادند، که هیچ کدام از 30 ژنوتیپ هاپلوتیپی مشابه Pokkali (ژنوتیپ مرجع) تولید نکردند (Mohammadi-Nejad *et al*, 2010). هاپلوتیپ‌های شماره 2، 4، 5، 8 ، 9 و 10 (شامل ارقام متحمل و نیمه‌متحمل به شوری)، که از نظر جایگاه نشانگری RM3412 مشابهت آللی با پوکالی داشتند، می‌توان گفت کهQTL کنترل کننده

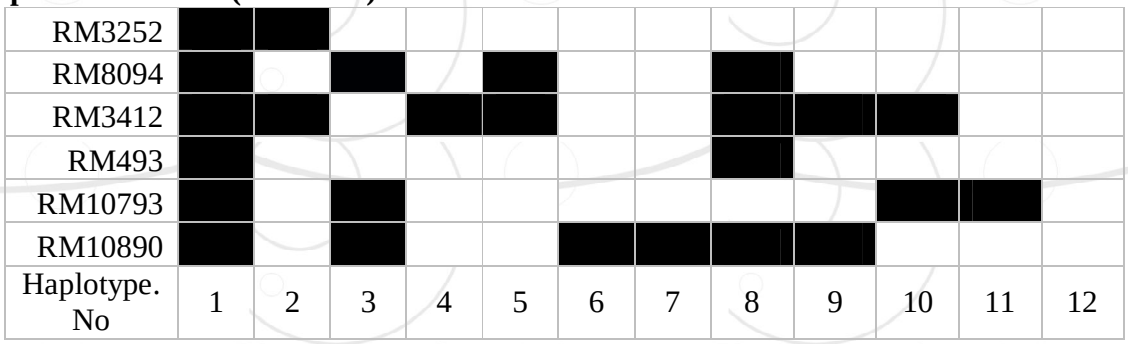
تحمل به شوری موجود در پوکالی را در بر دارند. همچنین هاپلوتیپ‌های شماره 3، 6، 7، 8 و 9 (شامل ارقام متحمل و نیمه متحمل) از نظر لوکوس RM10890 که در منطقه پایین‌تر از *Saltol* قرار دارد شبیه Pokkali بودند. بررسی تنوع هاپلوتایپی با استفاده از نشانگرهای SSR پیوسته به QTLهای مرتبط با صفات که بر مبنای مقایسه الگوی آللی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با ژنوتیپ رفرنس (کولتیوارهای شناخته شده)، می‌باشد، می‌تواند اطلاعات مفیدی جهت شناسایی QTLهای جدید فراهم کند (Yu *et al*, 2006) اگر ژنوتیپ‌ها الگوی آللی یکسان با مکان نشانگری پیوسته به QTL مقاومت در ژنوتیپ‌های مقاوم شناخته شده داشته باشند به احتمال زیاد دربردارنده همان QTL می‌باشند (Bai *et al*, 2003; McCartney *et al*, 2004). از طرف دیگر اگر دارای الگوی آللی متفاوتی با ژنوتیپ مقاوم شناخته شده باشند به احتمال زیاد آلل‌های متفاوتی نسبت به آن QTL دارند (Yu *et al*, 2006). 14 رقم ترکیب متفاوتی از برخی آلل‌های Pokkali را شامل شدند که به احتمال زیاد دربردارنده ناحیه کنترل کننده تحمل به شوری یکسانی می‌باشند، در حالی‌که 6 رقم سپیدرود، طارم پاکوتاه، غریب، گیل، آمل و دمسیاه هیچ‌یک از آلل‌های نشانگر مرتبط با *Saltol* را نداشتند که می‌تواند نشان دهنده این باشد که کنترل تحمل به شوری در این ارقام می تواند علاوه بر این ناحیه بوسیله سایر نواحی جدید صورت بگیرد و می‌توانند بعنوان منابع جدیدی جهت مکان‌یابی ژن‌های جدید تحمل به شوری و توسعه لاین‌های اصلاحی جدید تحمل به شوری مرحله گیاهچه‌ای مورد استفاده قرار گیرند.

ارقامی که آلل نشانگر یکسان با Pokkali را برای RM3412 وRM18090 دارا بودند، پاسخ متفاوتی نسبت به شوری نشان دادند (شامل ارقام حساس، متحمل و نیمه متحمل) در حالی‌که نشانگر RM8094 آلل مشابه با Pokkali را در ژنوتیپ‌های متحمل (ندا، موسی‌طارم و زاینده‌رود) تکثیر کرد، بنابراین می‌توان گفت این نشانگر، نشانگر مناسبی جهت مطالعات تحمل به شوری در برنج باشد از این نظر که آلل مشابه با ژنوتیپ مرجع را در ژنوتیپ‌های متحمل تکثیر کرد (جدول 3).

براساس آخرین نتایج مکان یابی دقیق مکان *Saltol* در فاصله بین دو نشانگر RM8094 و RM3412 قرار دارد (MohammadiNejad *et al*, 2011). همچنین هاپلوتیپ شماره 5 (موسی‌طارم)، از لحاظ نشانگرهای RM8094 و RM3412، آلل مشابه با Pokkali را داشت و روندی متحمل به تنش در مرحله گیاهچه‌ای نشان داد، به نظر می‌رسد QTL کنترل‌کننده تحمل به شوری ناحیه *Saltol* در مرحله گیاهچه‌ای، در این رقم وجود داشته باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که نشانگر RM8094 برای انتخاب به کمک نشانگر برای ناحیه *Saltol* مفید می‌باشد.

جدول 3- هاپلوتایپ‌های تولید شده به وسیله نشانگرهای SSR واقع در ناحیه سالتول بر روی کروموزوم 1 با ارجاع به Pokkali* (رفرنس).

Table 3- Haplotypes produced by SSR markers on *Saltol* region on chromosome 1 with compare to Pokkali* (reference).



1: Pokkali ؛ 2: شاهپسند؛ 3: ندا؛ 4: بینام؛ 5: موسی‌طارم؛ 6: درفک، طارم محلی، اهلمی طارم، حسنی، خزر؛ 7: نعمت؛ 8: زاینده‌رود؛ 9: قشنگه؛ 10: عنبربو؛ 11:صدری؛ 12: سپیدرود، طارم پاکوتاه، غریب، گیل، آمل، دمسیاه

1- Pokkali, 2- Shahpasand, 3- Neda, 4- Binam, 5- Mosa Taram, 6- Dorfak, Tarom-Mahali, Ahlami-Tarom, Hassani, Khazar. 7- Neamat, 8- Zayanderood, 9- Ghashange, 10- Anbarbou, 11- Sadri, 12- Sepidrood, Traom-Pakoutah,Gharib, Gil, Amol, Domsiah.

نتیجه گیری

نشانگرهای RM8094 و RM493 با داشتن بیشترین میزان PIC به عنوان بهترین نشانگرها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی نشانگرها در مرحله گیاهچه‌ای شناسایی شدند.

بر اساس نتایج بدست آمده از بررسی تنوع هاپلوتیپی می‌توان ارقام سپیدرود، طارم پاکوتاه، غریب، گیل، آمل و دمسیاه را به عنوان منابع جدید جهت نقشه‌یابی ژن‌های تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای همچنین نشانگر RM8094 واقع بر روی کروموزوم 1 را به عنوان نشانگر اطلاع رسان جهت انتخاب به کمک نشانگر معرفی کرد.

منابع

Fotokian MH (2004). QTL analysis of attributed traits to salinity tolerance and grain quality in rice, PhD Thesis, Dep. Of Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tehran.

Ansari R, Shereen A, Flowers TJ, Yeo, AR (2001). Identification rice lines for improved salt tolerance from a mapping population. In: Peng, S. and B. Hardy (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.

Arif M (2002). Molecular mapping of genes/QTLs affecting resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*and grain quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). Ph.D thesis. University of Philippines in Los Banos. Philippines.

Bonilla PS, Dvorak J, Mackill D, Deal K, Gregorio G (2002). "RFLP and SSLP mapping of salinity tolerance genes in chromosome 1 of rice (Oryza sativa L.) Using recombinant

inbred lines", The Philippine Agricultural Scientist 85: 64-74.

Flowers TJ, Koyama ML, Flowers S, Sudhakar C, Singh KP and Yeo AR (2000). QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. Journal of Experimental Botany 51: 99-106.

Flowers T J, Yeo A R (1995). "Breeding for salinity resistance in crop plants: where next?", Austuralian Journal Plant Physiology 22: 875-884.

Gregorio G B, Senadhira D, Mendoza RD, Manigbas NL, Roxas JP, Guerta CQ (2002). "Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice", Field Crop Research 79: 91-101.

Gregorio GB, Senadhira D, Mendoza RD (1997). Screening rice for salinity tolerance, IRRI Discussion paper Series No.22. International Rice Research Institute, Los Baños. Laguna, Philippines.

Gong J M, Qian Q A, Shen L S, Zhu LH, Chen SY (1999). Identification of salt- QTL in rice. Chinese Science Bulletin 4: 68-71.

IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) (2005). "The map-based sequence of the rice genome", Nature 436: 793-800.

Koyama ML, Levesley A, Koebner RMD, Flowers TJ Yeo AR (2001). Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. Plant Physiology 125: 406-422.

Lang NT, Yanagihara S, and Buu BC (2001). QTL analysis of salt tolerance in rice (Oryza sativa L.). SABRAO journal of Breeding and Genetics 33: 11-20

Liu S, Anderson JA (2003). Targeted molecular mapping of a major wheat QTL for head resistance using wheat ESTs and synteny with rice. Genome 46: 817–823

Liu K, Muse SV (2005). Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics 21: 2128-2129.

Maas EV, Hoffman GJ (1977). Crop salt tolerance, current assessment. Journal of the Irrigation and Drainage Division ASCE 103: 115-134.

McCouch S R, Chen X, Panaud O, Xu Y G, Cho N, Ishii T and Blair M (1997). Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. Plant Molecular Biology 35: 89-99.

McCouch S R, Teytelman L, Xu Y, Lobos K B, Clare K, Walton M, Maghirang R, Ware Y D, Stein L (2002). Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa L.*). DNA Research 9: 199-207 and 257-279.

McCartney CA, Sommers DJ, Fedak G, Cao W (2004). Haplotype diversity at Fusarium head blight resistance QTLs in wheat. Theoretical and Applied Genetics 109: 261-271.

Mohammadi-Nejad G, Arzani A, Rezai AM, Singh RK Gregorio GB (2008). Assessment of rice genotypes for salt tolerance using microsatellite markers associated with the *saltol* QTL. African Journal of Biotechnology 7: 730-736.

MohammadiNejad G, Singhb RK, Arzanic A, Rezaiec AM , Sabourid H, Gregoriob GB (2010). Evaluation of salinity tolerance in rice genotypes. International Journal of Plant Production 4 (3).

MohammadiNejad G, Sing RK, Rezaie AM, Arzani A, Nakhoda B, Fotokian MH, Moumeni A, Gregorio GB (2011). Fine Mapping of Major Effect QTL Responsible for Salinity Tolerance (*Saltol*) in Rice. Journal of crop biotechnology 1(1): 49-59

Moradi F (2002). physiological characterization of rice cultivars for salinity tolerance during vegetative and reproductive stage. PhD thesis. University of Philippines, Los Banos. Philippines

Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data II. Gene frequency data. Journal of Molecular Evolution 19: 153-170.

Niones J M (2004). "Fine mapping of the salinity tolerance gene on chromosome 1 of rice (Oryza sativa L.) Using near isogenic lines", M.S. Dissertation, University of Philippines, Los Baños, Laguna, Philippines.

Olufowote J O, Xu Y, Chen X, Park W O, Beachell H M, Dilday R H, Goto M McCouch S R (1997). Comparative evaluation of within cultivar variation of rice using microsatellite and RFLP markers. Genome 40: 370-378.

Ponnamperuma, F N (1984). Role of cultivar tolerance in increasing rice production in saline lands. Strategies for crop improvement. John Willey and Sons. 443 pages.

Prasad SR, Bagali PG, Hittalmani S, Shashidhar HE (2000). Molecular mapping of quantitative trait loci associated with seedling tolerance to salt stress in rice (*Oyza sativa* L.). Current Science 78: 162-164

Shannon M C (1984). Breeding, selection and the genetics of salt tolerance.In: Staples, R.CR , G.H. Toenniessen (eds.). Salinity tolerance in plants. Johan willey and Sons. pp: 231-254

Smith JSC, Kresovich S, Hopkins MS, Mitchell SE, Dean RE, Woodman WL, Lee M, Porter K (2000). Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats. Crop Science 40: 226-232.

Yang GP, Saghai Maroof MA, Xu CG, Zhang Q Biyashew R M (1994). Comparative analysis of microsatellited DNA polymophism in landraces and cultivars of rice. MolEcular and General Genetics 245: 187-194.

Yu JB, Ban T (2006). Marker-assisted characterization of Asian whea lines for resistance to fusarium head blight. Theoretical and Applied Genetic 113: 308-320. doi:10.1007.s00122-006-0297-z.

Yu LX, Liu S, Anderson JA, Singh RP, Jin Y, Dubcovsky J, Brown-Guider G, Bhavani S, Morgounov A, He Z, Huerta-Espino J, Sorrells ME (2010). Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. Molecular Breeding 26: 667–680.

Zhuang JY, Lin HX, Lu J, Qian HR, Hittalmani S, Huang N, Zheng KL (1997). Analysis of QTL×environment interaction for yield components and plant height in rice. Theoretical and Applied Genetics 95: 799–80.

Allelic variation of containing markers in responsible QTL for salinity tolerance (*Saltol*) at seedling stage in Iranian rice cultivars

Zarea R.[1], Mohammadi-Nejad G.*[2], Shahsavand-Hassani H.[2]

[1]MS Student, Dep. of Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
[2]Dep. of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

Abstract

Due to necessity of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) and availability of different approaches of molecular breeding in identification of major QTLs controlling salinity tolerance, it is very important to evaluate the presence of these QTLs in Iranian cultivars and the roles in breeding strategies. In this study, 20 different rice cultivars and two tolerance (Pokkali) and sensitive (IR29) controls were evaluated under salinity stress at, seedling stage in greenhouse conditions (EC= 0, 6 and 10 dSm^{-1}) using 6 polymorphic SSR markers. Analysis of variance showed the high significant difference among genotypes of different traits, rice genotypes showed different salinity tolerance at seedling stage. Obtained dendrogram by UPGMA method categorized genotypes in to 3 different groups. 20 rice cultivars based on major QTLs of *Saltol* region on chromosome 1 were arranged in separate haplotype groups. RM8094 marker was distinguished as the best marker for identification of salt tolerance genotypes in seedling stage.

Keywords: *Haplotype diversity, Microsatellite markers, Rice, Salinity tolerance.*

* Corresponding Author: Mohammadi-Nejad G. Tel: 09133415937 Email: g.mohamadinejad@yahoo.com

زارع و همکاران، 1392