مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال اول، شماره اول، پاییز ۱۳۹۰ (۵۹-۴۹)

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

قاسم محمّدی‌نژاد[1]*، راکش کومار سینگ[2]، عبدالمجید رضایی[3]، احمد ارزانی[4]، بابک ناخدا[5]، محمدحسین فتوکیان[6]، علی مومنی[7] و گلن گریگوریو[8]
۱، بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ۲، ۸، مرکز بین المللی تحقیقات برنج (IRRI)، لوس بانیوس، 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 بانیوس 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 BC_3F_4 حاصل از تلاقی IR29×Pokkali که برای این ناحیه ایجاد شده بود، استفاده شد. بدین منظور افراد تصادفی جامعه BC_3F_4 در سطوح شوری ۱۲، ۱۶و 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 QTL، Saltol

* نویسنده مسئول: قاسم محمدی‌نژاد E-mail: mohammadinejad@uk.ac.ir

مقدمه

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 ۲۱/۵ میلیون هکتار تحت تأثیر شوری بوده که از این مقدار ۱۲ میلیون هکتار شور و ۹/۵ 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[1] 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 شناسائی یک ناحیه 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×IR29 روی کروموزوم ۱ شناسایی شد. این QTL بزرگ اثر که سپس تحت نام *Saltol* معرفی گردید حدود ۶۴/۳ تا ۸۰/۲ 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)[2] 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[3] و SSLP[4] با استفاده از جوامع حاصل از تلاقی Pokkali×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 (BC_3F_4) 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

1. Quantitative Trait Loci (QTLs)

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

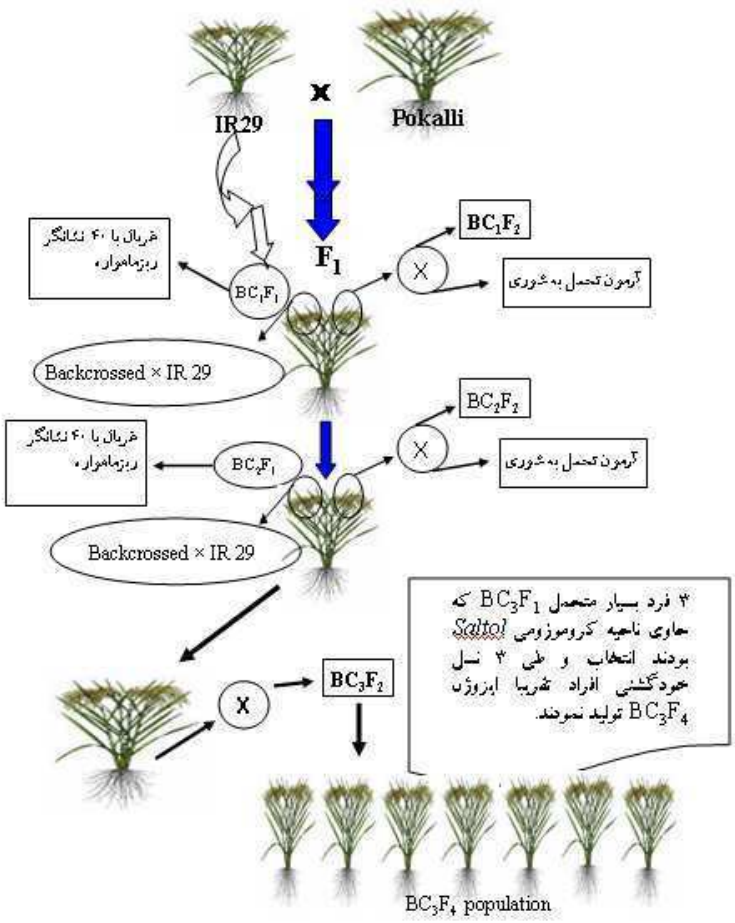
(1997) گزینش فنوتیپی برای تحمل به شوری و گزینش ژنوتیپی برای در برداشتن ناحیه *Saltol* صورت گرفت. گزینش ژنوتیپی به صورت گزینش برای ناحیه موردنظر[1] و گزینش زمینه‌ژنتیکی[2] با استفاده از ۴۰ نشانگر ریزماهواره انجام پذیرفت. در طی تولید جامعه نسبتاً ایزوژن، گزینش فنوتیپی با بررسی نتاج هر نسل تلاقی‌برگشتی 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 BC_3F_1 که برای نشانگرهای RM3412 و RM8094 طرفینی *Saltol* هتروزیگوت بودند (BC_3F_1-11-6-5، BC_3F_1-9-10-9 و BC_3F_1-9-5-2) گزینش و از خودگشنی آن‌ها سه جمعیت BC_3F_4 حاصل شد. از هر فامیل ۲۰۰۰ فرد تصادفی گزینش و مورد ارزیابی فنوتیپی قرارگرفتند (شکل۱). ارزیابی ۶۰۰۰ فرد BC_3F_4 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 قرارگرفتند. 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 درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز جوانه‌دار شدند.

بذرهای جوانه‌زده در درون حفره‌های ایجادشده در یونی‌لیت[3] 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[4] انتقال یافتند که با افزودن کلریدسدیم هدایت الکتریکی دلخواه بر حسب دسی‌زیمنس بر متر حاصل شد. اسیدیته محلول‌غذایی 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 تغییریافته 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 BC_3F_1-11-6-5 همگی فنوتیپ حساس را بروز دادند و جهت ارزیابی ژنوتیپی مناسب نبودند. بنابراین فقط افراد متعلق به دو فامیل دیگر (BC_3F_1-9-10-9 وBC_3F_1-9-5-2) 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 BC_3F_1-9 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).

1. Forground selection
2. Background selection
3. Styrofoam
4. Yoshida

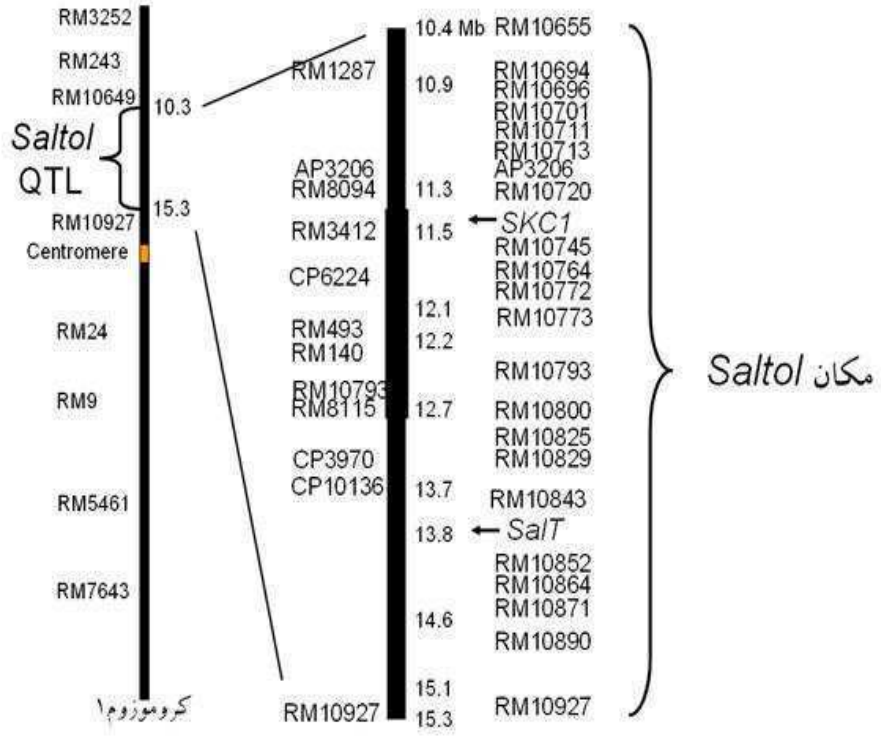


شکل ۱ – نمودار تولید جمعیت نسبتاً ایزوژن برای اشباع ظریف نقشه ناحیه *Saltol*

جدول ۱– نشانگرهای مورد استفاده برای اشباع نقشه ژنتیکی *Saltol*

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

سرانجام به منظور نقشه‌یابی دقیق *Saltol*، از ۴ نشانگر EST-SSR شامل CP10136، CP6224، CP3970 و AP3206 و نشانگرهای ریزماهواره شامل RM8115، RM10793، RM8094، RM3412، RM493 و RM140 استفاده شد که در فاصله ۱۱/۲Mb تا فاصله ۱۲/۷ Mb یا ۶۰/۶ سانتی‌مورگان تا ۶۷/۵ سانتی مورگان قرار داشتند (شکل۲).



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

آزمایش‌های مولکولی در آزمایشگاه کاربرد نشانگرهای مولکولی و آرایه‌های ژنی[1] در مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج در فیلیپین صورت گرفت و محصولات تکثیرشده با PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید 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 Imager، (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) رؤیت 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.

ماتریس ژنوتیپی برای۲۰۰۰ 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

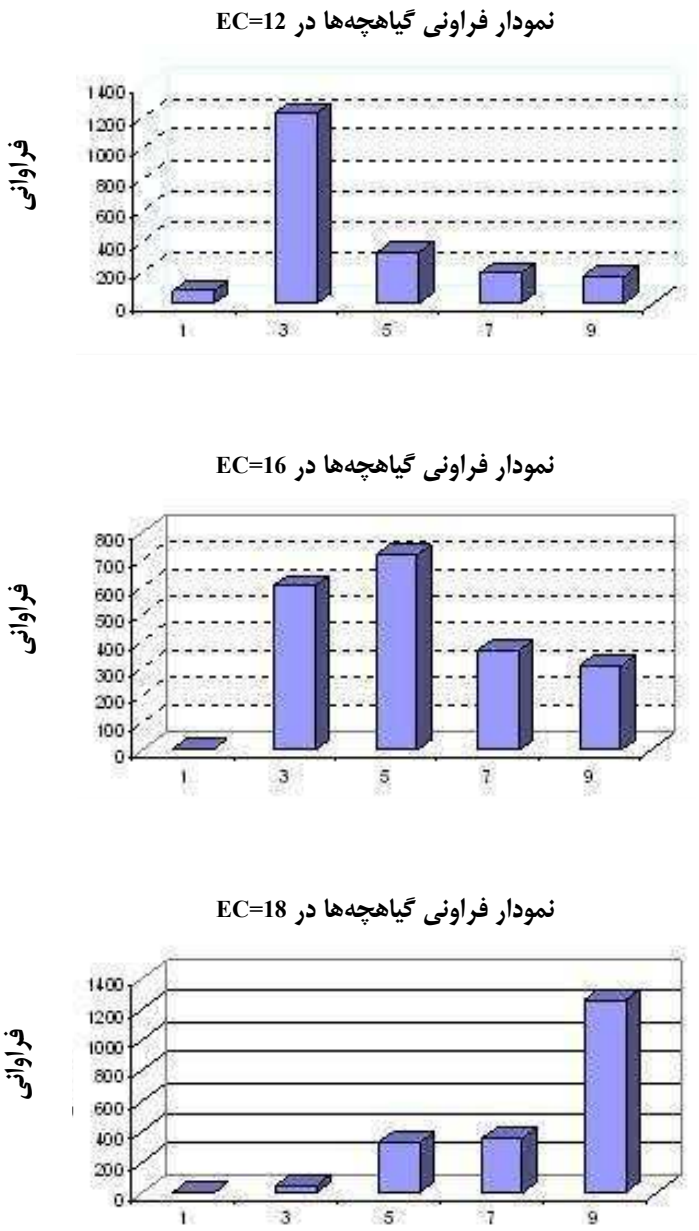
نتایج ارزیابی‌های فنوتیپی

امتیاز ژنوتیپ‌ها برای تحمل به شوری در دو فامیل منتج از BC_3F_1-۹ تنوع بالائی داشت به طوری که ژنوتیپ‌ها امتیاز[3] ۱ تا ۹ را نشان دادند. در

1. Gene Array and Molecular Marker Application (GAMMA)

2. Composite Interval Mapping
3. Score

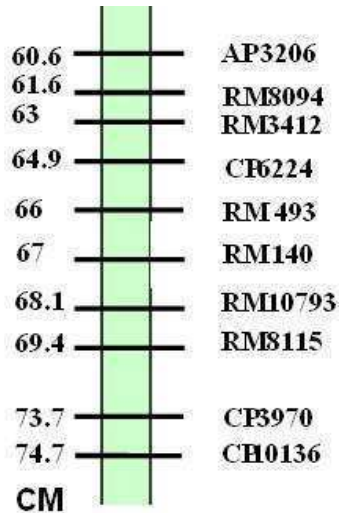
حالی‌که تمام لاین‌های منتج از BC_3F_1-۱۱-۶-۵ حساس تا نیمه‌حساس بودند. بنابراین، فقط اطلاعات ۲۰۰۰ فرد تصادفی از خانواده‌های BC_3F_4 حاصل از فامیل BC_3F_1-۹ جهت نقشه‌یابی مولکولی و اشباع ناحیه *Saltol* استفاده شدند. در هدایت الکتریکی ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، توزیع پیوسته و با کشیدگی کم به‌سمت والد متحمل و در هدایت الکتریکی ۱۸ دسی‌زیمنس بر متر، توزیع پیوسته و با کشیدگی به سمت والد حساس بود (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.



شکل ۳- توزیع فراوانی فنوتیپی افراد جمعیت مورد ارزیابی

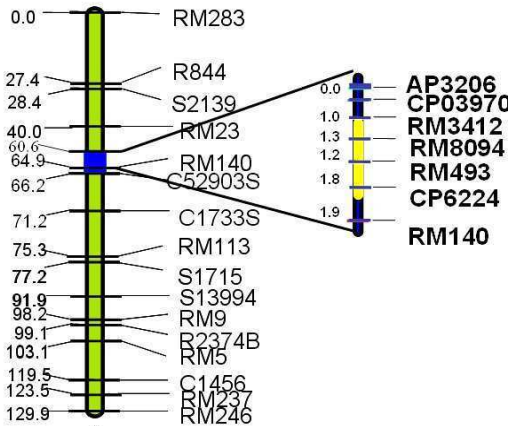
نتایج ژنوتیپی و مکان‌یابی QTL

ژنوتیپ ۲۰۰۰ فرد BC_3F_4 برای نقشه‌یابی دقیق ناحیه *Saltol* با استفاده از ۴ نشانگر EST-SSR شامل CP10136، CP6224، CP3970 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 (شکل۴). 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، همچنین 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

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 بین‌رفتن تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها به لحاظ اعمال غلظت بالای نمک و اریبی در داده‌های فنوتیپی 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

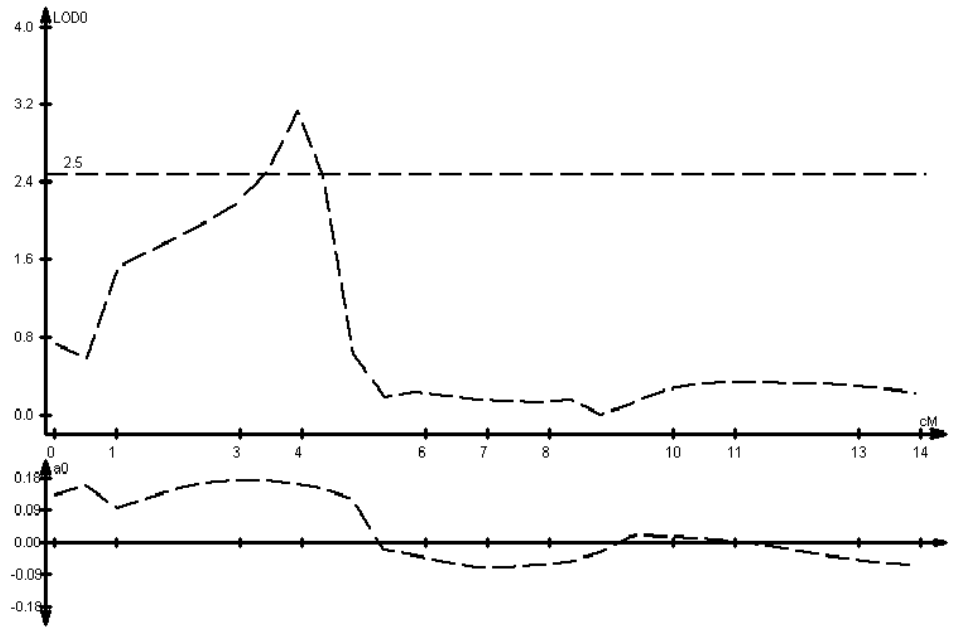
دسی‌زیمنس بر متر، استنباط می‌شود موقعیت این QTL در ناحیه *Saltol* و در فاصله بین ۲/۸ تا ۴ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم است (شکل۶).

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، RM3412 و CP6224 قرار می‌گیرد. بنابراین 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،

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

صفت	نشانگر	B0	B1	LOD	سطح معنی‌داری
امتیاز تحمل گیاهچه ها 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*
امتیازتحمل گیاهچه ها 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 گیاهچه ها 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 مبدا، B1: شیب خط رگرسیون وLRT: نسبت درستنمایی می‌باشد.



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

اشباع ظریف نقشه با ترتیب ارایه‌شده 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 BC_3F_4 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[1] (اطلاعات منتشرنشده) در جریان است و تاکنون هفت ژن کاندید برای این QTL گزارش شده است که در راستای شناسایی و جداسازی ژن‌های تحمّل 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 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 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 طورکلی 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 ازصفات 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 گزارش‌شده برای qSKC1 با ناحیه گزارش‌شده 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 BC_3F_4 و ۱۴ نشانگر CAPS موجود در ناحیه qskc1 برای نقشه‌یابی دقیق و از گیاهچه‌های BC_3F_4 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 BC_3F_4 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 BC_5F_2 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 جایگزین‌شده یافت

1. Generation Chalenege Program

شدند که با تغییر ۴ اسیدآمینه در ترکیب پروتئین منجر به تحمل به شوری می‌گردند. این ژن تنظیم‌کننده فعالیت غشاء برای نوعی از ترانسپورترها به نام HKT[1] 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 ژن شناسایی‌شده 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.

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 minipreparation, 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. IRRI 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, Rezai 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, Rezaie 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.

Crop Biotech. Vol. 1, No. 1, 2011

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

GH. MOHAMMADI-NEJAD[1], R. K. SINGH[2], A. M. REZAIE[3], A. ARZANI[4], B. NAKHODA[5], M. H. FOTOKIAN[6], A. MOUMENI[7] AND GLEN B. GREGORIO[8]

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