دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

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 [٤]

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 زیست شناسی، 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 ۹٦ لاین که از نسل هشتم تلاقی ارقام اهلی‌طارم 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 ۱٤۱۱/۳ سانتی‌مورگان ژنوم برنج را با متوسط فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر با ۱۵/۳٤ سانتی‌مورگان پوشش داد. در مجموع ۳۸ QTL برای صفات مورد مطالعه مکان‌یابی شد. در شرایط کمبود نیتروژن qRV-10 ۱۱/٤ 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 راکنترل نمود. QTLهای کنترل کننده تعداد ریشه (qRN-3 و qRN-6b)، 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 به‌نژادی مورد استفاده قرار گیرد.

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

مقدمه

با توجه به اهمیّت 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 پلاسم 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 نوکلوئیک، 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 درنتیجه 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 زایشی 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 Zhenshan97 (ZS97) وMinghui63 (MH63) به همراه والدین و نسل F_1 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 نمودندو 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

1- Quantitative Trait Loci
2- Marker Assisted Selection

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 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)

(π×قطر ریشه×طول ریشه)=چگالی سطح ریشه

میزان ازت با روش کجلدال که شامل سه مرحله هضم، تقطیر وتیتراسیون 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 کجلدال قرار داده شد. پس از انجام هضم لوله‌ها کاملا سرد شدند. بعد از هضم با دستگاه تمام اتوماتیک کجلدال 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 تیتر شد، سپس میزان ازت هر نمونه از فرمول زیر تعیین شد.

(رابطه ۲)

$$\text{میزان ازت} = \frac{(0.02)\ \text{نرمالیته‌اسید} \times 6.25 \times 1.400 \times \text{مصرفی‌اسید}}{\text{مقدار نمونه}}$$

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگی به روش CTAB سقای 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 (رفنس) استفاده شد. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز شش درصد تفکیک شدند. نمایان‌سازی باندها با روش موسوم به روش سریع رنگ‌آمیزی نقره[1] (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 نهایتا برای انجام مکان‌یابی صفات مورد بررسی از نرم‌افزار QTL Cartographer 2.5 استفاده شد.

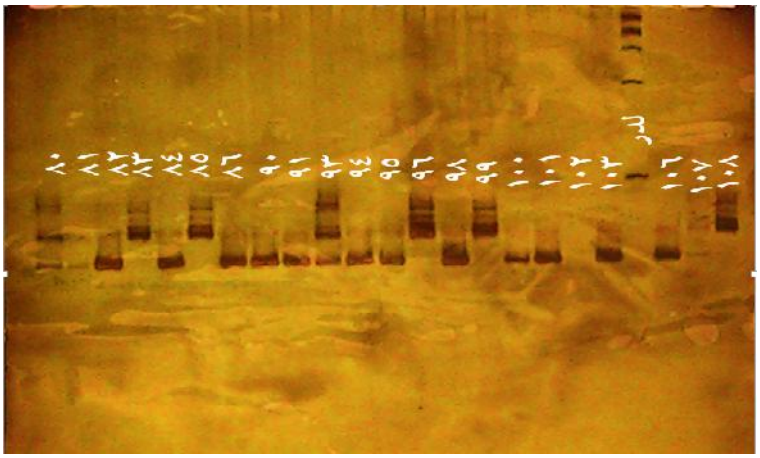
1- Rapid Silver Staining

(الف)

(ب)

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 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، امکان گزینش 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 × 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

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 در صد از تنوع فنوتیپی صفت مذکور را توجیه کند. دو QTL شناسایی شده برای وزن ساقه روی کروموزم‌های 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 اهلمی‌طارم 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 کروموزم 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 اهلمی‌طارم 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 کروموزم 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 اهلمی طارم 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 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 کنترل کننده 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 اهلمی‌طارم باعث افزایش وزن ریشه شدند. QTLهای qRW-5b و qRW-5c با تبیین ۲۹/۵ و ۲۶/۶ درصد از تنوع فنوتیپی بزرگ اثر برخودار بودند. در مطالعه لیان و همکارن (۱۰) پنج QTL کنترل‌کننده وزن ریشه تحت شرایط نرمال روی کروموزوم‌های ۲، ۵، ۷، ۱۱ و۱۲ قرار داشتند. در شرایط کمبود نیتروژن QTL ردیابی شده برای محتوای کلروفیل روی کروموزوم ۵ در حد فاصل نشانگرهای ISSR4-3- ISSR9-4 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 و 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 کنترل کننده روی کروموزوم ۷ شناسایی شد و اثر افزایشی آن ۰/۰۵ گرم بود. آلل‌های اهلمی‌طارم در این مکان باعث افزایش وزن ساقه شدند. QTL کنترل کننده 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.

جدول ۱- تجزیه مرکب صفات مورد مطالعه در لاین‌های F_8 برنج تحت شرایط نرمال و تنش کمبود نیتروژن

Table 1. The combined analysis of the traits in rice F_8 lines under normal and stress conditions of nitrogen deficiency

		میانگین مربعات صفات مورد مطالعه														
منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای کلروفیل	طول ساقه (cm)	طول ریشه (cm)	تعداد ریشه	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	سطح برگ	سطح ریشه	قطر ریشه (cm)	چگالی سطح ریشه	وزن تر ساقه (gr)	وزن تر ریشه (gr)	حجم ریشه (cm^3)	وزن خشک ساقه (gr)	وزن خشک ریشه (gr)
تکرار	۲	۰/۰۰۱*	۰/۱۰۲*	۰/۰۰۳^{ns}	۰/۰۳۵**	۰/۲۷**	۰/۰۰۰۲^{ns}	۱^{ns}	۰/۲۵**	۰/۰۰۰۵**	۰/۶۰*	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۳*	۰/۰۱**	۰/۰۰۰۵**	۰/۰۰۰۱^{ns}
شرایط کشت	۱	۰/۵۱۰**	۹۰/۴۶**	۱/۴۳**	۱۱/۵۱**	۲۸/۲۱**	۰/۸۴**	۹۸۳/۰۳**	۰/۱۴**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۱^{ns}	۴/۷۰**	۰/۰۰۵*	۰/۰۱**	۰/۰۸**	۰/۰۰۰۶**
خطای اول	۲	۰/۰۰۱	۰/۵۴	۰/۱۳	۰/۰۵	۰/۶۷	۰/۰۰۵	۱۱/۶۲	۰/۱۸	۰/۰۰۰۳	۰/۴۴	۰/۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۱
لاین	۹۵	۰/۰۰۷**	۱/۴۸**	۰/۳۸**	۰/۱۲**	۰/۷۶**	۰/۰۲۱**	۱۴/۷۹**	۰/۱۶**	۰/۰۰۰۱**	۰/۳۰**	۰/۰۲**	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۱**	/۰۰۰۶**	۰/۰۰۰۱**
لاین×شرایط کشت	۹۵	۰/۰۰۵**	۰/۳۱**	۰/۲۱**	۰/۰۵**	۰/۲۶**	۰/۰۰۴**	۵/۱۷**	۰/۰۷**	۰/۰۰۰۱**	۰/۲۲*	۰/۰۱**	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۰۳**	۰/۰۰۰۱**
خطای دوم		۰/۰۰۰۴	۰/۰۲۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۱	۰/۰۳	۰/۰۰۰۲	۰/۴۹	۰/۰۰۸	۰/۰۰۰۰۱	۰/۱۴	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰	۰/۰۰۰۰۱
ضریب تغییرات		۳۵/۶۷	۸/۳۷	۱۱/۴۹	۷/۷۷	۱۲/۲۹	۵/۷۹	۱۵/۴۳	۱۱/۶۴	۱۵/۲۰	۵۲/۲۸	۶/۸۰	۵۶/۴۴	۱۵/۹۳	۲۶/۱۱	۲۴/۰۲

* 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														
منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای کلروفیل	طول ساقه (cm)	طول ریشه (cm)	تعداد ریشه	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	سطح برگ	سطح ریشه	قطر ریشه (cm)	چگالی سطح ریشه	وزن تر ساقه (gr)	وزن تر ریشه (gr)	حجم ریشه (cm^3)	وزن خشک ساقه (gr)	وزن خشک ریشه (gr)
بلوک	۲	۰/۰۰۰۱^{ns}	۴۰/۴۵**	۴/۹۹**	۰/۰۰۱^{ns}	۶۵/۵۶**	۰/۱۹**	۲۹۰**	۳۹/۳۰**	۰/۰۸۹**	۱/۰۳*	۵۳۳۷/۱۲**	۰/۰۰۶^{ns}	۱۷/۳۸**	۱۷/۲۲^{ns}	۲/۵۹**
لاین	۹۵	۰/۰۰۲**	۸۱/۴۵**	۳۵/۲۸**	۰/۰۶**	۵۷/۶۹**	۱/۰۴**	۵۸۰**	۱۳/۲۷**	۰/۰۰۵۲**	۰/۴۴*	۳۱۶۶/۱۶**	۳۹۶۷/۷۴^{ns}	۱/۹۰**	۱۷۳/۳۸**	۳/۸۹**
خطا	۱۹۰	۰/۰۰۰۳	۲/۵۳	۰/۳۵	۰/۰۰۱	۴/۳۱	۰/۰۱	۱۳/۹۶	۱/۲۴	۰/۰۰۱۲	۰/۲۸	۱۰۹/۶۹	۲۴۲۱/۹۴	۰/۱۷	۹۱/۱۶	۰/۱۹
ضریب تغییرات		۶۷/۸۲	۱۰/۲۱	۹/۲۷	۸/۰۲	۱۷/۴۲	۵	۱۱/۴۳	۱۴/۵۶	۱۶/۰۶	۷۲/۴۶	۸/۸۴	۷۴/۹۱	۱۶/۶۶	۴۸/۱۸	۱۲/۳۳

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

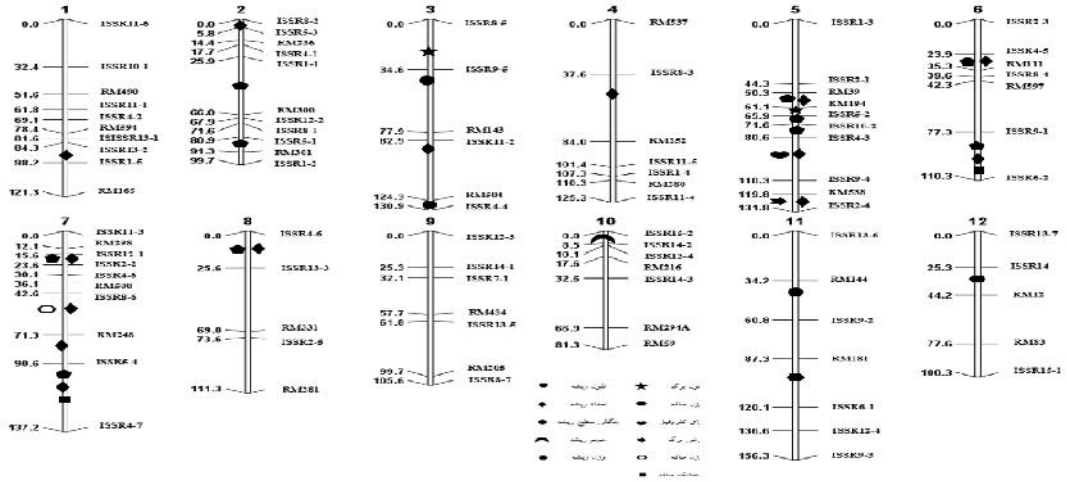
جدول ۳– QTLهای کنترل کننده برای صفات گیاهچه‌ای در شرایط نرمال و کمبود نیتروژن در برنج

Table 3. QTL controlling for seedling characteristics in normal conditions and a lack of nitrogen in rice

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

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

این مکان ژنی توانست ۱۰/۴ درصد از تغییرات فنوتیپی مربوط به وزن ساقه را توجیه کند. دو QTL کنترل‌کننده وزن خشک ساقه روی کروموزم‌های ۶ و ۷ قرار داشتند. در هر دو مکان ژنی آلل‌های والد اهلمی طارم به طور متوسط ۱۰ گرم وزن خشک ساقه را افزایش دادند. تنها یک QTL برای حجم ریشه روی کروموزوم ۱۰ در فاصله نشانگرهای ISSR15-2 و ISSR14-2 ردیابی شد که این QTL توانست ۱۱/۴ درصد از واریانس فنوتیپی را تبیین نماید



شکل ۳- QTLهای کنترل‌کننده 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

در مجموع، ۳۷ QTL مرتبط با صفات ارزیابی شده شناسایی شد. برخی از QTLهای شناسایی شده از جمله qRN-1، qRN-3، qRN-5c، qRN-6b، qRW-5b و qRW-5c با تبیین درصد بالاتری از تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه به‌عنوان QTL بزرگ‌اثر شناخته شدند که نشانگرهای پیوسته با این QTLها احتمالاً پس از تایید صلاحیت می‌توانند در برنامه‌های اصلاح به کمک نشانگر جهت گزینش لاین‌های برتر و انتقال آلل‌های مطلوب استفاده گردند.

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 × N-level interaction for plant height in rice (*Oriza 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 Genelica 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 RiceRecombinant Lines under Drought Stress Conditions. Journal of Crop Breeding, 9(21): 1-9.
9. Li, Z.K. 2001. QTL mapping in rice: afew critiical consideration. 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, choromosomal 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 Agronomic 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, philipines, 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 Mohammadalegh[1], Hossein Sabouri[2], Ali Sattarian[3], Abbas Biabani[3] and Abdollatif Gholizadeh[4]

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