

شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده مؤلفه‌های جوانه‌زنی در جمعیت لاین‌های نوترکیب برنج ایرانی (*Oryza sativa* L.) تحت شرایط مختلف تنش اسمتیک

حسین صبوری^{۱*}، شریفه محمدآلق^۲، عباس بیابانی^۳، احمدرضا دادرس^۴، عاطفه صبوری^۵، مهناز کاتوزی^۶، محبوبه نجارعمیم^۷، ماهم پیراسته^۸، رسول خاتمی‌نژاد^۹

۱، ۲، ۳، دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس، ۴، ۵، ۷، دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، ۶، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۸، دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ساری، ۹، کارشناس ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۲۳)

Identification of Quantitative Trait Loci related to germination parameters In Rice (*Oryza sativa* L.) Recombinant Inbred Lines under Different Osmotic Stresses

Hossein Sabouri^{1*}, Sharifeh Mohammad Alegh², Abbas Biabani³, Ahmad-Reza Dadras⁴, Atefeh Sabouri⁵, Mahnaz Katouzi⁶, Mahboubeh Najjar Ajam⁷, Maham Pirasteh⁸, Rasoul Khatami Nejad⁹

1, 2, 3, Associate Professor, M.Sc. Student of Biotechnology and Associate Professor, Department of Plant Production, College of Agriculture Science and Natural Resource, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran, 4, 5, 7, Ph.D. Student of Plant Breeding, Assistant Professor, M.Sc. Student, Department of Agronomy & Plant Breeding, University of Guilan, Rasht, Iran, 6, Former M.Sc. student in Plant Breeding, Gorgan Agriculture Sciences and Natural Resource University, Gorgan, Iran. 8. M.Sc. Student of Plant Breeding, Department of Agronomy & Plant Breeding, University of Sari, Sari, Iran, 9, M.Sc. Animal Science, College of Agriculture Science and Natural Resource, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

(Received: Dec. 26, 2014 - Accepted: Mar. 14, 2015)

Abstract

Osmotic stress (such as drought stress) is a serious limiting factor to rice production and yield stability in worldwide. In order to locate the QTL associated with tolerance to osmotic stresses in germination stage and determine the contribution of each QTL on the phenotypic variation caused 96 lines of F8 Anbarboo × Sepeedrud (tolerant and sensitive to drought stress in germination stage, respectively) an experiment was conducted at Gonbad Kavous university in 2011-2013. For construction of genetic linkage map, 365 SSR marker and 32 primer combination were evaluated. 136 polymorphic SSR markers and 21 primer combination were used for providing of linkage map. Germination components including root length, shoot, coleoptile and the percentage of seed germination was recorded for 100 seed of each line in the osmotic stress resulting from sucrose, sorbitol and mannitol. For root length in all three stress conditions was found a QTL on chromosome 4 that had positive effect in all cases. Among the identified QTL, qSUC-5 (QTL for coleoptile length under sucrose stress) on chromosome 5, qSUR-2 (QTL for radicle length under sucrose stress) on chromosome 2 and qSUR-4 (QTL for radicle length under sucrose stress) on chromosome 4, respectively, 23, 23 and 26% of phenotypic variation for coleoptile and root length were justified in terms of osmotic stress. This QTL explained that due to the high percentage of candidates for marker-assisted selection programs recombinant line population of Iranian rice.

Keywords: Rice (*Oryza sativa* L.), Germination, QTL, Major effect.

چکیده

تنش‌های اسمتیک از جمله خشکی در برنج یکی از جدی‌ترین عامل‌های تولید و پایداری عملکرد در جهان می‌باشد. به منظور مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با تحمل به تنش‌های اسمتیک در مرحله جوانه‌زنی و تعیین سهم هر QTL در تنوع فنوتیپی صفات ۹۶ لاین نسل هشتم تلاقی ارقام عنبربو × سپیدرود (به ترتیب متحمل و حساس به تنش خشکی در مرحله جوانه‌زنی) در دانشگاه گنبد کاووس طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. برای تشکیل نقشه پیوستگی، چند شکلی ۳۶۵ جفت آغازگر SSR و ۳۵ ترکیب پرایمری AFLP روی والدین مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۳۶ نشانگر SSR و ۲۱ ترکیب پرایمری چند شکل برای تهیه نقشه پیوستگی استفاده شد. مؤلفه‌های جوانه‌زنی شامل طول ریشه‌چه، ساقه‌چه، کلئوپتیل و درصد جوانه‌زنی روی ۱۰۰ بذر هر لاین در شرایط تنش اسمتیک ۵ بار حاصل از ساکارز، سوربیتول و مانیتول ثبت شد. برای طول ریشه‌چه در هر سه شرایط تنش روی کروموزوم ۴، QTL‌هایی یافت شد که اثر افزایشی آن در همه موارد مثبت بود. از بین QTL‌های شناسایی شده qSUC-5 (طول کلئوپتیل در تنش حاصل از ساکارز) روی کروموزوم ۵، qSUR-2 (طول ریشه‌چه در تنش حاصل از ساکارز) روی کروموزوم ۲ و qSUR-4 (طول ریشه‌چه در تنش حاصل از ساکارز) روی کروموزوم ۴ به ترتیب ۲۳، ۲۳ و ۲۶ درصد تغییرات فنوتیپی طول کلئوپتیل و طول ریشه‌چه را در شرایط تنش اسمتیک توجیه نمودند. این QTL‌ها به دلیل بالا بودن درصد توجیه پس از تعیین اعتبار، کاندید مناسبی برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر در جمعیت لاین‌های نوترکیب برنج ایرانی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: برنج (*Oryza sativa* L.)، جوانه‌زنی، مکان‌یابی، تنش اسمتیک.

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی در سطح جهان است و به عنوان غذای اصلی برای بیش از نیمی از جمعیت جهان محسوب می‌شود (Dowling *et al.*, 1998). از مشکلات عمده کشت و تولید برنج کمبود منابع آب است به خصوص در زمانی که بارندگی کم باشد (Fukai *et al.*, 1999). در سراسر جهان وسعت زمین‌های زیر کشت برنج و تحت آبیاری ۸۰ میلیون هکتار است که حدود ۷۵ درصد از برنج دنیا را تولید می‌کنند و ۶۰ میلیون هکتار از زمین‌های زراعی تحت کشت نیز بدون آبیاری بوده و تقریباً ۲۰ درصد تولید را به خود اختصاص داده است. در مقایسه با سایر گیاهان برنج به آب بیشتری نیاز دارد به طوری که به طور متوسط ۲۵۰۰ لیتر آب برای تولید یک کیلوگرم شلتوک نیاز است (Bouman, 2009). خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محدود کننده تولید برنج در اکوسیستم‌های گرمسیری و آپلند است (Bimpong *et al.*, 2011) و حدود ۲۷ میلیون هکتار از زمین‌های جهان دارای این نوع اکوسیستم هستند (IRRI, 2001). برای حدود ۳۴ درصد (۵۴ میلیون هکتار) از کل زمین‌های زیر کشت برنج آبیاری انجام نمی‌شود (Yoichi *et al.*, 2002; Maclean *et al.*, 2011; ۳۲/۱ درصد زمین‌های دیم جهان، زیر کشت برنج بوده و میانگین تولید در این زمین‌ها ۲/۳ تن در هکتار است (Tuong & Bouman, 2003). جوانه‌زنی بذر یکی از مراحل زیستی و تعیین‌کننده در چرخه رشد گونه‌های گیاهی است برای اینکه تضمین کننده استقرار موفق گیاه و عملکرد نهایی آن است (Hejazi & Kaffashi Sedghi, 2000). یکی از عواملی که بر جوانه‌زنی بذر اثر می‌گذارد، تنش اسمزی می‌باشد. این نوع تنش‌ها سرعت جوانه‌زنی را کاهش می‌دهند و در تنش‌هایی با شدت بالا علاوه بر جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند (Shah *et al.*, 2000). در شرایط مطلوب

جوانه‌زنی، بیشتر دانه‌های برنج در طی ۲-۵ روز جوانه می‌زنند اما در شرایط تنش بسته به شدت و طول مدت تنش جوانه‌زنی به تأخیر می‌افتد یا به طور کامل مهار می‌شود (Reddy & Vajaranabhiah, 1993; Choi *et al.*, 2000).

برخی از 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 و موجب آماس سلولی شوند. این فرایندها به تنظیم اسمزی معروف است که حساسیت گیاهان به آن با تغییر غلظت نمک تغییر می‌کند (Shanon *et al.*, 1987). گیاهان عالی، تنظیم اسمزی سیتوپلاسم را از طریق تجمع ترکیبات آلی کوچک مثل مانیتول، پینیتول، سوربیتول، پرولین، گلیسین بتائین، پلی آمین و سایر مواد ایجاد کننده اسمز انجام می‌دهند که در واکنش‌های بیوشیمیایی سلول اختلال ایجاد نمی‌کنند و موجب حفظ تعادل اسمزی و ادامه جذب آب و حفظ غشاء ساختارهای سلولی، ترکیبات پروتئینی و آنزیمی می‌شوند (Kafi *et al.*, 2004; Sairam & Aruna, 2004). تنظیم اسمزی از طریق ترکیبات آلی نیازمند صرف انرژی است که در حالت عدم حضور تنش می‌تواند به صرف رشد برسد، از این رو گیاه با کاهش رشد روبرو است (Kadda, 1963).

بکارگیری تکنولوژی نشانگرهای مولکولی کارایی و دقت برنامه‌های اصلاحی را بهبود بخشیده است (Kaushik *et al.*, 2003). مکان‌یابی QTL جزء ژنتیک پیشرو محسوب می‌شود (Angaji, 2009) و راه‌کاری است که قدرت شناسایی و دست‌کاری ژن‌های مربوط به صفات کمی پیچیده را میسر می‌سازد (McCouch & Doerge, 1995).

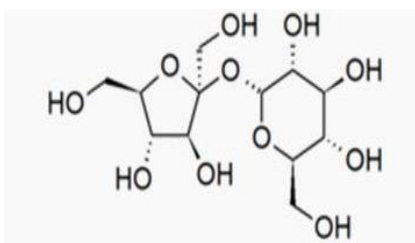
احتمالاً نشان دهنده پایداری این QTL ها و عدم تأثیرپذیری آن‌ها از شرایط محیطی بود. علاوه بر آن، هم‌مکانی QTL های qSKC-1 و qRL/SL در مرحله گیاهچه‌ای با QTL های مرتبط با صفات مربوط به جوانه‌زنی بیانگر کنترل ژنتیکی یکسان این صفات در مراحل جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای بود. آنها بیان نمودند که موقعیت بیشتر QTL های متحمل به شوری بسیار نزدیک به QTL های مرتبط با تحمل به خشکی بودند که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی این باشد که تحمل به خشکی و شوری در برنج به وسیله ژن-های با اثرات پلیوتروپیک یا ژن‌های پیوسته کنترل می‌شوند. از این‌رو آن‌ها پیشنهاد کردند که اصلاح برنج برای تحمل به یکی از این تنش‌ها، نسبت به تنش دیگر نیز موفق باشد. به منظور بررسی رابطه بین طول کلئوپتیل و مقاومت به خشکی Hu و همکاران (۲۰۰۷) از ۲۱۳ نشانگر SSR و ۱۹۵ لاین خالص نو ترکیب که از تلاقی ارقام Zhenshan 97B و IRAT109 به دست آمده بودند، استفاده کردند. آن‌ها اظهار داشتند که یک رابطه مثبت بین شاخص مقاومت به خشکی و طول کلئوپتیل در شرایط تنش خشکی وجود دارد.

در مطالعه‌ای Sabouri و همکاران (۲۰۱۰) به منظور مکان‌یابی QTL های کنترل کننده قدرت جوانه‌زنی بذر تحت تنش اسمتیک ناشی از سوربیتول با استفاده از ۱۹۲ فرد F_2 حاصل از تلاقی ارقام طارم محلی و خزر و ۷۴ نشانگر SSR انجام دادند توانستند نقشه پیوستگی که حدود ۱۲۳۱/۵۰ سانتی‌مورگان از کل ژنوم برنج را پوشش می‌داد، تهیه نمایند. QTL های مرتبط با سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه را در شرایط تنش اسمتیک حاصل از سوربیتول در ارقام برنج ایرانی روی کروموزوم ۱ در جمعیت F_2 شناسایی کردند. در مطالعه دیگری که Sabouri و همکاران (۲۰۱۲) در جمعیت $F_2:3$ انجام دادند ۳۲ QTL برای هشت صفت طول ساقه‌چه، طول کلئوپتیل، طول ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه،

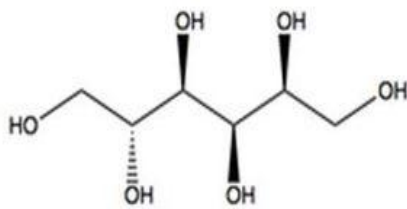
مطالعات مختلفی در زمینه تعیین مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات جوانه‌زنی در برنج انجام شده است. با توجه به پژوهشی که توسط Mardani و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از جمعیت $F_{2:4}$ و تلاقی رقم متحمل به خشکی غریب با رقم حساس به خشکی سپیدرود برای شناسایی و مقایسه QTL های مرتبط با جوانه‌زنی در شرایط تنش و بدون تنش مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۳۲ QTL در شرایط تنش و نه QTL در شرایط بدون تنش برای صفات سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه، طول کلئوریز و طول ساقه مشاهده شد. که تعداد QTL های شناسایی شده در شرایط بدون تنش در صفات طول کلئوریز و سرعت جوانه‌زنی به ترتیب ۲۱/۸۲٪ و ۱۹/۳۷٪ تنوع صفات را توجیه کرد و QTL های شناسایی شده در شرایط تنش مربوط به صفات طول کلئوریز و طول ساقه‌چه به ترتیب ۱۸/۳۴٪ و ۱۸/۲۲٪ صفات را توجیه کرد. QTL های بزرگ اثر مانند qGR-1، qGP-4، qRL-12 در هر دو شرایط تنش به ترتیب سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه مشخص شد.

در مطالعه دیگری توسط Rabiei و همکاران (۲۰۱۳) با هدف شناسایی QTL های مرتبط با تحمل به شوری و خشکی در دو مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای با استفاده از جمعیت $F_{2:4}$ حاصل از تلاقی دو رقم غریب متحمل به شوری و خشکی) و سپیدرود (حساس به شوری و خشکی) و ۲۳۶ نشانگر انجام شد. در مجموع هفده QTL کنترل کننده صفات سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول کلئوپتیل و شاخص-های تحمل به خشکی و شوری در مرحله جوانه‌زنی تحت چهار شرایط مختلف شناسایی شد QTL های بزرگ اثر qSV-1 و qGR-1 در هر دو شرایط تحت تنش و عدم تنش شناسایی شدند که ظهور QTL های مذکور تحت دو شرایط مختلف آزمایشی

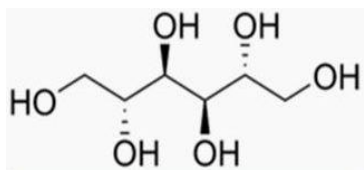
اسمزی و اثر یونی ویژه‌ای دارند که برای هر ماده این اثرات متفاوت خواهد بود. در این بررسی ساکارز با مانیتول و سوربیتول از نظر ترکیب شیمیایی متفاوت است ولی سوربیتول و مانیتول با توجه به اینکه جرم مولکولی هر دو یکسان می‌باشند اما اثر ویژه آنها به دلیل ساختار شیمیایی متفاوت با هم تفاوت دارد (شکل ۱). به عبارت دیگر ساختار شیمیایی و ترکیب شیمیایی آنها متفاوت می‌باشد. با توجه به اینکه این مولکول‌ها ساختار شیمیایی متفاوتی دارند میزان آب پوشی یا هیدراتاسیون و تاثیر آنها در پتانسیل آب و قدرت یونی متفاوت خواهد بود.



الف



ب



ج

شکل ۱- ساختار مولکولی مواد مورد استفاده برای اعمال تنش. الف- ساکارز، ب- سوربیتول و ج- مانیتول

در طبیعت نیز نوع خاک می‌تواند بر میزان پتانسیل کل آب در خاک (پتانسیل ماتریک و اسمزی)

وزن خشک کلئوپتیل، وزن خشک ریشه‌چه، درصد و سرعت جوانه‌زنی شناسایی کردند. نتایج نشان داد که اکثر QTL‌های ردیابی شده در جمعیت F₂ در جمعیت F_{2:3} ردیابی نشدند.

با توجه به محدودیت منابع آبی در کشور، معرفی شیوه‌هایی از کشت و آبیاری که میزان مصرف آب را کاهش دهد؛ بسیار ارزشمند بوده و کشت مستقیم برنج به روش خشکه‌کاری یکی از این روش‌ها است. روش خشکه‌کاری به عنوان یکی از شیوه‌های جایگزین کشت معمولی برنج در برخی از استان‌های کشور مانند استان خوزستان و گلستان قرار گرفته است. کشت برنج به روش خشکه‌کاری یکی از راه‌های غلبه بر کم آبی است که بر اثر خشکسالی سال‌های اخیر روی داده است. از مزایای استفاده از روش خشکه‌کاری برنج در شالیزارهای استان‌های مذکور، می‌توان کاهش مصرف انرژی و کاسته شدن از زحمت کشاورز نسبت به روش تهیه خزانه و کاهش ۴۰ درصدی هزینه‌ها، یکنواختی در سبز شدن مزرعه و رسیدن محصول، امکان استفاده از کمباین برای برداشت و نیز کاشت مستقیم در سطح وسیع و با سرعت بالا و جلوگیری از هدر رفتن کود و افزایش اکسیژن خاک و کاهش ترکیبات سمی خاک و افزایش آزادسازی آمونیوم و کاهش بیماری‌ها، حشرات و خم‌شدن ساقه برنج و کاهش مصرف حشره‌کش‌های آلوده‌کننده آب و خاک و کاهش نیاز به انرژی و اجرای آسان مدیریت مزرعه، استفاده بهتر از نهاده‌ها به دلیل عمق کشت مناسب و تراکم یکنواخت و کاهش ۵۰٪ میزان مصرف بذر در واحد سطح را ذکر نمود (Habibi Asl et al., 2010). استفاده از ارقام دارای قدرت جوانه‌زنی بالا در روش کشت خشکه‌کاری بویژه در نواحی گرمسیری که با تنش خشکی مواجه هستند، امری ضروری است. برای اعمال تنش‌ها و شبیه‌سازی شرایط مختلف تنش‌های غیر زیستی از مواد معدنی و آلی مختلفی استفاده می‌شود. مواد مورد استفاده در این راستا اثر

نمونه‌های DNA به کمک DNA فایز لامبدا با غلظت مشخص صورت گرفت و کیفیت نمونه‌های DNA از نحوه تشکیل نوارها مشخص گردید. نشانگرهای مورد استفاده در پژوهش SSR و AFLP بود و برای تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار Map Manager (Manly and Olson, 1999) استفاده شد. برای تهیه نقشه از تابع کوزامبی (Kosambi, 1944) استفاده شد. حد آستانه LOD برای تهیه نقشه لینکاژی ۲ در نظر گرفته شد.

نشانگرهای ریزماهوره

آغازگرهای مورد استفاده از نقشه‌های ژنتیکی ارائه شده توسط Chen و همکاران (۱۹۹۷)، Temnykh و همکاران (۲۰۰۰) و McCouch و همکاران (۲۰۰۲) انتخاب شدند. به منظور تشخیص نشانگرهای چندشکل، ابتدا واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تنها برای DNA والدینی (عنبربو و سپیدرود) برای ۳۶۵ جفت آغازگر انجام شد. از این تعداد ۱۳۶ آغازگر چندشکل تشخیص داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌های DNA لاین‌های نوترکیب با استفاده از ۱۲۴ آغازگر چندشکل که نواربندی واضح‌تری داشتند، تکثیر شدند. واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۲ نانوگرم از DNA الگو، ۰/۴ میکرومول بر لیتر برای هر آغازگر، ۱/۲ میلی مول بر لیتر برای dNTP، ۱/۶ میلی مول بر لیتر برای $MgCl_2$ ، ۰/۲ واحد از آنزیم Taq polymerase و ۱ میکرولیتر از بافر 10xPCR برای یک واکنش انجام شد. محصولات PCR روی ژل‌های توالی‌یاب ۶ درصد پلی‌اکریلامید ارزیابی شدند. توالی این آغازگرها در پایگاه اطلاعاتی گرامینه (<http://www.gramene.org>) قابل دسترس است.

نشانگرهای AFLP

روش AFLP مطابق روش Vos و همکاران (1995) با استفاده از ترکیبات آغازگری *EcoRI* و *MseI* انجام شد. پس از هضم DNA ژنومی با استفاده از آنزیم‌های

تاثیر داشته باشد. مثلاً در خاک رسی و خاک شنی هر چند که میزان رطوبت یکسان باشد اما میزان تنش ایجاد شده یا پتانسل کل اب ایجاد شده متفاوت خواهد بود. همچنین ساختار شیمیایی مختلف بر میزان هدایت الکتریکی ایجاد شده در اطراف آن‌ها اثر می‌گذارد و باعث تغییر قدرت یونی محلول‌ها می‌شود و قدرت یونی محلول در پتانسیل اسمزی آب یا پتانسل محلول‌ها تاثیر دارد (Alizadeh, 2011). در این راستا سعی شد تفاوت‌های موجود بین این مواد از نظر تاثیر آن‌ها بر ژن‌های کنترل کننده صفات مرتبط با جوانه‌زنی مورد بررسی قرار گیرد. هدف از اجرای این تحقیق مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با تحمل تنش اسمتیک در مرحله جوانه‌زنی برنج، تهیه نقشه پیوستگی و تعیین سهم هر QTL در تنوع فنوتیپی صفت مربوطه به کمک نشانگرهای ریزماهوره (SSR) و تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP)^۱ بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در پژوهش حاضر ۹۶ لاین حاصل از جمعیت لاین‌های نوترکیب نسل هشتم ارقام عنبربو × سپیدرود بود. نسل اول تلاقی در سال زراعی ۸۳-۱۳۸۲ در مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه گردید و سپس نسل‌های در حال تفکیک در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه گنبد کاووس تا نسل F₈ به روش بالک تک بذری توسعه یافت. به منظور استخراج DNA از بوته‌های نسل هشتم نمونه‌های برگ‌ی تهیه شد و استخراج DNA ژنومی به روش CTAB (Saghai Maroof *et al.*, 1994) در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه گنبد کاووس انجام شد. برای تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. تعیین غلظت

1. Amplified fragment length polymorphism

سه مرحله دمایی مختلف تکثیر شدند. ترکیبات آغازگری استفاده شده در تجزیه AFLP را نشان می‌دهد (جدول ۱). فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز شش درصد تفکیک و با روش نیترا نقره رنگ آمیزی شدند (شکل ۲). در پژوهش حاضر از نشانگر ریزوماهواره به دلیل اینکه دارای جایگاه مشخصی در ژنوم است به عنوان یکی از مهم‌ترین نشانگرها استفاده شد و نشانگر AFLP نیز با توجه به اینکه اطلاعات زیادی از ژنوم را با تولید تعداد زیادی نوار در اختیار قرار می‌دهد برای اشیاع‌تر کردن نقشه استفاده مورد استفاده قرار گرفت.

محدودگر *EcoRI* و *MseI* و اتصال سازگارها، در مرحله پیش تکثیر از آغازگرهای *EcoRI* و *MseI* واجد یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' باتوالی‌های زیر:

آغازگر *MseI*:

5'-GATGAGTCCTGAGTAAA-3'

آغازگر *EcoRI*:

5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'

استفاده شد. محصولات حاصل از تکثیر پیش انتخابی به نسبت ۱:۱۰ رقیق شده و با ۲۱ ترکیب (از ۳۵ ترکیب آغازگری) دارای ۲ نوکلئوتید انتخابی دیگر در انتهای ۳' (علاوه بر یک نوکلئوتید در پیش تکثیر) تحت چرخه حرارتی Touch down شامل

جدول ۱- ترکیبات آغازگری استفاده شده در تجزیه AFLP

آغازگرهای <i>EcoRI</i>		آغازگرهای <i>MseI</i>	
نام	توالی DNA	نام	توالی DNA
E060		M140	
E070	GACTGCGTACCAATTCAAG	M150	GATGAGTCCTGAGTAAAAC
E080	GACTGCGTACCAATTCAAT	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAAGA
E090	GACTGCGTACCAATTCACG		GATGAGTCCTGAGTAAAAGT
E100	GACTGCGTACCAATTCAGT		
E110	GACTGCGTACCAATTCATC		
E120	GACTGCGTACCAATTCATT		

Test نیز استفاده شد که در کلیه موارد آستانه لود حاصل ۲ به دست آمد. همچنین با توجه به اینکه تعداد مطالعات انجام شده برای تحمل به تنش خشکی در مرحله جوانه‌زنی برنج بسیار محدود بود، آستانه LOD لازم برای ردیابی QTLها، ۲ در نظر گرفته شد. برای این کار از نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب استفاده شد.

نتایج و بحث

نقشه پیوستگی با استفاده از ۲۶۴ نوار چندشکل AFLP و ۱۲۴ نشانگر SSR و ۹۶ فرد جمعیت F₈ تشکیل شد. این نشانگرها ۱۲ گروه پیوستگی تشکیل

مؤلفه‌های جوانه‌زنی شامل طول ریشه‌چه، ساقه‌چه، کلئوتیل و درصد جوانه‌زنی روی ۱۰۰ بذر هر لاین در شرایط تنش اسمتیک حاصل از ساکارز، سوربیتول و مانیتول در یک تکرار ثبت شد. برای محاسبه مقدار لازم از رابطه وانت هوف استفاده شد:

$$\sigma_s = mIRT$$

در این رابطه σ_s پتانسیل اسمزی، m مولاریته، I ضریب یونی، R عدد ثابت ۰/۰۸۳ و T دمای کلوین است. برای هر واحد آزمایشی ۲۰ بذر انتخاب شد و از میانگین داده‌های ۲۰ بذر برای تجزیه QTL با استفاده از نرم‌افزار QGene استفاده شد. برای صفات مورد بررسی از Permutation

دادند که ۱۹/۸۹ میلی‌متر طول کلئوپتیل را افزایش دادند که از این QTL ها qSUC-2 به تنهایی طول کلئوپتیل را به اندازه ۸/۸۶ میلی‌متر افزایش داد اما در QTL های qSUC-3، qSUC-5 آلل‌های اسپیدرود باعث کاهش طول کلئوپتیل شدند. Hu و همکاران (۲۰۰۷) در شرایط نرمال هفت QTL برای طول کلئوپتیل روی کروموزوم‌های ۱ (دو مورد)، ۲ (دو مورد)، ۷، ۱۱ و ۱۲ و در شرایط تنش چهار QTL روی کروموزوم‌های ۲ (دو مورد)، ۶ و ۹ گزارش کردند. همچنین Redona و Mackill (۱۹۹۶)، دو QTL برای طول کلئوپتیل روی کروموزوم‌های ۳ و ۶ ردیابی کردند. QTL های شناسایی شده برای طول ریشه‌چه روی کروموزوم‌های ۲، ۳ (دو مورد)، ۴، ۶ (دو مورد)، ۹ و ۱۲ قرار داشتند. در QTL های qSUR-3، qSUR-6، qSUR-9 و آلل‌های اسپیدرود باعث کاهش طول ریشه‌چه شدند. QTL های qSUS-2، qSUS-4 به ترتیب ۲۳ و ۲۶ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند. برای طول ساقه‌چه چهار QTL بر روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۴ و ۶ ردیابی شد که در qSUS-2، qSUS-4 و qSUS-6 آلل‌های عنبربو باعث افزایش طول ساقه‌چه و در qSUS-3 آلل اسپیدرود باعث کاهش طول ساقه‌چه شد. Redona و Mackill (۱۹۹۶) چند QTL روی کروموزوم‌های ۳ و ۹ برای طول ساقه‌چه گزارش کردند. دو QTL کنترل کننده درصد جوانه‌زنی بر روی کروموزوم‌های ۲ و ۹ قرار داشتند. که در qSUP-2، qSUP-9 آلل عنبربو به ترتیب با ۳/۱۱ و ۸/۶۷ میلی‌متر باعث افزایش درصد جوانه‌زنی در شرایط تنش اسمتیک ناشی از ساکارز شد.

جوانه‌زنی در شرایط تنش سوربیتول

از بین چهار صفت اندازه‌گیری شده دو QTL برای طول ریشه‌چه، پنج QTL برای طول ساقه‌چه و دو QTL برای درصد جوانه‌زنی گزارش شد. و برای طول کلئوپتیل QTL یافت نشد.

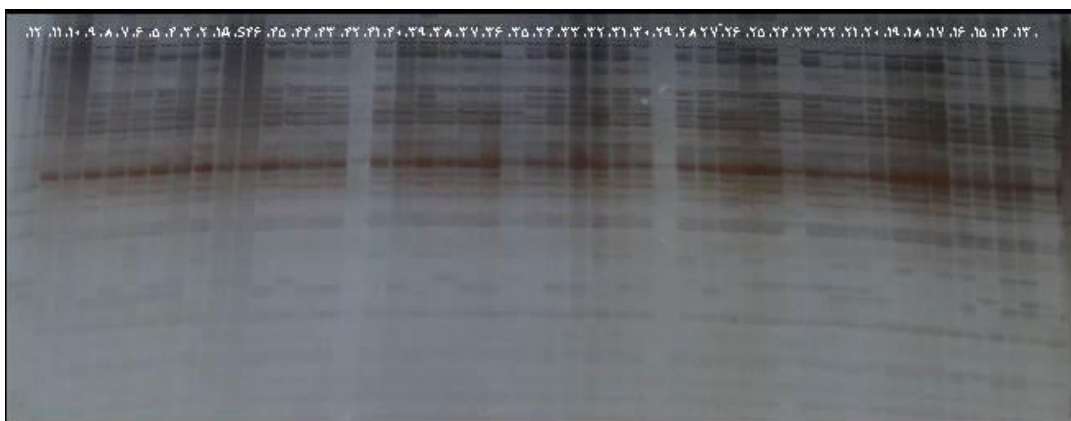
دادند که ۱۹۵۰/۴ سانتی مورگان از ژنوم برنج را پوشش دادند و به طور متوسط فاصله بین دو نشانگر ۵/۲۰ سانتی‌مورگان بود (شکل ۳). ۱۰ نشانگر از بین نشانگرهای چند شکل مورد بررسی نیز نسبت‌های مندلی انحراف نشان دادند و با توجه به اینکه این نشانگرها به قسمت‌های مختلفی از ژنوم تعلق داشتند، برای تهیه نقشه کنار گذاشته شدند (Liu, 1996). ترتیب نشانگرها با نقشه‌های تهیه شده توسط سایر محققان (Chen و همکاران، ۱۹۹۷؛ Temnykh و همکاران، ۲۰۰۰ و McCouch و همکاران، ۲۰۰۲) مقایسه شد و ترتیب آن‌ها با نتایج سایرین مطابقت داشت اما فاصله آن‌ها متفاوت بود. از آنجا که جمعیت‌های مورد استفاده در مطالعات مختلف متفاوت است، این تفاوت منطقی بود. در مجموع چهل و سه QTL که کنترل چهار صفت در سه شرایط تنش اسمتیک ناشی از ساکارز، سوربیتول و مانیتول را بر عهده داشتند، شناسایی شد. که از این تعداد بیست و یک QTL تنش اسمتیک ناشی از ساکارز، نه QTL تنش اسمتیک ناشی از سوربیتول و سیزده QTL تنش اسمتیک ناشی از مانیتول را کنترل نمودند (جدول ۲).

جوانه‌زنی در شرایط تنش ساکارز

از چهار صفت مورد بررسی در این پژوهش هفت QTL برای طول کلئوپتیل، هشت QTL برای طول ریشه‌چه، چهار QTL برای طول ساقه‌چه و دو QTL برای درصد جوانه‌زنی ردیابی شد. که در مجموع سه QTL، qSUC-5، qSUR-2 و qSUR-4 بزرگ اثر بودند. هفت QTL کنترل کننده طول کلئوپتیل روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۵، ۶ (دو مورد)، ۱۱ و ۱۲ قرار داشتند. که QTL، qSUC-5 به تنهایی ۲۳ درصد از تنوع فنوتیپی موجود را توجیه نمود. اثر افزایشی هر QTL منفرد از ۰/۸۰- تا ۵/۲۴ متغییر بود و در QTL های qSUC-11، qSUC-12، qSUC-2، qSUC-6، qSUC-6 آلل‌های عنبربو به طور متوسط

دو QTL از پنج QTL شناسایی شده qSOS-3، qSOS-5 آلل‌های سپیدرود باعث کاهش طول ساقه‌چه شدند. همچنین Sabouri و همکاران (۲۰۱۲) نیز شش QTL برای طول ساقه‌چه روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۴، ۵، ۷ و ۱۲ مکان‌یابی کردند. با مقایسه نتایج این پژوهش با مطالعه حاضر می‌توان به این نتیجه رسید که احتمالاً مکان‌های کنترل کننده طول ساقه‌چه روی کروموزوم‌های ۲، ۴ و ۵ مکان‌های ثابت کنترل کننده این صفت هستند.

برای طول ریشه‌چه دو QTL بر روی کروموزوم‌های ۴ و ۶ گزارش شد که در qSOR-4 و qSOR-6 آلل عنبربو به ترتیب ۱/۱۱ و ۱/۲۲ میلی‌متر طول ریشه‌چه را افزایش داد. هشت QTL برای طول ریشه‌چه روی کروموزوم‌های ۱، ۸ (سه مورد)، ۱۰ (دو مورد) و ۱۲ (دو مورد) گزارش کردند (Sabouri *et al.*, 2010). برای طول ساقه‌چه پنج QTL ردیابی شد که بر روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ قرار داشتند. اثر افزایشی این QTL‌ها از ۱/۰۷ تا ۱/۳۹ میلی‌متر بود.



شکل ۲- نمونه‌ای از نشانگر RM262 برای تعیین ژنوتیپ افراد ۱ تا ۹۶ و ژل‌های از ترکیب پرایمری E080-M150 برای تعیین ژنوتیپ افراد ۱ تا ۴۶

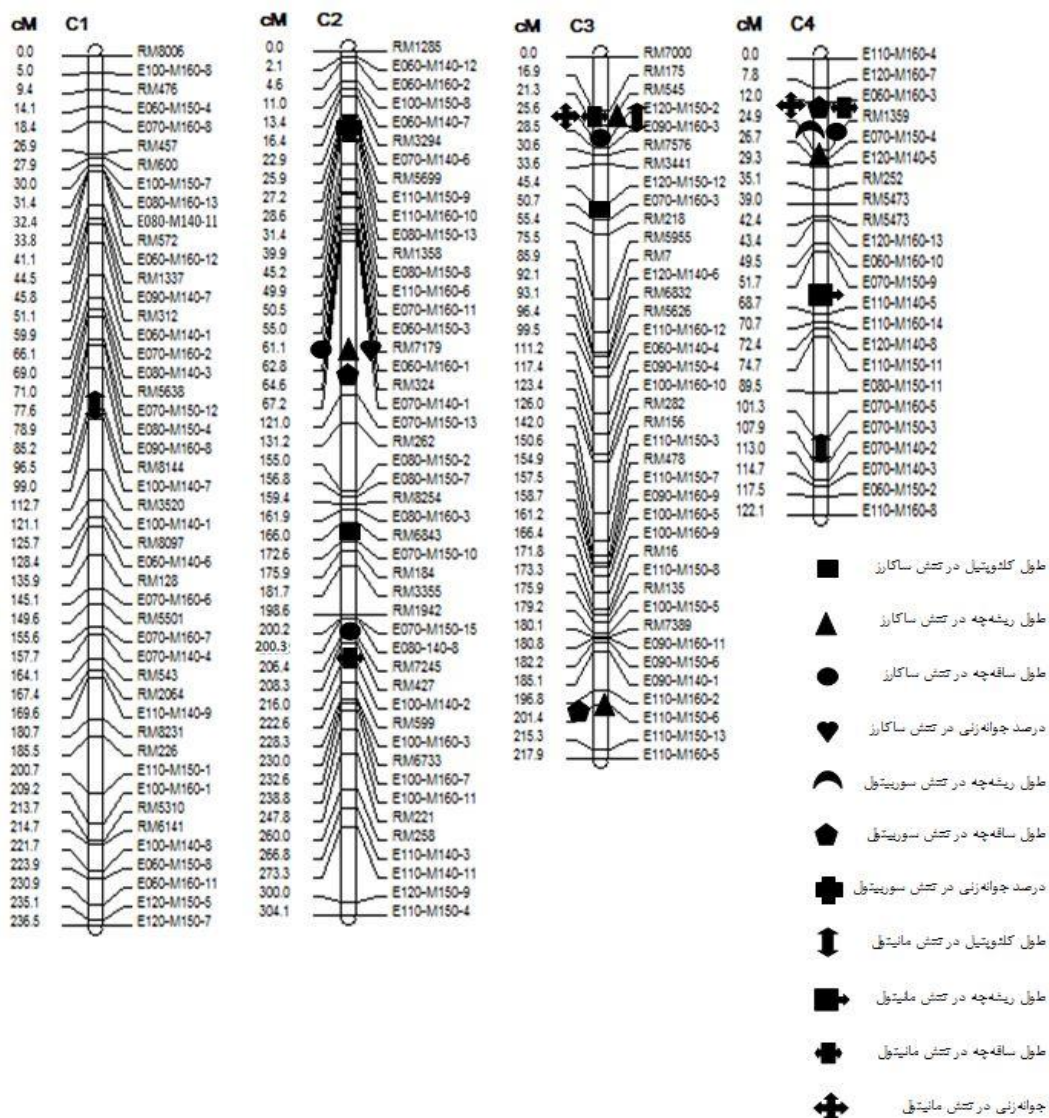
(۲۰۱۲) توانستند برای درصد جوانه‌زنی دو QTL روی کروموزوم‌های ۳ و ۸ شناسایی کنند. QTL‌های شناسایی شده در مطالعه آن‌ها با QTL‌های مطالعه حاضر مطابقت داشت.

دو QTL روی کروموزوم‌های ۲ و ۱۲ برای درصد جوانه‌زنی یافت شد که QTL‌های qSOP-12 و qSOP-2 به ترتیب به مقدار ۸/۰۶۲ و ۵/۷۳ درصد جوانه‌زنی را افزایش دادند. Sabouri و همکاران

جدول ۲- مجموع QTL‌های شناسایی شده برای مؤلفه‌های جوانه‌زنی در جمعیت لاین‌های نوترکیب برنج ایرانی تحت شرایط مختلف تنش اسمتیک

جهت آلل	ضریب تبین	اثرافزایشی (سانتی‌متر)	موقعیت (سانتی‌مورگان)	LOD	کروموزوم	نشانه‌های مجاور	QTL	صفت
جوانه زنی ساکارز								
عنبربو	13.6	5.524	38	3.049	11	RM144-E110-M150-15	<i>qSUC-11</i>	Cleoptil length
عنبربو	10	86.83	48	2.201	12	E120-M140-3-E100-M160-2	<i>qSUC-12</i>	طول کلئوپتیل
عنبربو	9.3	0.184	166	2.035	2	RM6843-E070-M150-10	<i>qSUC-2</i>	
سپیدرود	10.8	-1.431	46	2.387	3	E120-M150-12-E070-M160-3	<i>qSUC-3</i>	
سپیدرود	23.6	-0.804	106	5.614	5	E070-M150-14-E090-M160-10	<i>qSUC-5</i>	
عنبربو	12.8	4.25	0	2.846	6	E090-M150-10-RM5088	<i>qSUC-6a</i>	
عنبربو	9.8	2.946	8	2.149	6	RM5088-E090-M160-11	<i>qSUC-6b</i>	
سپیدرود	10.8	-1.47	60	2.377	12	E080-M140-14-E080-M150-9	<i>qSUR-12</i>	Radicle length
عنبربو	23.3	1.41	108	5.53	2	E070-M140-1-E070-M150-13	<i>qSUR-2</i>	طول ریشه‌چه
سپیدرود	13.3	-1.713	28	2.965	3	E120-M150-2-E090-M160-3	<i>qSUR-3a</i>	
سپیدرود	12.5	-1.818	198	2.786	3	E110-M160-2-E110-M150-6	<i>qSUR-3b</i>	
عنبربو	26	2.331	26	6.272	4	RM1359-E070-M150-4	<i>qSUR-4</i>	
عنبربو	10	1.503	2	2.202	6	E090-M150-10-RM5088	<i>qSUR-6a</i>	
سپیدرود	11.5	-1.398	148	2.535	6	E090-M160-2-E120-M160-10	<i>qSUR-6b</i>	
سپیدرود	10.2	-2.141	102	2.252	9	E120-M140-9-E090-M140-14	<i>qSUR-9</i>	
عنبربو	15.4	0.816	108	3.485	2	E070-M140-1-E070-M150-13	<i>qSUS-2</i>	Plumule length
سپیدرود	11.5	-1.111	26	2.537	3	E120-M150-2-E090-M150-3	<i>qSUS-3</i>	طول ساقه‌چه
عنبربو	19.4	0.976	22	4.497	4	E060-M160-3-RM1359	<i>qSUS-4</i>	
عنبربو	14.7	1.296	2	3.315	6	E090-M150-10-RM5088	<i>qSUS-6</i>	
عنبربو	9.6	3.117	108	2.105	2	E070-M140-1-E070-M150-13	<i>qSUP-2</i>	Percent of germination
عنبربو	9.6	8.67	86	2.098	9	E120-M140-9-E090-M140-14	<i>qSUP-9</i>	درصد جوانه‌زنی
جوانه‌زنی سوربیتول								
عنبربو	11.8	1.117	26	2.607	4	RM1359-E070-M150-4	<i>qSOR-4</i>	Radicle length
عنبربو	13.1	1.223	2	2.924	6	E090-M150-10-RM5088	<i>qSOR-6</i>	طول ریشه‌چه
عنبربو	12.1	0.827	116	2.693	2	E070-M140-1-E070-M150-13	<i>qSOS-2</i>	Plumule length
سپیدرود	9.6	-1.07	198	2.114	3	E110-M160-2-E110-M150-6	<i>qSOS-3</i>	طول ساقه‌چه
عنبربو	11.6	1.392	16	2.57	4	E060-M160-3-RM1359	<i>qSOS-4</i>	
سپیدرود	10.9	-1.702	106	2.395	5	E070-CM150-14-E090-M160-10	<i>qSOS-5</i>	
عنبربو	18.5	1.369	2	4.27	6	E090-M150-10-RM5088	<i>qSOS-6</i>	
عنبربو	10.2	8.62	64	2.239	12	E080-M160-5-E090-M140-3	<i>qSOP-12</i>	Percent of germination
عنبربو	9.8	5.727	28	2.157	2	E110-M150-9-E110-M160-10	<i>qSOP-2</i>	درصد جوانه‌زنی
جوانه‌زنی مانیتول								
عنبربو	13	0.15	88	2.897	1	E090-M160-8-RM8144	<i>qMAC-1</i>	Cleoptil length
سپیدرود	11.3	-0.247	26	2.494	3	E120-M150-2-E090-M160-3	<i>qMAC-3</i>	طول کلئوپتیل
عنبربو	13.7	0.468	106	3.079	4	E070-M160-5-E070-M150-3	<i>qMAC-4</i>	
سپیدرود	10.1	-0.527	50	225.2	12	E100-M160-2-E090-M140-4	<i>qMAR-12</i>	Radicle length
عنبربو	10.9	4.181	60	2.395	4	E070-M150-9-E110-M140-5	<i>qMAR-4</i>	طول ریشه‌چه
سپیدرود	10.6	-0.999	10	2.336	5	E110-M140-8-E090-M140-5	<i>qMAR-5</i>	
عنبربو	11.8	0.666	212	2.629	2	RM427-E100-M140-2	<i>qMAS-2</i>	Plumule length
سپیدرود	13.6	-1.017	26	3.057	3	E120-M150-2-E090-M160-3	<i>qMAS-3</i>	طول ساقه‌چه
عنبربو	9.7	0.881	18	2.132	4	E060-M160-3-RM1359	<i>qMAS-4</i>	
عنبربو	9.4	0.871	2	2.067	6	E090-M150-10-RM5088	<i>qMAS-6a</i>	
سپیدرود	10.9	-0.649	122	2.409	6	RM30-RM340	<i>qMAS-6b</i>	
سپیدرود	10.5	-4.903	28	2.322	3	E120-M150-2-E090-M160-3	<i>qMAP-3</i>	Percent of germination
عنبربو	10.5	6.357	16	2.319	4	E060-M160-3-RM1359	<i>qMAP-4</i>	درصد جوانه‌زنی

زیر نشانه‌های نزدیک‌تر به QTL خط کشیده شده است.



شکل ۳- نقشه پیوستگی و موقعیت QTL‌های شناسایی شده برای صفات مورد بررسی در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی عنبربو × سپیدرود.

افزایشی مکان‌های مربوط به طول کلنوتیل از ۰/۲۴ تا ۰/۴۶ میلی‌متر متغیر بود. به جز در مورد qMAC-3 که آلل سپیدرود باعث کاهش طول کلنوتیل شد، در سایر QTL‌ها آلل عنبربو باعث افزایش آن گردید. Mardani و همکاران (۲۰۱۳) نیز دو QTL روی کروموزوم‌های ۱ و ۴ در شرایط تنش خشکی و یک QTL روی کروموزوم ۴ در شرایط بدون تنش ردیابی

جوانه‌زنی در شرایط تنش مانیئول

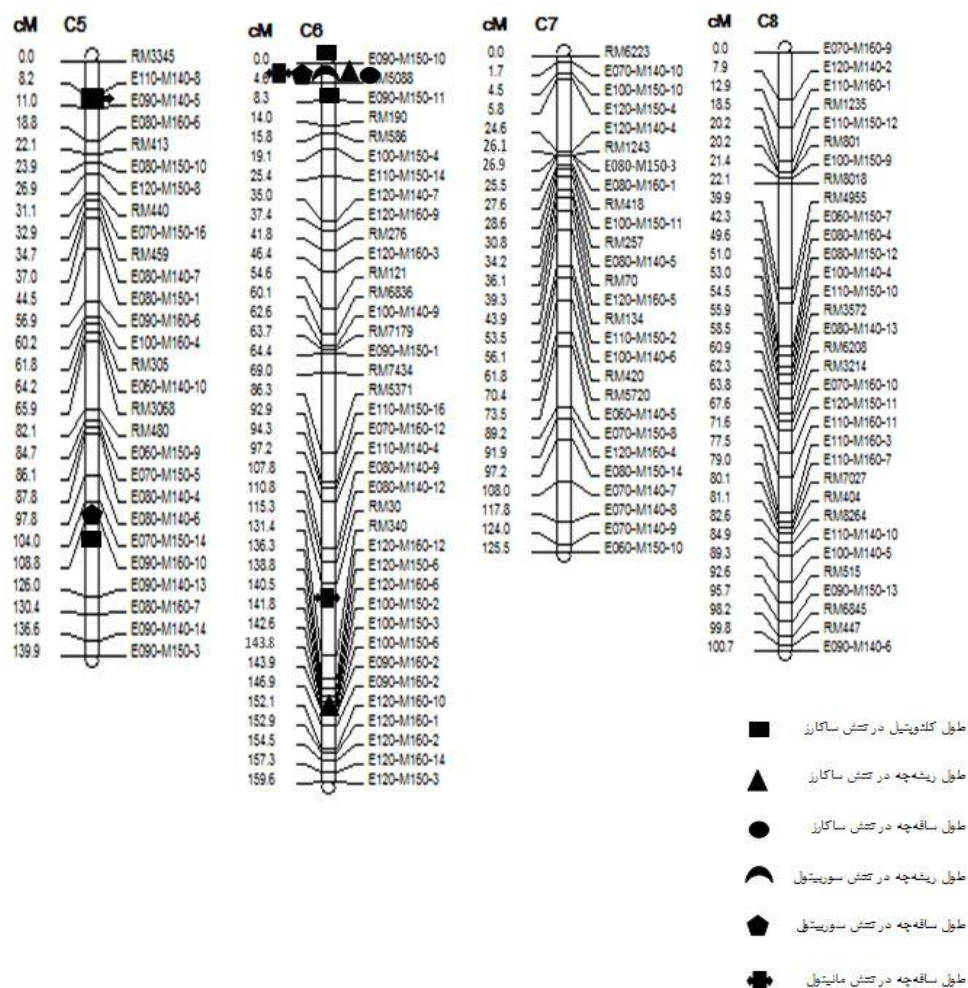
در شرایط تنش اسمتیک ناشی از مانیئول برای هر چهار صفت در مطالعه‌ی حاضر QTL پیدا شد. برای طول کلنوتیل سه QTL، طول ریشه‌چه سه QTL، طول ساقه‌چه پنج QTL و برای درصد جوانه‌زنی دو QTL ردیابی شد. QTL‌های شناسایی شده برای طول کلنوتیل روی کروموزوم‌های ۱، ۳ و ۴ قرار داشت. اثر

برای طول ساقچه پنج QTL روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۴ و ۶ (دو مورد) شناسایی شد. که اثر افزایشی آن‌ها از ۰/۶۴- تا ۰/۸۸+ متغیر بود. آلل اسپیدرود در qMAS-3 و qMAS-6 باعث کاهش طول ساقچه شد، در حالی که آلل اسپیدرود در qMAS-2، qMAC-4 و qMAS-6 طول ساقچه را افزایش داد. برای درصد جوانه‌زنی دو QTL روی کروموزوم ۳ و ۴ گزارش شد در یک QTL (qMAP-3) از این دو QTL آلل اسپیدرود باعث کاهش درصد جوانه‌زنی شد و در QTL دیگر (qMAP-4) آلل عنبربو باعث افزایش درصد جوانه‌زنی شد.

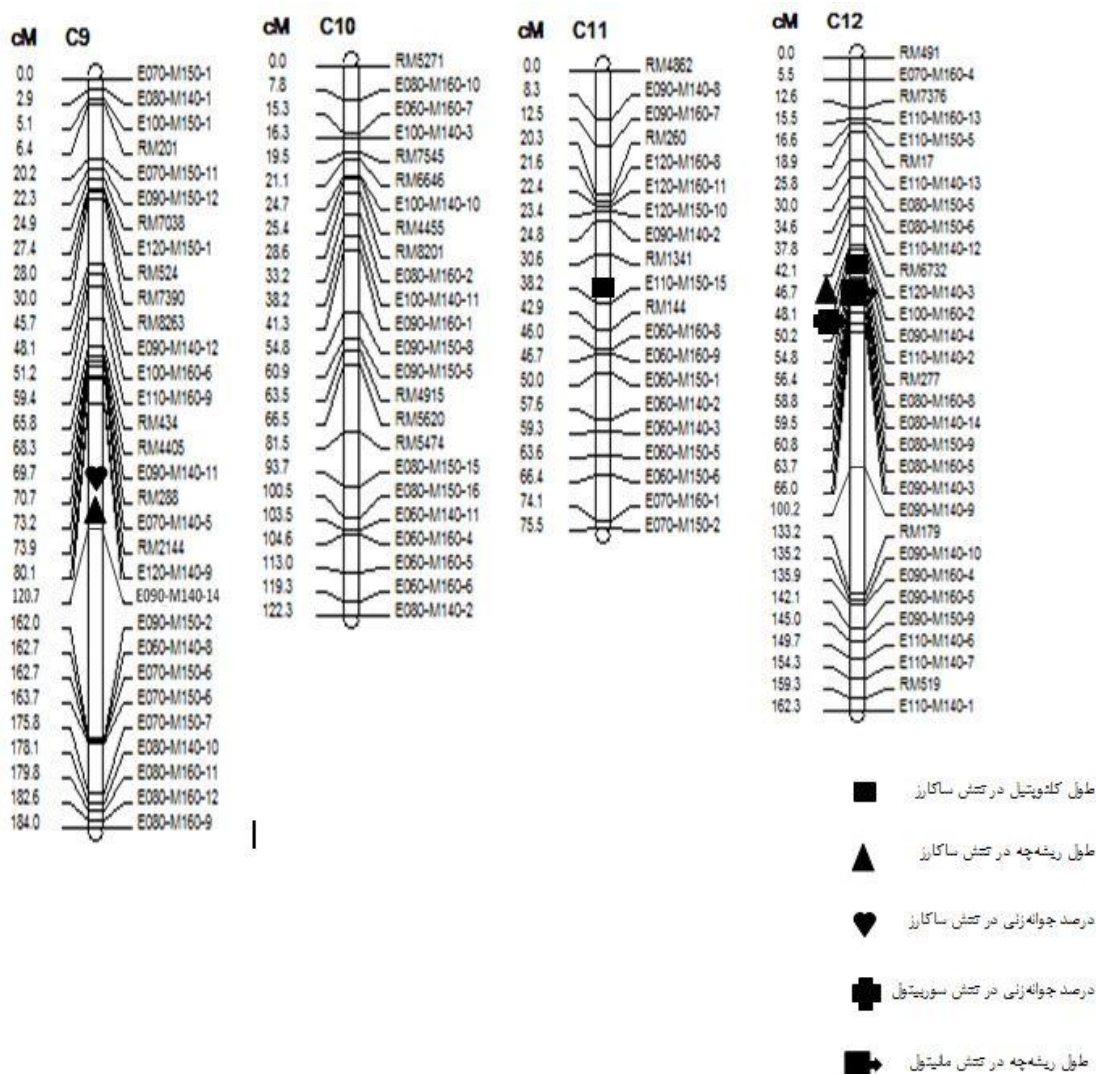
کردند که این QTL به تنهایی ۱۵/۳۳ درصد از تنوع فنوتیپی طول کلئوپتیل را توجیه کرد.

برای طول ریشه‌چه سه QTL بر روی کروموزوم‌های ۴، ۵ و ۱۲ ردیابی شد که در qMAR-4 آلل عنبربو باعث افزایش و qMAR-5 و qMAR-12 باعث کاهش طول ریشه‌چه شد. Redona و Mackill (۱۹۹۶) دو QTL برای طول ریشه‌چه روی کروموزوم‌های ۱ و ۲ ردیابی کردند. علاوه بر این Mardani و همکاران (۲۰۱۳) نیز دو QTL بر روی کروموزوم‌های ۵ و ۱۲ در شرایط تنش و یک QTL

روی کروموزوم ۱۲ در شرایط تنش شناسایی کردند.



ادامه شکل ۳



ادامه شکل ۳

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان وجود اثرات پلیوتروپی یا پیوستگی بین ژن‌های کنترل کننده صفات مورد بررسی را نشان داد. در مطالعه حاضر نقاطی از ژنوم مانند حد فاصل نشانگر E120-M150-2 و E090-M160-3 روی کروموزوم ۳ دربرگیرنده QTL‌هایی برای صفات مختلف از جمله طول ساقه‌چه در شرایط تنش ساکارز، طول کلئوتیل و طول ریشه‌چه در شرایط تنش مانیتول می‌باشد. همچنین در یک ناحیه روی

کروموزوم ۶ در فاصله نشانگری E090-M150-10-RM5088 برای صفات طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه تحت تنش ساکارز، طول ساقه‌چه و طول ریشه‌چه تحت تنش سوربیتول و طول ساقه‌چه تحت تنش مانیتول دارای QTL می‌باشد. علاوه بر این در فاصله نشانگرهای E070- و E120-M140-5 و همچنین حد فاصل نشانگرهای E060-M150-4 و M160-3-RM1359 روی کروموزوم ۴ برای صفات مختلف QTL‌هایی مشاهده گردید. مکان‌یابی صفات مورد بررسی نشان داد که QTL‌های

کروموزوم ۳ در شرایط مختلف تنش اسمتیک بیانگر کنترل ژنتیکی یکسان و اثر پلیوتروپیک برای این صفات در مرحله جوانه‌زنی است.

سپاسگزاری

نتایج این پژوهش حاصل از طرح تحقیقاتی شماره ۶/۵۸۱ مصوب تاریخ ۹۰/۱۲/۱ دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشکده گنبد کاووس می‌باشد. لذا از کلیه همکاران و به خصوص مدیریت پژوهشی جهت تأمین منابع مالی این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

qSUC-5، qSUR-2 و qSUR-4 بزرگ اثر بود و به ترتیب با توجیه ۲۳، ۲۳ و ۲۶ درصد از تنوع فنوتیپی اثر بزرگی روی توجیه صفات مرتبط داشتند. بنابراین می‌توان از نشانگرهای مرتبط با آن‌ها برای انتخاب بهترین افراد برای رسیدن به لاین‌های مطلوب و با قدرت جوانه‌زنی بالا در شرایط تنش اسمتیک استفاده نمود. هم‌مکانی QTL‌های qSUC-6، qSUR-6، qSUS-6، qSOR-6، qSOS-6 و qMAS-6 روی کروموزوم ۶ و همچنین QTL‌های qSUR-3، qSUC-3، qSUS-3، qMAC-3، qMAS-3 و qMAP-3 روی

REFERENCES

- Alizadeh A (2011) Soil, water, plant relationship. Emam Reza Press. Pp. 470.
- Angaji SA (2009) QTL mapping: A few key points. Inter. J. appl. Res. Nat. Prod. 2 (2): 1-3.
- Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG McCouch SR (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 95: 553-567.
- Bimpong IK, Serraj R, Chin JH, Ramos J, Mendoza EMT, Hernandez JE, Mendioro MS, Brar DS (2011) Identification of QTLs for Drought-Related Traits in Alien Introgression Lines Derived from Crosses of Rice (*Oryza sativa* cv. IR64) × *O. glaberrima* under Lowland Moisture Stress. J. of Plant Biol. 54: 237-250.
- Bouman B (2009) How much water does rice use? Rice Today, January March, IRRI Publications.
- Choi WY, Kang SY, Park HK (2000) Effects of Water Stress by PEG on Growth and Physiological Traits in Rice Seedlings, Korean. J. Crop Sci. 45: 112-117.
- Dowling NG, Greenfield SM, Fisher KS (1998) Sustainability of Rice in the Global Food System, Philippines, Los Banos. Intl. Rice Res. Inst. 404.
- Fukai S (1999) Phenology in Rainfed Lowland Rice. Field Crops Res. 64: 51-60.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. Annual Eugen. 12: 172-175.
- Habibi Asl J, Lobmi N, Gilani AA (2010) Evaluation and comparison of three method of dry farming of different cultivar in Khozestan. Journal of Agriculture Engineering Research. 10: 96-105.
- Hejazi A, Kaffashi Sedghi M (2000) Fundamentals of physiology. Tehran University Press.
- Hu SP, Yang H, Zou GH, Liu HY, Liu GL, Mei HW, Run C, Li MS, Luo LJ (2007) Relationship between coleoptile length and drought resistance and their QTL mapping in rice. Rice Sci. 14: 13-20.
- Kadda MT (1963) Salinity effect on growth of rice at the seedling and inflorescence stage of development. Soil Sci. 96: 103-111.
- Kafi M, Kamkar B, Damghani A (2004) Crop response to the growth medium (Translated). University of Mashhad Press.
- Kaushik A, Saini N, Jain S, Rana P, Singh

- RK, Jain PK (2003) Genetic analysis of a CSR10 (Indica)×Taraori Basmati F3 population segregating for slot tolerance using ISSR markers. *Euphytica*. 134:23-238.
- Liu BH (1998) Statistical genomics, linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press, New York, USA.
- Maclean JL, Dawe DC, Hardy B, and Hettel GP (2002) Rice Almanac: Sourcebook for the most important economic activity on earth. CABI Publishing, Wallingford, England. In association with the International Rice Research Institute, West Africa Rice Development Association, International Center for Tropical Agriculture, and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Mardani Z, Rabiei B, Sabouri H, Sobouri A (2013) Mapping of QTLs of Germination Characteristics under Non-stress and Drought Stress in Rice. *Rice Sci*. 20(6). 391-399
- Manly KF, Olson JM (1999) Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QTL. *Mammalian Genome*. 10: 327-334.
- McCouch, S, Doerge R (1995) QTL mapping in rice. *Planta*. 11(12): 482-487.
- McCouch SR, Teytelman L, Xu YB, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li ZK, Xing YZ, Zhang QF, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res*. 9: 199-207.
- Rabiei B, Mardani Z, Ghomi kh, Sabouri H, Sobouri A (2013) The effect of rice chromosome 1 on traits associated with drought and salinity tolerance at germination and seedling stages. *J. Agr. Sci.* (In Press).
- Reddy PC, Vajaranabiah SN (1983) Drought Induced Lipid Peroxidation, Defensive Mechanism in Upland Rice (*Oryza saliva* L.) Seeds during Germination. *Adv. Plant Sci*. 6: 229-236.
- Redona ED Mackill DJ (1996) Mapping quantitative trait loci for seedling vigor in rice using RFLPs. *Theor. Appl. Genet*. 92: 395-402.
- Sabouri H, Biabani A, Sabouri A, Esmaili M (2010) the study of QTLs related to seed vigour under stress caused to Sorbitol in rice. *J. Plant Prod*. 17: 123-136.
- Sabouri A, Sabouri H, Ocampo M (2012) Genetic Analysis Seedling vigour under osmotic stress in Rice by QTL Mapping. *Russ. Agri. Sci*. 38: 423-429.
- Saghi Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 5466-5570.
- Sairam RK, Aruna T (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci*. 86(3): 407-421.
- Shah FS, Watson CE, Cabera ER (2000) Seed vigor testing of subtropical corn hybrids. *Plant Sci*. 164: 317-322.
- Shanon MC, Gronwld JW, TAL M (1987) Effect of salinity on growth and accumulation of organic and inorganic ions in cultivated and wild tomato species. *J. Am. Horticulture Sci*. 112: 516-523.
- Themnykh SD, Park NA, Cartinnour NH, Lipovhch L, Cho YJ, Ishii T, Mccouch SR (2000) Mapping and genome organization of micro satellite sequences in rice (*Oryza Sativa* L.). *Theor. Apple. Genet*. 100: 697- 712.
- Tuong TP, Bouman BAM (2003) Rice production in water scarce environments. In: Water productivity in agriculture: limits and opportunities for improvement (eds) J. W. Kijne, R.

- Barker and D. Molden. CABI Publishing, Wallingford, UK. 53-67.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TVD, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Yoichi F, Oda M, Horikawa N, Ogura C (2011) Hydrologic Analysis of Rainfed Rice Areas Using a Simple Semi distributed Water Balance Model. *Water Resour Manag.* 25(9): 2061-2080.