

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

رضیه زارع<sup>۱</sup>، قاسم محمدی نژاد<sup>۲\*</sup>، حسین شاهسوند حسنی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد بخش بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.  
<sup>۲</sup> اعضای هیات علمی بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۵/۶

چکیده

با توجه به ضرورت تحمل به شوری در برنج و از طرفی وجود تحقیقات مختلف اصلاح نباتات مولکولی در شناسایی QTLهای بزرگ اثر کنترل کننده تحمل به شوری، ضرورت شناسایی حضور این QTLها در ارقام مختلف ایرانی و شناسایی تاثیرگذارترین QTLها در پیشبرد انتخاب در برنامه‌های اصلاحی بسیار مفید است. در این مطالعه، پاسخ به شوری ۲۰ رقم مختلف برنج ایرانی و دو شاهد متحمل (*Pokkali*) و حساس (*IR29*) در مرحله گیاهچه‌ای در شرایط گلخانه ( $10$  و  $6$ ،  $EC=0$ ) با استفاده از ۶ نشانگر چند شکل ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس اختلاف بسیار معنی داری بین ژنوتیپ‌ها از نظر صفات مختلف نشان داد. ژنوتیپ‌های برنج از نظر تحمل به شوری پاسخ متفاوتی در مرحله گیاهچه‌ای نشان دادند. دندروگرام به دست آمده از روش UPGMA (روش اتصال میانگین)، ارقام را به سه گروه طبقه‌بندی کرد. بیست رقم برنج بر اساس QTL بزرگ اثر ناحیه *Saltol* برای تحمل به شوری بر روی کروموزوم ۱ در گروه‌های هاپلوتیپی جداگانه قرار گرفتند. نتایج نشان دهنده پتانسیل ژرم پلاسم برنج‌های ایرانی جهت یافتن ژن‌های جدید تحمل در القاء تحمل به شوری، به غیر از ناحیه *Saltol* در مرحله گیاهچه‌ای بود. همچنین، نشانگر RM8094 در مرحله گیاهچه‌ای به عنوان مؤثرترین نشانگر جهت شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری می‌باشد.

کلمات کلیدی: برنج، تحمل شوری، تنوع هاپلوتیپی، ریز ماهواره.

اصلاح تحمل به شوری در ارقام برنج نیازمند درک مکانیسم های تحمل به شوری است (Moradi, 2002). روش های مولکولی از طریق نشانمندی کردن ژن ها و گزینش به کمک نشانگر باعث تسریع برنامه های اصلاحی شده است. شناسایی نشانگرهای مولکولی کاملاً پیوسته با ژن مورد نظر و مکان یابی آن یک هدف مهم در اصلاح برنج است که از این طریق می توان بر پیچیدگی های روش های اصلاحی متداول غلبه کرد (Flowers & Yeo, 1995). استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در طی سال های اخیر جهت نقشه یابی QTL ها در برنج مورد توجه فراوان قرار گرفته است (McCouch et al., 1997). در برنج به طور بالقوه ۵۷۰۰ تا ۱۰۰۰۰ توالی ریزماهواره با واحدهای تکراری ۲، ۳ و یا ۴ نوکلئوتیدی متفاوت وجود دارد (Arif, 2002; McCouch et al., 1997) مک کوچ و همکاران (McCouch et al., 2002) نقشه ای شامل ۲۲۴۰ نشانگر ریزماهواره تهیه نمودند که تمام ژنوم برنج را پوشش داد. پس از آن نقشه ژنتیکی کامل تری توسط International Rice Genome Sequencing Project ارائه شد که تعداد ۱۸۸۲۸ نشانگر SSR (دو، سه و چهار نوکلئوتیدی) را شامل می شود (IRGSP, ۲۰۰۵). این نشانگرها در برنج قادرند چند شکلی را در بین واریته ها و یا درون واریته ها شناسایی نمایند (Olufowote et al., 1997; Yang et al., 1994). مکان کروموزومی بزرگ اثر *Saltol* واقع بر روی

برنج بعد از گندم غذای اصلی مردم ایران است و در سطحی معادل ۶۰۰ هزار هکتار زراعت می شود (فتوکیان، ۱۳۸۳). ۹۰ درصد شالیزارهای دنیا به نوعی تحت تاثیر شوری هستند (Ansari et al., 2001). شوری رشد گیاه برنج را در مراحل مختلف رشد از جوانه زنی تا رسیدن کامل به درجات مختلف تحت تاثیر قرار می دهد (Lang et al., 2001b). واکنش برنج به شوری در مراحل مختلف رشد متغیر است، در مرحله جوانه زنی به شوری نسبتاً متحمل، در اوایل دوره گیاهچه ای (۳ برگی) خیلی حساس شده و مجدداً در مرحله رشد رویشی نسبتاً متحمل می گردد. در مرحله گرده افشانی و لقاح نیز به شوری حساس شده و در مرحله رسیدن دانه به طور فزاینده ای متحمل تر می گردد (Moradi, 2002; Lang et al., 2001a). اصلاح تحمل به شوری توسط محققان زیادی مطالعه شده است (Gregorio et al., 2002; Ponnampurama, 1984; Shannon, 1984) موفقیت های بدست آمده در گذشته به دلیل پیچیدگی کار اصلاح برای تحمل به شوری، فقدان احساس ضرورت و فوریت واقعی برای اصلاح آن، تنوع ژنتیکی ناکافی برای تحمل به شوری، پیچیدگی اثرات متقابل شوری با عوامل محیطی و فقدان تکنیک های گزینشی کارا چندان قابل توجه نبوده است (Flowers & Yeo, 1995; Gregorio, 1997). طراحی استراتژی های اصلاحی پویا برای

شناسایی نمودند (Lang et al., 2001). با استفاده از تجزیه نشانگر AFLP شانزده QTL مسئول جذب یون‌های سدیم و پتاسیم در جوانه‌های برنج گزارش شد (Flowers et al., 2000). در پژوهشی از ۱۱۸ فرد نسل ششم جمعیت RIL حاصل از تلاقی IR4630-22-2-51-3/IR15324-117-3-2-2 برای مکان‌یابی صفات مرتبط با تحمل شوری استفاده نمودند. آنها تعداد ۸۵ نشانگر AFLP و ۲۷ نشانگر SSR چند شکل را در پژوهش خود به کار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه، ۱۱ QTL روی کروموزوم های ۱، ۴، ۶ و ۹ برای صفات مختلف شناسایی نمود که تغییرات فنوتیپی از ۶/۴ تا ۱۹/۶ درصد را توجیه کردند (Koyama et al., 2001). در شرایط شوری صفات مرتبط با تحمل به شوری مثل طول اندام هوایی، مقدار کم یون سدیم و مقدار بیشتر یون پتاسیم در اندام هوایی، وزن خشک زیاد ریشه و اندام هوایی در گیاهچه‌های برنج مطالعه گردیدند و نشان داده شد که این صفات دارای آثار ژنتیکی افزایشی خیلی معنی‌دار می‌باشند، گرچه توارث‌پذیری آنها کم است. از این صفات می‌توان به عنوان معیار با ارزش در گزینش لاین‌های متحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای استفاده کرد (Gregorio, 1997; Gregorio et al., 2002). هاپلوتیپ، نشان دهنده‌ی توالی نوکلئوتیدهای ژنوم یک فرد بر روی تعدادی از SNP است. ژنوم هر فرد ترکیبی از دو هاپلوتیپ به ارث رسیده از والدین است که این ترکیب را اصطلاحاً ژنوتیپ فرد می‌-

کروموزوم ۱، که در تنظیم جذب سدیم، پتاسیم، نسبت سدیم به پتاسیم و تحمل به شوری در مرحله گیاهچه در برنج مؤثر است، در سال ۱۹۹۷ توسط گریگوریو درنسل  $F_8$  حاصل از تلاقی Pokkali×IR29 با استفاده از نشانگرهای ریز-ماهوره ( $SSR^1$  و  $SSLP^2$ ) شناسایی گردید (Gregorio, 1997). این نتیجه به وسیله محققین مختلفی تأیید گردیده است (Mohammadi-Nejad, 2008; Flowers et al., 2000; Niones, 2004). به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با ناحیه Saltol که به منظور اصلاح برای تحمل به شوری در برنامه های انتخاب به کمک نشانگر ( $MAS^3$ ) ضروری است، بونیا و نیونس (Bonilla et al., 2002; Niones, 2004) نقشه این ناحیه کروموزومی را با استفاده از جوامع حاصل از تلاقی Pokkali×IR29 با نشانگرهای  $RFLP^4$  و  $SSLP$  اشباع نمودند. در پژوهشی در کروموزوم یک برنج یک QTL اصلی برای تحمل به شوری گزارش دادند (Gong et al., 1999). در مطالعه دیگری نشانگرهای  $RFLP$  و  $SSR$  پیوسته‌ای با QTL‌های صفاتی چون بقای گیاهچه در محلول شور، وزن خشک ریشه و جوانه، جذب سدیم و پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۲ با استفاده از ۱۱۸ فرد جمعیت نسل هشتم RIL حاصل از تلاقی Tesnai2 و CB

<sup>1</sup> - Simple Sequence Repeat

<sup>2</sup> - Simple Sequence Length Polymorphism

<sup>3</sup> - Marker Assisted Selection

<sup>4</sup> - Restriction Fragment Length Polymorphism

کننده تحمل به شوری و شناسائی موثرترین نشانگرهای این ناحیه از اهداف مهم این مطالعه می‌باشد. همچنین ارزیابی فنوتیپی صفات جهت بررسی و میزان الگوی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها، گروه‌بندی و ایجاد زمینه بهره‌برداری از این تنوع ژنتیکی از طریق روش‌های مرسوم و مولکولی از دیگر اهداف این پژوهش بودند.

#### مواد و روش‌ها

##### ارزیابی‌های فنوتیپی

روش غربال‌گری سریع ۲۰ رقم برنج بومی و اصلاح‌شده ایرانی جهت ارزیابی پاسخ فنوتیپی آن‌ها به تنش شوری و شناسایی وضعیت *Saltol* در این ارقام در مرحله گیاهچه‌ای، طبق روش گریگوریو و همکاران (۱۹۹۷) انجام گرفت. در مرحله گیاهچه-ای ۱۴ روز پس از کشت، اعمال تنش در محلول غذایی یوشیدا با هدایت الکتریکی برابر با  $10 \text{ dsm}^{-1}$  به مدت ۲۱ روز تحت شرایط کنترل شده در فیتوترون در دمای  $25^\circ \text{C}$  در روز و  $21^\circ \text{C}$  در شب و رطوبت ۷۰ درصد انجام شد و امتیاز تحمل به شوری ژنوتیپ‌ها با استفاده از سیستم نمره‌دهی ۹-۱ صورت پذیرفت (Gregorio et al., 1997). ژنوتیپ‌ها در پنج گروه ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ رتبه‌دهی شدند که متحمل‌ترین ژنوتیپ رتبه ۱ و حساس‌ترین ژنوتیپ رتبه ۹ را به خود اختصاص دادند. آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو تکرار اجرا

نامند. با ادغام هاپلوتیپ پدری و مادری ژنوتیپ فرد که شامل یک رشته ۰، ۱ و ۲ است ایجاد می‌گردد، اگر دو هاپلوتیپ مشابه باشند هوموزیگوس است که با ۰ و ۱ نشان داده می‌شود و در حالت هتروزیگوسیتی با ۲ نشان داده می‌شود. به نظر می‌رسد تنوع هاپلوتیپ‌ها طی نسل‌های متوالی، در نواحی معینی از ژنوم بدون تغییر باقی می‌ماند. این نواحی، ژنوم را به مجموعه‌ای از بلوک‌های هاپلوتیپی افراز می‌کنند. بدین منوال حتی زمانی که ناحیه‌ای از کروموزوم‌ها بحث می‌گردد که براساس مکان‌یابی QTL‌ها حاوی ژن‌های تاثیرگذار در کنترل صفتی می‌باشد، می‌توان بر مبنای مطابقت توالی ریز ماهواره‌های آن ناحیه مورد نظر در یک جمعیت با هاپلوتیپ والد دهنده به بررسی هاپلوتیپ‌های مختلف پرداخت و با بررسی فنوتیپی جمعیت تعیین نمود کدام هاپلوتیپ بیان بهتری از صفت مربوطه دارد و ضمن تعیین بهترین و موثرترین ترکیب آلی ناحیه QTL مورد نظر که برای انتخاب به کمک نشانگر بسیار ضروری و مفید می‌باشد، بر اساس سایر هاپلوتیپ‌ها که فنوتیپ متحملی دارند ولی از نظر مطابقت با والد دهنده QTL هیچگونه مطابقتی ندارند پی برد که ژرم پلاسما‌های مورد نظر می‌توانند حاوی لوکوس-های جدیدی برای صفت مورد نظر باشند.

از آنجا که برنج به شوری حساس و نیمه حساس می‌باشد (Mass & Hafman, 1997) بررسی تنوع آلی نشانگرهای ناحیه QTL کنترل

الگو بود. به منظور تکثیر قطعات DNA چرخه‌های PCR به شرح زیر انجام شد: بعد از ۵ دقیقه واسرشت سازی در دمای  $94^{\circ}\text{C}$  سپس ۳۵ چرخه شامل: ۱ دقیقه در دمای  $94^{\circ}\text{C}$ ، ۴۵ ثانیه در دمای اتصال  $55^{\circ}\text{C}$ ، ۱ دقیقه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  و بسط نهایی ۷ دقیقه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  انجام شد. محصولات PCR در ژل پلی اکریل آمید ۸٪ با ولتاژ ۱۰۰ در بافر TBE (1x) به مدت ۲ ساعت تفکیک شدند. سپس در اتیدیوم برمایند رنگ آمیزی شدند و امتیازدهی باندها با استفاده از نرم افزار AlphaEaseFC4 انجام شد.

#### تجزیه و تحلیل داده‌های فنوتیپی

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

#### تجزیه و تحلیل داده‌های ژنوتیپی

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

شد. تیمارهای آزمایشی شامل دو سطح نرمال و شوری (با هدایت الکتریکی ۶ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر) عامل اصلی و ارقام برنج ایرانی، که شامل ارقام گیل، ندا، نعمت، خزر، سپیدرود، عنبربو، بینام، شاه‌پسند، حسنی، قشنگه، غریب، طارم پاکوتاه، درفک، اهلمی طارم، صدری، طارم محلی، موسی طارم، دم‌سیاه، آمل و زاینده رود عامل فرعی بودند. صفات طول ریشه و ساقه، وزن خشک ریشه و ساقه، غلظت سدیم، پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم به روش فلائیمتومتری برای گیاهان در مرحله ۴ برگ‌گی اندازه‌گیری گردید.

#### ارزیابی ژنوتیپی

گیاهچه‌های ۲۰ رقم برنج ایرانی و دو شاهد متحمل (Pokkali) و حساس (IR29) به شوری جهت استخراج DNA ژنومی طبق روش تغییر یافته دلاپورتا کشت گردیدند (Delaporta, 1983). از ۶ نشانگر چند شکل ریزماهواره در مرحله گیاهچه‌ای مربوط به ناحیه *Saltol* واقع بر روی کروموزوم ۱ برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf در حجم  $10\ \mu\text{l}$  انجام شد. مخلوط واکنش حاوی، PCR بافر یک برابر،  $1/5\ \text{MgCl}_2$  میلی مولار، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۵ میلی مولار، Taq پلیمرز یک واحد و ۵۰ نانو گرم از DNA

پتاسیم، نسبت  $Na^+/K^+$  و رتبه‌دهی تحمل به شوری) می‌باشد (جدول ۱). وجود تنوع ژنتیکی موثر در تحمل به شوری برای انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به شوری با عملکرد بالا و درک بهتر سازوکارهای فیزیولوژیکی تحمل به شوری در برنج می‌تواند بسیار مفید باشد. اختلاف آماری معنی‌دار بین ارقام بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا بین مواد گیاهی مورد ارزیابی و احتمالاً مکانیسم‌های متفاوت بین آن‌ها در واکنش به تنش شوری است که می‌توانند در انتخاب ارقام مناسب و تولید جمعیت‌های در حال تفرق جهت مکان‌یابی ژنی مورد استفاده قرار گیرند. اثرات متقابل ژنوتیپ در شوری در شرایط تنش برای اکثر صفات معنی‌دار بود، که نشان دهنده واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها در پاسخ به تنش شوری می‌باشد.

#### نتایج ارزیابی ژنوتیپی

با افزایش تعداد آلل تکثیر شده در یک مکان، میزان اطلاع‌رسانی آن مکان برای تعیین تنوع ژنوتیپ‌ها افزایش می‌یابد. در مرحله گیاهچه‌ای تعداد ۲۵ آلل در مطالعه به کمک ۶ آغازگر ریز-ماهواره تکثیر شدند. بیشترین تعداد آلل، مربوط به جایگاه RM8094 و برابر ۶ آلل و کمترین تعداد آلل (۳) مربوط به نشانگر RM10890 بود. محتوی اطلاعات پلی مورفیسم هر نشانگر میزان تنوع آن نشانگر را نشان می‌دهد. در واقع PIC تخمینی از قدرت تمایز هر نشانگر با محاسبه تعداد آلل‌هایی

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

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

#### آنالیز داده‌های هاپلوتیپی

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

#### نتایج و بحث

##### نتایج ارزیابی فنوتیپی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اختلاف بسیار معنی‌داری ( $p < 0.01$ ) را بین ژنوتیپ‌ها از نظر تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای نشان داد که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی از نظر صفات اندازه‌گیری شده (طول ریشه، طول ساقه، وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه، وزن تر ریشه، وزن تر ساقه، نسبت وزن ساقه به ریشه، بیوماس، غلظت سدیم و

RM10890 کمترین میزان PIC (۰/۵۴) را نشان داد. نشانگرهای RM8094 و RM493 با داشتن بیشترین میزان PIC به عنوان بهترین نشانگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی نشانگرها در مرحله گیاهچه‌ای شناسایی شدند (جدول ۲).

که بیان شده‌اند و همچنین فراوانی‌های مرتبط با آن آلل‌ها می‌باشد (Smith et al., 2000). محتوی اطلاعات پلی مورفیک از ۰/۷۷ تا ۰/۵۴ متفاوت بود. بالاترین PIC متعلق به نشانگرهای RM8094 (۰/۷۷) و RM493 (۰/۷۴) بود در حالی که

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات در دو شرایط شوری و نرمال.

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

X10	X9	X8	X7	X6	X5	X4	X3	X2	X1	درجه آزادی (df)	منابع تغییر S.O.V
0.06	0.001	1.15	0.008	3×10 <sup>-4</sup>	0.013	0.004	0.008	2.5*	0.53	1	تکرار rep
24.93**	4.47**	10.29	2.188**	10.18**	16.37**	118.7**	1.7**	2260.6**	110.6**	2	تیمار treatment
0.17	0.002	1.38	0.006	0.001	0.01**	0.01	0.006	0.117	0.139	2	خطای ۱ Error1
8.69**	0.35**	16.13**	0.13**	0.085**	0.417	1.04**	0.12**	315.6**	4.29**	19	ژنوتیپ genotype
0.71**	0.08**	4.22**	0.02**	0.027**	0.12*	0.33**	0.019**	18.1**	1.52	38	تیمار×ژنوتیپ treat×gen
0.45	0.027	33.05	0.15	0.054	1.35	0.46	0.14	99.5	14.43	57	خطای ۲ Error2

X1: طول ریشه، X2 طول ساقه، X3: وزن خشک ساقه، X4: غلظت سدیم، X5: غلظت پتاسیم، X6: نسبت سدیم/پتاسیم، X7: بیوماس، X8: وزن ساقه به ریشه.

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

اصلاحی از طریق انتخاب به کمک نشانگر افزایش می‌یابد. اطلاعات بدست آمده از این بررسی می‌تواند در مطالعات نقشه‌یابی ژنومی و توسعه ژنوتیپ‌های برنج با زمینه ژنتیکی وسیع‌تر و متنوع‌تر جهت دستیابی به بهره‌وری بالاتر در پروژه‌های

نتایج نشان داد که آنالیز ریز ماهواره سیستم نشانگری مفیدی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی است. اطلاع از شباهت‌های ژنتیکی می‌تواند جهت اجتناب از یکسان شدن ژرم پلاسماها از لحاظ ژنتیکی مفید باشد. کارایی و سرعت برنامه‌های

## زارع و همکاران، ۱۳۹۲

در این گروه بندی ارقام حساس، متحمل و نیمه متحمل به طور مختلط قرار داشتند که به نوعی بیانگر زمینه ژنتیکی متفاوت ارقام متحمل ایرانی از نظر QTL های دخیل در تحمل به شوری می باشد.

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

تجزیه خوشه‌ای بر مبنای داده‌های ریزماهواره ژنوتیپ‌های برنج را در ۳ گروه طبقه بندی کرد که

### جدول ۲- تعداد آلل و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) ۶ نشانگر SSR.

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

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

یکسان آلی از نظر همه نشانگرهای ریز ماهواره متعلق به Pokkali را نداشتند. محمدی نژاد و همکاران در بررسی تحمل به شوری ژنوتیپ‌های برنج، ۳۰ ژنوتیپ را بر اساس QTL ناحیه *saltol* در ۱۶ گروه هاپلوتیپی قرار دادند، که هیچ کدام از ۳۰ ژنوتیپ هاپلوتیپی مشابه Pokkali (ژنوتیپ مرجع) تولید نکردند (Mohammadi-Nejad *et al*, 2010). هاپلوتیپ‌های شماره ۲، ۴، ۵، ۸، ۹ و ۱۰ (شامل ارقام متحمل و نیمه‌متحمل به شوری)، که از نظر جایگاه نشانگری RM3412 مشابهت آلی با پوکالی داشتند، می‌توان گفت که QTL کنترل کننده

بررسی تنوع هاپلوتیپی QTL واقع بر روی کروموزوم ۱ در مرحله گیاهچه‌ای

شش نشانگر چند شکل پیوسته به QTL مقاوم به شوری در مرحله گیاهچه‌ای واقع بر روی کروموزوم ۱ (ناحیه کروموزومی *Saltol*) جهت بررسی تنوع هاپلوتیپی مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۳)، که ۲۰ ژنوتیپ از لحاظ مطابقت با نواحی ریز ماهواره Pokkali در ۱۲ گروه هاپلوتیپی قرار گرفتند (جدول ۳) هیچ یک از ۲۰ ژنوتیپ هاپلوتیپی مشابه با Pokkali نداشتند. بعبارت دیگر هیچ یک از ژنوتیپ‌های استفاده شده ترکیب دقیقاً



می‌توانند بعنوان منابع جدیدی جهت مکان‌یابی ژن‌های جدید تحمل به شوری و توسعه لاین‌های اصلاحی جدید تحمل به شوری مرحله گیاهچه‌ای مورد استفاده قرار گیرند.

ارقامی که آلل نشانگر یکسان با Pokkali را برای RM3412 و RM18090 دارا بودند، پاسخ متفاوتی نسبت به شوری نشان دادند (شامل ارقام حساس، متحمل و نیمه متحمل) در حالی که نشانگر RM8094 آلل مشابه با Pokkali را در ژنوتیپ‌های متحمل (ندا، موسی‌طارم و زاینده‌رود) تکثیر کرد، بنابراین می‌توان گفت این نشانگر، نشانگر مناسبی جهت مطالعات تحمل به شوری در برنج باشد از این نظر که آلل مشابه با ژنوتیپ مرجع را در ژنوتیپ‌های متحمل تکثیر کرد (جدول ۳).

براساس آخرین نتایج مکان‌یابی دقیق مکان Saltol در فاصله بین دو نشانگر RM8094 و RM3412 قرار دارد (MohammadiNejad et al, 2011). همچنین هاپلوتیپ شماره ۵ (موسی‌طارم)، از لحاظ نشانگرهای RM8094 و RM3412، آلل مشابه با Pokkali را داشت و روندی متحمل به تنش در مرحله گیاهچه‌ای نشان داد، به نظر می‌رسد QTL کنترل‌کننده تحمل به شوری ناحیه Saltol در مرحله گیاهچه‌ای، در این رقم وجود داشته باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که نشانگر RM8094 برای انتخاب به کمک نشانگر برای ناحیه Saltol مفید می‌باشد.

تحمل به شوری موجود در پوکالی را در بر دارند. همچنین هاپلوتیپ‌های شماره ۳، ۶، ۷، ۸ و ۹ (شامل ارقام متحمل و نیمه متحمل) از نظر لوکوس RM10890 که در منطقه پایین‌تر از Saltol قرار دارد شبیه Pokkali بودند. بررسی تنوع هاپلوتیپی با استفاده از نشانگرهای SSR پیوسته به QTL‌های مرتبط با صفات که بر مبنای مقایسه الگوی آللی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با ژنوتیپ رفرنس (کولتیوارهای شناخته شده)، می‌باشد، می‌تواند اطلاعات مفیدی جهت شناسایی QTL‌های جدید فراهم کند (Yu et al, 2006) اگر ژنوتیپ‌ها الگوی آللی یکسان با مکان نشانگری پیوسته به QTL مقاومت در ژنوتیپ‌های مقاوم شناخته شده داشته باشند به احتمال زیاد دربردارنده همان QTL می‌باشند (Bai et al, 2003; McCartney et al, 2004). از طرف دیگر اگر دارای الگوی آللی متفاوتی با ژنوتیپ مقاوم شناخته شده باشند به احتمال زیاد آلل‌های متفاوتی نسبت به آن QTL دارند (Yu et al, 2006). ۱۴ رقم ترکیب متفاوتی از برخی آلل‌های Pokkali را شامل شدند که به احتمال زیاد دربردارنده ناحیه کنترل‌کننده تحمل به شوری یکسانی می‌باشند، در حالی که ۶ رقم سپیدرود، طارم پاکوتاه، غریب، گیل، امل و دمسیاه هیچ‌یک از آلل‌های نشانگر مرتبط با Saltol را نداشتند که می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که کنترل تحمل به شوری در این ارقام می‌تواند علاوه بر این ناحیه بوسیله سایر نواحی جدید صورت بگیرد و

جدول ۳- هاپلوتایپ‌های تولید شده به وسیله نشانگرهای SSR واقع در ناحیه سالتول بر روی کروموزوم ۱ با ارجاع به Pokkali\* (رفرنس).

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

RM3252	■	■										
RM8094	■		■	■	■			■				
RM3412	■	■		■	■			■	■	■		
RM493	■							■				
RM10793	■		■							■	■	
RM10890	■		■			■	■	■				
Haplotype. No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

۱: Pokkali؛ ۲: شاهپسند؛ ۳: ندا؛ ۴: بینام؛ ۵: موسی طارم؛ ۶: درفک، طارم محلی، اهلمی طارم، حسنی، خزر؛ ۷: نعمت؛ ۸: زاینده‌رود؛ ۹: قشنگه؛ ۱۰: عنبربو؛ ۱۱: صدری؛ ۱۲: سپیدرود، طارم پاکوتاه، غریب، گیل، آمل، دمسیاه

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

### نتیجه گیری

بر اساس نتایج بدست آمده از بررسی تنوع هاپلوتیپی می‌توان ارقام سپیدرود، طارم پاکوتاه، غریب، گیل، آمل و دمسیاه را به عنوان منابع جدید جهت نقشه‌یابی ژن‌های تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای همچنین نشانگر RM8094 واقع بر روی کروموزوم ۱ را به عنوان نشانگر اطلاع رسانی جهت انتخاب به کمک نشانگر معرفی کرد.

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

### منابع

- Fotokian MH (2004). QTL analysis of attributed traits to salinity tolerance and grain quality in rice, PhD Thesis, Dep. Of Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tehran.
- Ansari R, Shereen A, Flowers TJ, Yeo, AR (2001). Identification rice lines for improved salt tolerance from a mapping population. In: Peng, S. and B. Hardy (eds.). Rice research for food security and poverty alleviation. Proceeding of the International Rice Research Conference, 31 March- 3 April 2000, Los Banos, Philippines. pp: 285-291.
- Arif M (2002). Molecular mapping of genes/QTLs affecting resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* and grain quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). Ph.D thesis. University of Philippines in Los Banos. Philippines.
- Bonilla PS, Dvorak J, Mackill D, Deal K, Gregorio G (2002). "RFLP and SSLP mapping of salinity tolerance genes in chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.) Using recombinant

- inbred lines", The Philippine Agricultural Scientist 85: 64-74.
- Flowers TJ, Koyama ML, Flowers S, Sudhakar C, Singh KP and Yeo AR (2000). QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. Journal of Experimental Botany 51: 99-106.
- Flowers T J, Yeo A R (1995). "Breeding for salinity resistance in crop plants: where next?", Austrialian Journal Plant Physiology 22: 875-884.
- Gregorio G B, Senadhira D, Mendoza RD, Manigbas NL, Roxas JP, Guerta CQ (2002). "Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice", Field Crop Research 79: 91-101.
- Gregorio GB, Senadhira D, Mendoza RD (1997). Screening rice for salinity tolerance, IRRI Discussion paper Series No.22. International Rice Research Institute, Los Baños. Laguna, Philippines.
- Gong J M, Qian Q A, Shen L S, Zhu LH, Chen SY (1999). Identification of salt- QTL in rice. Chinese Science Bulletin 4: 68-71.
- IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) (2005). "The map-based sequence of the rice genome", Nature 436: 793-800.
- Koyama ML, Levesley A, Koebner RMD, Flowers TJ Yeo AR (2001). Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. Plant Physiology 125: 406-422.
- Lang NT, Yanagihara S, and Buu BC (2001). QTL analysis of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). SABRAO journal of Breeding and Genetics 33: 11-20
- Liu S, Anderson JA (2003). Targeted molecular mapping of a major wheat QTL for head resistance using wheat ESTs and synteny with rice. Genome 46: 817-823
- Liu K, Muse SV (2005). Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics 21: 2128-2129.
- Maas EV, Hoffman GJ (1977). Crop salt tolerance, current assessment. Journal of the Irrigation and Drainage Division ASCE 103: 115-134.
- McCouch S R, Chen X, Panaud O, Xu Y G, Cho N, Ishii T and Blair M (1997). Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. Plant Molecular Biology 35: 89-99.
- McCouch S R, Teytelman L, Xu Y, Lobos K B, Clare K, Walton M, Maghirang R, Ware Y D, Stein L (2002). Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). DNA Research 9: 199-207 and 257-279.
- McCartney CA, Sommers DJ, Fedak G, Cao W (2004). Haplotype diversity at Fusarium head blight resistance QTLs in wheat. Theoretical and Applied Genetics 109: 261-271.
- Mohammadi-Nejad G, Arzani A, 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.
- MohammadiNejad G, Singhb RK, Arzanic A, Rezaie AM , Sabourid H, Gregoriob GB (2010). Evaluation of salinity tolerance in rice genotypes. International Journal of Plant Production 4 (3).
- MohammadiNejad G, Sing RK, Rezaie AM, Arzani A, Nakhoda B, Fotokian MH, Moumeni A, Gregorio GB (2011). Fine Mapping of Major Effect QTL Responsible for Salinity Tolerance (*Saltol*) in Rice. Journal of crop biotechnology 1(1): 49-59
- Moradi F (2002). physiological characterization of rice cultivars for salinity tolerance during vegetative and reproductive stage. PhD thesis. University of Philippines, Los Banos. Philippines

- Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution* 19: 153-170.
- Niones J M (2004). "Fine mapping of the salinity tolerance gene on chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.) Using near isogenic lines", M.S. Dissertation, University of Philippines, Los Baños, Laguna, Philippines.
- Olufowote J O, Xu Y, Chen X, Park W O, Beachell H M, Dilday R H, Goto M McCouch S R (1997). Comparative evaluation of within cultivar variation of rice using microsatellite and RFLP markers. *Genome* 40: 370-378.
- Ponnamperuma, F N (1984). Role of cultivar tolerance in increasing rice production in saline lands. *Strategies for crop improvement*. John Willey and Sons. 443 pages.
- Prasad SR, Bagali PG, Hittalmani S, Shashidhar HE (2000). Molecular mapping of quantitative trait loci associated with seedling tolerance to salt stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Current Science* 78: 162-164
- Shannon M C (1984). Breeding, selection and the genetics of salt tolerance. In: Staples, R.C.R., G.H. Toenniessen (eds.). *Salinity tolerance in plants*. John Willey and Sons. pp: 231-254
- Smith JSC, Kresovich S, Hopkins MS, Mitchell SE, Dean RE, Woodman WL, Lee M, Porter K (2000). Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats. *Crop Science* 40: 226-232.
- Yang GP, Saghai Maroof MA, Xu CG, Zhang Q Biyashew R M (1994). Comparative analysis of microsatellited DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Molecular and General Genetics* 245: 187-194.
- Yu JB, Ban T (2006). Marker-assisted characterization of Asian wheat lines for resistance to fusarium head blight. *Theoretical and Applied Genetic* 113: 308-320. doi:10.1007/s00122-006-0297-z.
- Yu LX, Liu S, Anderson JA, Singh RP, Jin Y, Dubcovsky J, Brown-Guider G, Bhavani S, Morgounov A, He Z, Huerta-Espino J, Sorrells ME (2010). Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. *Molecular Breeding* 26: 667-680.
- Zhuang JY, Lin HX, Lu J, Qian HR, Hittalmani S, Huang N, Zheng KL (1997). Analysis of QTL×environment interaction for yield components and plant height in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 799-80.

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

Zarea R.<sup>1</sup>, Mohammadi-Nejad G.\*<sup>2</sup>, Shahsavand-Hassani H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MS Student, Dep. of Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

<sup>2</sup>Dep. of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

**Abstract**

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

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

\* Corresponding Author: Mohammadi-Nejad G.

Tel: 09133415937

Email: g.mohamadinejad@yahoo.com