



شناسایی QTL‌های مرتبط با تعدادی از خصوصیات مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های برنج تحت تنش کمبود نیتروژن

شریفه محمدآلق^۱، حسین صبوری^۲، علی ستاریان^۳، عباس بیابانی^۳ و عبدالطیف قلی‌زاده^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس
۲- دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس، (نویسنده مسوول: hos.sabouri@gmail.com)
۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس
۴- استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس
تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۱۹

چکیده

نیتروژن مهم‌ترین عنصر غذایی پرمصرف می‌باشد که در ساختمان مولکول‌های پروتئینی گوناگون، آنزیم‌ها، کوآنزیم‌ها، اسیدهای نوکلئیک و سیتوکروم‌ها نقش دارد. به‌منظور مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با تحمل به کمبود نیتروژن در مرحله گیاهچه‌ای ۹۶ لاین که از نسل هشتم تلاقی ارقام اهلمی طارم و ندا به دست آمده بودند در آزمایشگاه‌های گیاه‌شناسی و ژنتیک دانشگاه گنبدکاووس در سال ۱۳۹۳ مورد مطالعه قرار گرفتند. برای تهیه نقشه ژنتیکی از ۳۰ نشانگر SSR و ۱۵ نشانگر ISSR استفاده شد. نقشه پیوستگی ۱۴۱۱/۳ سانتی‌مورگان ژنوم برنج را با متوسط فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر با ۱۵/۳۴ سانتی‌مورگان پوشش داد. در مجموع ۳۸ QTL برای صفات مورد مطالعه مکان‌یابی شد. در شرایط کمبود نیتروژن qRW-10 و qRW-11 در ۱۱/۴ درصد از تغییرات فنوتیپی حجم ریشه را تبیین نمود. برای میزان ازت در شرایط کمبود نیتروژن یک QTL روی کروموزوم ۲ شناسایی شد که ۱۳/۷ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را کنترل نمود. QTL‌های کنترل‌کننده تعداد ریشه (qRN-3 و qRN-6)، و وزن ریشه (qRW-5b و qRW-5c) در شرایط نرمال بزرگ اثر تشخیص داده شدند که این QTL‌ها توجیه بالای ۲۰ درصد از تغییرات فنوتیپی را به خود اختصاص دادند. از نشانگرهای پیوسته به این QTL‌ها پس از تعیین اعتبار به عنوان نشانگر پیوسته به صفات جهت انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های به‌زادی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: برنج، مرحله گیاهچه‌ای، کمبود نیتروژن، مکان‌یابی صفات کمی

مقدمه

با توجه به اهمیت غذایی برنج و جایگاه استراتژیک آن در امنیت غذایی جهان، لازم است برای دستیابی به عملکرد بالا، کیفیت مطلوب و سایر صفات مهم اقتصادی و زراعی، ابتدا مطالعات جامعی از تنوع ژرم پلاسما این گیاه صورت گیرد (۱). برنج یکی از مهمترین محصولات کشاورزی ایران و جهان است. تنش‌های محیطی تولید این محصول را محدود می‌نمایند (۸). نیتروژن یک جزء مهم از مولکول‌های ضروری مانند پروتئین، اسید نوکلئیک، برخی از چربی‌ها و کلروفیل است (۱۱). در دسترس بودن نیتروژن برای رشد بهینه و توسعه گیاهان حیاتی است. در طبیعت عوامل متعددی از جمله فرسایش خاک، شسته شدن آب، رشد گیاه و مصرف میکروبی منجر به کمبود نیتروژن می‌شود (۴). کمبود نیتروژن یک تنش غیرزنده است که بارها و بارها توسط گیاه تجربه شده است؛ این تنش در نتیجه کمبود نهاده و یا عدم جذب کافی ایجاد می‌شود که گیاهان به‌خصوص محصولات زراعی در معرض این تنش غیرزنده هستند (۱۲). از نظر کمی مقدار نیتروژن لازم برای نمو رویشی خیلی بیشتر از مقدار لازم برای نمو زیایشی است. برنج بیش از ۹۰ درصد کل نیتروژن لازم را برای یک عملکرد متوسط قبل از آنکه به مرحله خوشه‌دهی برسد، جذب می‌کند (۷). شناسایی نشانگرهای کاملاً پیوسته با ژن موردنظر و مکان‌یابی آن یک هدف مهم در اصلاح گیاهان از جمله برنج است. در واقع هدف مهم مکان‌یابی ژنی صفت کمی^۱ (QTL)، شناسایی نشانگرهای DNA دارای پیوستگی با صفت مورد نظر و استفاده از آن برای گزینش به کمک نشانگر^۲ (MAS) است (۹). هو و همکاران (۶) با استفاده از ۹۶ لاین دابل هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی

بین واریته‌های TN1 (هندی) و CJ06 (ژاپنی) توانستند در مجموع ۳ QTL برای محتوای نیتروژن در ساقه در کروموزوم‌های ۵، ۶ و ۸ در دو شرایط نیتروژن زیاد و نیتروژن کم شناسایی کنند. در این مطالعه qNC-8 در هر دو شرایط در فاصله نشانگری RM1111-RM4085 ردیابی شد؛ آن‌ها اظهار داشتند که این QTL ممکن است به‌منظور بهبود جذب استفاده بهینه از نیتروژن در شرایط کمبود و همچنین می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی از طریق شاخص انتخاب به کمک نشانگر (MAS) مورد استفاده قرار گیرد. ویو و همکاران (۱۵) با استفاده از ۱۲۷ لاین خالص نوترکیب حاصل از تلاقی لاین‌های Minghui63 (MH63) و Zhenshan97 (ZS97) به همراه والدین و نسل F₁ توانستند در شرایط کمبود نیتروژن در مجموع ۱۵ QTL برای صفات مورد بررسی (عملکرد دانه، وزن زیست توده، نیتروژن دانه و نیتروژن زیست توده) روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۷، ۹، ۱۰ و ۱۱ شناسایی کنند. لیان و همکاران (۱۰) برای شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده تحمل به کمبود نیتروژن در مرحله گیاهچه‌ای از ۲۳۹ لاین خالص نوترکیب حاصل از تلاقی ارقام Zhenshan 97 و Minghui 63 استفاده نمودند و نقشه پیوستگی جمعیت را با استفاده از ۱۶۸ نشانگر AFLP و ۷۸ نشانگر SSR با طول ۱۶۷۳ سانتی‌مورگان و فاصله متوسط ۶/۶ سانتی‌مورگان تهیه نمودند و توانستند ۷ و ۵ QTL برای وزن ریشه همچنین ۸ و ۵ QTL برای وزن ساقه به ترتیب در شرایط تنش کمبود نیتروژن و شرایط نرمال مکان‌یابی کنند. فنگ و همکاران (۳) به‌منظور مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با تحمل به کمبود نیتروژن در مرحله گیاهچه‌ای از ۲۳۸ لاین‌های خالص نوترکیب حاصل از تلاقی R9308 × Xieqingzao B و ۱۹۸

شد. صفات طول ساقه و ریشه، طول و عرض برگ پرچم با خط کش بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. با قرار دادن ریشه‌ها در یک استوانه مدرج ۲۵ میلی‌لیتری با حجم مشخص و اختلاف حجم آب قبل و بعد از قرار دادن ریشه، حجم ریشه اندازه‌گیری شد. سپس ریشه‌ها و ساقه‌های گیاهچه‌های مربوط به هر لاین، در هر تکرار، ابتدا با ترازو توزین شده و به طور مجزا در پاکت کاغذی بسته‌بندی شد و پس از آن در آون در دمای ۷۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. وزن خشک ساقه و ریشه نیز پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. و چگالی سطح ریشه با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

(رابطه ۱)

$\pi \times \text{قطر ریشه} \times \text{طول ریشه} = \text{چگالی سطح ریشه}$
میزان ازت با روش کج‌جدال که شامل سه مرحله هضم، تقطیر و تیتراسیون هست، صورت گرفت. بر این اساس یک دهم گرم از نمونه خشک شده را در لوله هضم ریخته شد. سپس دو دهم گرم کاتالیزور (۹۶ گرم سولفات پتاسیم، ۳/۵ گرم سولفات مس و ۰/۵ گرم اکسید سلنیوم) و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک تجاری غلیظ به لوله هضم افزوده و به مدت ۲/۵ ساعت در دستگاه هضم کج‌جدال قرار داده شد. پس از انجام هضم لوله‌ها کاملاً سرد شدند. بعد از هضم با دستگاه تمام اتوماتیک کج‌جدال تقطیر گردید تا نیتروژن آن جدا شود به این صورت که اسید بوریک ۰/۱ نرمال به مقدار ۴۰ میلی‌لیتر به همراه ۳ قطره معرف متیل رد درون بشر ریخته و در یک قسمت دستگاه قرار داده و در طرف دیگر لوله آزمایش حاصل از هضم قرار داده شد پس از ۱۲ دقیقه محلول موجود در بشر با اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال تیتراژ شد، سپس میزان ازت هر نمونه از فرمول زیر تعیین شد.

(رابطه ۲)

$$(0.02) \text{ نرمالینه اسید} \times 6.25 \times 1.4007 \times \text{مصرفی اسید} = \text{میزان ازت}$$

مقدار نمونه

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگ‌گی به روش CTAB سقایی معروف و همکاران (۱۳) در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه گنبدکاووس صورت گرفت. مطالعات ژنوتیپی برای تعیین ژنوتیپ افراد به منظور تهیه نقشه پیوستگی جمعیت ۹۶ لاین حاصل از تلاقی ارقام اهلمی‌طارم و ندا به همراه والدین با استفاده از ۳۰ نشانگر SSR و ۱۵ نشانگر ISSR انجام شد. برای تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار Map Manager QTX (رفرنس) استفاده شد. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید واسرشته‌ساز شش درصد تفکیک شدند. نمایان‌سازی باندها با روش موسوم به روش سریع رنگ‌آمیزی نقره^۱ (۱۴)، انجام شد (شکل ۲). جهت تجزیه داده‌های فنوتیپی (تجزیه واریانس و مقایسه میانگین) از نرم‌افزار SAS-9 استفاده شد. تهیه نقشه با استفاده از توابع کوزامبی (۱۱) انجام شد. همچنین جهت تهیه نقشه پیوستگی از نرم‌افزار Map Manager QTX17 و نهایتاً برای انجام مکان‌یابی صفات مورد بررسی از نرم‌افزار QTL Cartographer 2.5 استفاده شد.

نشانگر SSR استفاده کردند و ۷ QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳ و ۸ برای صفات وزن خشک ساقه، وزن خشک گیاه، طول حداکثر ریشه، محتوای کلروفیل و ارتفاع بوته شناسایی کردند. آن‌ها اظهار داشتند که برای پی بردن به فرآیندهای فیزیولوژیکی کمبود نیتروژن به مطالعات بیشتری نیاز است. هان هو و همکاران (۵) با استفاده از ۲۴۷ لاین با قطعات کروموزومی جایگزین CSSL حاصل از تلاقی ارقام Lemont و Teqing مکان‌های ژنی مرتبط با اواخر مرحله رشدی برنج را تحت دو سطح مختلف نیتروژن (صفر و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) شناسایی کردند. این محققین توانستند در مجموع ۳۱ QTL برای صفات ارتفاع بوته، تعداد خوشه، وزن ساقه، محتوای کلروفیل و عملکرد دانه شناسایی کنند. یو و همکاران (۱۶) برای شناسایی مکان‌های ژنی صفات کمی برنج در پاسخ به کمبود نیتروژن و فسفر از ۱۲۵ لاین CSSL استفاده نمودند، و توانستند ۸ QTL برای تعداد خوشه و ۱۸ QTL برای عملکرد دانه در سه سطح کودی نرمال، نیتروژن کم و فسفر کم شناسایی کنند. در پژوهشی که فنگ و وو (۲) برای مطالعه اثر متقابل QTL×سطح نیتروژن کم برای صفت ارتفاع بوته برنج در دو شرایط مزرعه‌ای و کشت هیدروپونیک داشتند توانستند ۶ QTL در شرایط کشت هیدروپونیک و ۱۰ QTL در شرایط مزرعه‌ای برای ارتفاع بوته مکان‌یابی کنند. هدف از این مطالعه مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده مرتبط با شرایط کمبود نیتروژن در لاین‌های خالص نوترکیب برنج در مرحله گیاهچه‌ای بود.

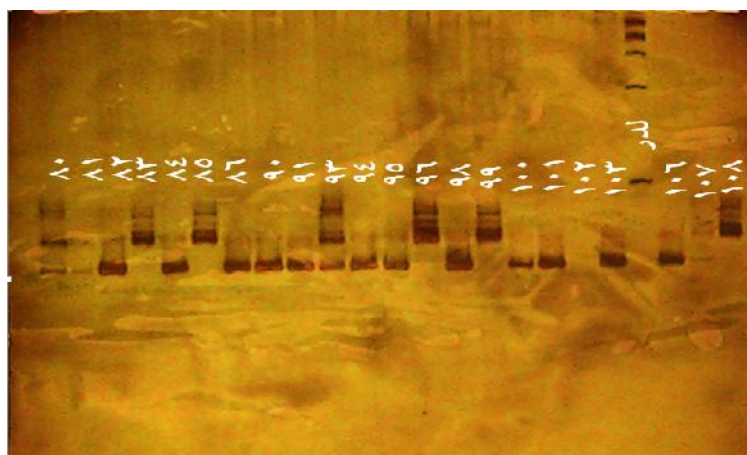
مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت کشت هیدروپونیک در سال ۱۳۹۳ در اتاقک کشت آزمایشگاه گیاه‌شناسی با دمای روز و شب ۲۹/۲۱ و رطوبت نسبی ۷۰ درصد و نور طبیعی (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) انجام شد. مواد گیاهی شامل ۹۶ لاین حاصل از تلاقی ارقام اهلمی‌طارم × ندا بود که به صورت آزمایش تجزیه مرکب در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. ابتدا بذور در پتری دیش جوانه‌دار شد سپس ۱۶ جوانه از هر لاین به صفحه‌های یونولیتی (در زیر صفحه‌های یونولیتی صفحه‌ای از جنس پلاستیک با سوراخ‌های ریز جهت عبور ریشه‌چه‌ها دوخته شده بود) منتقل شد. صفحه‌های یونولیتی در ظروف پلاستیکی با ابعاد ۱۹ در ۳۲ سانتی‌متر که ۸ لیتر محلول غذایی یوشیدا در آن بود قرار داده شدند. برای اعمال تنش کمبود عنصر نیتروژن از یک دهم (۱۰) غلظت نرمال محلول یوشیدا (۱۷) استفاده شد (شکل ۱). محلول غذایی هر هفته تعویض شد و pH محلول هفته‌ای سه بار کنترل شد و با محلول‌های هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید یک نرمال روی ۵/۵ به مدت یک ماه ثابت نگه داشته شد. در پایان این دوره ۶ گیاهچه از هر لاین برای هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و صفات آن‌ها ثبت شد. جهت اندازه‌گیری محتوای کلروفیل برگ پرچم با استفاده از دستگاه کلروفیل متر دستی مدل (SPDD 502 Minolta) برای هر برگ در سه نقطه پهنک برگ (نوک، وسط و قاعده) در یک سوی رگبرگ اصلی قرائت شد. تعداد ریشه نیز شمارش و ثبت



شکل ۱- الف- گیاهچه‌ها تحت شرایط نرمال و ب- گیاهچه‌ها تحت شرایط کمبود نیتروژن

Figure 1. A: Seedlings under normal conditions and B: Seedlings under nitrogen deficiency conditions



شکل ۲- الگوی نواربندی با استفاده از ژل پلی اکریلامید
Figure 2. Banding patterns using polyacrylamide gel

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در جدول ۱ ارائه شده است. بین لاین‌ها از نظر صفات تعداد ریشه، طول برگ، سطح ریشه، قطر ریشه، وزن تر ساقه، حجم ریشه و وزن خشک ساقه در سطح احتمال یک درصد و صفات محتوای کلروفیل، طول ساقه، چگالی سطح ریشه و وزن تر ریشه در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت که نشان‌دهنده وجود تنوع زیاد بین لاین‌های مورد بررسی برای صفات اندازه‌گیری شده بود. بنابراین با توجه به تفاوت‌های موجود، امکان‌پذیر است لاین‌های متحمل به کمبود نیتروژن وجود دارد که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد. به دلیل پاسخ متفاوت لاین‌ها به سطوح شرایط کمبود نیتروژن، اثر متقابل لاین \times شرایط کشت معنی‌دار شد. نظر به معنی‌دار شدن اثر متقابل لاین در شرایط کشت برای صفات مورد مطالعه، لاین‌ها به تفکیک در دو شرایط نرمال و تنش، مورد مقایسه قرار گرفتند. تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در شرایط تنش کمبود عنصر نیتروژن (جدول ۲) نشان داد که اختلاف بین لاین‌ها به جز

صفات چگالی سطح ریشه که در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود و وزن تر ریشه که معنی‌دار نبود؛ در سایر صفات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید. معنی‌دار شدن اختلاف بین لاین‌ها از نظر صفات مورد بررسی بیانگر وجود تنوع فنوتیپی گیاهچه‌های برنج مورد مطالعه در شرایط تنش کمبود عنصر نیتروژن بود. نقشه پیوستگی تهیه شده بر اساس ۳۰ نشانگر SSR و ۱۵ نشانگر ISSR (با ۶۰ آلل تکثیر شده چند شکل) روی ۹۶ فرد جمعیت F_8 نشانگرها را به ۱۲ گروه پیوستگی متعلق به ۱۲ کروموزوم برنج با طول نقشه برابر با ۱۴۱۱/۳ سانتی‌مورگان و فاصله در بین دو نشانگر مجاور برابر با ۱۵/۳۴ سانتی‌مورگان منتسب کرد (شکل ۳). در مجموع ۳۸ فاصله واجد QTL شناسایی شد که کنترل ۱۱ صفت را در بر داشتند. از این تعداد در شرایط نرمال دو QTL طول برگ، دو QTL وزن ساقه، یک QTL طول ریشه، ۱۴ QTL تعداد ریشه، دو QTL چگالی سطح ریشه و ۱۰ QTL وزن ریشه و در شرایط کمبود نیتروژن یک QTL محتوای کلروفیل، یک QTL عرض برگ، یک QTL وزن ساقه، دو QTL وزن خشک ساقه، یک QTL حجم ریشه و یک QTL میزان ازت

آن‌ها آلل‌های ندا باعث کاهش چگالی سطح ریشه شد. این QTL‌ها مجموعاً ۲۳/۱ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت مذکور را توجیه نمودند. ده QTL کنترل‌کننده وزن ریشه بر روی کروموزوم‌های ۲ (دو مورد)، ۵ (سه مورد)، ۶ (۲ مورد)، ۷ (دو مورد) و ۸ قرار داشتند. در همه این QTL‌ها آلل‌های اهلومی‌طارم باعث افزایش وزن ریشه شدند. QTL‌های qRW-5b و qRW-5c با تبیین ۲۹/۵ و ۲۶/۶ درصد از تنوع فنوتیپی بزرگ اثر برخوردار بودند. در مطالعه لیان و همکاران (۱۰) پنج QTL کنترل‌کننده وزن ریشه تحت شرایط نرمال روی کروموزوم‌های ۲، ۵، ۷، ۱۱ و ۱۲ قرار داشتند. در شرایط کمبود نیتروژن QTL ردیابی شده برای محتوای کلروفیل روی کروموزوم ۵ در حد فاصل نشانگرهای ISSR4-3-4-9 قرار داشت که حدود ۹/۷ درصد از کل تغییرات فنوتیپی این صفت را تبیین نمود. در مطالعه هان هو و همکاران (۵) QTL‌های شناسایی شده برای محتوای کلروفیل روی کروموزوم‌های ۲، ۳ و ۱۲ قرار داشتند. همچنین QTL شناسایی شده برای محتوای کلروفیل در مطالعه فنگ و همکاران (۳) روی کروموزوم ۳ قرار داشت. QTL‌های شناسایی شده در این مطالعات با QTL شناسایی شده در مطالعه حاضر مطابقت نداشت که این عدم تطابق می‌تواند به علت تفاوت در نوع و اندازه جمعیت مورد مطالعه، نوع نشانگرها، تراکم و توزیع آن‌ها در ژنوم، طول نقشه ژنتیکی، فاصله بین نشانگرها و QTL‌ها روی نقشه و غیره در پژوهش‌های مذکور باشد. برای عرض برگ یک QTL روی کروموزوم ۵ در جهت کاهش آن به اندازه ۰/۰۷ میلی‌متر ردیابی شد این QTL توانست ۹/۷ درصد از تغییرات عرض برگ را توجیه نماید. برای صفت وزن ساقه، مکان ژنی کنترل‌کننده روی کروموزوم ۷ شناسایی شد و اثر افزایشی آن ۰/۰۵ گرم بود. آلل‌های اهلومی‌طارم در این مکان باعث افزایش وزن ساقه شدند. QTL کنترل‌کننده میزان ازت روی کروموزوم ۲ در فاصله نشانگری ISSR5-1-RM301 و با LOD ۳/۰۶ توانست ۱۳/۷ درصد از واریانس فنوتیپی صفت مذکور را توجیه نماید.

را کنترل نمودند (جدول ۲). در شرایط نرمال برای طول برگ دو QTL بر روی کروموزوم‌های ۳ و ۵ شناسایی شد که در آن‌ها آلل‌های والد ندا باعث کاهش طول برگ شد. qLL-5 به عنوان یک QTL بزرگ اثر به تنهایی توانست ۱۸/۳ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مذکور را توجیه کند. دو QTL شناسایی شده برای وزن ساقه روی کروموزوم‌های ۱۱ و ۱۲ قرار داشتند. اثر افزایشی این QTL‌ها به ترتیب برابر ۰/۱۰- و ۰/۰۸ گرم بود. در مورد qSW-11 آلل‌های والد ندا باعث کاهش وزن ساقه شد، در حالی که در خصوص qSW-12 آلل‌های اهلومی‌طارم باعث افزایش وزن ساقه شد. در مطالعه لیان و همکاران (۱۰) برای وزن ساقه در شرایط نرمال ۶ QTL روی کروموزوم‌های ۱ (دو مورد)، ۵، ۶ (دو مورد) و ۱۱ شناسایی شد که QTL کروموزوم ۱۱ با QTL شناسایی شده در مطالعه حاضر نیز مطابقت داشت. برای صفت طول ریشه، یک QTL مکان‌یابی شد که بر روی کروموزوم ۳ در فاصله نشانگری RM504-ISSR4-4 قرار داشت. در این QTL آلل‌های والد اهلومی‌طارم باعث افزایش مقدار این صفت شد. این QTL تنها ۹ درصد از واریانس فنوتیپی صفت طول ریشه را توجیه نمود (جدول ۳). در مطالعه‌ای که فنگ و همکاران (۲) با استفاده از ۲۳۸ لاین خالص نوترکیب و ۱۹۸ نشانگر SSR برای شناسایی QTL‌های مرتبط با کمبود نیتروژن در مرحله گیاهچه‌ای داشتند توانستند یک QTL روی کروموزوم ۱ برای طول ریشه در فاصله نشانگری RM5385-RM7192 شناسایی کنند. برای تعداد ریشه ۱۵ QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ (سه مورد)، ۶ (دو مورد)، ۷ (چهار مورد) و ۸ شناسایی شد. QTL‌های qRN-1، qRN-3، qRN-5c و qRN-6b به ترتیب با ضریب تبیین برابر با ۱۸/۹، ۲۰، ۱۹/۱ و ۲۵ اثر نسبتاً بزرگی بر تعداد ریشه داشتند. به جز در QTL‌های qRN-3 و qRN-4 که آلل‌های اهلومی‌طارم باعث کاهش تعداد ریشه شدند در سایر QTL‌ها آلل‌های ندا باعث افزایش تعداد ریشه شدند. QTL‌های شناسایی شده برای چگالی سطح ریشه روی کروموزوم‌های ۳ و ۱۱ قرار داشتند که در

جدول ۱- تجزیه مرکب صفات مورد مطالعه در لاین‌های F₈ برنج تحت شرایط نرمال و تنش کمبود نیتروژنTable 1. The combined analysis of the traits in rice F₈ lines under normal and stress conditions of nitrogen deficiency

میانگین مربعات صفات مورد مطالعه

وزن خشک ریشه (gF)	وزن خشک ساقه (gF)	حجم ریشه (cm ³)	وزن تر ریشه (gF)	وزن تر ساقه (gF)	چگالی سطح ریشه	قطر ریشه (cm)	سطح ریشه	سطح برگ	عرض برگ (cm)	طول برگ (cm)	تعداد ریشه	طول ریشه (cm)	طول ساقه (cm)	محتوی کلروفیل	درجه آزادی	منابع تغییر
۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۵ ^{**}	۰/۰۱ ^{**}	۰/۰۰۳ [*]	۰/۰۰۲ ^{**}	۰/۶۰ [*]	۰/۰۰۰۵ ^{**}	۰/۲۵ ^{**}	۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۲ ^{ns}	۰/۲۷ ^{**}	۰/۰۳۵ ^{**}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۱۰۲ [*]	۰/۰۰۱ [*]	۲	تکرار
۰/۰۰۰۶ ^{**}	۰/۰۸ ^{**}	۰/۰۱ ^{**}	۰/۰۰۵ [*]	۴/۷۰ ^{**}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۱ ^{**}	۰/۱۴ ^{**}	۹۸۳/۰۳ ^{**}	۰/۸۴ ^{**}	۲۸/۲۱ ^{**}	۱۱/۵۱ ^{**}	۱/۴۳ ^{**}	۹۰/۴۶ ^{**}	۰/۵۱۰ ^{**}	۱	شرایط کشت
۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲	۰/۰۲	۰/۴۴	۰/۰۰۰۳	۰/۱۸	۱۱/۶۲	۰/۰۰۵	۰/۶۷	۰/۰۵	۰/۱۲	۰/۵۴	۰/۰۰۱	۲	خطای اول
۰/۰۰۰۱ ^{**}	۱/۰۰۰ ^{**}	۰/۰۰۱ ^{**}	۰/۰۰۲ ^{**}	۰/۰۲ ^{**}	۰/۳۰ ^{**}	۰/۰۰۰۱ ^{**}	۰/۱۶ ^{**}	۱۴/۷۹ ^{**}	۰/۰۲۱ ^{**}	۰/۷۶ ^{**}	۰/۱۲ ^{**}	۰/۲۸ ^{**}	۱/۴۸ ^{**}	۰/۰۰۷ ^{**}	۹۵	لاین
۰/۰۰۰۱ ^{**}	۰/۰۰۰۳ ^{**}	۰/۰۰۱ ^{**}	۰/۰۰۲ ^{**}	۰/۰۱ ^{**}	۰/۲۲ [*]	۰/۰۰۰۱ ^{**}	۰/۰۷ ^{**}	۵/۱۷ ^{**}	۰/۰۰۴ ^{**}	۰/۲۶ ^{**}	۰/۰۵ ^{**}	۰/۲۱ ^{**}	۰/۳۱ ^{**}	۰/۰۰۵ ^{**}	۹۵	لاین شرایط کشت
۰/۰۰۰۰۱	۰	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۱۴	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۸	۰/۴۹	۰/۰۰۰۲	۰/۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۰۲۶	۰/۰۰۰۴		خطای دوم
۲۴/۰۲	۲۶/۱۱	۱۵/۹۳	۵۶/۴۴	۶/۸۰	۵۲/۲۸	۱۵/۲۰	۱۱/۶۴	۱۵/۴۳	۵/۷۹	۱۲/۲۹	۷/۷۷	۱۱/۴۹	۸/۳۷	۳۵/۶۷		ضریب تغییرات

* و **: معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد. ns: نبودن اختلاف معنی‌دار

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در شرایط تنش کمبود نیتروژن

Table 2. Analysis of variance of traits under nitrogen deficit stress conditions

میانگین مربعات

وزن خشک ریشه (gF)	وزن خشک ساقه (gF)	حجم ریشه (cm ³)	وزن تر ریشه (gF)	وزن تر ساقه (gF)	چگالی سطح ریشه	قطر ریشه (cm)	سطح ریشه	سطح برگ	عرض برگ (cm)	طول برگ (cm)	تعداد ریشه	طول ریشه (cm)	طول ساقه (cm)	محتوی کلروفیل	درجه آزادی	منابع تغییر
۲/۵۹ ^{**}	۱۷/۲۳ ^{ns}	۱۷/۳۸ ^{**}	۰/۰۰۶ ^{ns}	۵۳۳۷/۱۲ ^{**}	۱/۰۳ [*]	۰/۰۸۹ ^{**}	۳۹/۳۰ ^{**}	۲۹۰ ^{**}	۰/۱۹ ^{**}	۶۵/۵۶ ^{**}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۴/۹۹ ^{**}	۴۰/۴۵ ^{**}	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۲	بلوک
۳/۸۹ ^{**}	۱۷۳/۳۸ ^{**}	۱/۹۰ ^{**}	۳۹۶۷/۷۴ ^{ns}	۳۱۶۶/۱۶ ^{**}	۰/۴۴ [*]	۰/۰۰۵۲ ^{**}	۱۳/۲۷ ^{**}	۵۸۰ ^{**}	۱/۰۴ ^{**}	۵۷/۶۹ ^{**}	۰/۰۶ ^{**}	۳۵/۲۸ ^{**}	۸۱/۴۵ ^{**}	۰/۰۰۲ ^{**}	۹۵	لاین
۰/۱۹	۹۱/۱۶	۰/۱۷	۲۴۲۱/۹۴	۱۰۹/۶۹	۰/۲۸	۰/۰۰۱۲	۱/۲۴	۱۳/۹۶	۰/۰۱	۴/۳۱	۰/۰۰۱	۰/۳۵	۲/۵۲	۰/۰۰۰۳	۱۹۰	خطا
۱۲/۲۳	۴۸/۱۸	۱۶/۶۶	۲۴/۹۱	۸/۸۴	۷۲/۴۶	۱۶/۰۶	۱۴/۵۶	۱۱/۴۳	۵	۱۷/۴۲	۸/۰۲	۹/۲۷	۱۰/۲۱	۶۷/۸۲		ضریب تغییرات

* و **: معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد. ns: نبودن اختلاف معنی‌دار

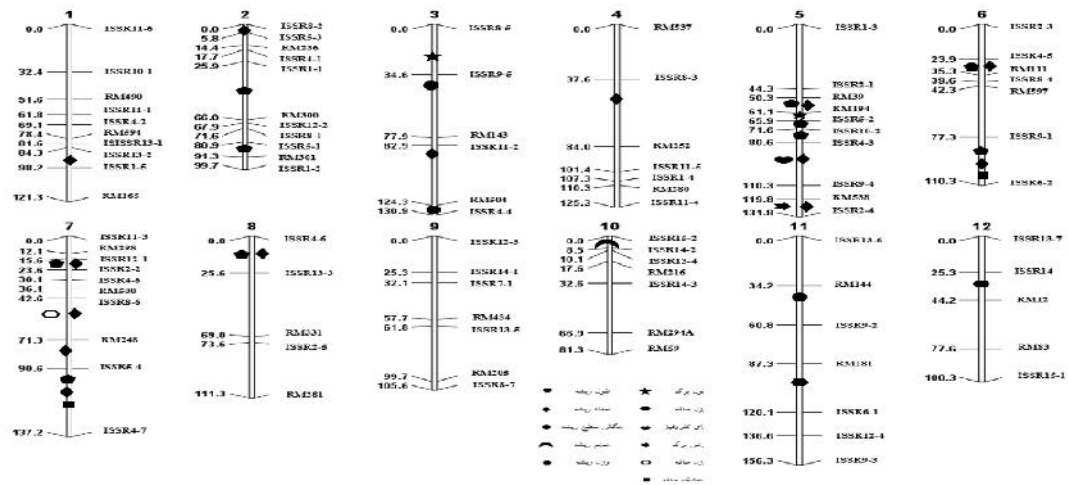
جدول ۳- QTL های کنترل کننده برای صفات گیاهچه ای در شرایط نرمال و کمبود نیتروژن در برنج
Table 3. QTL controlling for seedling characteristics in normal conditions and a lack of nitrogen in rice

صفت	QTL	نشانه های مجاور*	کروموزوم	LOD	موقعیت (سانتی مورگان)	اثر افزایشی	ضریب تبیین	جهت آلل
طول برگ	qLL-3	ISSR8-5- <u>ISSR9-5</u>	۳	۲/۹۱	۲۰	-۱/۳۱	۱/۱۳	ندا
	qLL-5	RM194- <u>ISSR5-2</u>	۵	۴/۲۱	۶۲	-۰/۸۷	۳/۱۸	ندا
وزن ساقه	qSW-11	RM181- <u>ISSR6-1</u>	۱۱	۲/۴۷	۹۸	-۰/۱۰	۲/۱۱	ندا
	qSW-12	ISSR14-4- RM12	۱۲	۲/۴۳	۳۸	-۰/۰۸	۱۱	اهلمی طارم
طول ریشه	qRL-3	RM504- <u>ISSR4-4</u>	۳	۲/۱۸	۱۳۰	۰/۲۱	۹	اهلمی طارم
	qRN-1	<u>ISSR13-2-ISSR1-5</u>	۱	۴/۳۶	۹۰	۰/۳۵	۱۸/۹	ندا
تعداد ریشه	qRN-2	<u>ISSR8-2-ISSR5-3</u>	۲	۲/۹۶	۲	۰/۳۲	۱۳	ندا
	qRN-3	<u>ISSR11-2-RM504</u>	۳	۴/۸۶	۸۴	-۰/۲۹	۲۰	اهلمی طارم
چگالی سطح ریشه	qRN-4	<u>ISSR8-3-RM252</u>	۴	۳	۵۰	-۰/۴۳	۱۳	اهلمی طارم
	qRN-5a	<u>RM39-RM194</u>	۵	۲/۱۰	۵۴	۰/۲۵	۹	ندا
وزن ریشه	qRN-5b	ISSR4-3- <u>ISSR9-4</u>	۵	۳/۸۶	۹۸	۰/۴۶	۱۶	ندا
	qRN-5c	RM538- <u>ISSR2-4</u>	۵	۴/۱۳	۱۳۰	۰/۴۰	۱۹/۱	ندا
محتوای کلروفیل	qRN-6a	ISSR4-5- <u>RM111</u>	۶	۳/۹۶	۲۸	۰/۳۶	۱۷	ندا
	qRN-6b	ISSR9-1- <u>ISSR6-2</u>	۶	۶/۰۲	۱۰۰	۱/۳۱	۲۵	ندا
عرض برگ	qRN-7a	ISSR12-1- <u>ISSR2-2</u>	۷	۳/۸۸	۲۰	۰/۶۱	۱۷	ندا
	qRN-7b	<u>ISSR8-6-RM248</u>	۷	۳/۵۷	۵۴	۰/۴۴	۱۵/۸	ندا
وزن خشک ساقه	qRN-7c	RM248- <u>ISSR5-4</u>	۷	۲/۷۳	۸۶	۰/۴۷	۱۲/۳	ندا
	qRN-7d	<u>ISSR5-4-ISSR4-7</u>	۷	۴/۰۲	۱۱۰	۰/۸۰	۱۷/۶	ندا
حجم ریشه	qRN-8	<u>ISSR4-6-ISSR13-3</u>	۸	۳/۱۱	۱۲	۰/۴۵	۱۳/۹	ندا
	qRSD-11	RM144- <u>ISSR9-2</u>	۱۱	۳/۰۹	۵۴	-۰/۰۷	۱۳/۸	ندا
میزان ازت	qRSD-3	ISSR9-5- <u>RM143</u>	۳	۲/۰۲	۳۶	-۰/۰۴	۹/۳	ندا
	qRW-2a	<u>ISSR1-1- RM300</u>	۲	۳/۸۹	۴۴	۰/۰۵	۱۷	اهلمی طارم
وزن خشک ساقه	qRW-2b	ISSR5-1- RM301	۲	۲/۳۹	۸۴	۰/۰۲	۱۰/۸	اهلمی طارم
	qRW-5a	RM39- <u>RM194</u>	۵	۳/۲۷	۵۶	۰/۰۳	۱۴/۵	اهلمی طارم
حجم ریشه	qRW-5b	<u>ISSR5-2- ISSR10-2</u>	۵	۷/۲۸	۶۸	۰/۰۴	۲۹/۵	اهلمی طارم
	qRW-5c	ISSR10-2- <u>ISSR4-3</u>	۵	۶/۴۳	۷۶	۰/۰۴	۲۶/۶	اهلمی طارم
وزن خشک ساقه	qRW-6a	RM111- <u>ISSR8-4</u>	۶	۳/۱۶	۳۸	۰/۰۲	۱۴/۱	اهلمی طارم
	qRW-6b	<u>ISSR9-1-ISSR6-2</u>	۶	۳/۶۴	۸۸	۰/۰۸	۱۶/۱	اهلمی طارم
میزان ازت	qRW-7a	<u>ISSR12-1-ISSR2-2</u>	۷	۳/۰۶	۱۸	۰/۰۵	۱۳/۷	اهلمی طارم
	qRW-7b	<u>ISSR5-4-ISSR4-7</u>	۷	۲/۰۷	۱۰۴	۰/۰۶	۹/۵	اهلمی طارم
میزان ازت	qRW-7b	ISSR5-4- <u>ISSR4-7</u>	۷	۲/۰۷	۱۰۴	۰/۰۶	۹/۵	اهلمی طارم
	qRW-8	ISSR4-6- <u>ISSR13-3</u>	۸	۴/۰۴	۱۴	۰/۰۵	۱۷/۶	اهلمی طارم
میزان ازت	qCHL-5	ISSR4-3- <u>ISSR9-4</u>	۵	۲/۱۲	۹۴	۰/۰۰۵	۷/۹	ندا
	qWL-5	RM538- <u>ISSR2-4</u>	۵	۲/۰۶	۱۲۰	-۰/۰۷	۴/۹	ندا
وزن خشک ساقه	qSW-7	RM248- <u>ISSR5-4</u>	۷	۲/۳۹	۷۴	۰/۰۵	۴/۱۰	اهلمی طارم
	qSDW-6	ISSR9-1- <u>ISSR6-2</u>	۶	۲/۰۳	۱۱۰	۰/۰۰۹	۳/۹	اهلمی طارم
وزن خشک ساقه	qSDW-7	ISSR5-4- <u>ISSR4-7</u>	۷	۲/۳۴	۱۱۲	۰/۰۱	۷/۱۰	اهلمی طارم
	qRV-10	ISSR15-2- <u>ISSR14-2</u>	۱۰	۲/۵۱	۸	-۰/۰۵	۱۱/۴	ندا
میزان ازت	qNH-2	<u>ISSR5-1-RM301</u>	۲	۳/۰۶	۸۶	-۰/۷۸	۱۳/۷	اهلمی طارم

*: نشانه هایی که زیرشان خط کشیده شده به QTL مربوطه نزدیکتر هستند.

وزن خشک ساقه را افزایش دادند. تنها یک QTL برای حجم ریشه روی کروموزوم ۱۰ در فاصله نشانه های ISSR15-2 و ISSR14-2 ردیابی شد که این QTL توانست ۱۱/۴ درصد از واریانس فنوتیپی را تبیین نماید

این مکان ژنی توانست ۱۰/۴ درصد از تغییرات فنوتیپی مربوط به وزن ساقه را توجیه کند. دو QTL کنترل کننده وزن خشک ساقه روی کروموزوم های ۶ و ۷ قرار داشتند. در هر دو مکان ژنی آلل های والد اهلمی طارم به طور متوسط ۱۰ گرم



شکل ۳- QTLهای کنترل کننده صفات مرتبط با کمبود نیتروژن در لاین‌های خالص نوترکیب حاصل از تلاقی ارقام اهلمی‌طارم و ندا در مرحله گیاهچه‌ای

Figure 3. QTLs controlling nitrogen deficiency traits in pure recombinant lines resulting from the crossing of AhlmieTarom and Neda cultivars in seedling stage

نشانگرهای پیوسته با این QTLها احتمالاً پس از تایید صلاحیت می‌توانند در برنامه‌های اصلاح به کمک نشانگر جهت‌گزنش لاین‌های برتر و انتقال آلل‌های مطلوب استفاده گردند.

در مجموع، ۳۷ QTL مرتبط با صفات ارزیابی شده شناسایی شد. برخی از QTLهای شناسایی شده از جمله qRW-5b، qRN-6b، qRN-5c، qRN-3، qRN-1 و qRW-5c با تبیین درصد بالاتری از تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه به‌عنوان QTL بزرگ‌اثر شناخته شدند که

منابع

1. Ahmadi Shad, M.A., A.A. Ebadi, M.M. Sohani, H. Samizadh Lahiji and M. Hosseini Chaleshtori. The Assessment of Genetic Variation of Rice (*Oryza Sativa* L.) Recombinant Lines Based On Some of Quantitative and Qualitative Traits. *Journal of Crop Breeding*, 10(26): 166-172.
2. Fang, P. and P. Wu. 2001. QTL \times N-level interaction for plant height in rice (*Oryza Sativa* L.). *Plant and Soil*, 236: 237-242.
3. Feng, Y., L.Y. Cao, W.M. Wu, X.H. Shen, X.D. Zhan, R.R. Zhai, R.C. Wang, D.B. Chen and S.H. Cheng. 2010. Mapping QTLs for nitrogen-deficiency tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding*, 129: 652-656.
4. Good, A.G., A.K. Shrawat and D.G. Muench. 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science*, 9, 597-605.
5. Han –Hua, T.H., M. Han-Wei, Y. Xin-Qiao, X. Xiao-Yan and L. Ming-Shou. 2006. Identification of Related QTLs at Late Developmental Stage in Rice (*Oryza sativa* L.) Under Two Nitrogen Levels. *Acta Genetica Sinica*, 33 (5), 458-467.
6. Hu, S., D.L. Zeng, W. Su, X.Y. Shi, W.J. Ye, G.J. Dong, L. Zhu, J. Hu, Q. Qian and L.B. Guo. 2012. QTL analysis of nitrogen content of plant shoot under two nitrogen conditions in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 6(12): 1737-1744.
7. Ihizuka, Y. and A. Tanaka. 1953. Studies on the developmental processes view point of plant growth stage and root age. *Bull. National Agricultural Science*, 16: 19-150.
8. Katouzi, M., S. Navabpour, A. Yamchi, S. Ramezanpour, and H. Sabouri. 2017. Identification of Genes Controlling Seedling Stage Traits in Iranian Rice Recombinant Lines under Drought Stress Conditions. *Journal of Crop Breeding*, 9(21): 1-9.
9. Li, Z.K. 2001. QTL mapping in rice: a few critical considerations. In Khush G.S., D.S. Brar, and B. Hardy (Eds.). *Genetics IV*. Science publisher Inc, 153-171.
10. Lian, X., Y. Xing, H. Yan, G. Xu, X. Li and Q. Zhang. 2005. QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 85-96.
11. Peng, M., C. Hannam, H. Gu, Y.M. Bi and S.J. Rothstein. 2007. A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of Arabidopsis to nitrogen limitation. *Plant Journal*, 50: 320-337.
12. Richard-Molard, C., A. Krapp, F. Brun, B. Ney, F. Daniel-Vedele, and S. Chaillou. 2008. Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two Arabidopsis genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 59: 79-91.
13. Saghi Maroof, M.A., R.M. Biyashev, G.P. Yang, Q. Zhang and R.W. Allard. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 5466-5570.
14. Tahmoorespoor, M. 2010. Assessment relationship between GH and STAT5A genes polymorphism and estimated breeding value (EBV) of growth traits in Baluchi sheep. Ferdowsi University of Mashhad, Iran, 54 pp.
15. Wei, D., K. Cui, G. Ye, J. Pan, J. Xiang, J. Huang and L. Nie. 2012. QTL mapping for nitrogen-use efficiency and nitrogen-deficiency tolerance traits in rice. *Plant Soil*, 359: 281-295.
16. Yu, W., S. Yong-Jian, C. Deng-Yin and Y. Si-Bin. 2009. Analysis of Quantitative Trait Loci in Response to Nitrogen and Phosphorus Deficiency in Rice Using Chromosomal Segment Substitution Lines. *Acta Agronomica Sinica*, 35(4): 580-587.
17. Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. IRRI, Los banos, philippines, 83 pp.
18. Manly, K.F. and J.M. Olson. 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QTL. *Mammalian Genom*, 10: 327-334.

Identification of QTLs Related to Root and Shoot Traits in Rice under Nitrogen Deficiency Conditions

Sharifeh Mohammadalegh¹, Hossein Sabouri², Ali Sattarian³, Abbas Biabani³ and Abdollatif Gholizadeh⁴

1- M.Sc. Student of Biotechnology of Agriculture Science and Natural Resource, Gonbad Kavous University

2- Associate Professor Department of Plant Production, College of Agriculture Science and Natural Resource, Gonbad Kavous University (Corresponding author: hos.sabouri@gmail.com)

3- Associate Professor Department of Biology, College of Agriculture Science and Natural Resource, Gonbad Kavous University

4- Assistant Professor Department of Plant Production, College of Agriculture Science and Natural Resource, Gonbad Kavous University

Received: July 30, 2015

Accepted: September 10, 2017

Abstract

In order to detect the QTL associated with nitrogen-deficiency tolerance at seedling stage, a population of 96 lines derived from Ahlami Tarom and Neda cross were studied at 2014. For genetic linkage map construction, 30 SSR and 15 ISSR makers were used. The resulted linkage map covered 1411.3 cM of rice genome with an average of 15.34 cM distance between two markers. A total of 37 QTLs were identified for the traits under study. qRV-10 under conditions of nitrogen deficiency explained 11.4% of the phenotypic variations of root volume. QTLs controlling root number (qRN-3 and qRN-6b) and root weight (qRW-5b and qRW-5c) under normal conditions were detected in the major stress that this is justified QTL accounted for over 20 percent of phenotypic changes. Markers linked to the QTL as markers linked to traits are likely to be used for marker-assisted selection in breeding programs.

Keywords: Nitrogen deficiency, Quantitative Traits Loci, Rice, Seedling stage