

"

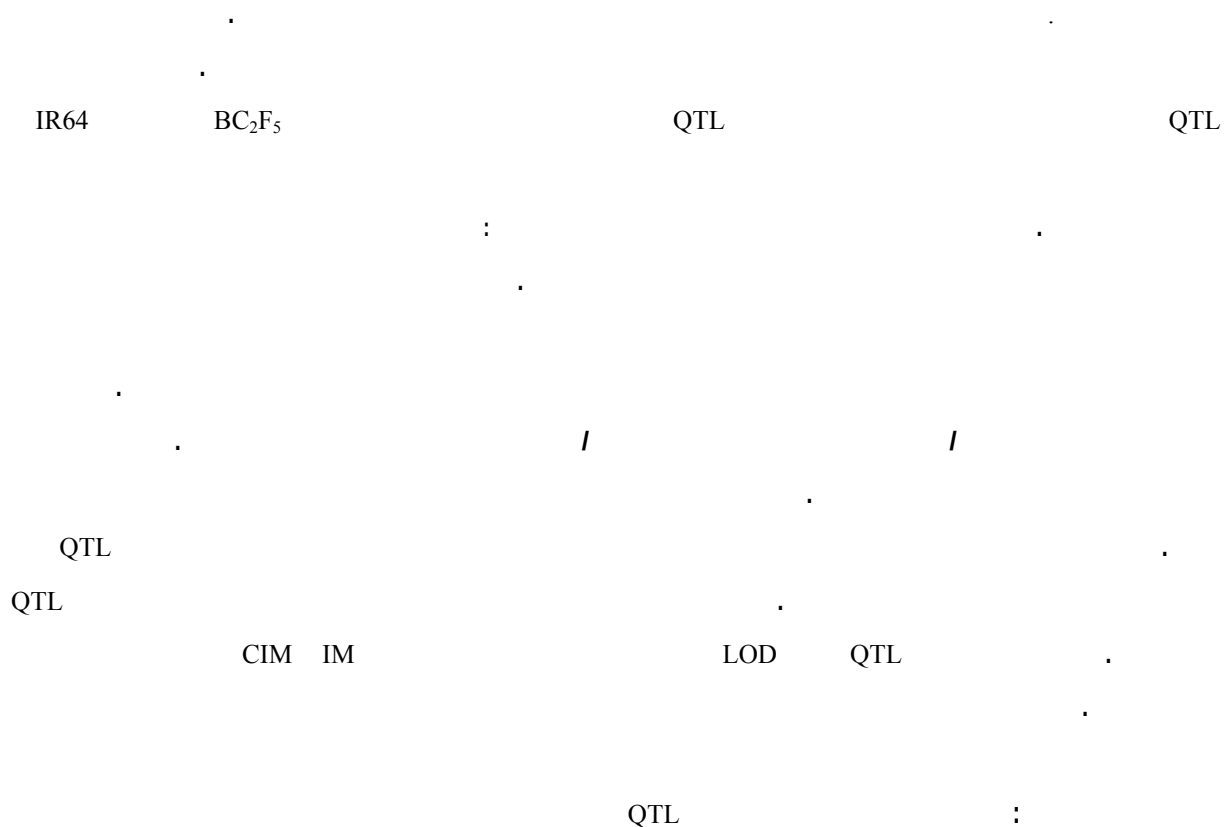
"

QTL mapping of genes affecting salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite markers

محمد حسین فتوکیان^۱، علیرضا طالعی^۲، بهزاد قره‌یاضی^۳، کاظم پوستینی^۴ و
علی اکبر شاه‌نجات بوشهری^۵

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده تحمل به شوری در برنج با استفاده از

نشانه‌های ریزماهوره، مجله علوم زراعی ایران، جلد ۶، شماره ۴، صفحه ۳۶۱-۳۶۳.



تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۷/۸

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه شاهد

۲- عضو هیأت علمی دانشگاه تهران

۳- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی

۴- محقق مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI)

برنج چندین مکانیسم برای تحمل به شوری شناسایی شده‌اند (Yeo and Flowers, 1986) که عبارتند از: ممانعت از ورود نمک، جذب نمک اضافی از آوند چوبی پس از جذب اولیه (Salt reabsorption)، ارتباط الکترولیتی ریشه با اندام هوایی، انتقال نمک اضافی از برگ‌های جوان به برگ‌های پیرتر (Compartmentation)، ذخیره نمک در واکوئل (Tissue tolerance) و رقیق نگه‌داشتن نمک در داخل برگ (Dilution effect). همه این مکانیسم‌ها باعث کاهش یون سدیم در بافت‌های فعال و در نتیجه منجر به کاهش نسبت یون سدیم به یون پتاسیم در اندام‌های هوایی می‌شود. نسبت یون سدیم به یون پتاسیم معیار مناسبی برای ارزیابی تحمل به شوری است. واریته‌های برنج متحمل به شوری تنها یک یا دو مکانیسم را دارند نه همه را. بهترین واکنش برای افزایش تحمل به شوری با بهینه کردن چندین صفت فیزیولوژیکی که احتمالاً مستقل از هم هستند به دست می‌آید (Flowers et al., 2000; Shehata Ismail, 1995). تحمل به شوری مانند سایر تنش‌های محیطی در گیاهان عالی یک صفت پیچیده ژنتیکی و فیزیولوژیکی است. بیشتر فرآورده‌های 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).

مطالعات ژنتیکی در مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI) نشان می‌دهد که هم اثرات افزایشی و هم اثرات غالبیت ژن در توارث تقریباً همه صفات مرتبط با شوری دخالت دارند (Gregorio, 1997; Lee, 1995; Mishra et al., 1990). گریگوریو و سنادهیرا (Gregorio and Senadhira, 1993) در برنج مشخص کردند که دو گروه ژن در جذب سدیم و پتاسیم دخالت دارند: یک گروه برای ممانعت از جذب سدیم و دیگری برای جذب پتاسیم. ژن‌های موثر در انتقال سدیم و پتاسیم متفاوت هستند و جذب آن‌ها در دو مسیر مختلف و مستقل از هم انجام می‌گیرد. اصولاً جذب سدیم به

نود درصد شالیزارهای دنیا به نوعی تحت تأثیر شوری هستند (Ansari et al. 2001). برنج به شوری نسبتاً حساس است (Gregorio, 1997; Lang et al., 2001a). شوری رشد گیاه برنج را در مراحل مختلف رشد از جوانه‌زنی تا رسیدن کامل به درجات مختلف تحت تأثیر قرار می‌دهد (Lang et al., 2001b). گیاه برنج در مرحله جوانه‌زنی به شوری نسبتاً متحمل، در اوایل دوره گیاهچه‌ای (۳ برگ) خیلی حساس شده و مجدداً در مرحله رشد رویشی مقاوم می‌گردد. در مرحله گرده‌افشانی و لقاح نیز به شوری حساس شده و در مرحله رسیدن دانه به طور فزاینده‌ای مقاوم‌تر می‌گردد (Moradi, 2002; Lang et al., 2001a).

اصلاح تحمل به شوری توسط محققان زیادی مطالعه شده است (Gregorio et al., 2002; Ponnampetuma, 1984; Shannon, 1984). موفقیت‌های به دست 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 تکنیک‌های گزینشی کارآچندان قابل توجه نبوده است (Flowers, 1995; Gregorio, 1997). در حال حاضر با پیشرفت‌هایی که در اصلاح ژرم پلاسما، تکنیک‌های ارزیابی (Gregorio et al., 1997)، تعیین توارث ژنتیکی (Gregorio and Senadhira, 1993; Lee et al., 1996)، استفاده از نشانگرهای ملکولی و مکان‌یابی (mapping) و نرم‌افزار (Jansen and Stam, 1994; Kearsey and Farquhar, 1998; Kearsey and Hyne, 1994) انجام گرفته، پیشرفت اصلاح برای تحمل به شوری و سایر تنش‌های غیرزنده تسهیل شده است.

طراحی استراتژی‌های اصلاحی پویا برای اصلاح تحمل به شوری در ارقام برنج نیازمند درک مکانیسم‌های تحمل به شوری است (Moradi, 2002). در

در برنج برای تحمل به شوری تعدادی از ژن‌های صفات فیزیولوژیکی مکان‌یابی شده‌اند (Gong et al., 1999; Koyama et al., 2001; Prasad et al., 2000). کویاما و همکاران (Koyama et al., 2001) با استفاده از نشانگرهای ملکولی AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)، RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)، و SSR در لاین‌های اینبرد نو ترکیب (Recombinant inbred lines) نشان دادند که QTL‌های (Quantitative Trait Loci) مربوط به جذب سدیم و پتاسیم و نسبت این دو در گروه‌های لینکاژی متفاوتی قرار دارند. آن‌ها برای جذب پتاسیم در کروموزم‌های یک، ۴ و ۱۲ و برای جذب سدیم در کروموزم‌های یک و ۱۰ و همچنین برای نسبت سدیم به پتاسیم در کروموزم‌های یک، ۱۰ و ۱۲ توانستند QTL‌هایی شناسایی کنند. گونگ و همکاران (Gong et al., 1999) نیز در کروموزم یک برنج یک QTL اصلی برای تحمل به شوری گزارش دادند. لانگ و همکاران (Lang et al., 2001a) با نشانگرهای SSR و خانواده‌های F_۳ توانستند در مرحله رویشی پیوستگی معنی‌داری بین نشانگر RM223 و QTL مربوط به تحمل به شوری در کروموزم یک بیابند که ۹۲ و ۸۲ درصد تنوع فنوتیپی به ترتیب در مرحله رویشی و زایشی به این مکان ژنی نسبت داده شد.

هدف از اجرای این تحقیق مکان‌یابی QTL‌های تحمل به شوری از طریق اجزاء فیزیولوژیکی تحمل به شوری، مشخص کردن اثر افزایشی هر QTL، و تعیین سهم هر QTL در تنوع فنوتیپی صفت مربوطه به کمک نشانگر ریزماهواره بوده است.

۱- (Phenotyping)

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۶۳ لاین تلاقی برگشتی پیشرفته BC₂F₅ بود که از تلاقی دو

صورت آپوپلاستیک (Apoplastic) و برای پتاسیم انتقال یک فرآیند مبتنی بر غشاء است (Gregorio and Senadhira, 1993).

شناسایی نشانگرهای ملکولی کاملاً پیوسته با ژن مورد نظر و مکان‌یابی آن در روی کروموزم یک هدف مهم در اصلاح نباتات برای کلون کردن ژن‌ها و گزینش به کمک نشانگر (Marker-aided selection) است (Arif, 2002). مطالعه پیرامون مکان‌یابی (Mapping) و یا نشانمند کردن (Tagging) اطلاعاتی را در مورد تعداد ژن‌های کنترل کننده صفت و محل این ژن‌ها در نقشه لینکاژ (Linkage map) ارائه می‌دهد.

در برنج به طور بالقوه ۵۷۰۰ الی ۱۰۰۰۰ ردیف ریزماهواره (Microsatellite) با واحدهای تکراری (Motif)، ۲، ۳ و یا ۴ نوکلئوتیدی (Nucleotide) متفاوت وجود دارد که می‌تواند برای ساخت یک نقشه ژنتیکی کامل برنج مورد استفاده قرار گیرد (Arif, 2002). ریزماهواره‌ها که به آن‌ها توالی تکراری ساده (Simple Sequence Repeat = SSR) نیز می‌گویند دارای یک الی ۶ جفت باز هستند و در ژنوم یوکاریوت‌ها وجود دارند (McCouch et al., 2002). این نشانگر ملکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (Polymerase Chain Reaction = PCR) است و دارای کاربرد فراوان در مطالعات ملکولی است.

مک کوچ و همکاران (McCouch et al., 2002) توانستند نقشه‌ای شامل ۲۲۴۰ نشانگر ریزماهواره را تهیه نمایند که کل ژنوم برنج را پوشش می‌دهد. در برنج این نشانگرها برای مکان‌یابی ژن‌ها و گزینش به کمک نشانگر مفید هستند (Chen et al., 1997; Moncada et al., 2001) و قادرند در بین و درون واریته‌های برنج چندشکلی (polymorphism) نشان دهند (Akagi et al., 1996; Akagi et al., 1997; Olufowote et al., 1997; Panaud et al., 1996; Yang et al., 1994).

اندازه گیری وزن خشک ابتدا اندام های فوق به مدت ۳ روز در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد خشک شده و سپس توزین شدند (Gregorio et al., 1997; International Rice Research Institute, 2002).

- -

بیست میلی گرم از نمونه های کاملاً خشک و خرد شده ریشه و اندام هوایی با ۱۰ میلی لیتر اسید استیک ۱٪ نرمال مخلوط و سپس به مدت ۲ ساعت در حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. یک میلی لیتر از محلول صاف شده با ۹ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و با دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (Atomic Absorbption Spectrophotometer) مقادیر OD (Optical Density) نمونه ها ثبت گردید. با استفاده از فرمول رگرسیون حاصل از OD و غلظت بر حسب قسمت در میلیون (ppm) نمونه های استاندارد شده، مقادیر OD به ppm تبدیل گردید.

(Genotyping)

-

DNA

- -

برای استخراج DNA چهار میلی گرم از نوک برگ گیاهچه ها در ۸۰۰ میکرولیتر محلول CTAB کاملاً لاله گردید. هفتصد میکرولیتر از مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از خنک شدن ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط حاصل با شیکر تکان داده شد. پس از سانتریفوژ به مدت ۴ دقیقه در ۱۵ هزار دور در دقیقه، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی (supernatant) با هزار میکرولیتر اتانول خالص مخلوط و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. عمل سانتریفوژ به شرح فوق مجدداً انجام گرفت. توده DNA به دست آمده با اتانول ۷۰ درصد شسته شد و در ۵۰ میکرولیتر محلول TE حل گردید. محلول حاصل برای استفاده در واکنش زنجیره ای پلی مرز ۱۰۰ برابر با TE رقیق گردید.

واریته زراعی برنج IR64 به عنوان والد دوره ای (Recurrent) و واریته طارم مولایی به عنوان والد دهنده (Donor) به دست آمده بودند. واریته IR64 دارای سطح کشت گسترده در جنوب و جنوب شرقی آسیا است و نسبت به شوری و سایر تنش های غیر زنده دارای تحمل متوسط است (Moradi, 2002). واریته طارم مولایی که واریته بومی شمال کشور است و دارای کیفیت پخت عالی است دارای تحمل قابل توجه به شوری است.

- -

(phytotron)

ابتدا بذرها در دستگاه جوانه زنی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد جوانه دار شدند. بذرهای جوانه زده در درون سوراخ های استیروفوم (Styrofoam) قرار داده شدند. برای هر لاین ۵ سوراخ در هر تکرار در نظر گرفته شد و در هر سوراخ دو بذر جوانه زده قرار داده شد. بذرهای جوانه زده به مدت ۳ روز بر روی آب مقطر و سپس بر روی محلول غذایی یوشیدا (Yoshida) قرار داده شدند. گیاهچه ها به مدت یک هفته با محلول یوشیدای دارای هدایت الکتریکی ۶ دسی زیمنس بر متر ($EC=6\text{ dsm}^{-1}$) و به مدت دو هفته با محلول دارای هدایت الکتریکی ۱۲ تیمار گردیدند. pH محلول غذایی به طور روزانه به اسیدیته ۵/۵ تنظیم گردید. دمای روزانه و شبانه فیتوترون به ترتیب ۲۹ و ۲۲ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد بوده است. واریته های برنج FL478 و IR29 به ترتیب به عنوان شاهد متحمل و حساس به شوری همراه با والدین و لاین ها مورد مطالعه قرار گرفتند. این آزمایش در فیتوترون موسسه بین المللی تحقیقات برنج- فیلیپین در دو تکرار اجرا گردید. ارزیابی گیاهچه ها از نظر تحمل به شوری طی دو مرحله - ۱۵ و ۲۲ روز پس از تیمار شوری- و با استفاده از سیستم ارزیابی استاندارد (International Rice Research Institute, 2002) انجام گرفت. ریشه و اندام هوایی گیاهچه های ارزیابی شده از هم جدا و وزن تر با ترازوی حساس توزین گردید. برای

مرحله نخست تجزیه با دو روش مکان‌یابی فاصله‌ای (Interval Mapping) و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (Composite Interval Mapping) به طور جداگانه انجام شد. در مرحله بعد فقط QTL‌هایی که با هر دو روش دارای آستانه (threshold) یا LOD (Logarithm of Odds) بزرگتر از ۴ بودند انتخاب گردیدند. سرعت پیمایش (Walk Speed) بر روی کروموزم‌ها برای محاسبه لینکاژ یک سانتی‌مورگان بود. برای تجزیه به روش CIM از رگرسیون جلوبر و مدل ۶ استفاده شد (Basten et al., 2001). برای ۱۱۴ نشانگر ریزماهواره که در والدین چندشکلی واضح نشان داده بودند نقشه لینکاژ به کمک نرم‌افزار Mapmaker تهیه شد. این نشانگرها کل ژنوم برنج را با ۱۶۹۲/۶ سانتی‌مورگان با متوسط فاصله ۱۶/۳ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور پوشش دادند. حداکثر طول گروه لینکاژ در کروموزم ۳ با ۲۳۱ سانتی‌مورگان و حداقل ۹۵/۳ سانتی‌مورگان در کروموزم ۱۲ بوده است. نسبت کل واریانس ژنوتیپی قابل توجه به وسیله هر QTL با معیار R^2 (نسبت واریانس ژنوتیپی هر QTL به واریانس ژنوتیپی صفت مورد مطالعه) برآورد گردید. نام‌گذاری QTL‌ها بر اساس مک‌کوچ و همکاران (McCouch et al., 1997) انجام شد.

شکل ۱ توزیع فراوانی صفات را در لاین‌های BC_2F_5 به همراه میانگین والدین نشان می‌دهد. همه صفات به استثنای ارزیابی تحمل به شوری دارای توزیع پیوسته و تقریباً نرمال بودند. برای همه صفات تفکیک متجاوز (Transgressive Segregation) مثبت و یا منفی مشاهده گردید. برای مقدار پتاسیم در اندام هوایی، وزن خشک ریشه و ارزیابی تحمل به شوری میانگین جمعیت دارای چولگی (Skewness) به سمت والد دوره‌ای بوده است. برای صفات نسبت سدیم به پتاسیم در ریشه و وزن

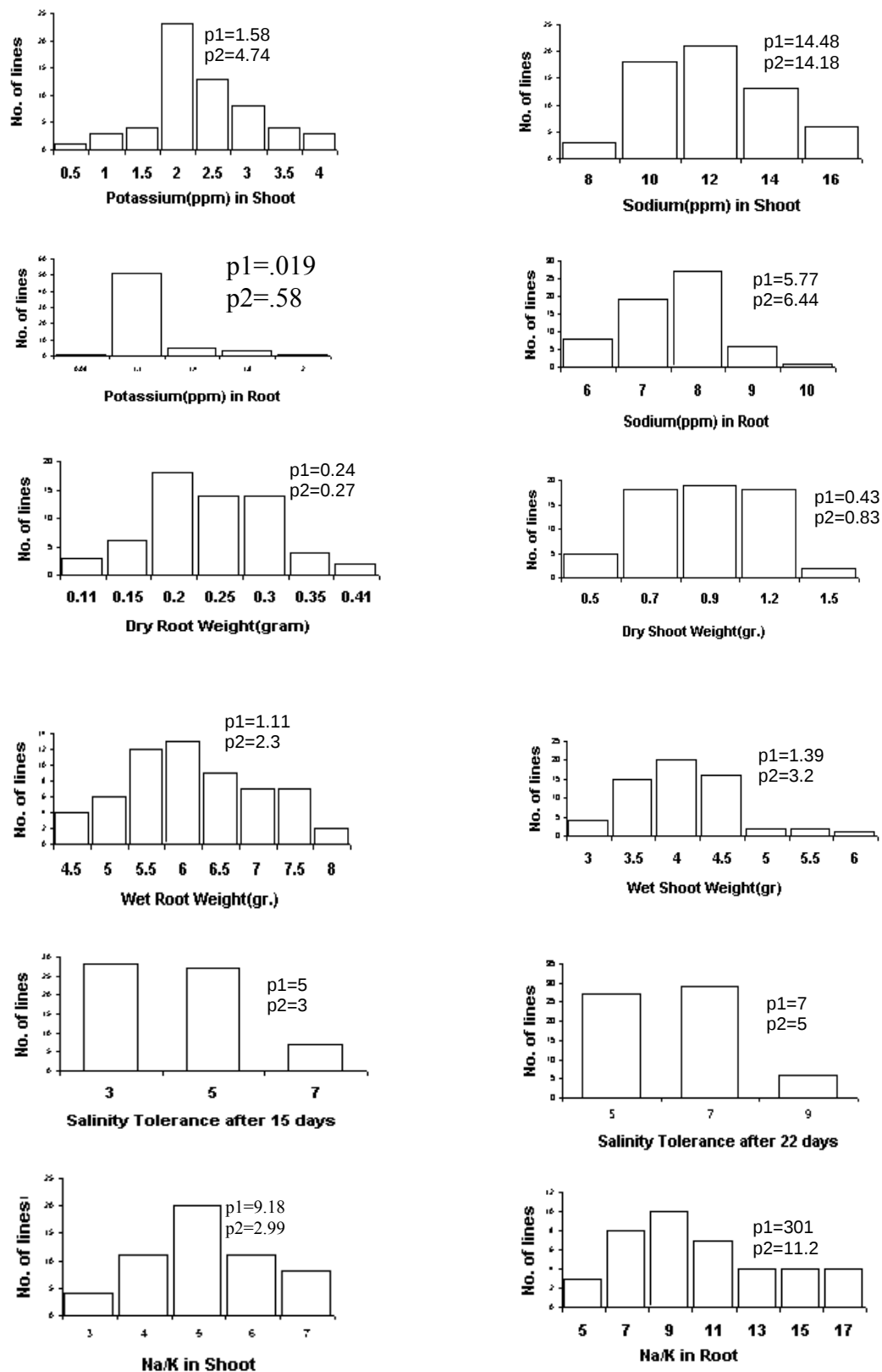
DNA

برای تهیه محلول PCR به حجم ۱۰ میکرولیتر، از دو میکرولیتر محلول DNA، ۴/۷۵ میکرولیتر آب مقطر، یک میکرولیتر بافر ۱۰x PCR، یک میکرولیتر dNTP، نیم میکرولیتر از هریک از آغازگرهای جلوبر (Forward) و عقب‌بر (Backward) و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم تک پلیمرز (Taq polymerase) استفاده گردید. برنامه ماشین PCR به شرح زیر تنظیم گردید: یک چرخه (cycle) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه (برای تعدادی از نشانگرها این دما ۶۱ و یا ۶۶ درجه سانتی‌گراد بوده است) دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و یک چرخه به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (Arif, 2002).

مطالعه چندشکلی در والدین (Parental Survey) با استفاده از ۲۳۵ نشانگر ریزماهواره و در ژل‌های پلی‌آکریل آمید ۵٪ و آگاروز ۳٪ انجام گرفت. تعداد ۷۲ نشانگر با ژل پلی‌آکریل آمید و ۴۲ نشانگر با ژل آگاروز الکتروفورز گردیدند. رنگ‌آمیزی ژل پلی‌آکریل آمید با نیترا ت نقره (Panaud et al., 1996) و رنگ‌آمیزی ژل آگاروز با اتیدیوم بروماید انجام گرفت (Arif, 2002). انتخاب نشانگر برای مطالعه چندشکلی در والدین بر اساس توزیع یکنواخت در سطح ژنوم و بررسی منابع انجام گرفت (Koyama et al., 2001; Lang et al., 2001a; Lang et al., 2001b).

QTL

محاسبه توزیع فراوانی صفات با نرم‌افزار Excel و محاسبه ضریب همبستگی فنوتیپی پیرسون با نرم‌افزار SPSS و تجزیه QTL به کمک نرم‌افزار QTL Cartographer V.2 انجام گرفت (Basten et al., 2001). شناسایی ژن‌ها یا QTL‌های صفات مرتبط با تحمل به شوری طی دو مرحله انجام گرفت. در



شکل ۱- توزیع فراوانی صفات مورد مطالعه در جمعیت BC_2F_5 . والد دوره‌ای IR64 با P_1 و والد دهنده با P_2 نشان داده شده‌اند. در صفت ارزیابی تحمل به شوری عدد ۳ تحمل و عدد ۹ حساسیت به شوری را نشان می‌دهد

Fig. 1. Frequency distribution of traits under study in BC_2F_5 population. The recurrent and donor parents demonstrated by p_1 and p_2

اختلاف در پتاسیم ریشه و در نتیجه در نسبت سدیم به پتاسیم ریشه حداکثر و در وزن خشک ریشه حداقل بوده است. با توجه به وجود تفکیک متجاوز قابل توجه در صفات مورد مطالعه می‌توان نسبت به شناسایی لاین‌های امیدبخش از نظر تحمل به شوری و در نتیجه به انتقال و هرمی کردن (pyramiding) ژن‌های مربوطه اقدام کرد.

جدول ۱ نتایج همبستگی فنوتیپی را بین صفات مورد مطالعه نشان می‌دهد. غلظت سدیم در ریشه و اندام هوایی دارای همبستگی معنی‌دار بودند و برای غلظت

خشک اندام هوایی چولگی به سمت والد دهنده (طارم مولایی) مشاهده شد. همه لاین‌های مورد مطالعه از نظر وزن تر ریشه مقادیر بزرگتری نسبت به والدین داشتند. نسبت سدیم به پتاسیم در ریشه والد دوره‌ای بسیار بزرگ بود که ناشی از ناچیز بودن غلظت پتاسیم در ریشه این واریته بوده است. والد دوره‌ای برای صفت پتاسیم در اندام هوایی دارای بیشترین مقدار بود. در همه صفات مورد مطالعه که از اجزاء فیزیولوژیکی تحمل به شوری هستند، والد دهنده در مقایسه با والد دوره‌ای IR64 دارای علائم تحمل بیشتر به شوری بود. و این

جدول ۱- ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مرتبط با تحمل به شوری در جمعیت BC₂F₅

Table 1. Phenotypic correlation coefficients among traits examined in BC₂F₅ population

a	Potassium in Shoot (KS)	NaS	KR	NaR	DSW	WRW	WSW	FS	FLS	NaS/ KS
Sodium in Shoot (NaS)	.23**									
Potassium in Root (KR)	.08	-.13								
Sodium in Root (NaR)	.07	-.2*	.23**							
Dry Root Weight (DRW)	.12	-.1	.04	.01						
Dry Shoot Weight (DSW)	.1	-.71**	.06	.4**	.35**					
Wet Root Weight (WRW)	.006	-.63**	.07	.38**	.29**	.89**				
Wet Shoot Weight (wsw)	.09	-.72**	.01	.39**	.32**	.97**	.89**			
Salinity Tolerance after 15 days (FS)	-.5	.63**	.08	-.36**	-.1	-.7**	-.67**	-.73**		
Salinity Tolerance after 22 days (FLS)	-.1	.67**	-.04	-.46**	-.14	-.7**	-.65**	-.74**	.65**	
NaS/KS	-.49**	.28**	-.18*	-.02	-.11	-.11	-.03	-.01	.004	.13
NaR/KR	.002	.18*	-.24**	-.11	-.18*	-.1	-.06	-.01	.03	.1
										.04

*, **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

* and **: Significant at 5% and 1% level of probability respectively.

a : KS و KR = به ترتیب غلظت پتاسیم در اندام هوایی و ریشه، NaS و NaR = به ترتیب غلظت سدیم در اندام هوایی و ریشه، DRW و DSW = به ترتیب وزن خشک ریشه و اندام هوایی، WRW و WSW = به ترتیب وزن تر ریشه و اندام هوایی، FS و FLS = به ترتیب ارزیابی ۱۵ و ۲۲ روزه در تیمار شوری در فیتوترون، NaS/KS = نسبت غلظت سدیم به پتاسیم در اندام هوایی، NaR/KR = نسبت غلظت سدیم به پتاسیم در ریشه،

بود زیرا با افزایش سدیم، اثرات سوء شوری از طریق کاهش رشد و خشک شدن برگ‌ها ظاهر می‌گردد. غلظت سدیم در اندام هوایی با نسبت سدیم به پتاسیم ریشه همبستگی معنی‌دار داشت و این ارتباط از طریق همبستگی معنی‌دار سدیم اندام هوایی با سدیم ریشه ایجاد شده است گرچه سدیم اندام هوایی با پتاسیم ریشه فاقد ارتباط معنی‌دار بود. پتاسیم ریشه با سدیم اندام هوایی ارتباط معنی‌دار نداشت ولی با نسبت سدیم اندام هوایی به پتاسیم اندام هوایی همبستگی داشت و این ارتباط می‌تواند از طریق سدیم ریشه باشد زیرا این صفت با سدیم اندام هوایی دارای همبستگی معنی‌دار بود. رابطه

پتاسیم این رابطه معنی‌دار نبوده است. غلظت‌های سدیم و پتاسیم هم در ریشه و هم در اندام هوایی با هم همبستگی معنی‌دار داشتند. غلظت سدیم در اندام هوایی با وزن تر اندام هوایی و ریشه ارتباط معنی‌دار داشت و جهت این ارتباط منفی بوده است. در حالی که این رابطه برای غلظت سدیم ریشه مثبت و معنی‌دار بود و این می‌تواند بدان معنی باشد که هر چه غلظت سدیم در اندام هوایی بیشتر می‌شود بدلیل کاهش فتوسنتز و مواد آلی از میزان وزن کاسته می‌شود. ارزیابی تحمل به شوری در فیتوترون با غلظت سدیم در ریشه و اندام هوایی دارای ارتباط معنی‌دار بود. این نتیجه مورد انتظار

جدول ۲- QTL‌های مکان‌یابی شده برای صفات مرتبط با تحمل به شوری در جمعیت BC₂F₅

Table 2. The QTLs detected for salinity tolerance traits in BC₂F₅ population

Traits	صفات	کروموزم Chromosome	فواصل نشانگر Marker interval b	QTL	LOD	R ² c	اثر افزایشی Additive effect
Potassium in shoot (KS)		1	<u>RM583</u> -M23	QKs1	4.1	21.8	-8
		8	RM25- <u>M339</u>	QKs8	5.7	20.9	13.7
Dry root weight (DRW)		5	<u>RM163</u> -M161	QDrw5	7.2	27.8	8.5
Dry shoot weight (DSW)		5	<u>RM163</u> -M161	QDsw5	7.2	23.7	8.5
Sodium-potassium ratio in shoot (NaS/KS)		7	<u>RM214</u> -RM11	QNas/Ks7	12.7	24.6	-18.5
		11	<u>RM287</u> -M229	QNas/Ks11	11.5	17.4	-12
Sodium-potassium ratio in root (NaR/KR)		1	<u>RM431</u> -M14	QNar/Kr1	6.2	7.3	60
		2	<u>RM71</u> -M300	QNar/Kr2	6.7	4.8	-64
		3	<u>RM16</u> -M203	QNar/Kr3	6.2	9.3	-58
		4	<u>RM261</u> -M273	QNar/Kr4	7.2	7.5	-54
		5	<u>RM289</u> -M163	QNar/Kr5	5.6	2.6	58
		6	<u>RM204</u> -M314	QNar/Kr6	7.7	1.5	-54
		7	<u>RM172</u> -M51	QNar/Kr7	6.6	25	-50
		8	<u>RM25</u> -M339	QNar/Kr8	8.9	28	67
		10	<u>RM474</u> -M216	QNar/Kr10	7.1	8.3	-75
		11	<u>RM287</u> -M229	QNar/Kr11	4.1	12.7	-58
		12	<u>RM247</u> -M313	QNar/Kr12	13.8	21.2	-69

a: KS = غلظت پتاسیم در اندام هوایی، DRW و DSW: به ترتیب وزن خشک ریشه و اندام هوایی، NaS/KS = نسبت غلظت سدیم به پتاسیم در اندام هوایی، NaR/KR = نسبت غلظت سدیم به پتاسیم در ریشه،

b: Underlined markers are more closer to QTL.

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

c: Phenotypic variance explained by each QTL.

c: واریانس فنوتیپی نسبت داده شده به هر QTL

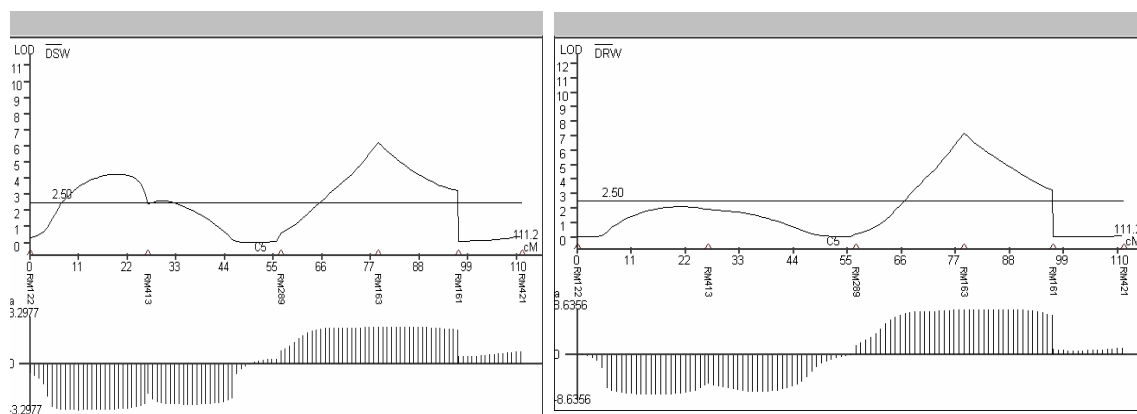
این QTLها در همه ۱۲ کروموزم برنج به استثنای کروموزم ۹ حضور داشتند و بخش قابل توجهی از واریانس ژنوتیپی برای صفات اندازه‌گیری شده در جمعیت مورد مطالعه به آن‌ها نسبت داده شد.

بزرگترین LOD در صفت نسبت سدیم به پتاسیم ریشه با مقدار ۱۳/۸ مشاهده شد که QTL مربوطه در کروموزم ۱۲ قرار داشت و توانست ۲۱/۲ درصد واریانس ژنوتیپی صفت را به خود نسبت دهد. این QTL بر صفت فوق اثر کاهشی داشت و لذا می‌تواند برای تحمل به شوری مفید باشد. البته در تجزیه به روش CIM بزرگترین LOD در صفت نسبت سدیم به پتاسیم اندام هوایی مشاهده گردید. این QTL در کروموزم ۲ قرار داشت و مقدار LOD آن بزرگتر از ۱۴ بوده است. یک QTL مشترک برای وزن خشک ریشه و وزن خشک اندام هوایی که در کروموزم ۵ قرار داشت از طریق نشانگر RM163 شناسایی گردید. این QTL با اثر افزایشی ۸/۵ باعث افزایش مقدار در صفات فوق می‌گردد. در شکل ۲ موقعیت این QTL در کروموزم ۵ نشان داده شده است.

معنی‌دار ارزیابی‌های تحمل به شوری در تیمار شوری ۱۵ و ۲۲ روزه ($R^2 = 0.65^{**}$) و همسویی واکنش آن‌ها با سایر صفات می‌تواند مؤید استفاده از تیمار شوری ۱۵ روزه به جای ۲۲ روزه باشد که در این صورت در میزان مصرف امکانات و زمان اخیر ارتباط معنی‌دار صرفه‌جویی خواهد شد. پتاسیم ریشه با پتاسیم و سدیم اندام هوایی همبستگی نداشت ولی با نسبت دو صفت همبستگی نشان داد و این رابطه می‌تواند از طریق سدیم ریشه تحقق پیدا کند زیرا سدیم ریشه و سدیم اندام هوایی دارای همبستگی معنی‌دار بودند.

QTL -

در جدول ۲ QTLهای مکان‌یابی شده برای صفات مرتبط با تحمل به شوری در جمعیت مورد مطالعه به همراه موقعیت QTLها در کروموزم، LOD، نسبت واریانس ژنوتیپی و اثر افزایشی ارائه شده است. همه این QTLها دارای اثرات افزایشی (additive) و فاقد اثر غالبیت و اپیستازی بودند. لاین‌های مورد مطالعه تقریباً خالص هستند و لذا اثرات ژنتیکی از نوع افزایشی است.



شکل ۲- موقعیت نشانگر RM163 در کروموزم ۵ که با QTL وزن خشک ریشه ارتباط معنی‌دار دارد

Fig. 2. Location of RM163 in chromosome 5 linked to QTL for Dry root weight

سدیم اندام هوایی و سدیم ریشه در روش IM هیچ QTL مشاهده نشد در حالی که در روش CIM برای

بین روش‌های CIM و IM از نظر ارائه QTL تفاوت‌هایی مشاهده گردید. برای مثال برای صفات

صفات فوق QTL به دست آمد. در هر دو روش برای نسبت سدیم به پتاسیم ریشه در همه کروموزم‌ها باستانی کروموزم ۹، QTL به دست آمد. برای سدیم و پتاسیم ریشه گرچه هیچ QTLی به دست نیامد ولی برای نسبت این دو تعداد QTLهای به دست آمده قابل توجه است. برای پتاسیم اندام هوایی دو QTL که در کروموزم‌های ۱ و ۸ قرار داشتند به دست آمد که اولی دارای اثر افزایشی منفی و دیگری دارای اثر افزایشی مثبت بود. نوع مثبت باعث افزایش پتاسیم در اندام هوایی می‌شود که برای اصلاح تحمل به شوری مفید است. برای نسبت سدیم به پتاسیم اندام هوایی یک QTL به دست آمد که در کروموزم ۱۱ قرار داشت و دارای اثر افزایشی منفی بوده است. این QTL نیز برای تحمل به شوری مفید است. برای صفت مورد مطالعه در کروموزم ۹ هیچگونه QTLی به دست نیامد. کویاما و همکاران (Koyama et al., 2001) با نشانگر RFLP توانستند برای غلظت پتاسیم در اندام هوایی در کروموزم یک QTL پیدا کنند. در این تحقیق نیز در این کروموزم برای صفت فوق QTL به دست آمد که ممکن است در همان مکان واقع باشد.

QTLهای ارایه شده در جدول ۲ دارای $LOD > 4$ هستند. برای این صفات و تعداد دیگری از صفات نیز QTL با LOD کمتر از ۴ و بزرگتر از ۲/۵ به دست آمد که در جدول ارائه نشده‌اند. به عبارت دیگر نتایج به دست آمده حالت پلی‌ژن بودن صفات مورد مطالعه را مورد تأیید قرار می‌دهد و این حالت برای صفت نسبت سدیم به پتاسیم ریشه بسیار معنی‌دار است و برای این صفت تعداد قابل توجهی QTL به دست آمد.

لانگ و همکاران (Lang et al., 2001b) توانستند برای نسبت سدیم به پتاسیم اندام هوایی در کروموزم ۷ از طریق نشانگر RM214 یک QTL شناسایی کنند. در این تحقیق نیز ما توانستیم برای نسبت سدیم به پتاسیم اندام هوایی این QTL را با $LOD = 12/7$ شناسایی کنیم

که توانست بیش از ۲۴/۶ درصد واریانس ژنوتیپی را به خود نسبت دهد. فلاورز و یئو (Flowers and Yeo, 1995) با نشانگر AFLP توانستند در کروموزم ۴ برای نسبت سدیم به پتاسیم یک QTL شناسایی کنند. ما هم در این تحقیق برای نسبت سدیم به پتاسیم در ریشه و اندام هوایی توانستیم QTL پیدا کنیم که احتمالاً ممکن است این دو QTL مشابه باشند. کویاما و همکاران (Koyama et al., 2001) توانستند با نشانگر RM261 برای نسبت سدیم به پتاسیم در کروموزم ۴ یک QTL پیدا کنند. ما هم توانستیم در این جمعیت با این نشانگر یک QTL برای نسبت سدیم به پتاسیم ریشه شناسایی کنیم که دارای $LOD > 7/1$ بود و حدود ۷/۵ درصد واریانس ژنوتیپی صفت فوق به این QTL نسبت داده شد و همچنین دارای اثر افزایشی منفی بود و از این رو می‌تواند برای اصلاح تحمل به شوری به ویژه در هرمی کردن مورد استفاده قرار گیرد. گریگوریو (Gregorio, 1997) نیز توانست با نشانگر AFLP برای نسبت سدیم به پتاسیم سه QTL در کروموزم‌های یک، ۱۰ و ۱۲ مکان‌یابی کند. ما هم در این تحقیق برای صفت فوق توانستیم در کروموزم‌های یاد شده QTL پیدا کنیم که ممکن است با نتایج گریگوریو مشابه باشند.

گرچه در جمعیت مورد مطالعه نشانگرهای به کار رفته کل ژنوم برنج را پوشش دادند ولی در بعضی نقاط و در بعضی از کروموزم‌ها مثل کروموزم‌های ۱، ۶، ۷ و ۱۲ در مناطقی به دلیل فقدان چندشکلی بین والدین از نظر آغازگرهای این نواحی، این پوشش کامل نبوده است. برونسانی و همکاران (Brondani et al., 2001) و همچنین عارف (Arif, 2002) در کروموزم‌های ۱، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۱۰ چندشکلی کمتر از میزان مورد انتظار مشاهده کردند. تولید و استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بیشتر (McCouch et al., 1997; Temnykh et al., 2001) برای افزایش تعداد نشانگرهای مکان‌یابی شده در همه کروموزم‌ها مفید خواهد بود و همچنین دقت مکان‌یابی QTL را تسهیل خواهد کرد.

انتقال QTL‌های مؤثر در این تحقیق بدرون یک زمینۀ ژنتیکی مناسب به کمک نشانگر
(Marker aided introgression) می‌تواند روش خوبی در اصلاح تحمل به شوری در برنج باشد.

References

- Akagi, H., Y. Yokozeki, A. Inagaki and T. Fujimura. 1996.** Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1071-1077.
- Akagi, H., Y. Yokozeki, A. Inagaki and T. Fujimura. 1997.** Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theor. Appl. Genet.* 94: 61-67.
- Ansari, R., A. Shereen, T.J. Flowers and A. R. Yeo. 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.). PhD thesis. University of Philippines in Los Banos. Philippines.
- Basten, C. J., B. S. Weir and Z. B. Zeng. 2001.** QTL cartographer, version 1.15. Department of statistics, North carolina state university. Raleigh, NC. USA.
- Brondani, C., R. P. V. Brondani, P. H. N. Rangel and M. E. Ferreira. 2001.** Development and mapping of *Oryza glumaepatula* derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *Oryza sativa*. *Hereditas* 134: 59-71.
- Chen, X., S. Temnykh, Y. Xu, Y. G. Cho and S. R. McCouch. 1997.** Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice. *Theor. Appl. Genet.* 95: 553-567.
- Flowers, T. J. and A. R. Yeo. 1995.** Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Aust. J. Plant Physiology.* 22: 875-884.
- Flowers, T. J., M. L. Koyama, S. A. Flowers, C. Sudhakar, K. P. Singh and A. R. Yeo. 2000.** QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. *Journal of Experimental Botany.* 51: 99-106.
- Gong, J. M., P. He, Q. A. Qian, L. S. Shen, L. H. Zhu and S. Y. Chen. 1999.** Identification of salt-tolerance QTL in rice. *Chin. Sci. Bull.* 4: 68-71.
- Gregorio, G. B. 1997.** Tagging salinity tolerance genes in rice using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). PhD thesis. University of Philippines in Los Banos.
- Gregorio G. B. and D. Senadhira. 1993.** Genetic analysis of salinity tolerance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 86: 333-338.
- Gregorio, G. B., D. Senadhira and RD. Mendoza. 1997.** Screening rice for salinity tolerance. IRRI Discussion paper series No. 22. International Rice Research Institute. Philippines.
- Gregorio, G. B., D. Senadhira and R. D. Mendoza. 2002.** Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice. *Field Crop Research.* 79: 91-101.
- International Rice Research Institute. 2002.** Standard Evaluation System for rice (SES). International Rice Research Institute. Philippines. 56 pages.

- Jansen, R. C. and P. Stam. 1994.** High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455.
- Kearsey, M.J. and A.G.L. Farquhar. 1998.** QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity* 80: 137-142.
- Kearsey, M. J. and V. Hyne. 1994.** QTL analysis: a simple marker-regression approach. *Theor. Appl. Genet.* 89: 698-702.
- Koyama, M. L., A. Levesley, R. M. D. Koebner, T. J. Flowers and A.R. Yeo. 2001.** Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. *Plant Physiology* 125: 406-422.
- Lang, N. T., S. Yanagihara, and B. C. Buu. 2001a.** A microsatellite marker for a gene contributing salt tolerance on rice at the vegetative and reproductive stages. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 33: 1-10.
- Lang, N. T., S. Yanagihara, and B. C. Buu. 2001b.** QTL analysis of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*. 33: 11-20.
- Lee, K. S. 1995.** Variability and genetics of salt tolerance in japonica rice. PhD thesis. University of Philippines, Los Banos. Philippines.
- Lee, K. S., D. Senadhira and G. B. Gregorio. 1996.** Genetic analysis of salinity tolerance in japonica rice. *SABRAO Journal of Breeding and Genetic* 28: 7-13.
- McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xiang, Q. Zhang, I. Kano, M. Yano, R.F. Jellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Wave and L. Stein. 2002.** Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 9: 199-207 and 257-279.
- McCouch, S. R., Y. G. Cho, M. Yano, E. Paul, and M. Blinstrub. 1997.** Report on QTL nomenclature. *Rice Genetic Newsletter*. 14: 11-13.
- Mishra, B., M. Akba and D. V. Seshu. 1990.** Genetic studies on salinity tolerance in rice towards better productivity in salt-affected soils. Proceeding of the paper presented at the rice research seminar. July, 12. International Rice Research Institute. Philippines.
- Moncada, P., C. P. Martinez, J. Borrero, M. Chatel, H. Gauch, E. Guimaraes, J. Tohme, and S.R. McCouch. 2001.** Quantitative trait loci for yield and yield components in an *Oryza sativa* x *Oryza rufipogon* BC₂F₂ population evaluated in an upland environment. *Theor. Appl. Genet.* 102: 41-52.
- Moradi, F. 2002.** Physiological characterization of rice cultivars for salinity tolerance during vegetative and reproductive stages. PhD thesis. University of Philippines, Los Banos. Philippines.
- Mori, I. and T. Kinoshita. 1987.** Salt tolerance of rice callus clones. *Rice Genetic Newsletter* 4: 112-113.
- Olufowote, J. O., Y. Xu, X. Chen, W. O. Park, H.M. Beachell, R. H. Dilday, M. Goto, and S. R. McCouch. 1997.** Comparative evaluation of within cultivar variation of rice using microsatellite and RFLP markers. *Genome* 40: 370-378.
- Panaud, O., X. Chen and S. R. McCouch. 1996.** Development microsatellite markers and characterization of Simple Sequence Length Polymorphism (SSR) in rice. *Mol. Gen. Genet.* 252: 597-607.
- 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, S. R., P. G. Bagali, S. Hiltalmani and H. E. Shashidhar. 2000.** Molecular mapping of quantitative trait loci associated with seedling tolerance to salt stress in rice. *Curr. Sci.* 78: 162-164.
- Shannon, M. C. 1984.** Breeding, selection and the genetics of salt tolerance. In: Staples, R. CR and G.H. Toenniessen (eds.). *Salinity tolerance in plants*. Johan willey and Sons. pp: 231-254.
- Shehata, I. S. M. 1995.** Genetic studies on salt and drought tolerance in rice. PhD thesis. Zagazig university. Egypt.
- Temnykh, S., G. DeClerk, A. Lukashova, N. Lipovich, S. Cartinhour, and S. R. McCouch. 2001.** Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa L.*): frequency, length variation, transposon associations, and genetic. *Genome Research* 11 (8): 1441-1452.
- Yang, G. P., M. A. Saghai Maroof, C. G. Xu, Q. Zhang and R. M. Biyashew. 1994.** Comparative analysis of microsatellited DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol. Gen. Genet.* 245: 187-194.
- Yeo, A. R. and T. J. Flowers. 1986.** Salinity resistance in rice and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust. Journal of Plant Physiology* 13: 161-173.
- Zhang, G. Y., Y. Guo, S. L. Chen and S. Y. Chen. 1995.** RFLP tagging of a salt tolerance gene in rice. *Plant Science* 110: 227-234.

QTL mapping of genes affecting salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite markers

Fotokian¹, M., A. Taleie², B. Ghareyazie³, K. Postini⁴,
A. A. Shahnejat Bushehri⁵ and Z-k. Li⁶

ABSTRACT

Rice is moderately sensitive to salinity. Salinity affects virtually all aspects of rice growth in varying degree at all stages from germination through maturity. Tolerance to salinity is genetically and physiologically complicated and inherited quantitatively. Application of molecular-marker aided selection technique for improvement of salinity tolerance would accelerate breeding progress by increasing selection efficiency. In order to map the Quantitative Trait Loci (QTLs) for salinity tolerance in rice and determine the contribution of each QTL in phenotypic variation, 63 advanced backcross lines (BC₂F₃) derived from a cross between IR64 as recurrent parent and Tarom Molaii as donor parent, were used. The phenotypic traits under study included: Sodium(Na) and Potassium(K) concentration in root and shoot, dry and wet weight of root and shoot, Na⁺:K⁺ ratio in root and shoot. Polymorphism between the two parents was assessed using 235 SSR markers with uniform coverage on all 12 linkage groups, through which 114 markers showed polymorphism and assigned for genotyping. The map length was 1692.6 cM with an average interval size of 16.3 cM. Transgressive segregation was observed for all traits. We found QTLs with additive effects for K⁺ in shoot, dry weight of root and shoot, Na⁺:K⁺ ratio in root and shoot. At least one QTL was mapped for Na⁺:K⁺ ratio in root, on all chromosomes except chromosome 9. All detected QTLs had significant threshold (LOD>4) and also approved by both IM and CIM methods.

Key words: Rice (*Oryza sativa* L.), Salinity tolerance, Microsatellite, QTL, Na:K ratio, Transgressive segregation.

Received: September, 2003

1- Scientific board member of shahed University, Iran

3- Scientific board member of Agrcultural Biotechnology Research Institute Iran

2 , 4 and 5- Scientific board member g the University of Tehran, Iran