

ردیابی مکان‌های ژنی مرتبط با مولفه‌های جوانه‌زنی برنج در تنش اسمتیک خشکی

حسین صبوری^{۱*}، مهناز کاتوزی^۲

^۱ دانشیارگروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس.

^۲ کارشناس ارشد زراعت و دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۰۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۳/۲۶

چکیده

قدرت جوانه‌زنی بالا یکی از فاکتورهای مهم برای استقرار گیاه در شرایط تنش خشکی است. شناخت ساختار ژنتیکی صفات مرتبط با جوانه‌زنی در شرایط تنش یکی از اهداف برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه چه و طول ساقه چه در شرایط تنش اسمتیک خشکی با استفاده از نقشه ژنتیکی حاصل از ۷۴ نشانگر ریزوماهواره و ۱۹۲ خانواده $F_{2:4}$ (۱۲ گروه پیوستگی) جمعیت طارم محلی \times خزر ردیابی شد. در این مطالعه سه QTL با اثر افزایشی مثبت در جهت افزایش قدرت بذر در فاصله بین نشانگرهای RM466 و RM259 روی کروموزوم ۱ شناسایی شد. از بین QTL‌های تشخیص داده شده $qGR-1a$ بزرگ اثر بوده و بیش از ۲۶/۲۷ درصد از تغییرات مرتبط با سرعت جوانه‌زنی را کنترل نمود. همبستگی بین صفات مذکور و همپوشانی QTL‌ها ناحیه مذکور نشان داد که از این ناحیه کروموزومی می‌توان برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

کلمات کلیدی: برنج، تحمل به خشکی، جوانه‌زنی، مکان‌یابی ژن‌های کمی.

مقدمه

برای شناسایی QTL های مرتبط با تحمل به خسارت قلیایی، ۱۲۰ لاین دابل هاپلوئید (DH) حاصل از تلاقی بین لاین TN1 و Chunjiang 06 مورد استفاده قرار گرفتند. در پژوهشی چهارده QTL افزایشی و سیزده جفت QTL اپیستاتیک کنترل کننده تحمل به قلیایی ردیابی شد (Cheng et al., 2008). دو QTL با اثر اصلی در منطقه RM251-RM3280 روی کروموزوم ۳ شناسایی شدند و ۳ QTLs با اثر اصلی بین RM3286 و RM1279 روی کروموزوم ۷ مکان یابی شد. جایگاه های اپیستاتیک RM1 - RM1195، RM1358 - RM290، RM505 - RM1279 و RM519 - RM1246 به ترتیب بر روی کروموزوم ۱، ۲، ۷ و ۱۲ تحت تنش قلیایی با اهمیت گزارش شدند. برخی از QTL های تحمل به تنش قلیایی با QTL های تحمل به شوری مطابقت داشتند.

با استفاده از تعدادی از جمعیت اینبرد لاین نوترکیب (RIL) که شامل ۱۹۵ لاین حاصل از تلاقی Zhenshan 97B (رقم بومی) و IRAT109 (رقم آپلند)، QTL های طول کلئوپتیل و شاخص مقاومت به خشکی شناسایی شد. ارتباط معنی داری مثبت بین طول کلئوپتیل و شاخص مقاومت به خشکی تحت شرایط تنش آب وجود داشت. در شرایط نرمال و تنش، به ترتیب یازده و چهار QTL برای طول کلئوپتیل و شاخص مقاومت به خشکی روی کروموزوم ۱، ۲، ۴، ۵، ۶، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۲ با استفاده از نقشه پیوستگی SSR ردیابی

استفاده از ارقام دارای قدرت جوانه زنی بالا در نواحی گرمسیری که با تنش خشکی مواجه هستند، امری ضروری است. به طوریکه امروزه قدرت جوانه زنی بالا یکی از صفاتی است که در ایجاد و توسعه ارقام برنج اصلاح شده مورد توجه قرار می گیرد (Sabouri et al., 2008). با رشد چشمگیر استفاده از نشانگرهای مولکولی از دهه ۷۰ ابزارهای قدرتمندی برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی صفات کمی مرتبط با جوانه زنی فراهم گردیده است (Redona and Mackill, 1996). در مطالعه ای Redona and Mackill (1996) سیزده QTL ردیابی نمودند که چهار QTL طول ساقچه (روی کروموزوم های ۱، ۳ و ۹) دو QTL طول ریشه چه (روی کروموزوم های ۱ و ۲) دو QTL طول کلئوپتیل (روی کروموزوم های ۳ و ۶) و پنج QTL طول مزوکوتیل (روی کروموزوم های ۱، ۳، ۵ و ۷) را تحت تاثیر قرار دادند. در مطالعه ای برای توان ذخیره ای بذر سه QTL روی کروموزوم های ۹، ۱۱ و ۱۲ گزارش شد (Zeng et al., 2006). این QTL ها مجموعاً ۳۵/۴ درصد از تغییرات فنوتیپی کل را توجیه نمودند. QTL های مرتبط با سرعت جوانه زنی، طول ریشه چه و طول ساقچه در تنش اسمتیک حاصل از سوربیتول ردیابی شد (Sabouri et al., 2008). QTL های بزرگ اثر مکان یابی شده برای طول ساقچه در این مطالعه روی کروموزوم پنج و دوازده قرار داشتند.

کنترل آنها را بر عهده دارند. در مجموع هفت QTL روی کروموزوم‌های ۴، ۶ و ۹ دو تا مرتبط با سرعت جذب آب (qIR-6, qIR-9)، یکی برای سرعت جوانه زنی (4 - qGR)، دو تا مرتبط با شاخص جوانه زنی (qGI-4-1, qGI-4) (2) و دو تا برای طول ریشه (qRL-4-1, qRL-4) (2) بودند. هیچ QTLی برای کنترل طول ساقه و قدرت بذر شناسایی نشد. دو QTL بزرگ اثر بیش از ۳۰ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه نمودند. بسیاری از QTL های مشاهده شده در مناطقی گزارش شدند که قبلاً برای تحمل به سرما گزارش شده بود. با این وجود 2 - qRL - 4 قبلاً گزارش نشده بود (Wang et al., 2009).

جمعیت لاین های نوترکیب اینبرد حاصل از تلاقی بین IR26 و Jiucaiqing برای شناسایی قابلیت جوانه زنی بذر برنج تحت تنش شوری کلرید سدیم مورد استفاده قرار گرفت. شش صفت جوانه زنی شامل سرعت جذب آب، سرعت جوانه زنی، شاخص جوانه زنی، طول ریشه، طول ساقه و شاخص قدرت بذر مورد بررسی قرار گرفت. اختلافات معنی دار در همه صفات تحت تنش شوری در میان لاین‌های برنج مشاهده شد. توزیع فراوانی صفات جوانه زنی تحت تنش شوری در جمعیت RIL تفکیک پیوسته نشان داد که نشان می‌دهد صفات کمی آنها توسط چندین ژن کنترل می‌شوند. صفات جوانه زنی تحت تنش شوری توسط دو یا سه ژن اصلی عمدتاً وراثت پذیری بالا، که ۱۲/۵ تا ۰/۹۹ درصد تنوع فنوتیپی بیان کرد. شاخص جوانه

شد. QTL های طول کلئوپتیل و شاخص مقاومت به خشکی در ناحیه مشابهی با QTL های تعداد و وزن ریشه قرار داشتند. علاوه بر این، ۱۶ و ۳ جفت جایگاه اپیستاتیک برای طول کلئوپتیل و شاخص مقاومت به خشکی ردیابی شد که به ترتیب ۵۷/۱۷ درصد و ۱۱/۹۳ درصد از تنوع را بیان نمودند (Hu et al., 2007).

در مطالعه‌ای مجموعه‌ای از لاین‌های نوترکیب اینبرد برای صفات قدرت گیاهچه در محیط های طبیعی مزرعه شامل دو تیمار (نرمال و خشکی) ارزیابی شدند. نه QTL با صفات مرتبط با قدرت گیاهچه شناسایی شد. این QTL ها چهار تا ۱۴ درصد از کل تنوع را بیان نمودند. در میان این QTL ها، سه و چهار QTL فقط در شرایط تنش و دو تا بین دو تیمار مشترک بود. چهار QTL به طور همزمان روی دو صفت یا بیشتر اثر داشتند. مقایسه QTL ها نشان داد که نتایج مکان‌یابی QTL بر اساس ارزیابی های مزرعه‌ای می تواند تا حدی با محققانی که بر اساس آزمون‌های آزمایشگاهی انجام شده یکسان می‌باشد (Zhou et al., 2007).

جمعیت F₉ لاین‌های اینبرد نوترکیب (RIL) حاصل از تلاقی بین IR28 و Daguandao برای تهیه نقشه پیوستگی و شناسایی صفات با قدرت جوانه زنی بذرمانند سرعت جذب آب، سرعت جوانه زنی، شاخص جوانه زنی، طول ریشه، طول ساقه و قدرت بذر در دمای ۱۴ درجه سانتیگراد استفاده شد. نتایج نشان داد که صفات مذکور دارای توزیع پیوسته هستند و چندین ژن

مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب استفاده شد. مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب با استفاده از نرم افزار QTL Cartographer (Basten et al., 2001) انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی فنوتیپی صفات مورد مطالعه حاکی از وجود تغییرات کمی و پیوسته بود (شکل ۱). برای هر سه صفت سرعت جوانه زنی، طول ریشه چه و طول ساقه چه ارزش‌های بیشتر از والد دارای حداکثر مقدار صفت و کمتر از والد دارای حداقل صفت دیده شد که مبین تفکیک متجاوز برای صفات مورد مطالعه بود. آماره‌های توصیفی برای صفات مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است. ضریب چولگی و کشیدگی برای کلیه صفات معنی‌دار نشد. برای سرعت جوانه زنی چهار QTL به ترتیب با نسبت درستمایی ۱۷/۳۹، ۱۲/۴۵، ۲۲/۴۴ و ۲۱/۱۹ مشاهده شد که مجموعاً بیش از ۵۰ درصد از تغییرات مربوط به سرعت جوانه زنی را کنترل نمودند (جدول ۲ و شکل ۲). از بین QTL‌های ردیابی شده qGR-1a ۲۶/۲۷ درصد از تغییرات مرتبط با سرعت جوانه زنی را کنترل نمود. از آنجائیکه QTL مذکور بیش از ۲۰ درصد از تغییرات را بخود اختصاص داد بزرگ اثر شناخته شده و آلل‌های افزایشی این QTL از والد خزر باعث افزایش سرعت جوانه زنی شد، این QTL را برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر کاندید ساخت. درجه غالبیت در هر چهار QTL مثبت بود و نوع عمل ژن جز در

زنی، شاخص قدرت بذر و طول ریشه توسط دو ژن اصلی کنترل شد (Wang et al., 2010). این مطالعه با هدف تعیین ساختار ژنتیکی و نوع اثرات حاکم بر خصوصیات مرتبط با جوانه زنی با روش مکان‌یابی صفات کمی در جمعیت برنج ایرانی حاصل از تلاقی طارم محلی × خزر اجرا شد.

مواد و روش‌ها

به منظور مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات جوانه زنی در جمعیت برنج ایرانی، ارقام طارم محلی با خزر تلاقی داده شدند و DNA ژنومی ۱۹۲ بوته به تصادف آنها به روش CTAB (Saghi Maroof et al., 1994) استخراج گردید. اندازه‌گیری‌های فنوتیپی بر روی فامیل‌های F4 انجام گرفت و صفات سرعت جوانه زنی، طول ریشه چه، طول ساقه چه روی نمونه ۱۰۰ بذر از ۲۰ بوته هر خانواده در محلول حاوی مانیتول با هدایت الکتریکی ۱۶ دسی زیمنس بر متر ثبت شد. برای تهیه نقشه پیوستگی ژنتیکی نشانگرهای SSR در جمعیت مورد مطالعه، از داده‌های ژنوتیپی ۷۴ نشانگر چند شکل در دو والد و ۱۹۲ فرد جمعیت F۲ استفاده گردید. گروه‌های پیوستگی اولیه با استفاده از نرم افزارهای Map Manager (Manly and Olson, 1999) ایجاد شدند. QTL‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به تنش اسمتیک خشکی، با استفاده از نقشه پیوستگی تهیه شده و ارزش‌های فنوتیپی صفات شناسایی شدند. برای این منظور، از روش

RM466-RM259 روی کروموزوم ۱، هر سه صفت درصد جوانه‌زنی، طول ساقه چه و طول ریشه‌چه را کنترل کردند، ضمن اینکه همبستگی فنوتیپی این دو صفت نیز بسیار بالا بود.

وجود همبستگی‌های منفی و معنی دار بین صفات می‌تواند به وسیله اثرات پلیوتروپی یا پیوستگی شدید بین ژنهای کنترل کننده آنها توصیف شود. صفات همبسته اغلب به وسیله QTL‌هایی کنترل می‌شوند که در نواحی مشابهی بر روی کروموزوم‌ها قرار دارند (Paterson et al., 1994). چنین نتایجی برای امتیاز ژنوتیپی در این مطالعه نیز مشاهده شد (جدول ۳). درصد جوانه‌زنی، طول ساقه چه و طول ریشه‌چه دارای همبستگی‌های معنی دار بودند. QTL‌های شناسایی شده برای درصد جوانه‌زنی، صفات طول ساقه چه و طول ریشه‌چه را نیز کنترل نمودند. ضرایب همبستگی بین درصد جوانه‌زنی، طول ساقه چه و طول ریشه‌چه در جدول ۳ آمده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً برای ژن‌های کنترل کننده این صفات پلیوتروپی حاکم بوده و برای تجمع ژن‌های مفید و هرمی کردن ژن‌ها می‌توان از آنها استفاده نمود.

qGR-1a فوق‌غالبیت بود. برای طول ریشه چه نیز چهار QTL تشخیص داده شد که از بین آنها qRL-10 بیش از سایر QTL‌ها توانست تغییرات طول ریشه را کنترل کند (۲۱/۵۵). آل‌های افزایش دهنده طول ریشه چه از والد خزر توانست ۰/۸۸ سانتی متر طول ریشه چه را افزایش دهد. از بین QTL‌های مشخص شده، qRL-10 با نسبت درست‌نمایی ۳۱/۲۳ و اثر افزایشی ۳/۲۱ سانتی متر، ۱۷/۲۷ درصد از تغییرات طول ریشه چه را کنترل نمود. برای طول ساقه چه پنج QTL ردیابی شد که بالاترین تغییرات را QTL روی کروموزوم ۷ توجیه نمود (qSL-7). موقعیت مکانی qSL-7 در مطالعه حاضر با QTL‌های ردیابی شده توسط محققین دیگر برای سرعت جوانه زنی مطابقت داشت (Zhang et al., 2005a,b). اثر افزایشی این ناحیه از ژنوم برنج روی کروموزوم هفت در هر دو مطالعه مثبت و در جهت افزایش قدرت جوانه‌زنی گزارش شد. بالا بودن درصد توجیه این QTL آنرا کاندید بسیار مناسبی برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر ساخت. برای طول ساقه چه نیز یک QTL روی کروموزوم یک ردیابی شد که توانست ۱۸/۱۷ درصد از تغییرات مربوط به طول ساقه چه را کنترل کند. QTL‌های مرتبط با فاصله

جدول ۱- آماره‌های توصیفی برای صفات مرتبط با جوانه‌زنی.

Table 1- Descriptive statistics for germination traits.

طول ساقه‌چه Plumule lenght	طول ریشه‌چه Radicle lenght	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	
3.7987±0.115	5.0194±0.121	8.7587±0.101	میانگین Mean
4.0000	4.9750	9.0020	میانه Median
1.59607	1.67783	1.41036	انحراف استاندارد Std. Deviation
2.547	2.815	1.989	واریانس Variance
-0.140±0.158	0.104±0.165	-0.739±0.575	چولگی Skewness
-0.735±0.421	-0.690±0.354	0.165±0.346	کشیدگی Kurtosis
7.60	7.50	7.00	دامنه Range

جدول ۲- QTL‌های شناسایی شده برای صفات مرتبط با جوانه‌زنی.

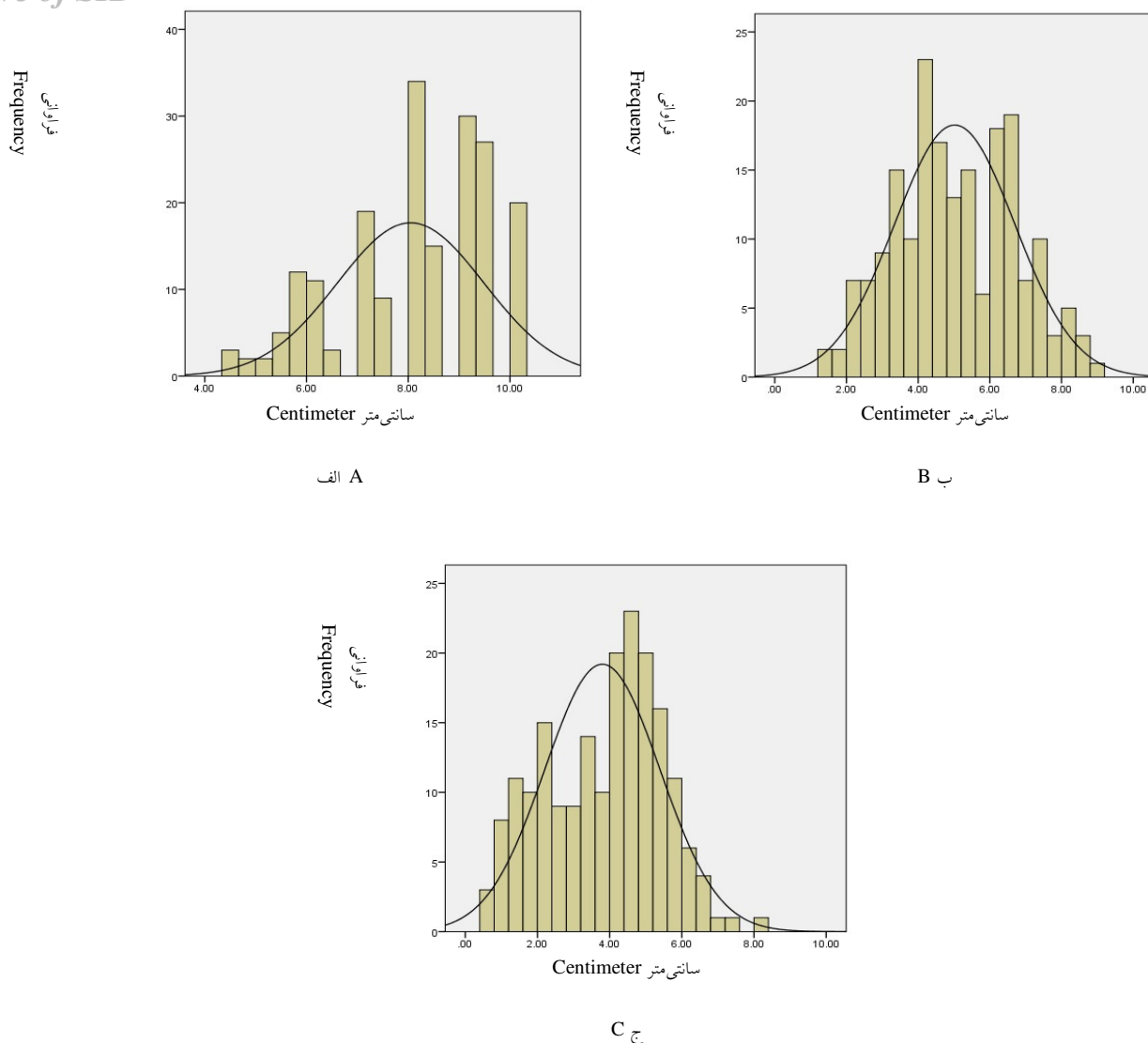
Table 2- Detected QTLs for germination traits.

واریانس بیان شده Explained variance	اثر غالبیت Dominant effect	اثر افزایشی Additive effect	نسبت درست‌نمایی Likelihood ratio	نقطه اوج Pick point	نشانه‌گرهای مجاور Flanking markers	کروموزوم Chromosome	QTL	صفات Traits
26.27	1.32	3.31	17.39	26.8	RM466-RM259	1	qGR-1a	سرعت جوانه‌زنی
15.31	2.45	-2.10	12.45	32.1	RM562-RM543	1	qGR-1b	زنی
13.71	21.17	0.99	22.44	12	RM7389-RM7000	3	qGR-3	سرعت جوانه‌زنی
18.84	4.32	-0.32	21.19	71.6	RM320-RM134	4	qGR-7	Germination rate
17.27	-0.65	3.21	32.23	23.2	RM466-RM259	1	qRL-1a	طول ریشه‌چه
11.32	34.12	1.87	11.98	45.2	RM259-RM3148	7	qRL-1b	طول ریشه‌چه
12.25	21.67	0.11	23.43	38.6	RM3148-RM5302	1	qRL-1c	طول ریشه‌چه
21.55	1.19	0.88	37.25	59	RM184-RM3152	10	qRL-10	Root length
18.77	-0.77	5.34	11.23	42.1	RM8235-RM8144	1	qSL-1a	طول ساقه‌چه
14.21	-0.89	-0.25	65.23	67.7	RM3148-RM8097	1	qSL-1b	طول ساقه‌چه
16.14	12.54	2.23	21.11	91.9	RM320-RM478	7	qRL-3	طول ساقه‌چه
20.21	23.12	2.61	26.94	76.4	RM152-RM8264	8	qRL-7	Shoot length
9.12	0.89	4.71	42.87	25.3	RM543-RM8231	1	qSL-10	طول ساقه‌چه

جدول ۳- ماتریس همبستگی بین صفات مورد ارزیابی.

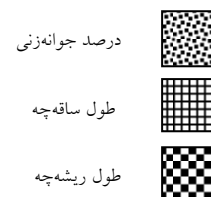
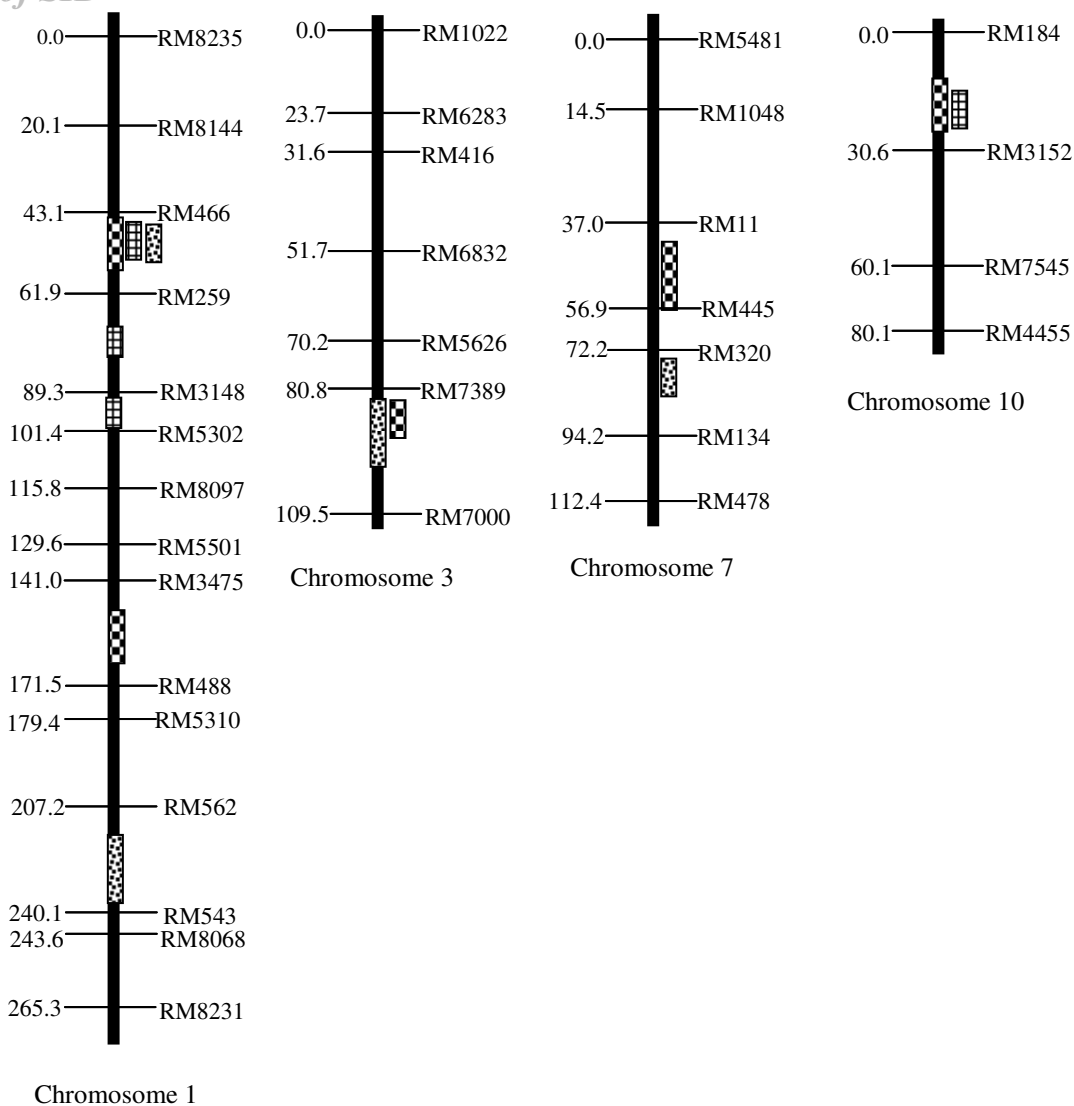
Table 3- Correlation matrices of evaluated traits.

طول ساقه‌چه Plumule lenght	طول ریشه‌چه Radicle lenght	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	Traits
		1	سرعت جوانه‌زنی Germination rate
	1	0.692**	طول ریشه‌چه Radicle lenght
1	0.584**	0.363**	طول ساقه‌چه Plumule lenght



شکل ۱- نمودار ستونی صفات مورد بررسی، الف- سرعت جوانه‌زنی، ب- طول ریشه‌چه و ج- طول ساقه‌چه.

Figure 1- Histogram of evaluated traits, A. germination rate, B. radicle length, C. plumule length.



شکل ۲ - نقشه پیوستگی نشانگر های SSR جمعیت F2 حاصل از تلاقی طارم محلی در خزر همراه با مکان های ژنی کنترل کننده صفات مرتبط با جوانه زنی در برنج.

Figure 2- linkage map of SSR markers of F2 population caused Tarom Mahalli × Khazar with QTLs controlling of germination traits.

- Basten CJ, Weir BS, Zeng ZB (2001). QTL Cartographer: A Reference Manual and Tutorial for QTL Mapping. North Carolina State University Press. Rigny, NC, USA.
- Cheng HT, Jiang H, Xue DW, Guo LB, Zeng DL, Zhang GH, Qian Q (2008). Mapping of QTL Underlying Tolerance to Alkali at Germination and Early Seedling Stages in Rice. *Acta Agronomica Sinica* 34: 1719-1727.
- Hu SP, Yang H, Zou GH, Liu HY, Liu GL, Mei HW, Cai R, Li MS, Luo LJ (2007). Relationship between coleoptile length and drought resistance and their QTL mapping in rice. *Rice Science* 14(1): 13-20.
- Manly KF, Olson J M (1999). Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QTX. *Mammalian Genome* 10: 327-334.
- Redona ED, Mackill DJ (1996). Mapping quantitative trait loci for seedling vigor in rice using RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 395-402.
- Paterson AH (1996). Making genetic maps. PP. 23-39. In: A.H. Paterson (Ed.), *Genome Mapping in Plants*. Academic Press, Austin, Texas.
- Sabouri H, Biabani A, Gharavi A Gh, Dadras A R, Katouzi M (2008). Mapping of germination traits in rice using of microsatellite markers under osmotic stress caused by sorbitol. First Iranian Science and seed Technology Symposium. Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resource. Gorgan. Iran. 12-13 Nov.
- Saghi Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, and Allard RW (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics. *Proceeding of National Academy Science USA* 91: 5466-5570.
- Wang Y, Cheng LR, Sun Y, Zhou Z, Zhu LH, Xu ZJ, Xu JL, Li ZK (2009). Effect of genetic background on QTLs for heading date and plant height and interactions between QTL and environment using reciprocal introgression lines in rice. *Acta Agronomica Sinica* 35(8): 1386-1394
- Wang ZF, Wang JF, Bao YM, Wu YY, Su X, Zhang HS (2010). Inheritance of rice seed germination ability under salt stress. *Rice Science* 17(2): 105-110
- Wang ZF, Wang JF, Wang FH, Bao YM, Wu YY, Su X, Zhang HS (2009). Genetic control of germination ability under cold stress in rice. *Rice Science* 16(3): 173-180
- Zeng DL, Guo LB, Xu YB, Yasukumi K, Zhu L H, Qian Q (2006). QTL analysis of seed storability in rice. *Plant Breeding* 125: 57-60.
- Zhang ZH, Yu SB, Yu T, Huang Z, Zhu YG (2005)a. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for seedling vigour using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Field Crops Research* 91:161-170.
- Zhang ZH, Qu XS, Wan S, Chen LH, Zhu YG (2005)b. Comparison of QTL controlling seedling vigour under different temperature conditions using recombinant inbred lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* 95: 423-429.
- Zhou L, Wang JK, Yi Q, Wang YZ, Zhu YG, Zhang ZH (2007). Quantitative trait loci for seedling vigor in rice under field conditions. *Field Crops Research* 100: 294-30.

Detection of chromosomal regions controlling drought osmotic stress in rice**Sabouri H.^{*1}, Katouzi M.²**

¹ Associate Prof. Department of plant production, College of agriculture science and natural resource, Gonbad Kavous University.

² MSc in Agronomy and MSc student of plant breeding in Gorgan Agriculture Science and Natural Resource University.

Abstract

Germination vigour is one of the most important factors for plant stablishing under drought stress. In order to detect of quantitative trait loci related to drought tolerance in germination stage a genetic map was provided by 74 SSR marker and 192 individuals of F_{2:4} derived from cross between Taron mahalli × Khazar population. The hundred seeds of 20 families were used for recording of germination rate, radical length and plumule length. Seventy four SSR markers grouped in 12 linkage groups. Thirteen QTLs were detected for traits. Three QTLs were mapped on chromosome 1 that increased drought tolerance in germination stage in rice. Out of these QTLs, qGR-1a distinguished as major effect and explained 26.27% of the total variation. Correlations between traits and overlapping QTLs in RM466-RM259 interval provided a good region for gene pyramiding and marker assisted programs.

Key words: Rice, Drought tolerance, Germination, QTL mapping.

* Corresponding Author: Sabouri H.

Tel: 09111438917

E-mail: hos.sabouri@gmail.com