ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹
صفحه ۳۵-۲۷

شناسایی مکان‌هایی ژنی مرتبط با جوانه‌زنی برنج در شرایط غیرهوازی

محمدحسین فتوکیان[۱]*، سیدعبدالحمید انگجی[۲]، امیر محمد ناجی[۳]، علاءالدین کردنائیچ[۴]، جعفر احمدی[۵]، کیوان آگاهی[۶]

۱،۳و۴- استادیاران دانشکده علوم کشاورزی و مرکز تحقیقات علوم کشاورزی دانشگاه شاهد، تهران
۲- استادیار دانشگاه تربیت معلم تهران
۵- استادیار دانشگاه بین المللی امام خمینی، قزوین
۶- مربی، دانشگاه شاهد
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fotokian@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۳۰)

چکیده

به منظور شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با جوانه‌زنی برنج در شرایط غیرهوازی، جمعیتی شامل ۳۹۸ گیاه BC_2F_2 از تلاقی KHAO HLAN ON (KHO) به عنوان والد مادری با رقم IR64 به عنوان والد پدری و والد دوره‌ای مورد مطالعه قرار گرفتند. مطالعه چند شکلی در والدین با ٦٨٠ نشانگر ریزماهواره انجام گرفت که از بین آنها ۱۷۱ نشانگر چند شکلی واضح بین والدین را نشان دادند و از آنها برای ارزیابی ژنوتیپی جمعیت مورد مطالعه استفاده بعمل آمد. طول نقشه کروموزمی مورد استفاده ١٤٨٣/٥ سانتی‌مورگان با میانگین فاصله‌ای ۸/۳ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور بود. نتایج ارزیابی لاین‌های BC_2F_2 نشان داد که دامنه بقاء آنها از نظر جوانه‌زنی در شرایط غرقابی از صفر تا ٦٨ درصد متغیر بوده و میانگین آن در حدود ۲۸ درصد بدست آمد. با استفاده از روش‌های مکان‌یابی فاصله‌ای و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، تعداد شش QTL برای جوانه‌زنی در شرایط غیرهوازی شناسایی شدند که دو QTL در کرموزوم یک (qAG-1-1 و qAG-1-2)، دو QTL در کرموزوم هفت (qAG-7-1 و qAG-7-2) و دو QTL در کرموزوم نه (qAG-9-1 و qAG-9-2) قرار داشتند. اثر افزایشی پنج QTL منفی بود که از والد KHO به جمعیت مورد مطالعه منتقل گردید. نتایج نشان داد که آلل‌های KHO باعث افزایش تحمل به جوانه‌زنی در شرایط غیرهوازی می‌گردند. این QTLها توانستند حدود ۹۳ درصد از تغییرات فنوتیپی جوانه‌زنی غیرهوازی را در جمعیت مورد مطالعه توجیه نمایند.

واژه‌های کلیدی

برنج،
جوانه‌زنی غیرهوازی،
مکان‌یابی QTL،

مقدمه

کشت مستقیم برنج در کشورهای آسیایی با استقبال زیادی روبرو شده است، زیرا هزینه این روش کمتر بوده و از نظر عملیاتی نیز ساده است (۲۲). در نواحی مستعد به سیلاب، که معمولاً برنجکاران در اوایل فصل کاشت با آن مواجه می‌گردند، کشت مستقیم همواره با چالش مواجه است. تحت این شرایط کشاورزان یا دوباره کشت برنج را انجام می‌دهند که به ناچار بایستی متحمل هزینه‌های بیشتر شده و همچنین ممکن است با مشکلاتی در انتهای فصل رشد روبرو شوند، یا اینکه از کشت مجدد صرفنظر نموده و لذا کاهش محصول در این مناطق دیده می‌شود. یک راه حل اساسی برای مقابله با این چالش استفاده از ارقام برنج متحمل به شرایط غیرهوازی است که با استقرار زود هنگام و تحمل شرایط غیرهوازی این مشکل را پشت سر می‌گذارد. علاوه بر این، تحت شرایط آبیاری نگهداری چند سانتی‌متر آب بالای سطح خاک بعد از کاشت مستقیم، یک روش پایدار، ارزان و مؤثر در کنترل علف‌های هرز محسوب می‌شود (۶).

اصلاح برای افزایش قدرت بذر و گیاهچه و تحمل به شرایط غیرهوازی در مرحله جوانه‌زنی توسط چندین محقق انجام گرفته است (۲، ۶، ۲۱، ۳۰، ۳۱، ۳۲). پیشرفت مطالعه پیرامون اصلاح تحمل به شرایط غیرهوازی در مرحله جوانه‌زنی برنج به واسطه اطلاعات محدود در مورد مبنای ژنتیکی مقاومت به شرایط غیرهوازی و همچنین بدلیل طرز عمل پیچیده آن و استفاده از روش‌های ناکارآمد در ارزیابی تحمل به شرایط غیرهوازی بسیار آهسته بوده است که این امر منجر به عدم دسترسی به ژرم پلاسم مناسب گردیده است (۱۲، ۲۳).

با پیشرفتی که در تجزیه و تحلیل نشانگرهای مولکولی بدست آمده است، می‌توان صفات ساده و کمی را مورد تجزیه و تحلیل قرار داده و ژن‌های کنترل کننده آنها را شناسایی نمود. نشانگرهای مولکولی موجب انتخاب آلل‌های مطلوب شده و پیشرفت ژنتیکی را باعث می‌گردند (۲۶). شناسایی نشانگرهای مولکولی که با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به سیلاب (شرایط غیرهوازی) در مرحله جوانه‌زنی پیوسته می‌باشند، می‌تواند انتخاب برای این صفت را که دارای توارث‌پذیری و قدرت تظاهر پایینی است، تسهیل نماید. انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی می‌تواند سریع‌تر، کارآمدتر و مقرون به صرفه‌تر از ارزیابی‌های مرسوم تحت شرایط غیرهوازی باشد (۱۲).

هدف از اجرای این تحقیق که در موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج[1] طی سال‌های ۱۳۸۳ الی ۱۳۸۶ انجام گرفت، شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با مقاومت به جوانه‌زنی تحت شرایط غیرهوازی در یک جمعیت BC_2F_2 و مشخص نمودن اثرات هر مکان ژنی در این صفت بود.

مواد و روش‌ها

۱) ارزیابی تحمل به شرایط غیر هوازی در مرحله جوانه‌زنی

در ابتدا بیش از ده هزار نمونه از خزانه ژنتیکی و لاین‌های اصلاحی برنج برای یافتن ژرم پلاسم‌های متحمل به شرایط غرقابی در مرحله جوانه‌زنی ارزیابی شدند. این ارزیابی با کشت مستقیم بذرها در ظروف پلاستیکی که دارای لایه کم عمقی از خاک بودند انجام گرفت. بذرهای هر نمونه در ردیف‌های مربوطه کاشته شده و بلافاصله تا ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر غرقاب گردیدند. این ارتفاع آب بمدت ۳ هفته حفظ گردید و سپس تعداد بذور جوانه زده و در نتیجه درصد جوانه‌زنی محاسبه شد. نتایج ارزیابی نشان داد که تعداد محدودی از نمونه‌ها دارای قدرت زنده ماندن بیشتر در شرایط غیرهوازی بودند. از میان ژنوتیپ‌های دارای تحمل مناسب به جوانه‌زنی در شرایط غرقابی، رقم KHAO HLAN ON که زیرگونه ژاپونیکا بوده و به جوانه‌زنی در شرایط غیرهوازی مقاوم است و از این پس به اختصار KHO نامیده می‌شود برای مطالعه بیشتر انتخاب گردید. مقاومت پایدار این رقم در آزمایشات تکراردار نیز مورد تائید قرار گرفت. این رقم پا بلند، مقاوم به سرما و معطر می‌باشد.

۲) مواد گیاهی بکار رفته

رقم IR64 که از زیرگونه ایندیکا است و به شرایط جوانه زنی غیرهوازی نیمه حساس است به عنوان والد پدری با رقم KHO به عنوان والد مادری تلاقی و F_1 بدست آمده با IR64 تلاقی برگشتی

[1] International Rice Research Institute (IRRI)

داده شد. نتاج بدست آمده خودگشن شده و ۱۵۰ لاین BC_1F_2 بدست آمد. از میان این لاین‌ها، ۱۸ لاین BC_1F_2 بر مبنای فنوتیپ انتخاب و لاین‌هایی که دارای صفات نامطلوب از قبیل بلندی و عقیمی بودند حذف شدند. به منظور تولید جمعیت BC_2F_1 ابتدا خواب بذرهای لاین‌های BC_1F_2 با تیمار ۵ روزه آنها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد شکسته شد و سپس تلاقی برگشتی آنها با رقم IR64 انجام گرفت. لاین‌های بدست آمده خودگشن شده و ۴۲۳ گیاه BC_2F_2 بدست آمد. بهترین خوشه هر گیاه بطور جداگانه برای مطالعه ژنتیکی[2] و بقیه خوشه‌های آن گیاه بصورت توده‌ای جهت مطالعه فنوتیپی[3] برداشت شدند.

۳) آزمایش قدرت جوانه‌زنی بذر

برای انجام آزمایش قدرت جوانه زنی بذور ۴۲۳ بوته BC_2F_2، از هر نمونه تعداد ۴۰ بذر بصورت تصادفی انتخاب و این بذرها در ۲ تکرار و در هر تکرار ۲۰ بذر در سینی‌های مخصوص کشت و با مقدار کمی خاک الک شده باغبانی پوشیده شدند. میزان جوانه‌زنی بر اساس میانگین تعداد بذرهای جوانه‌زده در مدت ۱۰ روز ارزیابی شد و لاین‌هایی که دارای قدرت جوانه‌زنی کمتر از ۸۰ درصد (۲۵ لاین) بودند حذف شدند. بدین ترتیب آزمایش در شرایط غیرهوازی با ۳۹۸ بوته BC_2F_2 ادامه یافت.

۴) مطالعه ژنوتیپی و مکان‌یابی QTL

برای استخراج DNA بذرهای انتخاب شده از خوشه اصلی هر نمونه گیاهی در یک ردیف کاشته و پس از جوانه‌زنی، برگ‌های هر ردیف به صورت توده‌ای برداشت شدند. استخراج DNA بر اساس روش موری و تامسون (۱۵) انجام گرفت. غلظت DNA با اسپکتروفتومتر نانودراپ[4] (از شرکت Thermo مدل ۲۰۰۰) برآورد گردید. غلظت DNA هر نمونه به حدود ۵ الی ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق گردید. مخلوط PCR از ۲ میکرولیتر بافر PCR محتوی $MgCl_2$، ۲ میکرولیتر dNTPs، یک واحد آنزیم تک پلی‌مرآز، یک میکرولیتر از پرایمرهای ریزماهواره با غلظت ۱/. میکرومول و ۳ میکرولیتر از DNA (معادل ۲۰ نانوگرم) تشکیل شده بود. چرخه‌های PCR شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه متوالی که به ترتیب شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در انتها یک مرحله امتداد نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. محصولات PCR با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد تفکیک، با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و سپس با اشعه ماوراء بنفش بررسی شدند.

مطالعه چندشکلی در والدین با استفاده از ۶۸۰ نشانگر ریزماهواره انجام گرفت. از بین آنها ۱۷۱ نشانگر باندهای واضح و روشنی را نشان داده و برای ارزیابی ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه قرار گرفتند. باندهای هتروزیگوت بصورت H و باندهای تیپ والد دوره‌ای IR64 با B مشخص گردیدند (شکل ۱).

فاصله پیوستگی بین نشانگرها با استفاده از نقشه ژنتیکی Nipponbare/Kasalath (۵) و نقشه فیزیکی برنج (۹) محاسبه گردید. نقشه پیوستگی در این تحقیق از طریق نرم‌افزار Mapchart (۲۸) ترسیم شد.

مکان‌های ژنی صفت جوانه‌زنی غیرهوازی با استفاده از روش تک نقطه‌ای (SPA)[5]، مکان‌یابی فاصله‌ای (IM)[6] و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM)[7] انجام گرفت. تجزیه و تحلیل اولیه مکان‌های ژنی با استفاده از دو روش SPA و IM به کمک نرم‌افزار QGene 3.4 (۱۶) انجام شد. برای تجزیه و تحلیل به روش IM با نرم‌افزار QGene از ساختار BC_2 استفاده و فاصله پیمایش یک سانتی مورگان در نظر گرفته شد. برای تبدیل درصد نوترکیبی به فاصله ژنتیکی از تابع کوسامبی[8] استفاده گردید. به منظور یافتن یک آستانه معنی‌دار برای مکان‌های ژنی مورد مطالعه از روش نمونه‌گیری مجدد[9] ده هزار مرتبه برای ۱۲ کروموزوم استفاده شد (۴).

[2] Genotyping
[3] Phenotyping
[4] Nanodrop

[5] Single Point Analysis (SPA)
[6] Interval Mapping (IM)
[7] Composite Interval Mapping (CIM)
[8] Kosambi function
[9] Permutation

علاوه بر روش IM، از روش CIM نیز استفاده شد. این روش می‌تواند اثرات زمینه ژنتیکی را کاهش دهد (۳۲) و QTL های بدست آمده با روش IM را تائید نماید و همچنین QTL های بیشتری را که ممکن است بوسیله QLT های بزرگ اثر پنهان مانده باشند را مکان‌یابی نماید. عامل کمکی[10] با استفاده از روش رگرسیون مرحله‌ای با F_{in}=۰/۱ و F_{out}=۰/۱ و به کمک نرم‌افزار QTL Cartographer (ver.2.5) انتخاب شد (۲۹). در روش CIM در زمان آزمون برای QTL در یک فاصله، از سایر نشانگرها برای کنترل بقیه QTLها و نیز برای کاهش واریانس باقیمانده به عنوان عامل کمکی استفاده می‌کند و در نتیجه باعث بهبود آزمون می‌گردد. آستانه معنی‌دار برای CIM با استفاده از روش نمونه‌گیری مجدد هزار مرتبه برای جمعیت مورد مطالعه بدست آمد.

واریانس فنوتیپی توجیه شده (R^2) بوسیله هر QTL و اثر افزایشی QTL ها نیز برآورد شدند.

نتایج

۱) ارزیابی جمعیت گیاهی مورد مطالعه

نتایج بدست آمده نشان داد که قدرت بقاء جمعیت در شرایط غرقاب از صفر الی ۶۸٪ متغیر بوده و میانگین جوانه‌زنی حدود ۲۸٪ و واریانس آن تقریباً ۰/۰۱۲ بود. توزیع داده‌های درصد جوانه زنی دارای توزیع پیوسته بوده و این بدان معنی است که توارث این صفت می‌تواند به صورت کمی باشد و در کنترل ژنتیکی این صفت بیش از یک ژن دخالت دارند (شکل ۲).

۲) مطالعه ژنوتیپی و مکان‌یابی QTL ها

از آنجا که برگ‌های هر خانواده بصورت توده برای استخراج DNA برداشت شده بودند، تیپ هموزیگوت برای والد دهنده KHO بدست نیامد و فقط بصورت هتروزیگوت در جمعیت BC_2F_2 مشارکت داشت. لذا باندهای تیپ آن بصورت H و باندهای تیپ والد دوره‌ای IR64 با B مشخص گردیدند (شکل۱).

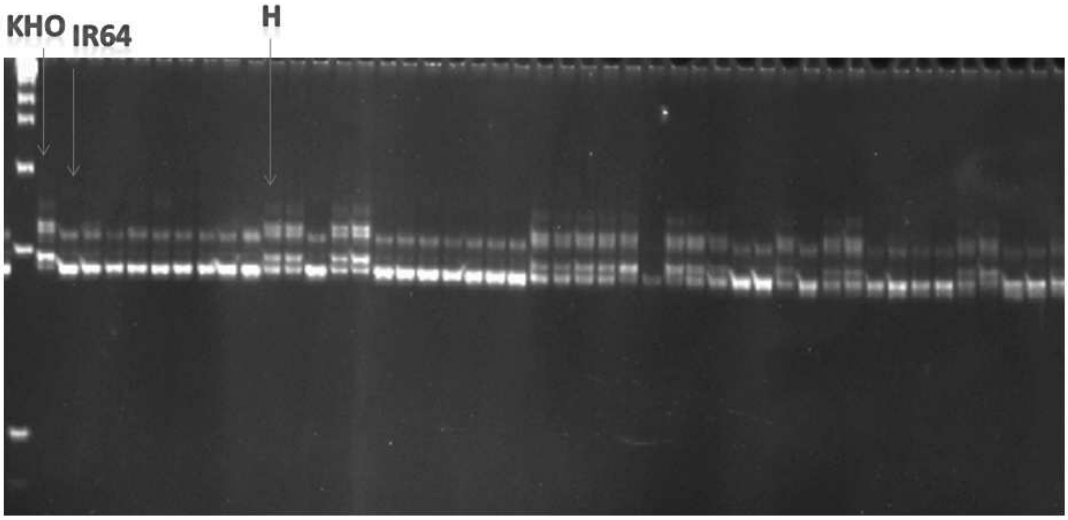
[10] Cofactor

دامنه قطعات تکثیر شده در ۱۷۱ نشانگر ریزماهواره که چندشکلی واضحی را در والدین نشان دادند از ۸۳ تا ۴۴۰ جفت باز متغیر بود. شکل ۳ نقشه پیوستگی ۱۷۱ نشانگر ریزماهواره و فاصله بین آنها را نشان می‌دهد. اندازه کل این نقشه ۱۴۸۳/۵ سانتی‌مورگان با متوسط فاصله ۸/۳ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور بوده است. در روش IM مطابق با میانگین LOD، سطح معنی‌دار آزمایش با احتمال کمتر از ۰/۰۱ بیش از ۴/۷ و با احتمال کمتر از ۰/۰۵ بیش از ۳/۸ بدست آمد. در روش CIM سطح معنی‌دار برای احتمال کمتر از ۰/۰۱ مطابق با میانگین LOD بیش از ۳/۵۲ و برای احتمال کمتر از ۰/۰۵ مطابق با میانگین LOD بیش از ۳/۴۸ بوده است.

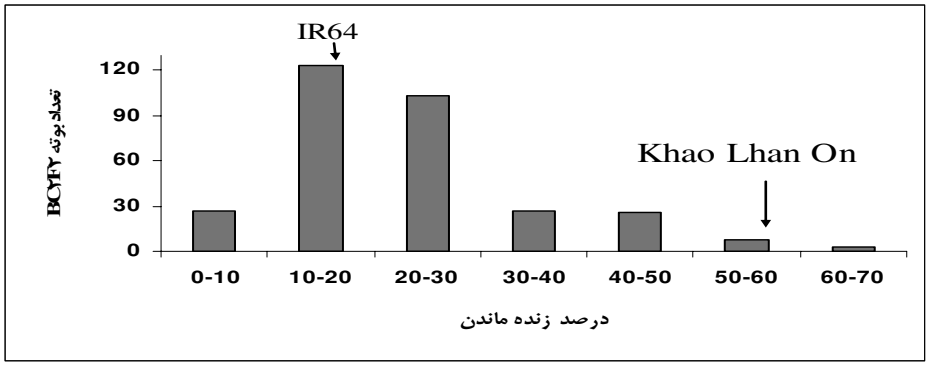
نتایج QTL های بدست آمده در این تحقیق با QTL های حاصله از مطالعات قبلی (۷) مورد مقایسه قرار گرفتند. QTL هایی که با دیگر مطالعات هم پوشانی داشتند به دو دسته تقسیم شدند: ۱) QTL هایی که هم از نظر موقعیت مکانی و هم از جهت صفت مشابه بودند، ۲) QTL هایی که موقعیت مکانی مشابه‌ای داشتند، ولی صفات متفاوتی را کنترل می‌نمودند.

مکان‌های ژنی بدست آمده با روش‌های SPA و IM در این جمعیت مطابقت خوبی با یکدیگر داشته و در نتیجه فقط نتایج IM به دلیل برتری این روش نسبت به روش SPA مورد بررسی قرار خواهند گرفت. شش QTL برای جوانه‌زنی در شرایط غرقابی شناسایی شد که دو QTL بر روی کروموزوم یک (qAG-۱-۱ و qAG-۱-۲)، دو QTL بر روی کروموزوم هفت (qAG-۷-۱ و qAG-۷-۲) و دو QTL بر روی کروموزوم نه (qAG-۹-۱ و qAG-۹-۲) قرار داشتند (جدول ۱ و شکل ۳). این QTL ها توانستند در مجموع ۹۳ درصد از تغییرات فنوتیپی جوانه‌زنی در شرایط غرقابی را در جمعیت مورد مطالعه توجیه نمایند. نقش سایر عوامل شامل QTL های کوچک اثر و عوامل ناشناخته در توجیه تنوع فنوتیپی صفت مورد مطالعه ۷ درصد بوده است. از میان مکان‌های ژنی شناسایی شده، دو QTL بوسیله روش CIM نیز تأیید شدند. اثر این شش QTL نسبتاً بالا بوده و دامنه تغییرات سهم انفرادی هر یک از ۶/۶۷ درصد تا ۳۱ درصد متغیر بوده است. مقدار LOD مکان‌های ژنی شناسایی شده از ۴/۶۹ تا ۱۹/۹۱

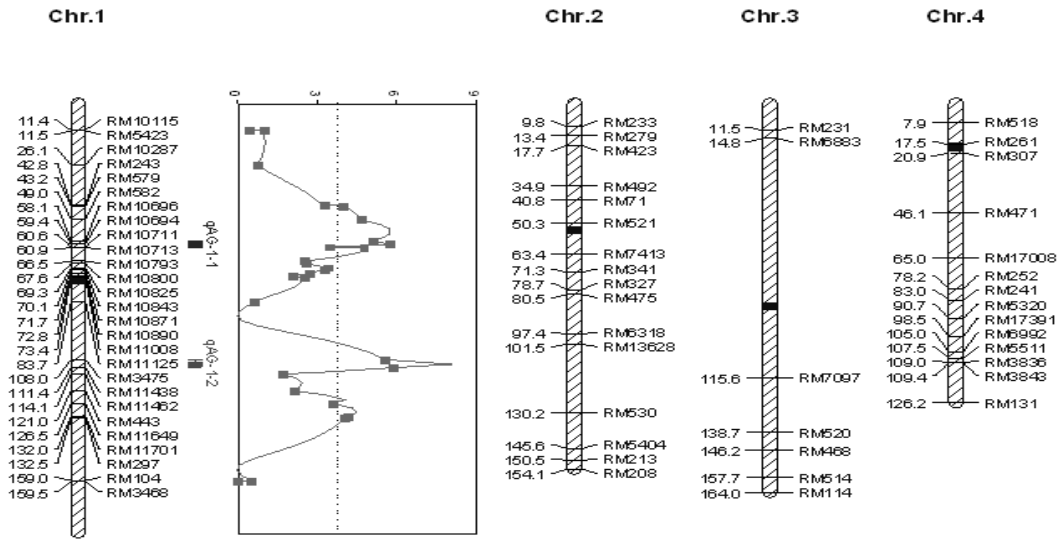
بوده است. به استثنای اثر افزایشی QTL شناسایی شده توسط نشانگر RM10694، اثر افزایشی سایر QTL های شناسایی شده منفی بوده و از والد KHO به نتاج منتقل شده است. این نتایج نشانگر آنست که آلل‌هایی از والد KHO باعث افزایش مقاومت به شرایط غیرهوازی در مرحله جوانه‌زنی می‌گردند. مکان ژنی شناسایی شده توسط نشانگر RM10694 در کروموزم یک که دارای اثر افزایشی بوده و از والد IR64 به نتاج منتقل شده بود بیانگر آن است که والد IR64 علیرغم نیمه حساس بودن به جوانه‌زنی در شرایط غیرهوازی دارای آلل مقاومت نیز می باشد. ولی چون اثر آلل‌های این صفت افزایشی است و بیش از یک آلل آنرا کنترل می‌نماید، به تنهایی قادر نیست تحمل به جوانه‌زنی در شرایط غرقاب را ایجاد نماید (جدول ۱).



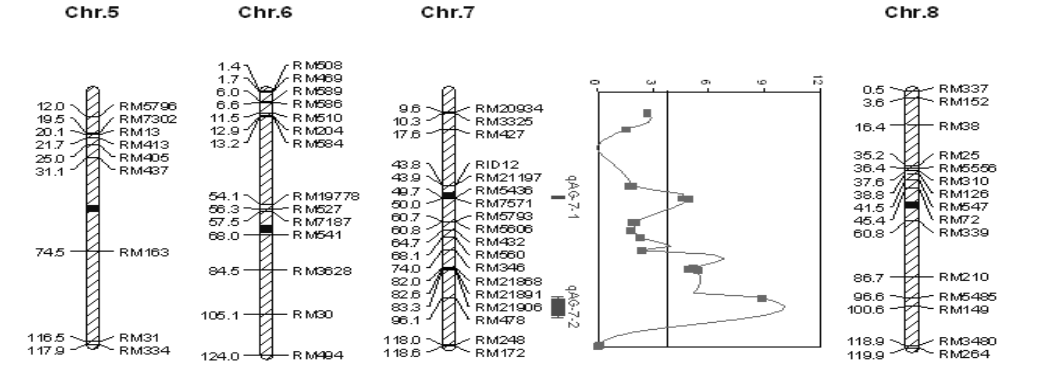
شکل۱- تصویر ژل الکترفورز برای محصولات تکثیر شده بوسیله نشانگر ریزماهواره RM478. منظور از H باند تیپ والد دهنده KHO است.



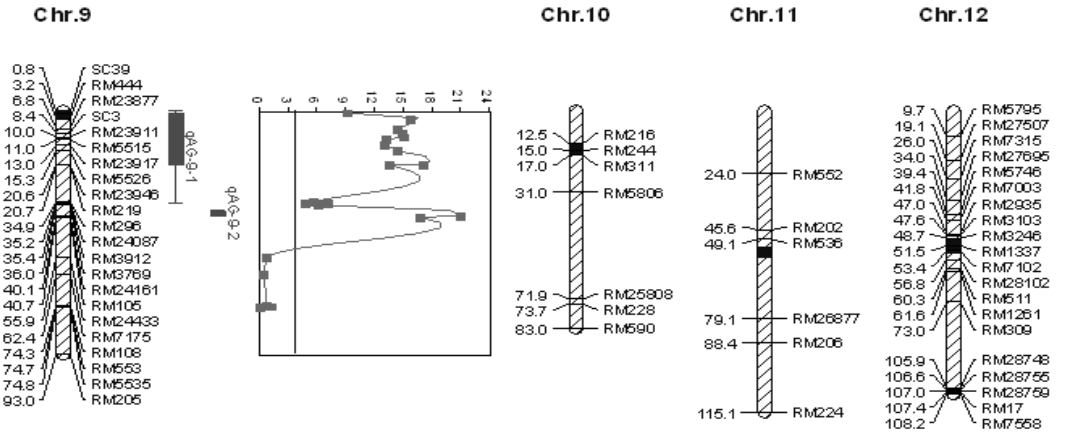
شکل۲- توزیع فراوانی طبقات درصد زنده ماندن (جوانه‌زنی) در شرایط غیرهوازی



شکل۳- نقشه پیوستگی (لینکاژی) نشانگرهای ریزماهواره با نمودار LOD برای QTL های مقاوم به شرایط غیرهوازی در مرحله جوانه‌زنی. خطوط نقطه چین عمودی آستانهLOD را نشان می‌دهد.



ادامه شکل۳.



ادامه شکل۳.

جدول۱- مکان‌های ژنی شناسایی شده مرتبط با تحمل به شرایط غیر هوازی در مرحله جوانه‌زنی در جمعیت BC2F2 حاصل از تلاقی KHO با IR64.

			Interval Mapping			Composite Interval Mapping		
QTL	کروموزم	نشانگر پیوسته با QTL	LOD	R^2**	اثر افزایشی*	LOD	R^2**	اثر افزایشی×
qAG-1-1	1	RM10694	5.77	7.76	1.38			
qAG-1-2	1	RM3475	10.02	12.2	-2.1			
qAG-7-1	7	RM7571	4.69	6.67	-1.62			
qAG-7-2	7	RM478	8.73	12.02	-1.62	10.3	9.1	-1.44
qAG-9-1	9	RM23946	16.49	23.39	-2.23			
qAG-9-2	9	RM24161	19.91	31	-2.3	14.3	13.5	-1.8

*: اثر افزایشی منفی یعنی آلل مورد نظر از والد KHO و اثر افزایشی مثبت یعنی آلل مورد نظر از والد IR64 به نتاج منتقل شده است .

**: منظور از R2 واریانس فنوتیپی توجه شده توسط هر QTL است.

بحث

در جمعیت مورد مطالعه، ۱۷۱ نشانگر برای ترسیم نقشه ژنتیکی و شناسایی QTL مورد استفاده قرار گرفتند. نقشه‌های ژنتیکی در نقشه‌یابی لینکاژی و کشف ژن‌ها با اهمیت هستند (۵). در این تحقیق فاصله لینکاژی بین نشانگرهای ریزماهواره بر اساس نقشه ژنتیکی Nipponbare/Kasalath (۵) و نقشه فیزیکی برنج (۹) استخراج گردید. نقشه‌های ژنتیکی حاصل از نوترکیبی همیشه دارای اعتبار نمی‌باشند. تعداد کل نوترکیبی‌های موجود برای بدست آوردن تخمین درستی از فاصله ژنتیکی بین نشانگرهایی که پیوستگی بالایی دارند کافی نمی‌باشد. در حقیقت، در اغلب موارد مرتب کردن ژنتیکی نشانگرهای دارای پیوستگی بالا امری غیر ممکن به نظر می‌رسد، چرا که یا نوترکیبی بین دو نشانگر نزدیک بهم اتفاق نمی‌افتد و یا نوترکیبی میوزی بین جفت نشانگرها اطلاعات مفیدی را در اختیار نمی‌گذارد (۲۰). سه نوع اشتباه اختصاصی در زمینه نقشه ژنتیکی، به ویژه در زمینه تجزیه و تحلیل چند نقطه‌ای وجود دارند که عبارتند از: ۱) مکان‌های ژنی اشتباهاً به کروموزوم خاصی نسبت داده می‌شوند، ۲) مکان‌های ژنی بدرستی به کروموزوم‌های مربوطه نسبت داده می‌شوند ولی ترتیب قرار گرفتن آنها بر روی کروموزوم صحیح نیست، و ۳) اختصاص مکان‌های ژنی به کروموزوم‌های مربوطه و ترتیب آنها صحیح است اما فاصله بین مکان‌های ژنی بر حسب مقدار نوترکیبی اتفاق افتاده بین آنها درست نیست (۱۷). در این مطالعه به منظور اجتناب از این نوع اشتباهات (اشتباهات تیپ یک و تیپ دو)، موقعیت مکانی هر نشانگر ریزماهواره با توجه به جایگاه آن در نقشه فیزیکی با کیفیت بالا مشخص گردید. لازم به ذکر است که نقشه فیزیکی ژنوم برنج با کیفیت بالا در دسترس است (۹). نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی از نظر اختصاص دادن نشانگرها به کروموزوم‌ها و ترتیب آنها بر روی کروموزوم مربوطه مشابه هستند. اگر چه فاصله آنها ممکن است متفاوت باشد.

در جمعیت مورد مطالعه شش QTL شناسایی شد که اثر افزایشی آنها نسبتاً بالا بوده و ۶/۶۷ درصد تا ۳۱ درصد از کل تغییرات فنوتیپی مربوط به جوانه‌زنی در شرایط غرقاب را توجیه نمودند. در حالیکه QTL های متفاوت برای یک صفت معمولاً با یکدیگر برهمکنش نمی‌دهند، واریانس کل ژنتیکی که بوسیله همه QTL های آن صفت توجیه می‌شود کمتر از جمع واریانس ژنتیکی توجیه شده بوسیله هر QTL به صورت منفرد است. نتایج حاصل از این پژوهش نیز مشابه بود. شش QTL با هم ۴۰/۲ درصد واریانس را توضیح دادند (با دستور PROC GLM در نرم‌افزار SAS محاسبه گردید)، در حالیکه جمع واریانس ژنتیکی توجیه شده بوسیله QTL ها تقریباً ۹۳ درصد بوده است. این مطلب با

پیش‌بینی افزایش آماری متغیرهای مستقل تناقض دارد. عواملی مانند تأثیرات محیطی، پلیوتروپی فیزیولوژیک، QTL های کوچک اثر که شناسایی آنها مشکل است، کوواریانس بین QTL هایی که بطور تنگاتنگی به یکدیگر پیوسته‌اند و همچنین اپیستازی ممکن است تا اندازه‌ای این تفاوت‌ها را توجیه نماید (۱۱).

تاکنون فقط ۲ مطالعه بوسیله لینگ و همکاران (۱۲، ۱۳) برای نقشه‌یابی ژنتیکی مقاومت به شرایط غیرهوازی در مرحله جوانه‌زنی در برنج صورت گرفته است. در یکی از این مطالعات، ۸۱ اینبرد لاین حاصل از تلاقی Kinmaze (*Japonica*)/DV85 (*Indica*) با استفاده از نشانگرهای RFLP مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مجموعاً پنج QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۵ و ۷ شناسایی شد که دو عدد از پنج QTL با QTL های بدست آمده در این مطالعه متناسب بوده‌اند. این QTL ها شامل مکان ژنی شناسایی شده در فواصل نشانگرهای XR2635–R1485 در کروموزم یک (مشابه QTL شناسایی شده در این تحقیق توسط نشانگر RM3475) و مکان ژنی شناسایی شده در فواصل نشانگرهای X379–C213 در کروموزم ۷ (مشابه QTL شناسایی شده در این تحقیق توسط نشانگر RM478) می‌باشند (۱۲).

نتایج چندین مطالعه نشان داد که تعداد زیادی از عوامل کنترل کننده صفات مهم برنج بصورت دست جمعی در بلوک‌های کروموزومی قرار دارند (۳). برای مثال ارتباط بین خواب بذر و طول عمر آن در گذشته گزارش شده است (۱۹، ۲۴). ایکاشی (۸) مشاهده نمود که بعضی از واریته‌های ایندیکا علیرغم آنکه خواب بذر ضعیفی دارند ولی دارای طول عمر بیشتری هستند. مورا و همکاران (۱۴) QTL هایی را برای خواب بذر با استفاده از لاین‌های اینبرد تلاقی برگشتی (BC_1F_5) حاصل از تلاقی Nipponbare/Kasalath//Nipponbare شناسایی نمودند. مکان *qAG-7-2* با *qSD-7-2* بدست آمده برای خواب بذر در کرموزوم ۷ یکسان بود و نشانگر RM1245 دارای قویترین پیوستگی ژنتیکی با این QTL بود.

گیاه برنج بخش هوایی خود را در هنگام جوانه‌زنی تحت شرایط غیرهوازی توسعه می‌دهد که به کلئوپتیل سفید محدود می‌شود (۱۰). طویل شدن این بافت امکان رسیدن گیاهچه غرقاب شده برنج را به منطقه هوازی فراهم می‌سازد (۱۰، ۲۵). با توجه به اینکه تقسیم سلولی محدود به ساعت‌های اولیه بعد از جوانه‌زنی می‌باشد، رشد کلئوپتیل تحت شرایط غیرهوازی ضرورتا وابسته به طویل شدن سلول‌ها است (۱۸). در مدت جوانه‌زنی تحت شرایط غیرهوازی، کلئوپتیل برنج مواد غذایی را از آندوسپرم (به منظور رشد و نگهداری فشار تورژسانس در سطح بالا) جذب می‌نماید. فشار تورژسانس به همراه شکل پذیری دیواره سلول طویل شدن آن را کنترل می‌نماید. در میان مواد متنوع غذایی، نیترات و متابولیسم و انتقال پذیری آن مهم به نظر می‌رسد (۱). ترپاتی و همکاران (۲۷) نواحی ژنومی مربوط به پایداری دیواره سلولی را با استفاده از جمعیت دابل هاپلوید حاصله از تلاقی CT9993-5-IR2266-42-6-2/10 مشخص نمودند. موقعیت مکانی *qAG-9-1* در این مطالعه با *qCMS-9* بدست آمده برای پایداری دیواره سلولی متناسب بوده است.

یاماچی و وین (۳۲) گزارش دادند که کهنه شدن بذرها باعث کاهش استقرار گیاهچه‌ها در خاک‌های غیرهوازی می‌گردد و پیشنهاد کردند واریته‌های مقاوم به کهنه شدن برای اصلاح رقم های برنج در کشت مستقیم مفید خواهند بود. بنابراین اصلاح برای طول عمر بذر در برنامه‌های اصلاحی از جذابیت بالایی برخوردار است تا بهبود برای شرایط غیرهوازی در مرحله جوانه‌زنی تقویت گردد. میورا و همکاران (۱٤) QTL مربوط به این صفت *(qLG-9)* را بر روی کرموزوم ۹ مکان‌یابی نمودند. این QTL در موقعیت مکانی مشابه‌ای با *qAG-9-2* بدست آمده در این مطالعه همراه بوده است.

در انتهای لازم به ذکر است که این پژوهش نیازمند مطالعات تکمیلی از قبیل نقشه‌یابی با قدرت تفکیک بالا و نشانمند کردن ژن‌های شرکت کننده در مسیر جوانه زنی غیر هوازی می‌باشد تا بتوان این ژن‌ها را در فرآیند انتقال ژن به سایر ارقام منتقل نمود.

سپاسگزاری

از موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI) که مواد گیاهی و امکانات آزمایشگاهی را برای اجرای این تحقیق در اختیار ما قرار دادند سپاسگزاریم.

منابع

1. Atwewl B.J., Waters I., Greenway H. (1982) The effect of oxygen and turbulence on elongation of coleoptiles of submergence-tolerant and -intolerant rice cultivars. J.Exp.Bot. 33: 1030-1044.
2. Biswas J.K., Yamauchi M. (1997) Mechanism of seedling establishment of direct-seeded rice (*Oryza sativa* L.) under lowland conditions. Bot.Bull.Acad.Sin.38:29-32.
3. Cai H.W., Morishima H. (2002) QTL clusters reflect character associations in wild and cultivated rice. Theor.Appl.Genet.**100**:840-846.
4. Churchill G.A., Doerge R.W. (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138:963-971.
5. Harushima Y., Jano M., Shomura A. (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F_2 population. Genetics 148:479–494.
6. Holt D., Ismail A.M. (2002) Anaerobic germination and seedling establishment: solution to early flooding and weed problems. 32. Annual Scientific Conference of the Crop Science Society of the Philippines, Tagbilaran City, Bohol Philippines. P 51.
7. http://www.gramene.org.
8. Ikehashi H. (1973) Studies on the environmental and varietal differences of germination habits in rice seeds with special reference to plant breeding (in Japanese with English summary). J.Cent.Agric.Exp.Stan.19:1–60.
9. International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP) (2005) The map-based sequence of the rice genome. Nature 436:793-800.
10. Kordan H.A. (1976) Oxygen as an environmental factor in influencing normal morphogenetic development in germinating rice seedlings. J.Exp.Bot. 27:947-952.
11. Li Z.K., Pinson S.R.M., Park W.D., Paterson A.H. , Stansel J.W. (1997) Epistasis for three grain yield components in rice (*Oryza sativa* L.). Genetics Society of America 145:453-465.
12. Ling J,, Ming-yu H,W,, ming C,, Jian-min W, (2004) Quantitative trait loci and epistatic analysis of seed anoxia germinability in rice (*Oryza sativa* L.). Rice Science 11 (5-6):238-244.
13. Ling J., Liu S., Hou M., Tang J., Chen L., Zhai H., Wan J. (2006) Analysis of QTLs for seed low temperature germinability and anoxia germinability in rice (*Oryza sativa* L.). Field crops research 98:68-75.
14. Miura K., Lin S.Y., Yano M., Nagamine M.T. (2002) Mapping quantitative trait Loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa L.*). Theor.Appl.Genet.**104**:981–986.
15. Murray M.G., Thomson W.F. (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. Nuc. Acids Res. 8:4321-4325.
16. Nelson J.C. (1997) QGene software for marker-based genomic analysis and breeding. Mol Breed. 3:239-245.
17. Nievergelt C.M., Douglas W., Smith J., Kohlenberg B., Schork N.J. (2004) Large-scale integration of human genetic and physical maps. Genome Research 14:1199–1205.
18. Opik H. (1973) Effect of anaerobiosis on respiratory rate, cytochrome oxidase activity and mitochondrial structure in coleoptiles of rice (*Oryza sativa* L.). J. Cell Sci. 12:725-739.
19. Ota Y., Takemura Y. (1970) Rice grain storage and seed dormancy (in Japanese). J. Agri. Sci. Tokyo. 25:218–222.
20. Pflieger S., Lefebvre V., Causse M. (2001) The candidate gene approach in plant Genetics: a review. Mol. Breed. 7:275-291.
21. Redoña E.D., Mackill D.J. (1996) Genetic variation for seedling-vigor traits in rice. Crop Science. 36:285-290.
22. Sasaki T. (1974) Studies on breeding for the germinability at low temperature of rice varieties adapted to direct sowing cultivation in flooded paddy field in cool region. Rep. Hokkaido. Prefect. Agric. Exp. Stn. 24:1-90.
23. Seshu D.V., Krishnasamy V., Siddique S.B. (1988) Seed vigor in rice. In rice seed health. IRRI. Pp 315-329.
24. Siddique S.B., Seshu D.V., Pardee W.D. (1988) Rice cultivar variability for accelerated aging of seed. In: IRRI research paper series number 131.IRRI. Pp. 1-7.
25. Takahashi N. (1978) Adaptive importance of mesocotyl and coleoptile growth in rice under different moisture regimes. Aust. J. Pl. Physiol. 5:511-517.
26. Tanksley S.D., Nelson J.C. (1996) Advanced backcross QTL analysis: A method for the simultaneously discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. Theor.Appl.Genet. 92:191-203.
27. Tripathy J.N., Zhang J., Robin S., Nguyen T.H.T. (2000) QTLs for cell-membrane stability mapped in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. Theor.Appl.Genet. 100:1197–1202.
28. Voorrips R.E. (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. Journal of Heredity 93(1):77-8.
29. Wang S., Basten C.J., and Zeng Z.B. (2007) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm).
30. Yamauchi M., Aguilar A.M., Vaughan D.A., Seshu D.V. (1993) Rice (*Oryza sativa* L.) germplasm suitable for direct sowing under soil surface. Euphytica 67:177-184.
31. Yamauchi M., Herradura P.S., Aguilar A.M. (1994) Genotype difference in rice postgermination growth under hypoxia. Pl. Sci. 100:105-113.
32. Yamauchi M., Winn T. (1996) Rice seed vigor and seedling establishment in anaerobic soil. Crop Sci. 36:680-686.
33. Zeng Z.B. (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136:1457-1468.