

نقشه‌یابی دقیق QTL بزرگ اثر کنترل‌کننده تحمل به شوری (*Saltol*) در برنج

قاسم محمدی‌نژاد^{۱*}، راکش کومار سینگ^۲، عبدالمجید رضایی^۳، احمد ارزانی^۴،

بابک ناخدا^۵، محمدحسین فتوکیان^۶، علی مومنی^۷ و گلن گریگوریو^۸

۱، بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهر کرمان، ۲، ۸، مرکز بین‌المللی

تحقیقات برنج (IRRI)، لوس بانوس، فیلیپین، ۳، ۴، بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی

دانشگاه صنعتی اصفهان، ۵، بخش تحقیقات فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

۶، بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد، تهران، ۷، مؤسسه تحقیقات برنج کشور،

معاونت آمل

(تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۱۰ - تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲۸)

چکیده

این بررسی با هدف اعتبارسنجی و اشباع ظریف ناحیه کروموزومی کنترل‌کننده تحمل به شوری در برنج (*Saltol*)، در مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI) در شهر لوس بانوس فیلیپین از سال ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۶ اجرا گردید. QTL بزرگ اثر تحمل به شوری (*Saltol*) که در تنظیم جذب سدیم، جذب پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم و در نتیجه تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای در برنج مؤثر است، با استفاده از جامعه اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی Pokkali×IR29 روی کروموزوم ۱ شناسایی شده است که حدود ۶۴/۳ تا ۸۰/۲ درصد از تنوع فنوتیپی را برای صفات فوق توجیه کرد. در این پژوهش، به منظور اشباع دقیق ناحیه *Saltol* از ۱۰ نشانگر ریزماهواره EST-SSR و جمعیت لاین‌های نسبتاً ایزوژن BC₃F₄ حاصل از تلاقی IR29×Pokkali که برای این ناحیه ایجاد شده بود، استفاده شد. بدین منظور افراد تصادفی جامعه BC₃F₄ در سطوح شوری ۱۲، ۱۶ و ۱۸ دسی‌زیمنس بر متر فنوتیپ‌یابی و ژنوتیپ‌یابی شدند و QTL کنترل‌کننده تغییرات تحمل به شوری در سطوح شوری ۱۲ و ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر در مکانی تقریباً یکسان مشاهده شد. این مکان‌های ژنی به ترتیب ۱۸ و ۲۴ درصد از تغییرات امتیاز تحمل به شوری را توجیه کردند. بر اساس یافته‌های این پژوهش، مکان احتمالی *Saltol* در فاصله‌ای به طول حدود ۱/۲ سانتی‌مورگان در روی کروموزوم ۱ تعیین شد که بر اساس مطابقت با نقشه فیزیکی برنج این محدوده در حدود ۳۵۰ کیلوباز می‌باشد و در فاصله نشانگری RM8094، RM3412 و CP6224 می‌باشد. بدین ترتیب گزینش به کمک این نشانگرها جهت اصلاح ژنوتیپ‌های ایرانی برای تحمل به شوری امکان‌پذیر است.

واژه‌های کلیدی: برنج، تحمل به شوری، مرحله گیاهچه‌ای، نقشه‌یابی دقیق

Saltol, QTL

مقدمه

کروموزومی بزرگ اثر بود که در تنظیم جذب سدیم، جذب پتاسیم، نسبت سدیم به پتاسیم و تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای در برنج مؤثر است (Gregorio. 1997). این ناحیه کروموزومی توسط Gregorio (1997) در نسل F_8 حاصل از تلاقی Pokkali \times IR29 روی کروموزوم ۱ شناسایی شد. این QTL بزرگ اثر که سپس تحت نام *Saltol* معرفی گردید حدود $64/3$ تا $80/2$ درصد از تنوع فنوتیپی را برای صفات فوق توجیه کرد. جهت یافتن نشانگرهای با پیوستگی نزدیک با ناحیه *Saltol* که در طرح‌های گزینش به کمک نشانگر (MAS)^۲ به منظور اصلاح برای تحمل به شوری ضروری است. Bonilla *et al.* (2002) و Niones (2004) نقشه این ناحیه از کروموزوم را با استفاده از نشانگرهای RFLP^۳ و SSLP^۴ با استفاده از جوامع حاصل از تلاقی Pokkali \times IR29 اشباع نمودند. پژوهش حاضر به منظور نقشه‌یابی دقیق‌تر این ناحیه که جهت یافتن نشانگرهای مطمئن‌تر جهت اصلاح برای تحمل به شوری به کمک نشانگر و همچنین زمینه‌ساز شناسایی ژن‌های مسئول در این ناحیه خواهد بود، انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از یک جمعیت تلاقی برگشتی (BC₃F₄) حاصل از تلاقی لاین حساس به شوری IR29 با رقم محلی و متحمل به شوری Pokkali از هندوستان و سه مرتبه تلاقی برگشتی با IR29 استفاده گردید. جمعیت مذکور توسط بخش اصلاح‌نباتات، ژنتیک و بیوتکنولوژی در مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج در فیلیپین تولید شده بود. طی مراحل تولید این جمعیت توسط Gregorio

عملکرد گیاهان زراعی تحت تأثیر اثر متقابل ژنوتیپ و محیط قرار داشته و عوامل زیستی و غیرزیستی متعددی بر آن مؤثرند. شوری به‌عنوان دومین عامل غیرزیستی است که پس از خشکی باعث کاهش عملکرد گیاهان زراعی از جمله برنج می‌گردد (Szaboles. 1999). بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار از اراضی کشاورزی در سرتاسر جهان با مشکل شوری (۳۹۷ میلیون هکتار) و یا قلیائیت (۴۳۴ میلیون هکتار) روبرو می‌باشند. این مقدار برابر با ۲۰ درصد اراضی قابل‌کشت و ۵۰ درصد اراضی آبی جهان می‌باشد (Nakhoda *et al.* 2012). بر اساس برآوردها ۱۵۰ میلیون هکتار از اراضی مساعد کشت برنج در جهان تحت تأثیر شوری قرار دارند. شوری به عنوان یک معضل مهم در کشورهای آسیایی مطرح است. به طوری که در این قاره $21/5$ میلیون هکتار تحت تأثیر شوری بوده که از این مقدار ۱۲ میلیون هکتار شور و $9/5$ میلیون هکتار قلیایی می‌باشند (Laffite *et al.* 2006). حتی در بسیاری از کشورهای این منطقه شوری و قلیائیت به نحوی گسترش یافته است که به صورت مشکلی برای اقتصاد ملی این کشورها تبدیل شده است. در قاره آسیا پس از کشورهای شوروی سابق، چین، هندوستان و پاکستان، بیشترین گسترش خاک‌های شور و قلیائی در ایران وجود دارد. استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در طی سال‌های گذشته جهت نقشه‌یابی QTLها^۱ در برنج مورد توجه فراوان قرار گرفته است (McCouch *et al.* 1995). تلاش‌های به‌نژادگران گیاهی با استفاده از نشانگرهای مولکولی برای افزایش تحمل به تنش شوری شتاب بیشتری به خود گرفته و یکی از پیشرفت‌های بزرگ در این زمینه شناسایی یک ناحیه

2. Marker Assisted Selection
3. Restriction Fragment Length Polymorphism
4. Simple Sequence Length Polymorphism

1. Quantitative Trait Loci (QTLs)

درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز جوانه‌دار شدند. بذره‌های جوانه‌زده در درون حفره‌های ایجادشده در یونی‌لیت^۳ که یک شبکه نایلونی در زیر آن قرار گرفته بود، کشت شدند. بذرها پس از رشد به مدت ۳ روز روی آب‌مقطر به محلول غذایی یوشیدا^۴ انتقال یافتند که با افزودن کلریدسدیم هدایت الکتریکی دلخواه بر حسب دسی‌زیمنس بر متر حاصل شد. اسیدیته محلول غذایی به‌طور روزانه تنظیم و با استفاده از NaOH و HCl یک نرمال در H برابر با ۵/۲ ثابت نگاه داشته شد (Gregorio *et al.* 1997).

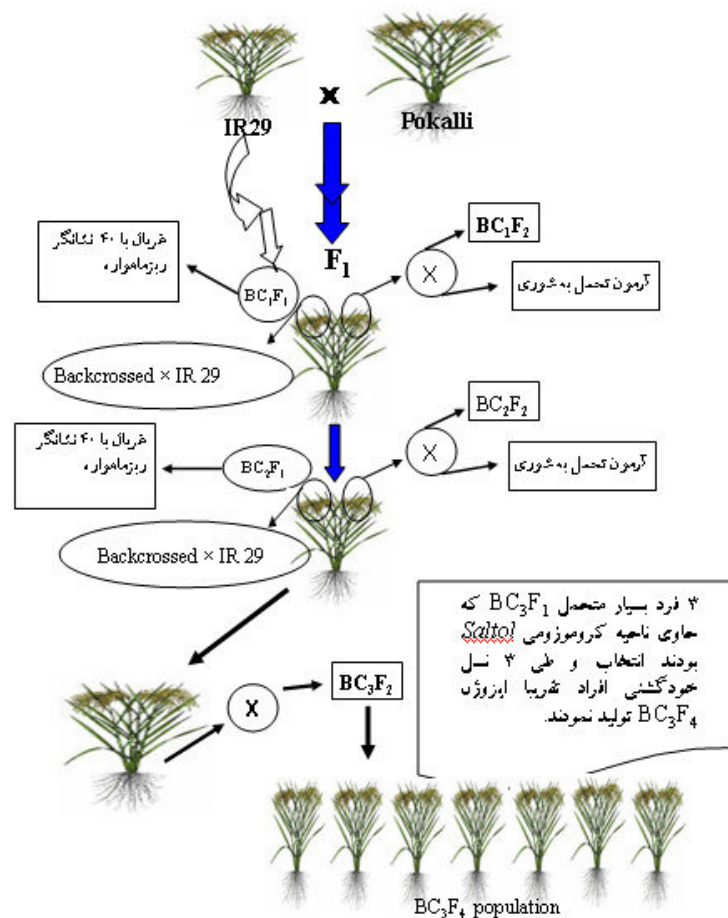
رتبه ژنوتیپ‌ها (امتیاز تحمل به شوری) دو هفته بعد از تیمار گیاهچه‌ها با ارزیابی ظاهری وضعیت ساقه و ریشه گیاهچه‌ها براساس روش تغییر یافته Gregorio *et al.* (2002) انجام شد. در این ارزیابی گیاهچه‌ها به‌صورت انفرادی ارزیابی شدند و افراد بسیار متحمل رتبه ۱ و افراد بسیار حساس رتبه ۹ گرفتند. از بین ۳ جمعیت نسبتاً ایزوژن، افراد جمعیت منتج از BC₃F₁-11-6-5 همگی فنوتیپ حساس را بروز دادند و جهت ارزیابی ژنوتیپی مناسب نبودند. بنابراین فقط افراد متعلق به دو فامیل دیگر (BC₃F₁-9-10-9 و BC₃F₁-9-5-2) برای ارزیابی ژنوتیپی مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA با روش تغییر یافته Delaporta *et al.* (1983) و ژنوتیپ‌یابی ۲۰۰۰ فرد تصادفی از بین ۴۰۰۰ فرد فنوتیپ‌یابی شده که همگی منتج از BC₃F₁-9 بودند انجام گرفت. علاوه بر نشانگرهای استفاده‌شده توسط نیونس در نقشه‌یابی این ناحیه براساس اطلاعات حاصل از نقشه مولکولی حاصل از نقشه‌یابی فیزیکی برنج برای ناحیه موردنظر (IRGSP, 2005) نشانگرهای چندشکل بین والدین انتخاب شدند (جدول ۱).

(1997) گزینش فنوتیپی برای تحمل به شوری و گزینش ژنوتیپی برای برداشتن ناحیه *Saltol* صورت گرفت. گزینش ژنوتیپی به صورت گزینش برای ناحیه موردنظر^۱ و گزینش زمینه‌ژنتیکی^۲ با استفاده از ۴۰ نشانگر ریزماهواره انجام پذیرفت. در طی تولید جامعه نسبتاً ایزوژن، گزینش فنوتیپی با بررسی نتاج هر نسل تلاقی‌برگشتی تحت شرایط شوری انجام شد که در عمل یک خوشه جهت ارزیابی فنوتیپی خودگشن شده و خوشه اصلی تلاقی برگشتی داده شد. بر اساس نتایج ژنوتیپی و فنوتیپی گزینش صورت گرفته و تا ۳ نسل تلاقی برگشتی ادامه یافت. در نهایت سه فرد BC₃F₁ که برای نشانگرهای RM3412 و RM8094 طرفینی *Saltol* هتروزیگوت بودند (BC₃F₁-11-6-5، BC₃F₁-9-10-9 و BC₃F₁-9-5-2) گزینش و از خودگشنی آن‌ها سه جمعیت BC₃F₄ حاصل شد. از هر فامیل ۲۰۰۰ فرد تصادفی گزینش و مورد ارزیابی فنوتیپی قرار گرفتند (شکل ۱). ارزیابی ۶۰۰۰ فرد BC₃F₄ در شرایط کشت در آب در اتاقک رشد با دمای روزانه ۳۴ و شبانه ۲۹ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد صورت گرفت. اعمال دمای بالا با هدف ارزیابی نهایی برای کشت در نواحی ساحلی گرم انجام شد. امتیاز تحمل به شوری ژنوتیپ‌ها در ۳ تیمار شوری کلریدسدیم با هدایت‌های الکتریکی ۱۲، ۱۶ و ۱۸ دسی‌زیمنس بر متر صورت پذیرفت. لاین‌های والدی IR29 و Pokkali به ترتیب به‌عنوان شاهد حساس و متحمل به شوری به همراه نتاج مورد ارزیابی قرار گرفتند. بذرها پیش از کشت به مدت پنج روز در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا رکود احتمالی بذر شکسته شود. سپس بذرها در پتری‌دیش روی کاغذ صافی مرطوب در دستگاه جوانه‌زنی در دمای ۳۲

3. Styrofoam
4. Yoshida

1. Foreground selection
2. Background selection



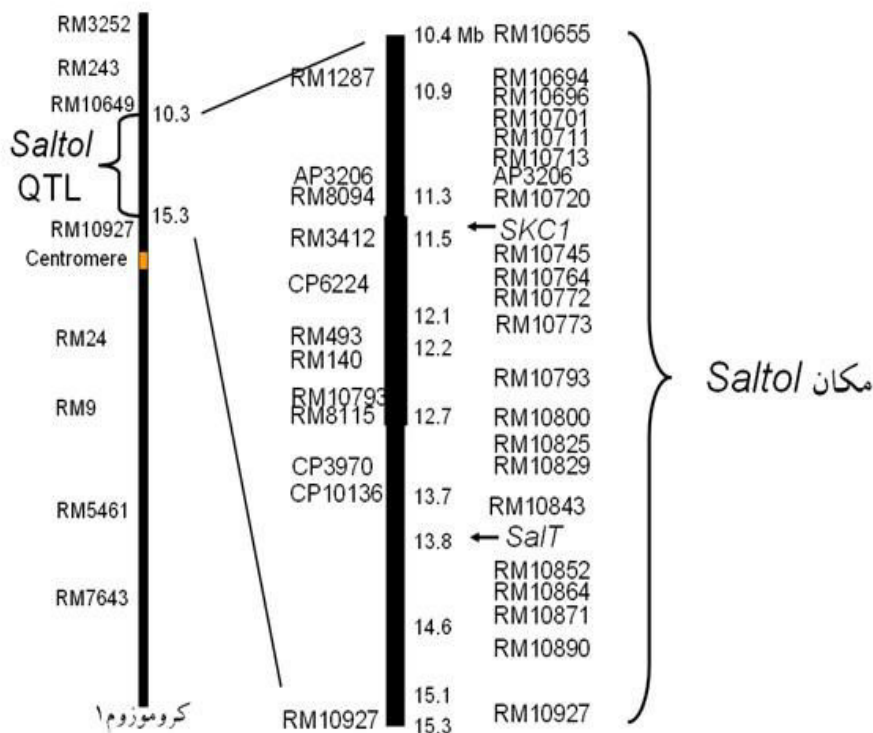
شکل ۱ - نمودار تولید جمعیت نسبتاً ایزوژن برای اشیاع ظریف نقشه ناحیه *Saltol*

جدول ۱- نشانگرهای مورد استفاده برای اشیاع نقشه ژنتیکی *Saltol*

آغازگر عقب	آغازگر جلو	طول نوار	موتیف	موقعیت	نشانگر
GGA GGA GGA GAG GAA GAA G	TTC TCA TCG CAC CAT CTC TG	375	(AGA)12	0.11	AP3206
CGC GAC CAG TAC TAC TAC TA	AAG TTT GTA CAC ATC GTA TACA	209	(AT)31	2.11	RM8094
CCC ATG TGC AAT GTG TCT TC	AAA GCA GGT TTT CCT CCT CC	211	(CT)17	6.11	RM3412
TAC TGC TGC TAC CCT TGT TC	GTA GCA TGC AAC CGT GGT AG	180	-	12	CP6224
GTA CGT AAA CGC GGA AGG TG	TAG CTC CAA CAG GAT CGA CC	259	(CTT)9	2.12	RM493
GGC ATG CCG AAT GAA ATG CATG	TGC CTC TTC CCT GGC TCC CCTG	263	(CT)12	3.12	RM140
TCGTGAGTAGCTTCCCTCTCTACC	GACTTGCCAACCTTCAATTCG	124	AGAT	12.5	RM10793
ACAGATGGATATTATAAGAAGTAACA	TATATAGTAAATTTGTTTGGTGTAGG	112	AT	12.7	RM8115
CCA TCA ATC TCA GCC GTC CG	CGA GCA GGG CTA CGT GTA CC	240	-	13.5	CP3970
GAG GTT ATC AGG TAG AAC GC	GCT CTA CAA TGG TTT GTG AG	170	-	13.8	CP10136

RM3412، RM493 و RM140 استفاده شد که در فاصله ۱۱/۲Mb تا ۱۲/۷ Mb یا ۶۰/۶ سانتی‌مورگان تا ۶۷/۵ سانتی‌مورگان قرار داشتند (شکل ۲).

سرانجام به منظور نقشه‌یابی دقیق *Saltol*، از ۴ نشانگر EST-SSR شامل CP10136، CP6224، CP3970 و AP3206 و نشانگرهای ریزماهواره شامل RM8115، RM10793، RM8094



شکل ۲- نقشه پیوستگی نشانگرهای ناحیه کروموزومی *Saltol* بر اساس اطلاعات توالی‌یابی ژنوم برنج

ماتریس ژنوتیپی برای ۲۰۰۰ فرد تصادفی و ۱۰ نشانگر جهت تشکیل نقشه پیوستگی بر مبنای تابع کوزامبی با استفاده از نرم‌افزار *Map manager/GTX* تشکیل گردید و نقشه‌یابی دقیق با استفاده از نرم‌افزار *QGene Version 4* به روش مکان‌یابی فاصله‌ای CIM^2 انجام گرفت و حد آستانه QTLها بر اساس توزیع تجربی جمعیت و بر مبنای چرخش داده‌ها بدست آمد.

نتایج و بحث

نتایج ارزیابی‌های فنوتیپی

امتیاز ژنوتیپ‌ها برای تحمل به شوری در دو فامیل منتج از BC_3F_1-9 تنوع بالایی داشت به طوری که ژنوتیپ‌ها امتیاز 1^3 تا 9 را نشان دادند. در

آزمایش‌های مولکولی در آزمایشگاه کاربرد نشانگرهای مولکولی و آرایه‌های ژنی^۱ در مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج در فیلیپین صورت گرفت و محصولات تکثیرشده با PCR روی ژل پلی‌اکریل‌امید ۸٪ در ولتاژ ۱۰۰ و به مدت ۲/۵ ساعت در بافر ۱X TBE الکتروفورز شدند و تفکیک نوارها صورت گرفت. الگوهای نوارها با دستگاه (Alpha Innotech, Alpha Imager Corporation, San Leandro, CA) رویت شدند و رتبه‌دهی نوارها انجام گرفت. نمونه‌های دارای نوار مشابه با والد حساس و دوره‌ای (IR29) رتبه A، افراد دارای نوار مشابه با والد متحمل (Pokkali) رتبه B و افراد هتروزیگوت که هر دو نوار والدینی را داشتند، رتبه H گرفتند.

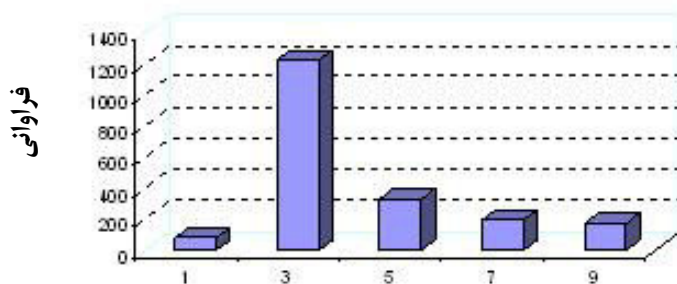
2. Composite Interval Mapping
3. Score

1. Gene Array and Molecular Marker Application (GAMMA)

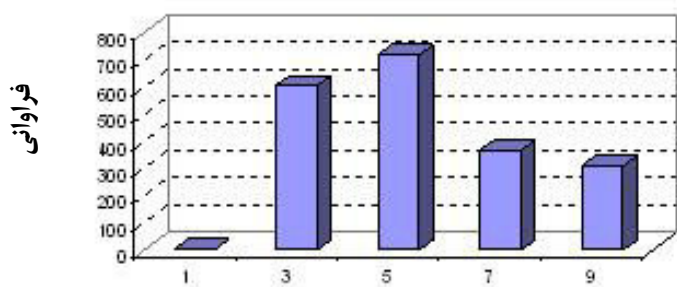
(شکل ۳). در هدایت الکتریکی ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر، توزیع پیوسته و نرمال بود. در هدایت الکتریکی ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر، ۳۰/۲۶ درصد از لاین‌ها متحمل و ۱۴/۹۳ درصد از لاین‌ها مانند IR۲۹ حساس بودند. در شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، ۶۱/۷۴ درصد لاین‌ها متحمل و ۸/۶۸ درصد آن‌ها حساس و در شوری ۱۸ دسی‌زیمنس بر متر ۲/۵۵ درصد از لاین‌ها متحمل و ۶۸/۲۶ درصد حساس بودند.

حالی که تمام لاین‌های منتج از BC₃F₁-۱۱-۶-۵ حساس تا نیمه‌حساس بودند. بنابراین، فقط اطلاعات ۲۰۰۰ فرد تصادفی از خانواده‌های BC₃F₄ حاصل از فامیل BC₃F₁-۹ جهت نقشه‌یابی مولکولی و اشباع ناحیه *Saltol* استفاده شدند. در هدایت الکتریکی ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، توزیع پیوسته و با کشیدگی کم به سمت والد متحمل و در هدایت الکتریکی ۱۸ دسی‌زیمنس بر متر، توزیع پیوسته و با کشیدگی به سمت والد حساس بود.

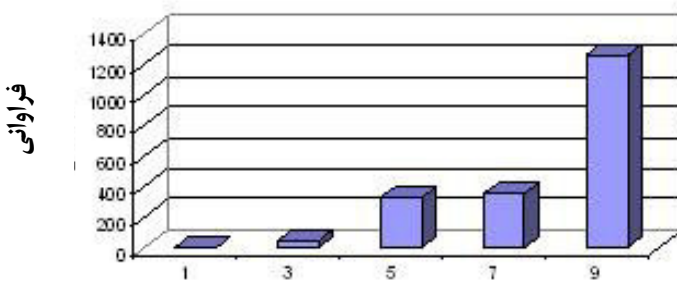
نمودار فراونی گیاهچه‌ها در EC=12



نمودار فراونی گیاهچه‌ها در EC=16

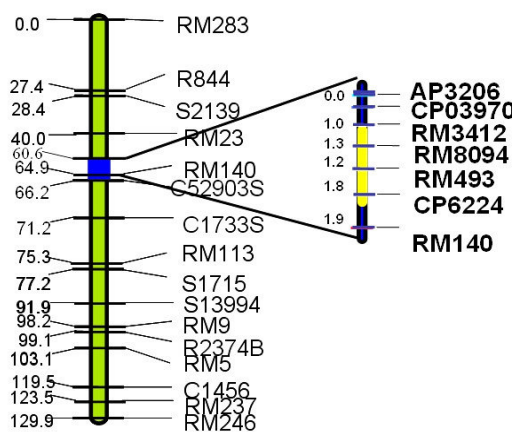


نمودار فراونی گیاهچه‌ها در EC=18



شکل ۳- توزیع فراونی فنوتیپی افراد جمعیت مورد ارزیابی

نتایج مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) برای امتیاز تحمل به شوری در هدایت الکتریکی ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر، یک QTL در موقعیت ۶۴/۶ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم با مقدار LOD برابر با ۳/۱ و ضریب تبیین ۲۴ درصد بین نشانگرهای RM3412 و CP6224 نشان داد. در هدایت الکتریکی ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر یک QTL با مقدار LOD برابر با ۲/۹ و ضریب تبیین ۱۸ درصد در فاصله ۶۳/۴ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم بین نشانگرهای RM8094 و RM3412 مکان‌یابی شد. در هدایت الکتریکی ۱۸ دسی‌زیمنس بر متر، مقدار LOD هیچ‌کدام از QTL‌های شناسایی‌شده بالاتر از حد آستانه $LOD=2.5$ نبود. علت این امر را می‌توان به از بین رفتن تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها به لحاظ اعمال غلظت بالای نمک و اریبی در داده‌های فوتویی در این سطح هدایت الکتریکی نسبت داد (جدول ۲).

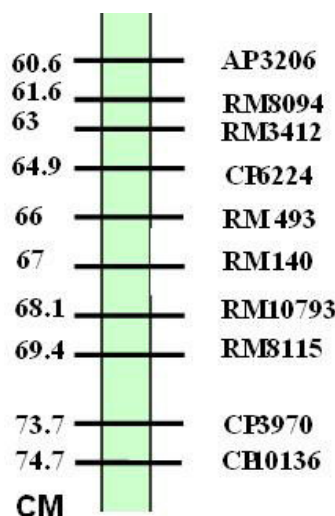


شکل ۵- نقشه ناحیه کروموزومی کنترل‌کننده تحمل به شوری در کروموزوم ۱ در مطالعه اولیه توسط Bonilla *et al.* (2002)

اثر افزایشی $qScor1$ در هدایت‌های الکتریکی ۱۲ و ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر، به ترتیب برابر با ۱/۶- و ۲/۷- بود. علامت منفی این مقادیر حاکی از تحمل به شوری بالای والد دهنده می‌باشد. براساس نتایج مشاهده‌شده در هدایت‌های الکتریکی ۱۲ و ۱۶

نتایج ژنوتیپی و مکان‌یابی QTL

ژنوتیپ ۲۰۰۰ فرد BC_3F_4 برای نقشه‌یابی دقیق ناحیه *Saltol* با استفاده از ۴ نشانگر EST-SSR شامل CP3970، CP6224، CP10136 و AP3206 و نشانگرهای ریزماهواره RM8115، RM10793، RM8094، RM3412، RM493 و RM140 که در فاصله Mb۱۱/۲ تا Mb۱۲/۷ یا ۶۰/۶ سانتی‌مورگان تا ۶۷/۵ سانتی‌مورگان قرار داشتند، تعیین شد و نقشه پیوستگی به دست آمد (شکل ۴). طول کلی نقشه برابر با ۱۴/۱ سانتی‌مورگان و متوسط فاصله بین دو نشانگر ۱/۴ سانتی‌مورگان بود. کمترین فاصله برابر با یک سانتی‌مورگان بین نشانگرهای AP3206، RM8094، RM493، RM140 و بیشترین آن برابر با ۴/۷ سانتی‌مورگان بین نشانگرهای CP3970 و RM8115 در بخش انتهایی ناحیه *Saltol* بود. تجزیه تک‌نشانگری، اثر بسیار معنی‌داری برای QTL‌های پیوسته با نشانگرهای RM140، RM8094، RM3412 و CP6224 و اثر معنی‌داری برای QTL پیوسته با نشانگر RM493 را نشان داد (جدول ۲).



شکل ۴- نقشه پیوستگی ۱۰ نشانگر استفاده شده جهت نقشه‌یابی دقیق ناحیه *Saltol* روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱

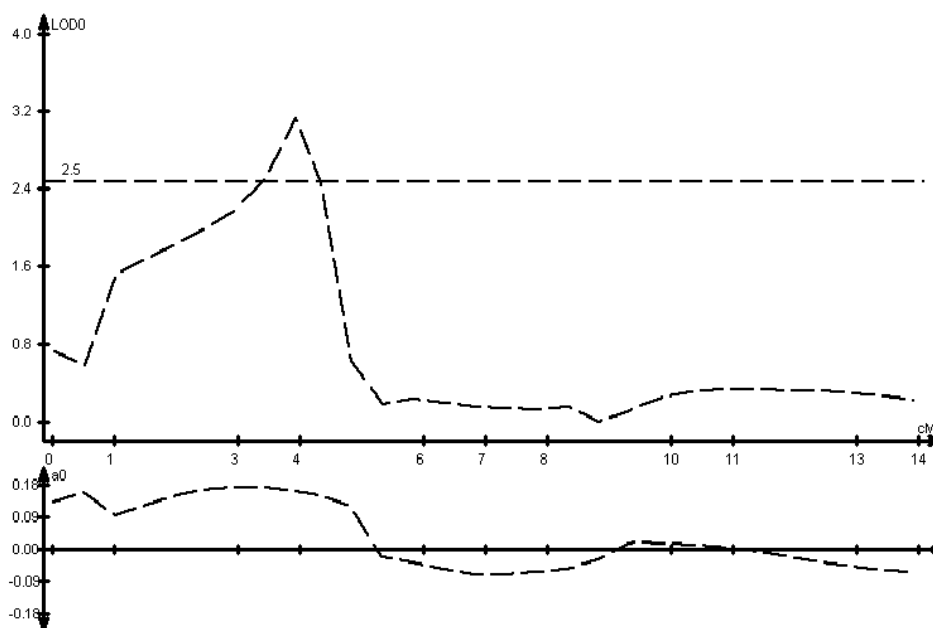
بنابراین RM3412 و CP6224 قرار می‌گیرد. براین گزینش به کمک این نشانگرها جهت اصلاح ژنوتیپ‌های ایرانی برای تحمل به شوری امکان‌پذیر می‌باشد. همچنین براساس نتایج تجزیه و تحلیل هاپلوتیپی این ناحیه نیز نشانگر RM8094 به‌عنوان نشانگری ارزشمند در برنامه‌های به‌نژادی با انتخاب به کمک نشانگر معرفی شد (Mohammadi-Nejad *et al.* 2008, 2010). در پژوهش حاضر،

دسی‌زیمنس بر متر، استنباط می‌شود موقعیت این QTL در ناحیه *Saltol* و در فاصله بین ۲/۸ تا ۴ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم است (شکل ۶). بر این اساس، مکان احتمالی *Saltol* در فاصله‌ای به طول حدود ۱/۲ سانتی‌مورگان روی کروموزوم شماره ۱ تعیین شد که براساس مطابقت با نقشه فیزیکی برنج این محدوده در حدود ۳۵۰ کیلوباز می‌باشد و در فاصله نشانگری RM8094،

جدول ۲- نشانگرهای پیوسته با QTLهای تحمل به شوری در سطوح مختلف هدایت الکتریکی

صفحت	نشانگر	B0	B1	LOD	سطح معنی‌داری
امتیاز تحمل گیاهچه‌ها به شوری در EC=16	RM8094	2.7	-0.66	4.17	0.003**
	RM3412	2.43	-0.43	3.55	0.005**
	RM140	2.87	-0.42	3.03	0.03*
	RM493	2.21	-0.82	2.66	0.04*
	CP6224	2.06	-0.48	3.94	0.007**
	RM10793	2.19	0.508	3.03	0.04*
امتیاز تحمل گیاهچه‌ها به شوری در EC=12	RM8094	2.8	-0.14	2.02	0.01*
	RM3412	2.54	-0.60	2.79	0.04*
	RM140	2.79	-0.33	2.90	0.02*
	CP6224	2.96	-0.29	2.84	0.03*
امتیاز تحمل گیاهچه‌ها به شوری در EC=18	RM8094	2.33	-0.52	1.82	0.04*
	CP6224	2.55	-0.43	1.51	0.06
	CP3970	2.43	-0.19	1.99	0.05
	CP10136	2.78	-0.13	1.26	0.04*

* B0: عرض از مبدأ، B1: شیب خط رگرسیون و LRT: نسبت درست‌نمایی می‌باشد.



شکل ۶- مکان‌یابی دقیق ناحیه کروموزومی *Saltol* روی کروموزوم ۱. محور افقی بیانگر حد آستانه تشخیص QTL می‌باشد.

نسبت آن‌ها در ریشه و اندام هوایی به همراه امتیاز لاین‌ها برای تحمل به شوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده، به طور کلی ۱۱ عدد QTL با میزان LOD بین ۳/۲۵ تا ۱۱/۷۴ مکان‌یابی شدند که سه QTL برای امتیاز تحمل به شوری روی کروموزوم‌های ۱، ۶، ۷ و یک QTL برای هر کدام از صفات غلظت سدیم اندام هوایی، غلظت پتاسیم اندام هوایی، غلظت سدیم ریشه و دو QTL برای غلظت پتاسیم در ریشه گزارش شدند. واضح‌ترین QTL بزرگ اثر برای غلظت سدیم اندام هوایی (qSKC1) با LOD برابر با ۲۲/۷۴ بیش از ۴۰ درصد از واریانس فنوتیپی کل را توجیه کرد که روی کروموزوم ۱ در ناحیه بین نشانگرهای C1214 و S2139 قرار داشت. ناحیه گزارش شده برای qSKC1 با ناحیه گزارش شده توسط *Bonilla et al.* (2002) مطابقت داشت و حدود ۲ Mb بالاتر از ناحیه گزارش شده توسط *Koyama* (2001) قرار دارد.

پیشرفت جالبی در نقشه‌یابی دقیق qSKC1 با استفاده از همسانه‌سازی بر پایه نقشه ارایه گردید (*Ren et al.* 2003). این پژوهشگران از ۱۹۲ گیاهچه BC₃F₄ و ۱۴ نشانگر CAPS موجود در ناحیه qskc1 برای نقشه‌یابی دقیق و از گیاهچه‌های BC₃F₄ برای اندازه‌گیری غلظت پتاسیم در اندام هوایی تحت شرایط شور استفاده کردند. در مطالعه آن‌ها از دو نشانگر CAPS به نام‌های K159 و K061 که نشانگرهای طرفینی این QTL بودند برای شناخت افراد نوترکیب از بین 2973 فرد BC₃F₄ استفاده شد و گیاهچه‌های هموزیگوت نوترکیب مشخص شدند تا امکان استفاده از لاین‌های خالص برای اندازه‌گیری غلظت پتاسیم وجود داشته باشد. این پژوهشگران موفق به شناسایی یک لاین نسبتاً ایزوژن در BC₅F₂ شدند که حاوی بخش بسیار کوچکی برای qSKC1 از والد دهنده در زمینه ژنتیکی والد دوره‌ای بود. با مقایسه توالی نوکلئوتیدی qSKC1 بین دو والد، ۶ نوکلئوتید جایگزین شده یافت

اشباع ظریف نقشه با ترتیب ارایه شده با توالی ژنومی برنج مطابقت داشت. بنابراین، با تمرکز بر فاصله بین نشانگرهای CP6224 و RM8094 برای ایجاد جمعیتی جدید با استفاده از تلاقی برگشتی لاین‌های BC₃F₄ متحمل که حاوی نواحی نوترکیب برای این ناحیه کروموزومی با والد دوره‌ای IR29 باشد و استفاده از حداکثر نشانگرهای ممکن در این ناحیه، می‌توان به شناسایی ژن‌های مؤثر برای تحمل به شوری اقدام کرد. ارزیابی ویژگی‌های ژنومی این ناحیه با استفاده از فناوری‌های پروتئومیکس و ریزآرایه ژنی تحت پروژه GCP^۱ (اطلاعات منتشر نشده) در جریان است و تاکنون هفت ژن کاندید برای این QTL گزارش شده است که در راستای شناسایی و جداسازی ژن‌های تحمل به شوری و انتقال این ناحیه از راه نقشه‌یابی دقیق‌تر برای برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر مفید خواهد بود. *Tanksley et al.* (1998) با استفاده از نشانگرهای RFLP موقعیت کروموزومی این ناحیه Salt mRNA را روی کروموزوم ۱ و در ناحیه RG146B مکان‌یابی نمود. بعد از توالی‌یابی ژنوم برنج مکان دقیق این ژن در فاصله ۱۳/۸۸۵ تا ۱۳/۸۸۷ Mb روی کروموزوم ۱ نقشه‌یابی شد.

در مطالعه‌ای جامع *Ren et al.* (2003) و *Lin et al.* (2004) یک QTL بزرگ اثر را برای جذب سدیم و پتاسیم در اندام هوایی و ریشه برنج نقشه‌یابی کردند. در این بررسی از جمعیت F_{2:3} حاصل از تلاقی یک رقم متحمل ایندیکا (NonaBokra) با یک رقم حساس ژاپونیکا (Koshihikori) برای نقشه‌یابی استفاده شد. ارزیابی تحمل به شوری در مرحله گیاهچه انجام شد و با استفاده از ۱۶۱ نشانگر RFLP نقشه پیوستگی ایجاد شد. تعداد ۹ ویژگی در رابطه با غلظت یون‌ها و

ژن شناسایی شده در برنج برای تحمل به شوری از طریق مطالعات کلاسیک و هدفمند بوده است. پایان‌یافتن توالی‌یابی ژنوم برنج توسط IRGSP (2005)، نقشه‌یابی QTLها با استفاده از اطلاعات این بانک جهت انتخاب نشانگرهای هدفمند و به منظور رسیدن به نشانگرهای راهنما در گزینش و نهایتاً اصلاح به کمک نشانگر را بسیار عملی و امیدبخش نموده است. ادغام ژن‌های تحمل به غرقاب (Sub1) در یک رقم با دامنه کشت بسیار وسیع به نام Swarna با استفاده از اصلاح به کمک نشانگر و ارزیابی موفقیت‌آمیز این رقم در شرایط مزرعه و در پی آن ادغام این ژن در سایر ارقام، نمونه‌ای از جنبه‌های کاربردی مهم اصلاح به کمک نشانگر در برنج می‌باشد.

شدند که با تغییر ۴ اسیدآمینو در ترکیب پروتئین منجر به تحمل به شوری می‌گردند. این ژن تنظیم‌کننده فعالیت غشاء برای نوعی از ترانسپورترها به نام HKT⁺ می‌باشد که در گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها یافت می‌شود و به صورت گزینشی در جهت جذب سدیم نیز عمل می‌کند. البته کنش فیزیولوژیک این غشاء در برنج هنوز مطالعه نشده است و بنابراین پیشنهاد گردیده است که در شرایط شور، ژن‌های SKC مسئول تنظیم نسبت سدیم به پتاسیم می‌باشد که در ناحیه ۱۱/۴۵ تا ۱۱/۴۶ Mb روی نقشه فیزیکی قرار دارند. در واقع این ژن به عنوان اولین

1. High-affinity K⁺ Transporter (HKT)

REFERENCES

- 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 Philippines Agricultural Scientist*. 85: 64-74.
- Delaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep, version II. *Plant Molecular Biology*. 4: 19-21.
- Gregorio GB (1997) Tagging salinity tolerance genes in rice using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Ph.D Dissertation, University of the Philippines, Los Baños, Philippines.
- Gregorio GB, Senadhira D, Mendoza RD (1997) Screening rice for salinity tolerance. IRRRI Discussion Paper Series No. 22. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.
- Gregorio GB, 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.
- 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.
- Lafitte H, Ismail A, Bennett J (2006) Abiotic stress tolerance in tropical rice: progress and future prospects. *Oryza*. 43: 171.
- Lin H X, Zhu MZ, Yano M, Gao JP, Liang ZW, Su WA, Hu XH, Ren H, Chao DY (2004) QTLs for Na⁺ and K⁺ uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. *Theor. Appl. Genet*. 108: 253-260.
- McCouch SR, Doerge RW (1995) QTL mapping in rice. *Trends in Genetics*. 11: 482-487.
- Mohammadi-Nejad G (2008) Identification and validation of QTLs controlling the attributed traits to salinity in rice. Ph.D Dissertation, College of Agriculture, Isfahan

- University of Technology.
- Mohammadi-Nejad G, Arzani A, Rezaei 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.
- Mohammadi-Nejad G, Singh RK, Arzani A, Rezaei AM, Sabouri H, Gregorio GB (2010) Evaluation of salinity tolerance in rice genotypes. *International Journal of Plant Production*. 4: 199-208.
- Nakhoda B, Leung H, Mendioro MS, Mohammadi-Nejad G, Ismail AM (2012) Isolation, characterization, and field evaluation of rice (*Oryza sativa* L., Var. IR64) mutants with altered responses to salt stress. *Field Crops Research*. 127, 191-202.
- 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.
- Ren ZH, Zhu MZ, Yano M, Gao JP, Liang ZW, Su WA, Hu XH, Chao DY, and Lin HX (2003) QTLs for Na and K content of shoot and root controlling rice salt tolerance, Proc. First Intl. Symp. Rice Functional Genomics, International Convention Center, Shanghai, China.
- Szaboles I (1989) *Salt-Affected Soils.*, CRC Press., Florida.
- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, and Bonierbale MW (1989) RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science, *Biotechnology*, 7: 257-264.

Fine-Mapping of a Major Effect QTL Responsible for Salinity Tolerance (*Saltol*) in Rice

GH. MOHAMMADI-NEJAD¹, R. K. SINGH², A. M. REZAIE³,
A. ARZANI⁴, B. NAKHODA⁵, M. H. FOTOKIAN⁶, A. MOUMENI⁷
AND GLEN B. GREGORIO⁸

1, Dep. of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, 2, 8, Plant Breeding, Genetics and Biotechnology Division-International Rice Research Institute, (IRRI), LosBanos-Laguna-Philippines, 3, 4, Dep. of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, 5, Dep. of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, 6, Dep. of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahed University-Tehran, 7, Rice Research Institute of Iran, Rasht- Iran

(Received: Dec. 1, 2011- Accepted: Dec. 19, 2011)

ABSTRACT

This research was conducted to validate and fine-map the region attributed to salinity tolerance (*Saltol*) on chromosome1 in rice at International Rice Research Institute (IRRI) during years 2005 to 2007. A major effect QTL (*Saltol*) which is responsible for Na⁺ and K⁺ uptake and Na/K ratio was identified using F8 recombinant inbred lines (RILs) of Pokkali/ IR29 cross on chromosome 1. This QTL explained around 64.3 to 80.2% of the phenotypic variation for the mentioned traits. Fine-mapping was done using 10 SSR and EST-SSR markers and near isogenic lines (BC3F4), derived from IR29 × Pokkali produced for salinity tolerance at seedling stage. Random BC3F4 individuals were genotyped and phenotyped under two different electrical conductivities at seedling stage. QTL responsible for salinity tolerance at both ECs, were found in the *Saltol* region, which explained 18 and 24% of the phenotypic variation for SES scores, respectively. According to the present results, possible location of *Saltol* was found in the interval around 1.2 cM on chromosome 1 that was around 350Kb based on physical map. This QTL was mapped at the intervals of RM8094, RM3412 and CP6224. Therefore, molecular breeding for salinity tolerance in Iranian genotypes could be done using the mentioned markers.

Keywords: Fine mapping, Rice, Salinity tolerance, *Saltol*, Seedling stage

* Corresponding author: Gh. Mohammad-Nejad E-mail: Mohammadinejad@mail.uk.ac.ir