



تجزیه ساختار ژنتیکی تحمل به سرما در لاین‌های نوترکیب برنج ایرانی

مهناز کاتوزی^۱، سعید نواب‌پور^۲، احد یامچی^۳، سیده ساناز رمضانپور^۲ و حسین صبوری^۴

۱- ۳ و ۲- کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۴- گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، (نویسنده مسؤل: hos.sabouri@gmail.com)
تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۶

چکیده

برنج یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی ایران و جهان است. تنش‌های محیطی شامل شوری، خشکی و سرما تولید این محصول را محدود می‌نمایند. به منظور اشیاع نقشه پیوستگی جمعیت نوترکیب حاصل از تلاقی سپید رود و عنبربو آزمایشی با استفاده از ۹۶ لاین نوترکیب و ۳۵ نشانگر ISSR، در دانشگاه گنبد کاووس اجرا شد. جهت مکان‌یابی صفات مرتبط با تنش سرما در مرحله گیاهچه لاین‌های مذکور در شرایط هیدروپونیک تحت تنش فوق کشت داده شدند. صفات مورد بررسی شامل وزن ساقه، وزن ریشه، بیوماس، کد ژنتیکی، سطح برگ، طول ساقه، طول ریشه و ضخامت ریشه بودند. نقشه پیوستگی ۱۷۰۹/۳۹ سانتی مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد. در شرایط سرما شش QTL مکان‌یابی گردید. qCBM-4 برای زیست توده، qCLA-5 برای سطح برگ، qCRL-5 برای طول ساقه و qCRTH-11 برای ضخامت ریشه به ترتیب ۱۳/۴، ۱۴/۳، ۱۲/۶ و ۲ درصد از تغییرات مربوط به صفت را توجیه نمودند. با توجه به مثبت بودن اثرات افزایشی، از آن‌ها می‌توان پس از تعیین اعتبار در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر جهت بهبود تحمل گیاهچه‌های برنج به تنش سرما استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اشیاع نقشه ژنتیکی، برنج، تنش غیر زنده، نشانگر ISSR

مقدمه

برای محتوای کلروفیل و صدمات سرمایی به‌عنوان شاخصی برای مقاومت به سرما در مرحله‌ی جوانه‌زنی و تولید مثل ردیابی نمودند. لو و همکاران (۱۰) با استفاده از روش مکان‌یابی مرکب، اثر عمده‌ی QTL‌های با کمتر از ۴ LOD را روی کروموزوم ۱، ۲ و ۸ شناسایی کردند. کل سهم پنج QTL ۶۲/۲۸ درصد بود و QTL بزرگ اثر (LOD=۱۵/۰۹) RM341 و RM561 که توسط ۲ قرار داشت که توسط ۲۷/۴۲ درصد از کل تنوع فنوتیپی را توجیه کرد. جیانگ و همکاران (۷) مجموعه‌ای از لاین‌های خالص نوترکیب را که از تلاقی بین *Dasanbyeon* (ایندیکا) و *TR22183* (ژاپونیکا) به دست آمده بودند در مناطق *Yanji* (منطقه‌ای با ارتفاع زیاد)، *Kunming* (منطقه مرتفع)، *Chancheon* (آبیاری با آب سرد) و *Suwon* (شرایط نرمال) برای ارزیابی QTL‌های بزرگ اثر و QTL‌های ایپستاتیک با در نظر گرفتن اثر متقابل آنها با محیط برای صفات وابسته، کشت نمودند. شش QTL برای باروری سنبلچه در سه تیمار سرما شناسایی شد. در این میان چهار QTL روی کروموزوم‌های ۲، ۷، ۸ و ۱۰ توسط چندین لاین ایزوژن تحت تیمار سرمای *Chancheon* مکان‌یابی ظریف شدند. مجموعاً ۵۷ QTL و ۷۶ E-QTL برای صفات مرتبط با سرما شناسایی شدند که در تمامی ۱۲ کروموزوم توزیع شده بودند. نتایج ثابت کرد که اثرات ایپستاتیک و QELS مهم‌ترین ویژگی پارامترهای QTL برای تحمل به سرما در مرحله باروری هستند. برای توسعه واریته‌های متحمل به سرمای سازگار به طیف وسیعی از تنش‌های سرمایی، راهکار ساده‌تر انتخاب به کمک نشانگر (MAS) برای انباشتن QTL‌های شناسایی شده در محیط‌های متفاوت است. ژو و همکاران (۱۴) مجموعه‌ای از لاین‌های ایزوژن با تحمل به سرما را در مرحله زایشی کشت نمودند که از تلاقی واریته بسیار متحمل به سرمای ژاپونیکا (KMxBG) با واریته

تنش سرما یکی از معمول‌ترین و رایج‌ترین تنش محیطی دوران جوانه‌زنی گیاه محسوب می‌شود. در مناطق معتدله و در مورد گیاهانی که در فصل گرم کاشته می‌شوند این مساله یک امر اجتناب‌ناپذیر است، به خصوص در جایی که کشت زود هنگام از هر نظر دارای مزیت می‌باشد (۱۱). ژنگ و همکاران (۱۸) سه QTL بزرگ اثر روی کروموزوم ۱، ۳ و ۹ برای جوانه‌زنی بالا و چهار QTL روی کروموزوم ۵، ۹ و ۱۲ برای صدمات سرمایی جوانه‌ی برنج تحت دمای پایین مکان‌یابی نمودند. همچنین آنها جایگاه RM160 را روی کروموزوم ۹ یافتند که رشد جوانه، کلروز، پژمردگی و مرگ گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهند. آندایا و مکیل (۱) یک QTL بزرگ اثر را روی کروموزوم ۱۲ شناسایی کردند و آن را *qCTS12a* نامیدند که به طور معنی‌داری با مقاومت به سرما همبستگی داشت و حدود ۴۱ درصد تنوع فنوتیپی را شامل می‌شد. لی و همکاران (۹) در لاین خالص نوترکیب به وجود آمده از تلاقی بین *Oryza rufipogon* و *Hwayeongbyeon*، ۱۹ QTL وابسته به مقاومت به سرما را شناسایی کردند. آنها نتیجه گرفتند که *Oryza rufipogon* به‌عنوان منبعی از آلل‌های با ارزش، برای اصلاح برنج سودمند است. ژنگ و همکاران (۱۷) یک QTL در کروموزوم ۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸، ۹ و ۱۲، دو QTL در کروموزوم ۱۱ یافتند که جوانه‌زنی بالا در دمای پایین را کنترل می‌کنند. همچنین آنها پی بردند که هفت QTL در کروموزوم ۱، ۲، ۵، ۶ و ۸ قرار دارند که صدمات کلروزی را کنترل می‌کنند. آندایا و مکیل (۱) مقاومت به سرما را با استفاده از درصد عقیمی سنبلچه گیاهان تحت تیمار سرما اندازه‌گیری کردند و QTL‌های روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۷، ۹ و ۱۲ را ردیابی کردند که مقاومت به سرما را در مرحله‌ی آبستنی کنترل می‌کردند. ژن و همکاران (۱۶) ۱۱ QTL روی کروموزوم‌های ۳، ۴، ۷، ۸ و ۱۱

شکل بودند. تجزیه تک نشانگری نشان داد که نشانگرهای روی کروموزوم ۷ با تحمل به سرما همبستگی دارند. با مکان‌یابی فاصله‌ای بر روی جمعیت F_2 حاصل از تلاقی لاین ایزوژن و رقم حساس به سرمای توووادا، یک QTL برای تحمل به سرما بر روی بازوی بلند کروموزوم ۷ مکان‌یابی شد. این QTL ۹ تا ۲۱ درصد از واریانس فنوتیپی را به ترتیب در نسل‌های F_2 و F_3 توجیه کرد. گیاهان نوترکیب به وسیله دو نشانگر RM182 و RM1132 در جمعیت F_2 با تعداد ۲۸۱۰ گیاه غربال شدند. مکان‌یابی چندگانه انجام شد و این QTL در فاصله ۹۲ کیلوباز بین نشانگرهای RI02905 و RM21862 قرار داشت. آندایا و تای (۲) مطالعه‌ای روی لاین‌های خالص نوترکیب حاصل از تلاقی M202 و IR50 (یک رقم ایندیکا که بسیار حساس به سرماست) انجام دادند که موجب شناسایی تعدادی از QTL‌های مرتبط با مقاومت به سرما گردید. این مکان‌ها از طریق کاهش پُرمردگی و نکروز عمل می‌کردند. QTL بزرگ اثر qCTS12 که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۲ قرار داشت ۴۰ درصد واریانس فنوتیپی را توجیه نمود. به‌منظور شناسایی ژن‌هایی که در همین ناحیه (qCTS12) قرار داشتند، نقشه‌یابی دقیق انجام شد. اشباع بازوی کوچک کروموزوم ۱۲ به وسیله نشانگرهای ریزماهوره نشان داد که RM2007 نزدیک‌ترین نشانگر به qCTS12 است.

با توجه به اهمیت تنش‌های غیر زیستی در ایران و نظر به اینکه در مورد تحمل به تنش سرما روی ارقام و لاین‌های برنج ایرانی تحقیقی انجام نشده است، این بررسی به‌منظور مکان‌یابی صفات کمی مرتبط با تحمل به سرما پایه ریزی شد.

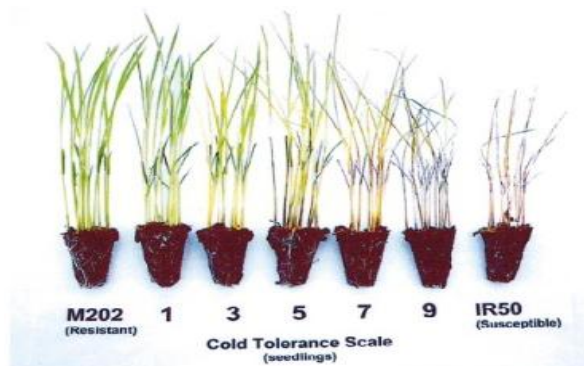
مواد و روش‌ها

آزمایش مربوط به مطالعات فنوتیپی در آزمایشگاه گیاه‌شناسی واقع در دانشگاه گنبد کاووس از تاریخ اردیبهشت سال ۱۳۹۲ تا دی‌ماه همان سال به روش گره‌گوریو و همکاران (۳) در شرایط کنترل‌شده اجرا شد. در این بخش از تحقیق ۹۶ لاین تصادفی حاصل از تلاقی عنبربو به‌عنوان والد متحمل و سپیدرود به‌عنوان والد حساس به سرما مورد ارزیابی قرار گرفتند و آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در ۴ تکرار پیاده شد. لاین‌های مذکور برای تنش سرما تحت تنش دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. همچنین تمامی لاین‌ها در شرایط بدون تنش (نرمال) نیز به‌عنوان تیمار شاهد کشت گردیدند. لاین‌های F_8 مذکور در محلول غذایی بوشیدا و همکاران (۱۵) کشت داده شدند. برای کشت از صفحه‌های یونولیت با ابعاد $۱۵ \times ۲۲ \times ۳۳$ سانتی‌متر استفاده گردید. جهت این عمل ۱۱ مربع ۲×۲ سانتی‌متر در هر ردیف و ۱۰ مربع در هر ستون و در دو طرف صفحه نیز فضایی جهت قرار دادن دسته ۳ سانتی‌متری قرار داده شد. سپس توسط انتهای لوله‌ی آزمایش به ابعاد ۱×۱ سوراخ‌هایی در مربع‌های مذکور ایجاد شد، بعد از آن شبکه نایلونی (Styrofoam) صفحه‌ای از جنس پلاستیک با سوراخ‌های ریز که ریشه‌چه‌ها از آن عبور داده شوند) نیز به ابعاد یونولیت‌های مورد نظر برش داده شدند و به کمک نخ و سوزن زیر این صفحات یونولیت، شبکه

ژاپونیکای حساس (Towada) به‌عنوان والد گیرنده به دست آمده بودند. لاین‌های BC5F3 توسعه داده شدند. تحمل به سرما در مرحله زایشی بر اساس باروری سنبل‌چه‌ی خوشه اصلی در دو سال و دو مکان مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از آستانه معنی‌دار $LOD=3$ و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب هشت QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۴، ۵، ۱۰ و ۱۱ شناسایی شدند. تمامی آلل‌های تحمل به سرما از والد KMXBG بودند و فاصله نشانگری بین آنها $۵/۶-۰/۶$ سانتی‌مورگان بود. چهار QTL، qCTB-1-1، qCTB-4-1، qCTB-5-2 و qCTB-10-1 در کروموزوم ۱ و ۴ شناسایی شدند. جیانگ و همکاران (۵) از ۷۱ لاین خالص نوترکیب که به‌منظور شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی (QTLs) موثر در تحمل به سرما در گیاهچه از تلاقی بین Asominori (ژاپونیکا) و IR24 (ایندیکا) ایجاد شده بودند، استفاده نمودند. میانگین مرگ گیاهچه‌ای به‌عنوان شاخص تحمل به سرما در مرحله ۳ برگی، پس از تیمار سرما در ۶ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز، در نظر گرفته شد. سه QTL موثر در تحمل به سرما در مرحله گیاهچه روی کروموزوم‌های ۱، ۵ و ۶ با LOD از $۱/۴$ تا $۲/۲$ در مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب ردیابی شدند. در این میان qSCT-1 که در ناحیه XNpb87-2-c955 بر روی کروموزوم یک قرار داشت، QTL بزرگ اثری بود که $۲۴/۵۱$ درصد از کل تغییرات فنوتیپی را توجیه کرد و این آلل مطلوب از والد ژاپونیکا بود. به علاوه آلل‌های IR24 در سایر مکان‌ها (qSCT-6 و qSCT) تحمل به سرما را افزایش دادند و این سه QTL در چهار لاین از قطعات کروموزومی جا به جاشونده IR24 تثبیت شدند. جابه‌جا شدن آلل‌ها از وارسته ژاپونیکا به پس‌زمینه‌های ایندیکا راه موثری برای بهبود تحمل به سرما در برنج است. جینگ و همکاران (۶) بر روی تحمل به سرما در مرحله گلدهی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد روی ۹۵ لاین جایگزین شده برنج تحقیق نمودند. نتایج نشان داد که شش لاین جایگزین شده دارای اثرات تحمل به سرمای بالاتری نسبت به ۹۳۱۱ بودند. مجموع چهار QTL برای گلدهی به وسیله نقشه‌یابی فاصله‌ای روی کروموزوم‌های ۵ و ۷ شناسایی شدند. qCTB-5-1، qCTB-5-2 و qCTB-5-3 با ترتیب یا فاصله ژنتیکی $۱۲/۷$ ، $۲۱/۳$ و $۲۷/۴$ سانتی‌مورگان از RM267-RM1237، RM2422-RM6054 و RM3321-RM1054 بر روی کروموزوم ۵ مکان‌یابی یابی شدند. qCTB-7 با فاصله $۶/۸$ سانتی‌مورگان از RM11-RM2752 روی کروموزوم ۷ ردیابی شد. ژو و همکاران (۱۹) بیان داشتند که دمای پایین در مرحله آبستنی تنشی جدی برای گیاه برنج به شمار می‌رود و تحمل به سرما صفت پیچیده ایست که توسط چندین مکان ژنی کنترل‌کننده صفات کمی (QTL) کنترل می‌گردد. آنها QTL‌ی برای تحمل به سرما در مرحله آبستنی در لاین تقریباً ایزوژن ZL1929-4 را مورد مطالعه قرار دادند. ۶۴۷ نشانگر SSR بر روی ۱۲ کروموزوم برنج برای دستیابی به نشانگرهای چند شکل روی لاین تقریباً ایزوژن ZL1929-4 و یک رقم ژاپونیکای حساس به سرمای (Towada) غربال گردیدند که ۹ نشانگر چند

هفت روز تعویض می‌شد. pH محلول نیز به وسیله اضافه نمودن HCl و NaOH در ۵/۵ ثابت نگه داشته شد و هفته‌ای سه بار کنترل گردید. برای اعمال سرما ۱۴ روز پس از رشد نرمال، گیاهچه‌ها در معرض دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته قرار گرفتند. برای تحمل به سرما بر اساس روش موسسه بین‌المللی برنج (۴) مطابق شکل (۱) برای هر لاین تعیین شد. جهت نمره‌دهی ژنوتیپ‌ها در تنش سرما، نمره ۱ به ژنوتیپ متحمل (همه برگ‌ها نرمال و هیچ‌گونه صدمه‌ای ندیده باشد) و نمره ۹ به ژنوتیپ حساس (همه برگ‌ها پژمرده و مرده باشد) براساس سیستم نمره‌دهی موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (شکل ۱) انجام شد (۴). صفات وزن ریشه، وزن ساقه، بیوماس، کد ژنتیکی، سطح برگ، طول ساقه، طول ریشه و ضخامت ریشه اندازه‌گیری شد.

نایلونی دوخته شد و دسته‌های مربوطه نیز جهت بلند کردن صفحه‌ها دوخته شدند و از سینی‌هایی به حجم ۱۰ لیتر و به ابعاد ۸/۵×۵۳/۵×۲۷ سانتی‌متر که ضد عفونی شده بود استفاده گردید و هر سینی تا شبکه نایلونی با آب مقطر پر گردید سپس صفحه‌های یونولیت روی سینی‌ها قرار داده شد، در هر سوراخ روی یونولیت سه بذر جوانه‌زده بوسیله پنس ضد عفونی شده انتقال داده شده و از طرف ریشه‌چه داخل آب قرار گرفتند. بعد از انتقال بذور به سیستم کشت، سینی‌های مربوطه در داخل اتاقک رشد در شرایط (۲۹ درجه سانتی‌گراد روز، ۲۱ درجه سانتی‌گراد شب، رطوبت ۷۰ درصد و شرایط نور طبیعی) قرار داده شدند. محلول غذایی یوشیدا در pH برابر ۵/۵ به سینی‌ها انتقال داده شد و گیاهچه‌های برنج تا دو هفته در محلول غذایی بدون تنش قرار داده شدند، محلول غذایی هر



شکل ۱- ارزیابی لاین‌ها در تنش سرما
Figure 1. Evaluation of lines under cold stress

کشیدگی نشان‌دهنده‌ی کیفیت خیلی خوب DNA ژنومی استخراج شده است. در این پژوهش نقشه حاصل از نشانگرهای SSR و AFLP به وسیله نشانگرهای ISSR اشباع شد. به منظور تشخیص نشانگرهای چندشکل، ابتدا واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تنها برای DNA والدینی (عنبرو و سپیدرود) برای ۴۰ آغازگر ISSR انجام شد. از این تعداد ۳۵ آغازگر، چندشکل مناسبی نشان دادند. در مرحله بعد نمونه‌های DNA لاین‌های نوترکیب با استفاده از ۳۵ آغازگر چندشکل که نواریندی واضح‌تری داشتند، تکثیر شدند و فرآورده‌های حاصل به منظور تعیین ژنوتیپ افراد الکتروفورز شدند.

مطالعات ژنوتیپی

در بهار سال ۱۳۹۲ اشباع نقشه ژنتیکی تهیه شده توسط صبوری و همکاران (۱۲) با استفاده از ۴۰ نشانگر ISSR بر روی ۹۶ تک‌بوته F_۸ انجام شد. مراحل استخراج DNA توسط روش سقای معروف و همکاران (۱۳) انجام پذیرفت. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز افقی استفاده شد و از طریق شدت باندهای تشکیل شده توسط هر نمونه در جریان الکتروفورز کیفیت نمونه‌ها تعیین شد. به این ترتیب که مشاهده یک باند ممتد کشیده و سرتاسری در کل مسیر حرکت DNA در روی ژل، حاکی از شکسته شدن و کیفیت نامطلوب DNA ژنومی استخراج شده است و مشاهده یک باند اضافی در پایین ژل افقی نشان‌دهنده‌ی وجود RNA در نمونه‌ها می‌باشد. مشاهده‌ی باندهای کاملاً واضح و بدون

جدول ۱- لیست آغازگرهای ISSR

Table 1. ISSR primers list

| شماره | توالی | شماره | توالی | شماره | توالی |
|-------|-------------------|-------|-------|---------------------------|-------|
| 59 | AGAGAGAGAGAGAGAGC | ۲۱ | 54 | CAGCAGCAGCAGCAG | ۱ |
| 59 | GAGGAGAGAGAGAGAGG | ۲۲ | 45 | CTCTCTCTCTCTCTT | ۲ |
| 53 | GAGAGAGAGAGAGAGAT | ۲۳ | 47 | CCACCACCACCACCA | ۳ |
| 53 | GAGAGAGAGAGAGAGAA | ۲۴ | 42 | ATGATGATGATGATG | ۴ |
| 53 | CTCTCTCTCTCTCTT | ۲۵ | 47 | CAACAACAACAACAA | ۵ |
| 48 | CTCTCTCTCTCTCTG | ۲۶ | 46 | ACTGACTGACTGACTG | ۶ |
| 54 | CACACACACACACAT | ۲۷ | 42 | GTGTGTGTGTGTCC | ۷ |
| 54 | CACACACACACACAA | ۲۸ | 43 | AAACAACAACAACAACG | ۸ |
| 54 | CACACACACACACAG | ۳۰ | 50 | ACACACACACACACACTA | ۹ |
| 59 | GTGTGTGTGTGTGTGTC | ۳۱ | 52 | ACACACACACACACACACG | ۱۰ |
| 59 | GTGTGTGTGTGTGTGTT | ۳۲ | 50 | ACAG ACAG ACAG ACAG ACAGC | ۱۱ |
| 54 | TCTCTCTCTCTCTCA | ۳۳ | 52 | CAGCAGCAGCAGCAGAGA | ۱۲ |
| 54 | TCTCTCTCTCTCTCC | ۳۴ | 55 | CTCTCTCTCTCTCTCG | ۱۳ |
| 54 | TCTCTCTCTCTCTCG | ۳۵ | 52 | CTGTCTGTCTGTCTGTGTG | ۱۴ |
| 54 | ACACACACACACACT | ۳۶ | 52 | GGAAGGAAGGAAGGAAGGAAT | ۱۵ |
| 62 | ACACACACACACACC | ۳۷ | 40 | GTAGTAGTAGTAGTAGTAC | ۱۶ |
| 54 | TGTGTGTGTGTGTGTG | ۳۸ | 50 | GTCGTCGTCGTCGTCGCA | ۱۷ |
| 52 | GAATGAATGAATGAAT | ۳۹ | 42 | GTTGTTGTTGTTGTTGTTA | ۱۸ |
| 52 | CCTACCTACCTACCTA | ۴۰ | 42 | TCTCTCTCTCTCTCTG | ۱۹ |
| | | | 40 | TGATGATGATGATGATGAA | ۲۰ |

استفاده شد. تهیه نقشه با استفاده از توابع کوزامبی (۸) انجام شد. همچنین جهت تهیه نقشه پیوستگی از نرم افزار Map Manager QTX17 و نهایتاً برای انجام مکان‌یابی صفات مورد بررسی از نرم افزار QTL Cartographer 2.5 استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس مرکب لاین‌ها

نتایج تجزیه واریانس مرکب نشان داد که در شرایط سرما و نرمال تفاوت معنی‌داری بین لاین‌ها از لحاظ صفات مختلف وجود داشت (جدول ۲). این تفاوت ناشی از تنوع موجود بین لاین‌ها بود. همچنین با توجه به اینکه اثر متقابل لاین‌ها × شرایط محیطی معنی‌دار شد، مقایسه میانگین‌ها به تفکیک شرایط مورد بررسی قرار گرفت.

برای الکتروفورز محصول PCR و آشکارساز DNA هدف از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد و سپس به نسبت هشت میکرولیتر محصول PCR و دو میکرولیتر محلول رنگی بارگذاری بر روی چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۷۵ وات به مدت ۶۵ دقیقه انجام شد. برای عکس‌برداری باندها، دستگاه ژل داگ استفاده شد و همچنین از ژل پلی‌اکریل‌آمید شش درصد برای جداسازی محصولات PCR استفاده شد. در چاهک ابتدای ژل سه میکرولیتر از مخلوط DNA ladder (1Kb) + آب دوبار تقطیر + بافر بارگذاری) به‌منظور تعیین اندازه قطعات، ریخته شد.

تجزیه داده‌ها

در این بررسی هر کدام از دو شرایط تنش و نرمال به صورت محیط در نظر گرفته شدند و آزمایش به صورت تجزیه مرکب اجرا شد. جهت تجزیه داده‌های فنوتیپی (تجزیه واریانس و مقایسه میانگین) از نرم افزار SAS-9

جدول ۲- تجزیه واریانس مرکب لاین‌ها

Table 2. Combined ANOVA of lines

| درجه آزادی | وزن ریشه | وزن ساقه | بیوماس | کد ژنتیکی | سطح برگ | طول ساقه | طول ریشه | ضخامت ریشه |
|--------------|-----------|----------|-----------|------------|-------------|--------------|------------|------------|
| ۱ | ۳۸۴/۲۲۳** | ۵۸/۱۸۷** | ۷۴۱/۴۵۷** | ۶۷۵۶/۸۸۰** | ۹۸۷۱۶/۰۴۲** | ۱۶۴۶۷۴/۶۸۰** | ۲۵۹۳/۳۲۹** | ۹۲/۴۰۹** |
| ۶ | ۰/۰۱۴ | ۰/۰۱۴ | ۰/۰۵۲ | ۰/۵۷۴ | ۵/۷۸۲ | ۷۳/۶۸۶ | ۱/۵۱۶ | ۰/۰۱۱ |
| ۹۵ | ۰/۶۸۳** | ۰/۱۲۶** | ۰/۹۹۴** | ۳/۵۰۱** | ۱۰۳/۳۴۹** | ۳۲/۵۶۸** | ۱۴/۶۹۵** | ۰/۱۳۸** |
| ۹۵ | ۰/۶۶۴** | ۰/۲۰۶** | ۱/۰۳۱** | ۳/۵۰۱** | ۱۰۹/۶۶۵** | ۵۶۷/۲۰۴** | ۱۳/۸۲۲** | ۰/۱۱۳** |
| ۵۷۰ | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۲۵ | ۰/۵۵۷ | ۵/۱۰۸ | ۱۳/۹۸۸ | ۲/۹۲۳ | ۰/۰۰۹ |
| ضریب تغییرات | ۱۷/۶۷۹ | ۱۴/۶۷۸ | ۱۴/۰۵۰ | ۱۸/۸۱۹ | ۱۶/۸۹۷ | ۱۰/۸۶۷ | ۱۷/۸۹۵ | ۲۳/۸۲۱ |

ns, ** و * به ترتیب نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ است.

تجزیه واریانس ساده در شرایط نرمال و سرما

تجزیه واریانس در شرایط نرمال و تنش سرما نشان داد که اختلاف بین لاین‌ها برای کلیه صفات از جمله وزن ریشه، وزن ساقه، بیوماس، کد ژنتیکی (در شرایط تنش)، طول ساقه، طول ریشه و ضخامت ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود که نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بین لاین‌ها از نظر صفات مورد بررسی در شرایط نرمال و تنش سرما بود (جدول ۳ و ۴).

تجزیه واریانس در شرایط نرمال و تنش سرما نشان داد که اختلاف بین لاین‌ها برای کلیه صفات از جمله وزن ریشه، وزن ساقه، بیوماس، کد ژنتیکی (در شرایط تنش)، طول ساقه،

جدول ۳- تجزیه واریانس ساده در شرایط نرمال

Table 3. Simlpe ANOVA under normal condition

| درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | | | ضخامت ریشه |
|------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| | وزن ریشه | وزن ساقه | بیوماس | سطح برگ | طول ساقه | طول ریشه | |
| ۳ | ۰/۰۰۳ ^{ns} | ۰/۰۰۷ ^{ns} | ۰/۰۰۳ ^{ns} | ۲/۷۰۰ ^{ns} | ۱۴۵/۱۳۵ ^{ns} | ۲/۱۲۸ ^{ns} | ۰/۰۴۳ ^{ns} |
| ۹۵ | ۰/۰۱۱ ^{ns} | ۰/۰۴۱ ^{ns} | ۰/۰۷۳۹ ^{ns} | ۲۰/۱۴۲ ^{ns} | ۵۵۲/۶۲۵ ^{ns} | ۱۷/۰۰۱۱ ^{ns} | ۰/۱۹۳ ^{ns} |
| ۲۸۵ | ۰/۰۰۲۳ | ۰/۰۰۷۹ | ۰/۰۱۳ | ۲/۶۶۱ | ۹۸/۲۶۵ | ۴/۰۵۲ | ۰/۰۳۶ |
| ۴/۳۲۱ | ۹/۷۴ | ۱۲/۰۲۶ | ۸/۸۸۵ | ۳۱/۷۵۴ | ۲۶/۵۲۱ | ۱۶/۴۴۲ | ضریب تغییرات |

ns, ** و * به ترتیب نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ است.

جدول ۴- تجزیه واریانس ساده در شرایط سرما

Table 4. Simlpe ANOVA under cold condition

| درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | | | ضخامت ریشه |
|------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| | وزن ریشه | وزن ساقه | بیوماس | کد ژنتیکی | سطح برگ | طول ساقه | |
| ۳ | ۰/۰۰۰۵ ^{ns} | ۰/۰۰۵ ^{ns} | ۰/۰۰۹ ^{ns} | ۱/۱۴۹ ^{ns} | ۱/۱۵۸ ^{ns} | ۱۴۷/۳۱۸ | ۲/۹۹۸ ^{ns} |
| ۹۵ | ۰/۰۰۰۳ ^{ns} | ۰/۰۰۳۱ ^{ns} | ۰/۰۰۴۸ ^{ns} | ۷/۰۰۲ ^{ns} | ۷/۱۸۲ ^{ns} | ۱۸۹/۶۹۵ ^{ns} | ۱۵/۹۴۶ ^{ns} |
| ۲۸۵ | ۰/۰۰۰۶ | ۰/۰۰۰۴ | ۰/۰۰۰۶ | ۱/۱۱۴ | ۱/۰۷۱ | ۲۷/۸۹۹ | ۵/۸۰۹ |
| ۴۹/۹۸۷ | ۷۱/۸۸۵ | ۵۷/۱۶۶ | ۱۵/۲۲۶ | ۵۰/۷۷۱ | ۲۶/۷۱۱ | ۳۱/۲۳۳ | ۱۰۹/۸۹۳ |

ns, ** و * به ترتیب نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ است.

مقایسه میانگین لاین‌ها در شرایط نرمال و تنش سرما

مقایسه میانگین لاین‌ها در شرایط نرمال نشان داد که برای صفات وزن ریشه، وزن ساقه، بیوماس و سطح برگ لاین شماره ۹ بالاترین میزان را دارا بود. برای صفات سطح برگ، طول ساقه و طول ریشه لاین‌های ۲۰ و ۱۷ به ترتیب دارای کمترین مقدار بودند. همچنین لاین ۱۷ بیوماس، وزن ساقه و ریشه پایینی نیز داشت. لاین‌های ۵ و ۶۵ به ترتیب دارا بیشترین و کمترین میزان ضخامت ریشه بودند. با توجه به اینکه شرایط نرمال بود و هیچگونه تنش در این حالت اعمال نگردید، صفت کد ژنتیکی برای لاین‌ها ثبت نشد. مقایسه میانگین لاین‌ها نشان داد که لاین ۵ در شرایط سرما بالاترین مقدار وزن ریشه، ساقه، بیوماس، سطح برگ و طول ساقه را دارا بود (جدول ارائه شده است). با نظر به اینکه این لاین کمترین مقدار کد ژنتیکی را پس از لاین ۳ کسب نمود، احتمالاً تحمل حاصله را از طریق بالا بودن صفات فوق به دست آورد. بیشترین و کمترین میزان ضخامت ریشه به ترتیب مربوط به لاین‌های ۱۷ و ۷۹ بود.

مکان‌یابی صفات کمی تهیه نقشه ژنتیکی

در پژوهش حاضر نقشه پیوستگی حاصل از ۲۶۱ نوار چندشکل AFLP و ۱۲۳ نشانگر SSR (۱۲) با استفاده از ۳۵ نشانگر ISSR و ۳۱۱ آلل چند شکل بین والدین و ۹۶ فرد جمعیت F₈ اشباع شد. از ۴۰ نشانگر مورد استفاده ۳۵ نشانگر ISSR قابل امتیاز دهی بودند. این نشانگرها به ۱۲ گروه پیوستگی معادل با ۱۲ کروموزوم برنج منتسب شدند که ۱۷۰۹/۲۹ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش دادند و به طور متوسط فاصله‌ی بین دو نشانگر ۵/۲۰ سانتی‌مورگان بود.

مکان‌یابی صفات کمی در شرایط نرمال

اختلاف دو رقم عنبربو و سپیدرود برای صفات وزن ریشه، وزن ساقه، زیست توده، سطح برگ، طول ساقه، طول ریشه و ضخامت در شرایط نرمال معنی‌دار بود (جدول ۵). عنبربو در تمامی صفات مقدار بالاتری داشت.

جدول ۵- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی بین والدین در شرایط نرمال

Table 5. Compare means of traits for parents under normal condition

| ت | سپیدرود | عنبربو | صفت |
|------------------------|---------|--------|-----------------------|
| ۱۲/۹۳ ^{ns} | ۰/۲۵۰ | ۲/۷۹۹ | وزن ریشه (گرم) |
| ۲/۷۴۶ ^{ns} | ۰/۳۰ | ۰/۲۸ | وزن ساقه (گرم) |
| ۱۰۷۳/۶۴۳ ^{ns} | ۰/۳۲۶ | ۳/۳۳۳ | زیست توده (گرم) |
| ۱۱۳/۷۱۴ ^{ns} | ۰/۶۱ | ۱/۴۴ | سطح برگ (سانتی‌متر) |
| ۴/۹۳۹ ^{ns} | ۱۳/۰ | ۱۹/۵ | طول ساقه (سانتی‌متر) |
| ۴۷/۶۶۷ ^{ns} | ۸/۸ | ۱۱/۷ | طول ریشه (سانتی‌متر) |
| ۹۴۸/۰۹۴ ^{ns} | ۰/۴۶۴ | ۱/۵۸۸ | ضخامت ریشه (میلی‌متر) |

ns, ** و * به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ است.

سایر QTL‌های یافت شده برای این صفت می‌باشد ولی به دلیل کم بودن مقدار آن می‌توان آن را جزء QTL‌های کوچک اثر دانست. همچنین qNRW-9b با فاصله نشانگری ۱۵۰-۱۰-E070-M150-7 با اثر افزایشی ۰/۳۵۶- باعث کاهش میزان صفت مذکور در افراد گردید (جدول ۶). برای وزن ساقه سه QTL مکان‌یابی شد (کروموزوم‌های ۱، ۲ و ۴)

برای صفت وزن ریشه در شرایط نرمال چهار QTL مکان‌یابی شد که یک QTL بر روی هر یک از کروموزوم‌های ۲، ۷ و دو QTL بر روی کروموزوم ۹ قرار داشتند. qNRW-2 در فاصله نشانگری E080-M160-3-RM6843 با اثر افزایشی ۰/۴۱۳ و نسبت درست‌نمایی ۲/۳۸۵ قرار داشت. هرچند که این QTL دارای بالاترین درجه تبیین نسبت به

کروموزوم‌های ۵ و ۶ (دو QTL)، ۱، ۲، ۴، ۷، ۹ و ۱۰ قرار داشتند. به جزء QTL‌های qNRTH-2، qNRTH-4 و qNRTH-10 سایر QTL‌های شناسایی شده موجب کاهش ضخامت ریشه شدند. qNRTH-1، qNRTH-6b و qNRTH-9 به ترتیب با LOD ۳/۱۲۱، ۳/۴۴۳ و ۳/۱۸۹ حدود ۱۴/۴۳ درصد تغییرات را در جهت کاهشی و QTL qNRTH-10 با LOD ۳/۷۱۲، بیش از ۱۶ درصد تغییرات را در جهت افزایشی توجیه کرد. به طور کلی برای صفات مورد بررسی در شرایط نرمال ۲۵ QTL شناسایی گردید که دو QTL بزرگ اثر و مربوط به صفت وزن ساقه بودند. لازم به ذکر است که این QTL‌ها دارای اثر افزایشی منفی بودند. برای وزن و ضخامت ریشه یک QTL مشترک بر روی کروموزوم ۲ مکان‌یابی گردید. این QTL در فاصله نشانگری E080-M160-3-RM6843 قرار داشت. دو QTL مشترک برای وزن و طول ساقه مکان‌یابی شد. این QTL‌ها به ترتیب بر روی کروموزوم‌های ۲ و ۴ قرار داشتند. QTL مشترک روی کروموزوم ۴ در حد فاصل نشانگرهای E070-M150-4-RM1359 قرار داشت. این QTL همچنین برای صفت ضخامت ریشه شناسایی شد. QTL E070-M150-6-ISSR20-10 که بر روی کروموزوم ۹ قرار داشت بطور مشترک در صفات طول و ضخامت ریشه مکان‌یابی شد.

که به ترتیب دارای LOD ۳/۱۳۵، ۵/۰۴۵ و ۴/۸۳۷ می‌باشند. qNSW-2 با فاصله نشانگری RM8254 به میزان ۲۱/۵ درصد تغییرات فنوتیپی را توجیه نموده، اما موجب کاهش این صفت به میزان ۰/۰۴ شد. همچنین qNSW-4 با فاصله نشانگری E070-M150-4-RM1359 مقدار ۲۰/۷ درصد از کل تغییرات را توجیه نمود و اثر افزایشی آن ۰/۰۴۶- بود. qNLA-8 با فاصله نشانگری RM684-4-ISSR23-2 تنها QTLی است که برای صفت سطح برگ یافت گردید دارای LOD ۲/۶۰۷ بوده و با درجه تبیین ۱۱/۸ درصد، موجب کاهش سطح برگ به میزان ۰/۱۴- می‌گردد. QTL‌های شناسایی شده برای طول ساقه بر روی کروموزوم‌های ۲ (دو QTL)، ۴، ۶ و ۱۰ قرار داشتند. اثر افزایشی هر QTL منفرد از ۰/۰۵۷- تا ۰/۱ متغیر بود. در همه QTL‌های شناسایی شده به جز qNSL-10 آلل سپیدرود موجب کاهش طول ساقه شد. QTL‌های qNSL-4، qNSL-6 و به ترتیب با LOD ۲/۸۹۷، ۳/۷۰۹، هر کدام بیش از ۱۳/۳۵ تغییرات را در جهت منفی و QTL qNSL-10 با LOD ۳/۲۷۹ به میزان ۱۴/۷ درصد از تغییرات را در جهت مثبت توجیه نمود. برای طول ریشه دو QTL بر روی کروموزوم‌های ۹ و ۱۱ با اثر کاهشی آلل سپیدرود شناسایی شد. عمل این ژن به صورت افزایشی و به سمت کاهش طول ریشه بود. این QTL‌ها حدود ۱۳/۲۵ درصد از تغییرات فنوتیپی طول ریشه را توجیه نمودند. ده QTL کنترل‌کننده ضخامت ریشه بر روی

جدول ۶- مکان، نسبت درست‌نمایی، اثر افزایشی و جهت اثر QTL‌های ردیابی شده برای شرایط نرمال

| صفات | QTL | کروموزوم | مکان QTL | نشانگرهای مجاور | LOD | اثر افزایشی | درجه تبیین | جهت آلل |
|------------|----------|----------|----------|-------------------------|-------|-------------|------------|---------|
| وزن ریشه | qNRW-2 | ۲ | ۱۰۲ | E080-M160-3-RM6843 | ۲/۳۸۵ | -۰/۴۱۳ | ۰/۱۰۸ | عنبیرو |
| | qNRW-7 | ۷ | ۱۱۴ | E070-M140-8-ISSR1-12 | ۲/۳۹۸ | -۰/۴۹ | ۰/۱۰۴ | عنبیرو |
| | qNRW-9a | ۹ | ۲۸ | RM524-RM7390 | ۲/۳۶۲ | -۰/۲۰۷ | ۰/۱۰۷ | عنبیرو |
| وزن ساقه | qNRW-9b | ۹ | ۹۲ | ISSR20-10-E070-M150-7 | ۲/۰۴۵ | -۰/۳۵۶ | ۰/۰۹۳ | سپیدرود |
| | qNSW-1 | ۱ | ۹۰ | ISSR34-1-E080-M150-4 | ۳/۱۳۵ | -۰/۱۴۳ | ۰/۱۱۴ | سپیدرود |
| | qNSW-2 | ۲ | ۱۰۰ | RM8254 | ۵/۰۴۵ | -۰/۰۴ | ۰/۲۱۵ | سپیدرود |
| سطح برگ | qNSW-4 | ۴ | ۲۴ | RM1359-E070-M150-4 | ۴/۸۳۷ | -۰/۰۴۶ | ۰/۲۰۷ | سپیدرود |
| | qNLA-8 | ۸ | ۹۴ | ISSR23-4-RM6845 | ۲/۶۰۷ | -۰/۱۴ | ۰/۱۱۸ | سپیدرود |
| | qNSL-2a | ۲ | ۱۰۰ | RM8254 | ۳/۹۴۵ | -۰/۰۵۶ | ۰/۱۷۲ | سپیدرود |
| طول ساقه | qNSL-2b | ۲ | ۱۵۴ | RM7245-RM427 | ۲/۵۹۴ | -۰/۰۴۳ | ۰/۱۱۷ | سپیدرود |
| | qNSL-4 | ۴ | ۲۴ | RM1359-E070-M150-4 | ۲/۸۹۷ | -۰/۰۵۷ | ۰/۱۳ | سپیدرود |
| | qNSL-6 | ۶ | ۴۲ | ISSR27-11-RM276 | ۳/۰۷۹ | -۰/۰۵۶ | ۰/۱۳۷ | سپیدرود |
| طول ریشه | qNSL-10 | ۱۰ | ۱۲۰ | ISSR2-10-ISSR33-1 | ۳/۲۷۹ | ۰/۱ | ۰/۱۴۶ | عنبیرو |
| | qNRL-9 | ۹ | ۹۰ | E070-M150-6-ISSR20-10 | ۲/۵۴۹ | -۰/۰۴۹ | ۰/۱۱۵ | سپیدرود |
| | qNRL_11 | ۱۱ | ۲۴ | E120-M160-11-ISSR20-4 | ۳/۳۸۱ | -۰/۰۳۸ | ۰/۱۵ | سپیدرود |
| ضخامت ریشه | qNRTH-1 | ۱ | ۹۲ | E080-M150-4-E090-M160-8 | ۳/۱۲۱ | -۰/۲۱۱ | ۰/۱۳۹ | سپیدرود |
| | qNRTH-2 | ۲ | ۲۰۴ | E080-M160-3-RM6843 | ۲/۵۶۲ | -۰/۱۶۱ | ۰/۱۱۶ | عنبیرو |
| | qNRTH-4 | ۴ | ۲۴ | RM1359-E070-M150-4 | ۲/۶۱۱ | -۰/۱۰۹ | ۰/۱۱۸ | عنبیرو |
| ضخامت ریشه | qNRTH-5a | ۵ | ۱۰ | E110-M140-8-ISSR19-1 | ۲/۶۷۴ | -۲۶/۵۱۱ | ۰/۱۲ | سپیدرود |
| | qNRTH-5b | ۵ | ۸۲ | ISSR6-4-ISSR25-2 | ۲/۵۱۵ | -۰/۲۶۸ | ۰/۱۱۴ | سپیدرود |
| | qNRTH-6a | ۶ | ۳۶ | ISSR1-2-ISSR4-6 | ۲/۹۳ | -۰/۱۲۸ | ۰/۱۳۱ | سپیدرود |
| ضخامت ریشه | qNRTH-6b | ۶ | ۱۴۰ | E090-M160-2-ISSR14-2 | ۳/۴۴۳ | -۰/۲ | ۰/۱۵۲ | سپیدرود |
| | qNRTH-7 | ۷ | ۱۱۸ | E070-M140-9-ISSR13-4 | ۲/۷۰۵ | -۰/۲۳۴ | ۰/۱۲۲ | سپیدرود |
| | qNRTH-9 | ۹ | ۹۰ | E070-M150-6-ISSR20-10 | ۳/۱۸۹ | -۰/۱۹۱ | ۰/۱۴۲ | سپیدرود |
| | qNRTH-10 | ۱۰ | ۱۰ | ISSR30-1-ISSR12-4 | ۳/۷۱۲ | ۱/۴۶۴ | ۰/۱۶۳ | عنبیرو |

مکان‌یابی صفات کمی در شرایط تنش سرما

نتایج مقایسه میانگین والدین برای صفات مورد بررسی اختلاف معنی‌دار آنها را نشان دادند و همچنین عنبربو برای تمامی صفات به جز کد ژنتیکی دارای مقادیر بالاتری نسبت به سپیدرود بود (جدول ۷). کد ژنتیکی پایین‌تر متعلق به عنبربو والد متحمل بود. برای وزن ساقه در سرما تنها یک QTL بر روی کروموزوم ۱۲ مکان‌یابی شد. QTL qCSW-12 با فاصله نشانگری 4- E090-M160-4 و LOD ۱۸-۴/۱۵۹ توانست تغییراتی فنوتیپی این صفت را به میزان ۱۴/۱ درصد در جهت کاهش وزن ساقه توجیه کرد (جدول ۴-۱۸). آندایا و مکیل (۱) یک QTL بزرگ اثر را روی کروموزوم ۱۲ شناسایی کردند و آن را qCTS12a نامیدند که به طور معنی‌داری با مقاومت به سرما همبستگی داشت و حدود ۴۱ درصد تنوع فنوتیپی را شامل می‌شد. آندایا و تای (۲) مطالعه ای روی لاین‌های خالص نوترکیب حاصل از تلاقی M202 و IR50 (یک رقم ایندیکا که بسیار حساس به سرماست) انجام دادند و یک QTL بزرگ اثر qCTS12 که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۲ قرار داشت و تحمل به سرما را کنترل می‌نمود، را مکان‌یابی کردند. QTL qCBM-4 بر روی کروموزوم ۴ برای صفت زیست توده در سرما شناسایی گردید. این QTL با دارا بودن LOD ۲/۸۹۸، به میزان ۱۳/۴ درصد از تغییرات را فنوتیپی زیست توده را با توجه به اثر افزایشی (۱۳۴/۰) در جهت مثبت، توجیه نمود. ژو و همکاران (۱۴) در مطالعه‌ای بر روی تحمل به سرما چهار QTL، qCTB-1-1، qCTB-4-1، qCTB-5-2، و qCTB-10-1 در کروموزوم ۱ و ۴ مکان‌یابی کردند. دو QTL کنترل‌کننده سطح برگ بر روی کروموزوم‌های ۵ و ۱۲ مکان‌یابی شدند. QTL qCLA-5 با LOD ۳/۲۰۶ بیشترین اثر را بر سطح برگ داشت و ۱۴/۳ درصد از تنوع فنوتیپی برای این صفت را در جمعیت مورد مطالعه توجیه نمود. در qCLA-12 با فاصله نشانگری 8- ISSR1-4- E090-M160-4 آلل سپیدرود موجب کاهش سطح برگ شد. ژنگ و همکاران (۱۷) یک QTL در کروموزوم ۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸، ۹ و ۱۲، دو QTL در کروموزوم ۱۱ یافتند که جوانه‌زنی بالا در دمای پایین را کنترل می‌کنند. نتایج حاصل از مکان‌یابی فاصله‌ای برای طول ساقه در سرما تنها یک QTL کوچک اثر در حد فاصل نشانگرهای 6- E080-M160-4- ISSR30-4 و با LOD ۲/۸۱۳ روی کروموزوم ۵ شناسایی کرد. این QTL توانست ۱۲/۶ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه نماید.

همچنین اثر افزایشی در این QTL در جهت افزایش مقدار آن به میزان ۹۲/۴۸۵ عمل نمود. ژو و همکاران (۱۴) مجموع چهار QTL برای گلدهی به وسیله نقشه یابی فاصله‌ای روی کروموزوم‌های ۵ و ۷ شناسایی کردند. QTL مکان‌یابی شده برای ضخامت ریشه qCRTH-11 با فاصله نشانگری E060-5- M150-5- ISSR34-5 و LOD ۳/۲۰۵ بود. این QTL کوچک اثر ۱۴/۳ درصد از تنوع فنوتیپی را با اثر افزایشی آلل عنبربو توجیه نمود. ژو و همکاران (۱۴) نیز برای تحمل به سرما هشت QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۴، ۵، ۱۰ و ۱۱ شناسایی کردند. ژنگ و همکاران (۱۷) دو QTL در کروموزوم ۱۱ یافتند که جوانه‌زنی بالا در دمای پایین را کنترل می‌کرد. در شرایط سرما به‌طور کلی شش QTL مکان‌یابی گردید که در این بین دو QTL دارای اثر افزایشی منفی (وزن ساقه و سطح برگ) و سایرین مثبت بودند. در این تنش QTL برگ اثر یافت شد. کروموزوم ۵ دارای یک QTL مشترک برای سطح برگ و طول ساقه، در حد فاصل نشانگرهای 6- E080-M160-4- ISSR30-4 بود. همچنین برای صفات وزن ساقه و سطح برگ QTL مشترکی بر روی کروموزوم ۱۲ شناسایی شد.

در شرایط نرمال و سرما لاین‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری از نظر کلیه صفات با یکدیگر داشتند. لاین ۵ در شرایط سرما بالاترین مقدار وزن ریشه، ساقه، بیوماس، سطح برگ و طول ساقه را دارا داشت. نقشه حاصل از نشانگرهای AFLP و SSR با استفاده از ۳۵ نشانگر ISSR چند شکل اشباع شد به طوری که ۱۷۰۹/۲۹ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش دادند. در شرایط نرمال ۲۵ QTL شناسایی گردید که دو QTL بزرگ اثر و مربوط به صفت وزن ساقه بودند. برای وزن و ضخامت ریشه یک QTL مشترک بر روی کروموزوم ۲ مکان‌یابی گردید. این QTL در فاصله نشانگری 3-RM6843- E080-M160-4 قرار داشت. در شرایط سرما به‌طور کلی ۶ QTL مکان‌یابی گردید که در این بین دو QTL دارای اثر افزایشی منفی (وزن ساقه و سطح برگ) و سایرین مثبت بودند. qCBM-4 برای زیست توده، qCLA-5 برای سطح برگ، qCRL-5 برای طول ساقه و qCRTH-11 برای ضخامت ریشه به ترتیب ۱۳/۴، ۱۴/۳، ۱۲/۶ و ۲ درصد از تغییرات مربوط به صفت را توجیه نمودند. با توجه به مثبت بودن اثرات افزایشی، از آن‌ها می‌توان پس از تعیین اعتبار در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر جهت بهبود تحمل گیاهچه‌های برنج استفاده نمود.

جدول ۷- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی بین والدین در شرایط سرما

Table 7. Compare means of traits for parents under cold condition

| صفت | عنبربو | سپیدرود | t |
|------------|--------|---------|-----------|
| وزن ریشه | ۰/۱۳۹ | ۰/۰۱۵ | ۱۰۷/۹۲۸** |
| وزن ساقه | ۰/۳۳۲ | ۰/۰۱ | ۱۶/۲۱۹** |
| زیست توده | ۰/۴۷۰ | ۰/۰۳ | ۱۹۱/۹۸۸** |
| کد ژنتیکی | ۱ | ۹ | ۳/۴۴۳** |
| سطح برگ | ۹/۰ | ۱/۹ | ۶۳/۹۲۶** |
| طول ساقه | ۳۶ | ۷/۵۷۵ | ۳۹/۲۵۱** |
| طول ریشه | ۱۲/۳۷۵ | ۳/۵ | ۳۷/۲۷۴** |
| ضخامت ریشه | ۰/۳۵۲ | ۰/۰۱ | ۱۷/۱۱۵** |

** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ است.

جدول ۸- مکان، نسبت درستمایی، اثر افزایشی و جهت اثر QTLهای ردیابی شده برای صفت سرما

Table 8. Position, Likelihood Ratio, additive effect and allele direction of detected QTLs under normal condition

| جهت آلل | درجه تیبین | اثر افزایشی | LOD | نشانه‌های مجاور | مکان QTL | کروموزوم | QTL | صفات |
|------------|---------------|-------------|-------|----------------------|-------------|----------|----------|------------|
| سپیندرود | ۰/۱۴۱ | -۰/۰۵۴ | ۰/۱۵۹ | E090-M160-4-ISSR1-8 | ۷۸ | ۱۲ | qCSW-12 | وزن ساقه |
| عنبربو | ۰/۱۳۴ | -۰/۱۳۴ | ۲/۸۹۸ | E060-M160-3-RM1359 | ۱۶ | ۴ | qCBM-4 | زیست توده |
| عنبربو | ۰/۱۴۳ | ۲/۴۳۸ | ۳/۲۰۶ | ISSR30-4-E080-M160-6 | ۱۶ | ۵ | qCLA-5 | سطح برگ |
| سپیندرود | ۰/۱۳۱ | -۰/۱۲۸ | ۲/۹۱۸ | E090-M160-4-ISSR1-8 | ۷۸ | ۱۲ | qCLA-12 | طول ساقه |
| عنبربو | ۰/۱۲۶ | ۹۲/۴۸۵ | ۲/۸۱۳ | ISSR30-4-E080-M160-6 | ۱۶ | ۵ | qCRL-5 | ضخامت ریشه |
| عنبربو | ۰/۱۴۳ | -۰/۰۲۹ | ۳/۲۰۵ | ISSR34-5-E060-M150-5 | ۵۸ | ۱۱ | qCRTH-11 | |

منابع

- Andaya, V.C. and D.J. Makill. 2003. QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from *japonica* × *indica* crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1084-1090.
- Andaya, V.C. and T.H. Tai. 2006. Fine mapping of the qCTS12 locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice, at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from *japonica* × *indica* crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 467-475.
- Gregorio, G.B., D. Senadhira and R. Mendoza. 1997. Screening rice for salinity tolerance. IRRI. Dis. Paper No. Los Baños. Philippine, 22 pp.
- IRRI. 1988. Standard evaluation system for rice. International Rice Research Institute.
- Jiang, L., M. Xun., J. Wang and J. Wan. 2007. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombination inbred lines. *Journaa of Cereal Science*, 8-13.
- Jiang, W., Y. Jin, J. Lee, R. Piao, L. Han, J. Shin, R. Jin, T. Cao, H. Pan and H. Koh. 2011. Quantitative trait loci for cold tolerance of rice recombinant inbred lines in low temperature environments. *Molecules and cells*, 32: 579-87.
- Jing, L., Z. Wen-yin, Z. Ya-dong, Z. Zhen, Z. Ling, C. Tao, Z. Qing-yong, Z. Li-hui, F. Xian-wen, W. Yan-ping and W. Cai-lin. 2011. Detection of QTL for cold tolerance at bud bursting stage using chromosome segment substitution lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Science*, 18: 71-74.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annual Eugenics*, 12: 172-175.
- Lee, S., S. Ohc, Y. Choi, J. Suh, H. Ju, D. Yoon and S. Ahn. 2004. Mapping quantitative trait loci controlling cold tolerance in an *oryza sativa* × *O.rufipogon* BC1F7 population. *Korean Journal Breeding*, 36: 1-8.
- Lou, Q., Z. Sun, Y. Xing, X. Xu, H. Mei and L. Luo. 2007. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*oryza sativa* L.) *Euphytica*, 158: 87-89.
- Mir Mohamadi Meybodi, S.A.M. and S. Tarkesh Esfahani. 2001. Phenological and breeding aspect of cold and freezing stress in crops. Golbon Esfahan press, 233 pp.
- Sabouri, H., A. Biabani, M. Katouzi, A. Sabouri, R. Khatami Nejhah, Sh. Mohammad Alegh, M. Najjar Ajam and M. Pirasteh. 2011. Relationship between genotype and phenotype in rice under drought stress. Research work in College of Agriculture Science and Natural Resource. Gonbad Kavous University, (In Persian). 144 pp.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 91: 5466-5570.
- Xu, L.M., L. Zhou, Y.W. Zeng, F.M. Wang, H.L. Zhang, S.Q Shen and Z.C. Li. 2008. Identification and mapping of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage in a japonica rice near-isogenic line. *Plant Science*, 340-347.
- Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. IRRI, 61 pp.
- Zhan, Q., Y. Zhuk and Z. Chen. 2005. Studies on the QTL for cold tolerance related characters on rice seedling molecular markers. *Hybrid Rice*, 20: 50-55.
- Zhang, Q., S. Koji, K. Akira and Q. Zhan. 2003. Molecular mapping for seedling cold tolerance QTLs in rice. *Hunan Agri Scieance Technology Newsletter*, 4: 8-15.
- Zhang, Q., K. Zhu, Z. Chen and S. Zang. 2004. Mapping of QTLs controlling seedling cold tolerance in rice using F2 population. *Journal of hunan Agricultural University*, 30: 303-306.
- Zhou, L., Y. Zeng, W. Zheng, B. Tang, S. Yang, H. Zhang, J. Li and Z. Li. 2010. Fine mapping a QTL qCTB7 for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 7 using a near-isogenic line. *Theoretical and Applied Genetics*, 121: 895-905.

Analysis of Genetic Structure of Cold Tolerance in Iranian Rice Recombinant Inbred Lines

Mahnaz Katouzi¹, Saeid Navabpour², Ahad Yamchi³, Seyedeh Sanaz Ramazanpour² and Hossein Sabouri⁴

1, 2 and 3- Graduated M.Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, in Plant Breeding, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

4- Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University (Corresponding Author: hos.sabouri@gmail.com)

Receive: March 8, 2016 Accepted: June 5, 2016

Abstract

Rice is one the most important crops in Iran and worldwide. Abiotic stresses including cold, restrict rice production. In order to saturation of linkage map in recombinant lines population caused by Sepidroud × Anbarbou crosses, an experiment was conducted using 96 recombinant lines and 40 ISSR markers at Gonbad Kavous University. 96 Recombinant lines were plant under hydroponic conditions for mapping of traits related to cold stress. Shoot weight, root weight, biomass, genetic score, leaf area, shoot length, root length and root thickness were recorded. Linkage map covered 1709.29 cM of rice genome. Six QTLs mapped in cold stress. qCLA-5 had the highest effects on leaf area with LOD=3.206 and explained 14.3 percent of phenotypic variation. The results of present work can be used for improvement of cold tolerance in rice seedlings after determining marker validation.

Keywords: Abiotic stresses, ISSR marker, Rice, Saturation of linkage map