

مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده محتوای کلروفیل برگ در مراحل

گیاهچه و زایشی تحت تنش شوری در بونج

حسین صبوری^۱، عاطفه صبوری^۲، مجید نحوی^۳، احمد رضا دادرس^۴، و مهناز کاتوزی^۵

۱- گروه تولیدات گیاهی، مجتمع آموزش عالی گنبد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع

طبیعی گرگان، صندوق پستی ۱۶۳ saboriho@yahoo.com

۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

۳- پژوهشگر موسسه تحقیقات بونج کشور

۴- کارشناس زراعت

۵- کارشناس ارشد زراعت

چکیده

بونج یکی از مهمترین گیاهان زراعی است که غذای نیمی از مردم جهان را تأمین می‌کند. با توجه به جمعیت روز افزون دنیا، نگرانی در مورد تولید غذا مرتباً افزایش یافته و نیاز به محصولات گیاهی بیشتر، کشت بونج در مناطق غیر قابل کشت را ایجاب می‌نماید. سطوح شوری بالاتر از حد بحرانی برای رشد بونج در این مناطق، نیاز به محصولات گیاهی متحمل به تنش شوری و تحقیقات بیشتر در این زمینه را بیش از پیش ضروری تر می‌نماید. محتوای کلروفیل تحت تنش شوری یکی از مهمترین صفات مرتبط با تحمل به شوری است. به منظور مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با محتوای کلروفیل برگ در مراحل گیاهچه و زایشی در شرایط تنش شوری از یک جمعیت F₂:۳ حاصل از تلاقی ارقام طارم محلی و خزر استفاده شد. نقشه پیوستگی ۷۴ نشانگر ریز ماهواره با پوشش ژئومی ۱۲۳۱/۵۰ سانتی مورگان با متوسط فاصله ۱۹/۸۳ سانتی مورگان تهیه گردید. برای محتوای کلروفیل در مرحله گیاهچه و در شرایط تنش شوری براساس مکان‌یابی فاصله ای مرکب، یک QTL در فاصله دو نشانگر RM1022-RM6283 در کروموزوم ۳ مکان‌یابی شد. این 40/14 (qCLS-3) QTL درصد از تغییرات مربوط به محتوای کلروفیل را در مرحله گیاهچه ای توجیه نمود. نتایج حاصل از این آزمایش می‌تواند ژنتیک‌های برتر برای برنامه‌های انتخاب بر مبنای نشانگر مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

بونج،

نشانگر ریز ماهواره،

نشانگرهای مولکولی،

محتوای کلروفیل،

مکان‌یابی QTL

مقدمه

AFLP و RFLP بررسی نمود. وانگ و همکاران (۳۰) شش QTL برای محتوای کلروفیل در مراحل مختلف رشدی گزارش نمود که روی کروموزومهای ۱ و ۴ قرار داشتند. از بین آنها دو QTL بزرگ اثر بودند که محتوای کلروفیل را در مرحله ظهور برگ ها کنترل نمودند. وانگ و همکاران (۳۰) گزارش نمود که QTL های کنترل کننده محتوای کلروفیل در مراحل مختلف رشدی در نواحی مختلفی از ژنوم قرار دارند، بنابراین نتیجه گرفت که مناطق مختلفی از ژنوم محتوای کلروفیل را در مراحل مختلف رشد QTL کنترل می کنند. ایشیمورا و همکاران (۹) گزارش نمودند که QTL های مرتبط با توانایی فتوسترزی مانند محتوای کلروفیل با QTL های مرتبط با عملکرد همپوشانی ندارند. ساتو و همکاران (۲۷) محتوای کلروفیل برگ را در شرایط تنفس اشعه ماوراء بمنفس مکان یابی نمودند. آنها سه QTL روی کروموزوم های ۱، ۳ و ۱۰ برای صفت مذکور را می بینند. QTL روی کروموزوم ۳ موجب افزایش محتوای کلروفیل و QTL های مربوط به کروموزوم های ۱ و ۱۰ آنرا کاهش دادند. چاو و همکاران (۴) QTL های مربوط به توانایی سبز ماندن گیاه را که بستگی به میزان دوام کلروفیل و پروتئین ها در برگ دارد، مکان یابی نمودند. آنها گزارش نمودند که ژن مرتبط با فنتوتیپ سبز گیاه (sgr(t)) یک ژن هسته ای بوده و با نشانگرهای RFLP ، RG662 و C985 پیوستگی دارد. از آنجاکه محتوای کلروفیل از مهمترین صفات فیزیولوژیک موثر بر عملکرد در شرایط تنفس می باشد، مطالعه حاضر با هدف شناسایی QTL های موثر بر محتوای کلروفیل برگ در شرایط تنفس شوری انجام شد.

مواد و روش‌ها**مواد گیاهی:**

جهت مکان یابی ژنتیکی محتوای کلروفیل برگ در شرایط شور از ۱۹۲ فرد از جمعیت $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی ارقام متتحمل (طارم محلی) و حساس (خرز) استفاده شد. والدین تلاقی از نتایج حاصل از برنامه گزینش ارقام برای تحمل به تنفس های استمیک مانند تحمل به شوری طی سالهای ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۶ انتخاب شدند.

برنج یکی از مهمترین گیاهان زراعی جهان است که غذای نیمی از جمعیت جهان را فراهم می کند. با افزایش روز افزون جمعیت جهانی، اصلاحگران برنج سعی در بالابردن سطح زیر کشت و استفاده از مناطق غیر حاصلخیز برای کشت برنج دارند. در حال حاضر مناطق وسیعی از کشت برنج در ایران و جهان در مناطق ساحلی می باشد. این مناطق حاشیه دریا دارای سطوح شوری بالاتر از حد بحرانی برای رشد برنج هستند (۱۱ و ۱۳). محققین در مطالعات متعددی صفات موثر بر عملکرد برنج را در شرایط تنفس شوری تشخیص داده اند (۷، ۱۱، ۱۳ و ۱۴). محتوای کلروفیل برگ یکی از مهمترین صفات فیزیولوژیک مرتبط با توانایی فتوسترزی در برنج و تحت تنفس شوری است (۹). از آنجاکه اکثر صفات مهم مرغولوژیک و فیزیولوژیک موثر بر عملکرد مانند محتوای کلروفیل کمی است و بلوک های ژنی در بروز آنها نقش دارند، ژنتیک کلاسیک قادر نیست نحوه رفتار ژن های کنترل کننده صفات کمی را به صورت ژن های مجزا مورد بررسی قرار دهد. با پیشرفت تکنولوژی نشانگرهای مولکولی، تهیه نقشه پیوستگی و نرم افزارهای مکان یابی ژن های کنترل کننده صفات کمی، ابزارهای قدرتمندی جهت بررسی مولکولی صفات کمی فراهم شده است (۵، ۶، ۱۷ و ۲۶). ژن های کنترل کننده صفات مهم و موثر بر عملکرد برنج در تنفس شوری در چندین مطالعه مکان یابی شده اند (۱۱، ۱۳ و ۱۴). همچنین نحوه کنترل ژنتیکی محتوای کلروفیل برگ در شرایط نرمال نیز بررسی شده است (۹، ۲۸ و ۳۰)، اما تاکنون گزارشی از نحوه کنترل ژنتیکی محتوای کلروفیل برگ در شرایط تنفس شوری منتشر نشده است. تنگ و همکاران (۲۹) QTL های موثر بر محتوای کلروفیل برگ را در مرحله پنجه زنی، ایشیمورا و همکاران (۹) در مرحله پنجم روز پس از گلدھی و زو و همکاران (۳۴) در مراحل حداکثر پنجه زنی، گلدھی و گیاهچه های ۴۵ روزه ای شناسایی نمودند. وانگ و همکاران (۳۰) محتوای کلروفیل برگ را در برنج با استفاده از روش نقشه یابی فاصله ای مرکب چندگانه و در ۱۳۱ لاین نوترکیب حاصل از تلاقی دو برنج ایندیکا با نشانگرهای

خاک حاوی $50N$ ، $25P$ و $25K$ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، استفاده شد. سطح خاک ۱ سانتی‌متر بالاتر از بالاترین سوراخ ظرف بود. ظرف‌ها پس از اینکه سطح خاک آنها تسطیح شد، در سینی‌های بزرگ قرار داده شدند و سینی‌های بزرگ با آب معمولی پر شدند، تا وقتی که سطح آب با سطح خاک یکی شد. خاک با جذب آب در داخل ظرف‌ها پایدار شد. برای ثابت ماندن سطح آب، بعد از ۱ الی ۲ روز در صورت لزوم آب اضافه شد. همزمان با تهیه مواد مذکور، جوانه‌زنی اولیه بذرها شروع شد. تعداد ۹ تا ۱۵ بذر از هر خانواده در داخل ظروف (سه بذر در هر ظرف) قرار داده شد. در این وضعیت سطح آب ۱ سانتی‌متر بالاتر از سطح خاک بود. سطح آب روزانه کنترل شد. هنگامی که گیاهچه‌ها ۲۱ روزه شدند، کل آب خارج شد و ۲۴ ساعت به همین صورت باقی ماند و سپس با آب شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر سینی‌های پلاستیکی پر شدند. به تدریج شوری آب افزایش یافته و در نهایت به ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر رسانده شد. در طول آزمایش، هر هفته به وسیله زهکش همه آب خارج شده و سپس سینی‌ها با آب شور که شوری مناسب را تأمین می‌کرد، پر شدند. برای اطمینان از اینکه فقط تنفس شوری روی گیاه اعمال شده است، گیاهان در طی آزمایش از هر گونه آفت و بیماری محافظت شدند. محتوای کلروفیل بوته‌ها پس از ۶۵ روز و در مرحله گلدهی ثبت شد.

تهیه نقشه ژنتیکی و مکان یابی ژن‌های کنترل کننده محتوای کلروفیل برگ:

برای تهیه نقشه پیوستگی، ابتدا چند شکلی والدین با استفاده از ۳۶۵ جفت آغازگر SSR بررسی شد و سپس نشانگرهای چند شکل برای غربال ۱۹۲ فرد F_2 استفاده گردید. برای اینکار از ژل-های پلی‌اکریلامید و اسربسته‌ساز ۶ درصد استفاده گردید. با ۷۴ نشانگر و ۱۹۲ فرد F_2 ، ماتریس داده‌های ژنتیکی به ابعاد 74×192 تشکیل شد و برای تهیه نقشه ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه نقشه از نرم افزار Map Manager (۱۸) استفاده شد. آزمون χ^2 برای بررسی انحراف تفرق از نسبت‌های مندلی در هر مکان نشانگر استفاده گردید. از مکان یابی فاصله‌ای (۱۰) و فاصله

(۱۹)، (۲۰)، (۲۱)، (۲۲)، (۲۳)، (۲۴) و (۲۵) بوته‌های مذکور با فاصله ۲۵ سانتی‌متر از یکدیگر در مزرعه تحقیقاتی موسسه برنج کشور در سال ۱۳۸۵ کشت شدند. در مرحله حداکثر پنجه زنی از هر کدام از افراد جمعیت برای استخراج DNA به روش CTAB (۲۶) نمونه برگی تهیه شد. از ۱۹۲ خانواده F_3 حاصل از افراد F_2 جهت اندازگیری کلروفیل در مراحل گیاهچه و رویشی در شرایط فایتوترون و گلخانه در سال ۱۳۸۶ استفاده شد.

اندازه گیری محتوای کلروفیل برگ در مرحله گیاهچه:

محتوای کلروفیل برگ در ۸۰ فرد از هر خانواده F_3 به روش گریگوریو و همکاران (۸) ثبت شد. برای استفاده از شرایط کنترل شده اتفاق رشد، از صفحه‌های یونیلیت، با ابعاد $10 \times 20 \times 35$ سانتی‌متر و سینی‌هایی به حجم ۴ لیتر استفاده شد. محلول غذایی هر ۷ روز تعویض شد. pH محلول، هفت‌های ۳ بار کنترل شده، و در pH ۵/۵ ثابت نگه داشته شد. شرایط کنترل شده $25^\circ C$ در روز و $21^\circ C$ در شب و رطوبت ۷۰ درصد بود. بذور جوانه زده‌ای که با حرارت $50^\circ C$ به مدت ۵ روز از خواب خارج شده بودند، به داخل هر سوراخ و شبکه نایلونی انتقال داده شدند. در هر سوراخ ۲ بذر جوانه زده، نشاء شد. تا سه روز پس از انتقال، بذور از آب مقطر استفاده کردند، سپس محلول غذایی یوشیدا (۳۳) به سینی‌ها انتقال داده شد. گیاهچه‌های برنج تا ۱۴ روز از محلول غذایی غیر شور استفاده نمودند. سپس ابتدا یک هفته شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر و سپس شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر به مدت دو هفته اعمال شد و نهایتا سه هفته بعد از اعمال شوری، محتوای کلروفیل برگ ۸۰ فرد از هر خانواده قرائت شد و از میانگین آنها برای مکان یابی استفاده شد.

اندازه گیری محتوای کلروفیل برگ در مرحله رویشی:

برای ثبت محتوای کلروفیل برگ در مرحله رویشی به روش گریگوریو و همکاران (۸) از ظرف‌های پلاستیکی استفاده شد. ابتدا به کمک سوراخ کن، سوراخ‌هایی به ابعاد ۳ الی ۴ میلی‌متر و با فاصله ۲ سانتی‌متر روی ظروف پلاستیکی ایجاد شد، به صورتی که بالاترین سوراخ‌ها، حداقل ۳ سانتی‌متر از لبه ظرف فاصله داشت. طبق دستورالعمل موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (۸) از

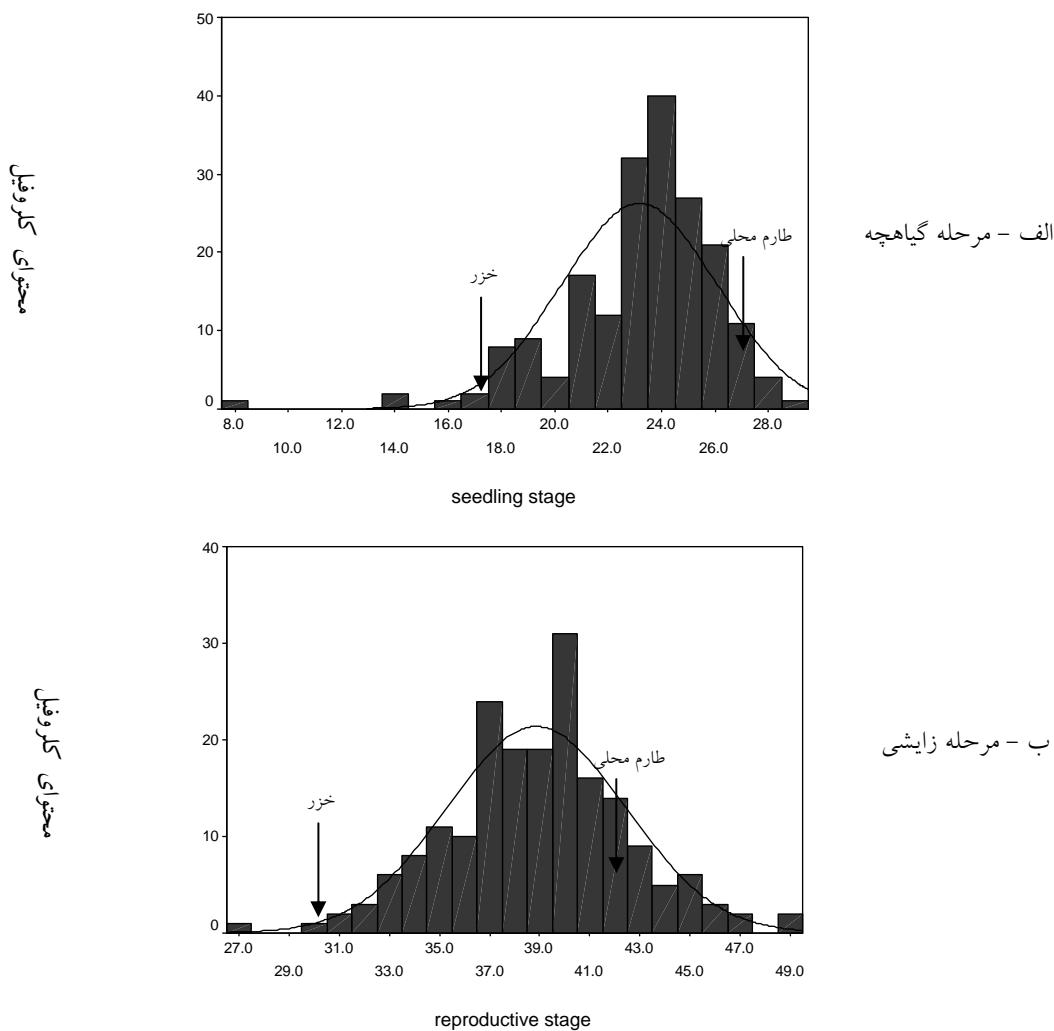
شوری نشان می دهد. تغییرات پیوسته در هر دو مرحله برای محتوای کلروفیل در خانواده های F_3 و در شرایط سور مشاهده شد. تغییرات پیوسته نشان می دهد که محتوای کلروفیل صفت کمی است که به وسیله تعداد زیادی ژن و با آثار کم کنترل می شود. اگرچه محتوای کلروفیل در مرحله گیاهچه دارای چولگی بود، اما این چولگی معنی دار نبود. بهر حال جهت مکان یابی محتوای کلروفیل از روش حداکثر درستنمایی استفاده شد که این روش نسبت به نرمال و عدم نرمال بودن متغیر حساس نیست (۱۵). تفکیک متجاوز نیز برای محتوای کلروفیل در مراحل گیاهچه و زایشی دیده شد.

ای مرکب (۳۳) برای مکان یابی QTL های کنترل کننده محتوای کلروفیل برگ استفاده گردید. مکان یابی QTL ها به کمک نرم افزار QTL Cartographer (۲) انجام شد.

نتایج

توزیع فراوانی محتوای کلروفیل برگ در مراحل گیاهچه و زایشی تحت تنش سوری :

شکل ۱ میانگین محتوای کلروفیل را در مراحل گیاهچه و زایشی برای والدین و توزیع فراوانی آن در خانواده های F_3 تحت تنش



شکل ۱: توزیع فراوانی محتوای کلروفیل برگ در در خانواده های F_3 را در مراحل گیاهچه ای و زایشی تحت تنش سوری

تغییر در ترتیب نشانگرها نیز روی کروموزوم های ۲ و ۸ دیده شد که احتمال می رود ناشی از ناهنجاریهای ساختمنی کروموزومی مانند معکوس شدن^۲ باشد. از آنجا که ارقام طارم محلی و خزر از جهات مرغولوژیکی و سایر صفات مانند تحمل به تنش ها با هم تفاوت دارند، از جمعیت حاصل از تلاقی طارم محلی و خزر تاکنون برای مکان یابی صفات متعددی در شرایط مختلف استفاده شده است (۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۵ و ۲۶). در این مقاله سعی شده است که مکان های ردیابی شده در سایر مقالات با مکان های ردیابی شده در این مقاله تا حد امکان با یکدیگر مقایسه شوند. مکان یابی فاصله ای برای محتوای کلروفیل تنها یک QTL (qCL-3) بر روی کروموزوم ۳ و در فاصله بین نشانگرهای RM1022-RM6283 برای مرحله گیاهچه ردیابی نمود. آلل کاهش دهنده محتوای کلروفیل از والد خزر موجب شد که این QTL اثر افزایشی به اندازه ۱/۵۴ داشته باشد. نوع عملکرد ژن به صورت غالیت ناقص بود که غالیت به سمت کاهش محتوای کلروفیل بود. این QTL، ۱۱/۶۰ درصد از تغییرات فنوتیپی محتوای کلروفیل برگ را در مرحله گیاهچه توجیه نمود. بالاترین نقطه اوج منحنی مکان یابی فاصله ای برای محتوای کلروفیل در مرحله زایشی نیز مربوط به یک QTL در ناحیه RM1022-RM6283 بود که آلل افزایش دهنده محتوای کلروفیل در آن از والد طارم محلی به اندازه ۱/۳۳ محتوای کلروفیل برگ را در شرایط تنش شوری افزایش داد. عملکرد ژن در این QTL به صورت فوق غالیت بود. این QTL، ۶ درصد از تغییرات فنوتیپی محتوای کلروفیل برگ را در مرحله زایشی توجیه نمود. ساتو و همکاران (۲۷) نیز QTL های مرتبط با محتوای کلروفیل برگ را در شرایط تنش اشعه ماوراء بنفش روی کروموزوم ۳ مکان یابی نمودند. QTL های مرتبط با تبادلات یونی نیز در شرایط تنش شوری برای جمعیت طارم محلی و خزر گزارش شده است. این QTL ها با صفات محتوای سدیم و پتاسیم و نسبت آنها (۲۶) و همچنین میزان جذب سدیم و پتاسیم و نسبت آنها (۲۳) مرتبط

مکان یابی QTL های کنترل کننده محتوای کلروفیل برگ: از ۳۶۵ جفت آغازگر SSR مورد مطالعه، ۸۵ جفت آغازگر (۲۳/۲۵ درصد) الگوی نواربندی متفاوتی برای والدین به نمایش گذاشتند. از بین ۸۵ جفت آغازگر ۷۴ جفت نشانگر الگوی نواربندی قابل امتیاز دهی داشتند. نتایج آزمون χ^2 برای بررسی انحراف فراوانی های اللی و ژنتیپی هر مکان نشانگر نشان داد که از ۷۴ نشانگر موجود در نقشه ژنتیکی، ۱۵ نشانگر (۲۰/۲۷ درصد) دارای فراوانی های اللی و ژنتیپی متفاوت و معنی داری ($p < 0.05$) از فراوانی های نمودن نقشه ژنتیکی این جمعیت مطالعات بعدی در اشباح تر نمودن نقشه ژنتیکی این جمعیت بدست آمد، مشخص شد که این نشانگرها در چند ناحیه ژنومی پیوسته قرار داشتند که در دو تا از آنها (RM445 و RM7424) آنها انحراف به سمت والد طارم محلی و در بقیه به سمت والد خزر بود (شکل ۲). از آنجا که نشانگرها دارای عدم تعادل^۱ به نواحی خاصی از ژنوم برنج متعلق بودند، این نتیجه را یکی از ویژگی های آن نواحی از ژنوم در نقشه جمعیت حاصل تلقی نمودیم و بنا به نظر لیو (۱۵) برای تهیه نقشه از این نشانگرها استفاده کردیم. ۷۴ نشانگر SSR در ۱۲ گروه پیوستگی (معادل تعداد کروموزوم های برنج) قرار گرفتند. نقشه حاصل، ۱۲۳۱/۵۰ سانتی مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد و فاصله بین هر دو نشانگر مجاور در روی نقشه بطور متوسط ۱۹/۸۳ سانتی مورگان برآورد گردید (شکل ۲). با توجه به اینکه فاصله متوسط بین نشانگرها کمتر از ۲۰ سانتی مورگان بود، بنا به پیشنهاد لندر و بوستین (۱۲)، این نقشه می توانست برای مکان یابی QTL ها مورد استفاده قرار گیرد. مقایسه نقشه ژنتیکی تهیه شده در این مطالعه با نقشه های ارایه شده قبلی (۵، ۲۸ و ۲۶) نشان داد که در تمامی گروه های پیوستگی، فاصله بین نشانگرها متفاوت با نتایج سایر نقشه های موجود بود (شکل ۲۳-۳) از آنجاکه نقشه ژنتیکی بدست آمده، حاصل از یک تلاقی با والدین متفاوت با سایر نقشه ها می باشد، تغییر در فاصله بین نشانگرها منطقی به نظر می رسد.

¹ Segregation distortion² Inversion

برگ را در مرحله گیاهچه ای کنترل نمود. صبوری و بیبانی (۲۲) QTL های مرتبط با ارتفاع بوته، طول خوش را در این جمعیت و در تنش شوری روی کروموزوم ۳ و در فاصله ای دورتر از این ناحیه گزارش نمودند. در این ناحیه نیز آلل های افزایش دهنده ارتفاع خوش و بوته از والد طارم محلی در جهت افزایش تحمل به شوری عمل نمودند. با توجه به مکان یابی QTL مرتبط با افزایش محتوای کلروفیل در این ناحیه به نظر می رسد گیاهان دارای ارتفاع بوته و طول خوش بالاتر بتوانند میزان کلروفیل خود را تا مراحل رسیدگی در سطح بالایی نگه داشته و با درصد فتوسنتر بالاتر بتوانند نسبت به تنش شوری متتحمل شوند.

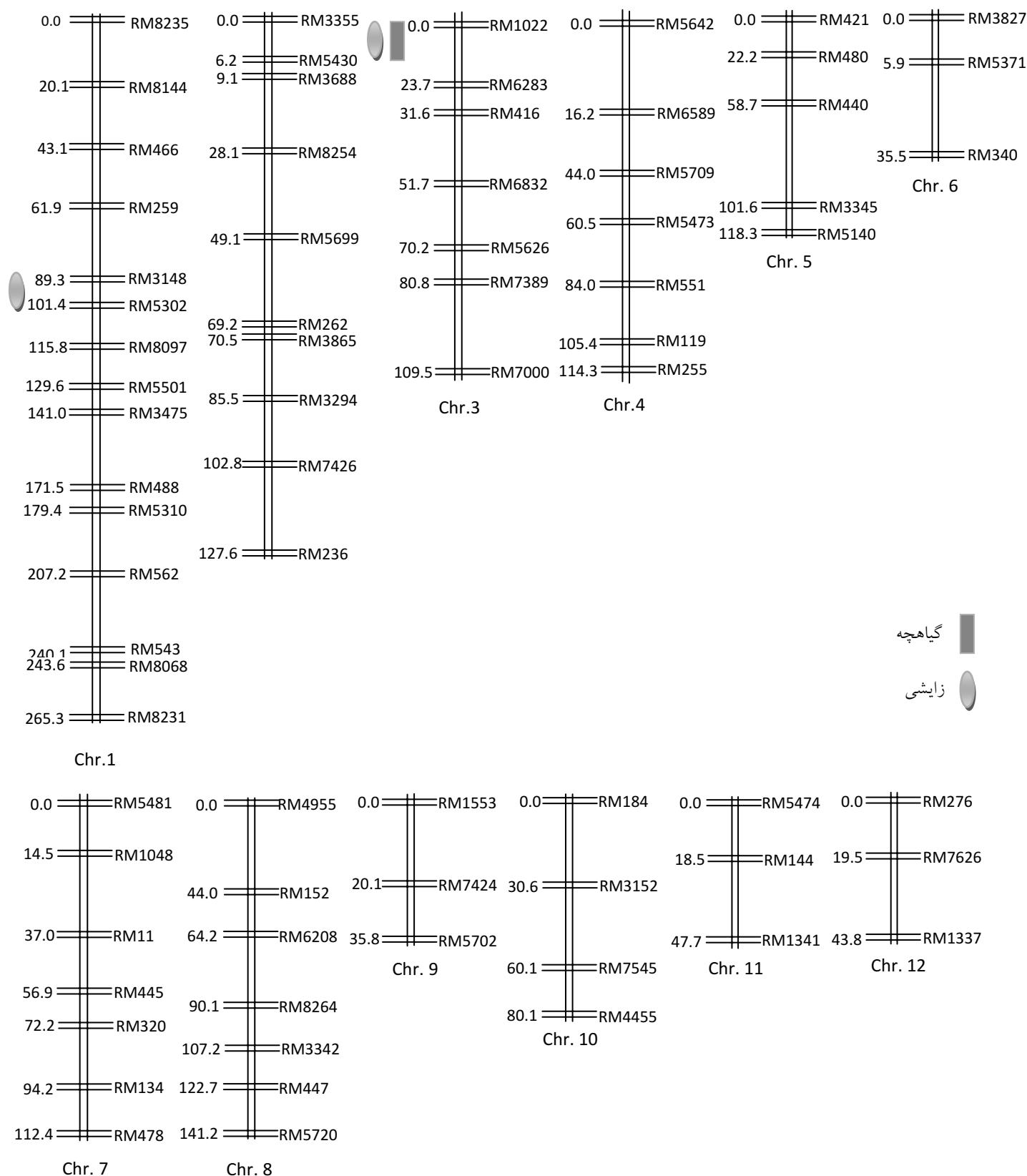
نتایج حاصل از مکان یابی محتوای کلروفیل برگ در مراحل گیاهچه و زایشی نشان داد که برخی از QTL های مرتبط با این صفت بسته مرحله رشدی اثر خود را بروز می دهند (QTL ریوی کروموزوم ۱) و برخی نیز در هر دو مرحله ثابت هستند (QTL های ریوی کروموزوم ۳). وجود همبستگی بین صفات می تواند به وسیله آثار پلیوتروفیپی یا پیوستگی شدید بین ژنهای کنترل کننده آنها توصیف شود. زیالو و همکاران (۳۱) نشان دادند که صفات همبسته اغلب به وسیله QTL هایی کنترل می شوند که در نواحی مشابهی بر روی کروموزوم ها قرار دارند. چنین نتایجی برای محتوای کلروفیل برگ و سایر صفات مکان یابی شده در این جمعیت در تنش شوری نیز مشاهده شد (۲۲، ۲۳ و ۲۶). ارتباط بین محتوای کلروفیل برگ در مراحل گیاهچه و زایشی در این مطالعه نیز معنی دار بود (0.373^{***}). از آنجا که محتوای کلروفیل برگ نقش مهمی در فعالیت های تنفسی به خصوص در شرایط تنش شوری دارد، نتایج حاصل از این آزمایش می تواند در انتخاب ژنتیک های برتر برای برنامه های انتخاب بر مبنای نشانگر و برنامه های هرمی کردن ژن ها مورد استفاده قرار گیرد.

بودند. صبوری و همکاران (۲۶) در این ناحیه یک QTL برای کد ژنوتیپی گزارش نمودند که آلل کاهش دهنده تحمل از والد خزر در جهت کاهش تحمل به شوری عمل نمود. همچنین آنها دیگری را در این فاصله ردیابی نمودند که آلل افزایش دهنده تحمل به شوری مرتبط با وزن خشک گیاهچه از والد طارم محلی تحمل گیاهچه را نسبت تنش شوری افزایش داد. QTL ردیابی شده در این مطالعه از نظر مکان ژنی با QTL های ردیابی شده برای محتوای سدیم qNA-3 و نسبت محتوای سدیم به پتاسیم (qNAK-3) یکسان و اثر افزایشی آلل های مرتبط با آنها از والد طارم محلی موجب افزایش تحمل به شوری در گیاهچه ها شد. همچنین در این ناحیه QTL های مرتبط با جذب سدیم، سطح سبز برگ، وزن تر و خشک ریشه و ساقه نیز ردیابی شد. کلیه QTL های ردیابی شده در این ناحیه ژنومی در جهت افزایش تحمل به شوری عمل نمودند و با توجه به وجود QTL مرتبط با محتوای کلروفیل در این مکان می توان هرمی کردن این QTL ها یکی از اهداف برنامه های اصلاحی مرتبط با افزایش تحمل به شوری در جمعیت حاضر در نظر گرفت.

مکان یابی فاصله ای مرکب برای محتوای کلروفیل برگ در مرحله زایشی یک QTL روی کروموزوم ۱ و با حد بحرانی $11/4$ نسبت درستنمایی شناسایی کرد، این QTL $10/56$ درصد از تغییرات محتوای کلروفیل را توجیه نمود. ساتو و همکاران (۲۷) QTL های کاهش دهنده محتوای کلروفیل را در شرایط تنش اشعه ماوراء بنفش روی کروموزوم ۲ ردیابی نمودند. نتایج نشان داد که یک QTL در ناحیه RM1022-RM6283 (qCLS-3) اثر نسبتاً بزرگی بر محتوای کلروفیل برگ در مرحله گیاهچه و در شرایط تنش شوری دارد. این QTL (qCLS-3) با نسبت درستنمایی $20/39$ درصد از تغییرات مربوط به محتوای کلروفیل

جدول ۱- QTL‌های شناسایی شده برای محتوای کلروفیل به روش مکان یابی فاصله‌ای و مکان یابی فاصله‌ای مرکب.

مرحله	QTL	کروموزوم	نشانگرهای مجاور	موقعیت	LR	اثر افزایشی	اثر غالیت	درجه غالیت	درصد واریانس
<u>مکان یابی فاصله‌ای</u>									
۳	qCLS-۳	گیاهچه	RM1022-RM6283	۸	۱۸/۷۱	-۱/۵۴	-۰/۰۵۲	-۰/۰۳۳	۱۱/۶۰
۳	qCLS-۳	زایشی	RM1022-RM6283	۱۸	۱۹/۱۳	۱/۳۳	-۱/۴۵	-۱/۰۹	۷
<u>مکان یابی فاصله‌ای مرکب</u>									
۳	qCLS-۳	گیاهچه	RM1022-RM6283	۴	۲۰/۳۹	-۱/۴۶	-۰/۰۵	-۰/۰۳۴	۱۴/۰۴
۱	qCLS-۱	زایشی	RM3148-RM5302	۹۷	۱۱/۴	۱/۰۹	-۱/۳۲	-۱/۲۱	۱۰/۵۶



شکل ۲- نقشه ژنتیکی و مکان یابی محتوای کلروفیل برگ تحت تنش شوری در مراحل گیاهچه و زایشی در تلاقي طارم محلی / خزر ♀

منابع

1. Akbar M, Gunawardena IE and Ponnampерuma FN (1986) Breeding for Soil Stresses. In: Progress in rainfed lowland rice. IRRI, Philippines. 263pp.
2. Basten CJ, Weir BS and Zeng ZB (2001) QTL Cartographer: a reference manual and tutorial for QTL mapping. North Carolina State University. USA. 163pp.
3. Bernstein L, Francois LE and Clark RA (1974) Interactive effects of salinity and fertility on yields of grains and vegetable. Agron. J. 66: 412-421.
4. Cha KW, Lee YJ, Koh HJ, Lee BM, Nam YW and Paek NC (2002) Isolation, characterization, and mapping of the stay green mutant in rice .TAG 104:526-532.
5. Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG and McCouch SR (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 95: 553-567.
6. Falconer DS, and Mackay FC (1996) Introduction to quantitative genetics. Longman, England.
7. Flowers TJ, Koyama ML, Flowers SA, Sudhakar C, Singh KP and Yeo AR (2000) QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. J. of Exp. Botany. 51: 91-106.
8. Gregorio GB, Senadhira D and Mendoza R (1997) Screening rice for salinity tolerance. IRRI. Dis. Paper No.22
9. Ishimaru K, Yano M, Aoki N, Ono K, Hirose T, Lin Y, Monna L, Sasaki T and Ohsugi R (2001) Toward the mapping of physiological and agronomic characters on a rice function map: QTL analysis and comparisons between QTLs and expressed sequence tags. Theor. Appl. Genet. 102:793-800
10. Jansen RC (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. Genetics 135: 205-211
11. Koyama ML, Levesley A, Koebner RMD, Flowers TJ, and Yeo AR (2001) Quantitative trait loci for component physiological trait determining salt tolerance in rice. Plant Physiol. 125:406-422.
12. Lander ES and Botstein R (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185-199.
13. Lee SY, Ahn YS, Cha DW, Yun MC, Lee JC, Ko KS, Lee N and Eun MY (2007) Mapping QTLs related to salinity tolerance of rice at the young seedling stage. Plant Breed. 126. 43-46.
14. Lin HX, Zhu MZ, Yano M, Gao J P, Liang ZW, Su WA, Hu XH, Ren ZH and Chao DY (2004) QTLs for Na and K uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. Theor. Appl. Genet. 108: 253-260.
15. Liu BH (1998) Statistical genomics, linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press, New York, USA. pp. 604.
16. McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, and Stein L (2002) Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.) DNA Res. 9: 199 - 207.
17. McCouch SR and Doerge RW (1995) QTL mapping in rice. Trends Genet. 11: 482-487.
18. Manly KF, and Olson JM (1999) Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QTX. Mammalian Genome 10: 327-334.
19. Sabouri H, Rezai A, Moumeni A, kavousi M (2007a) Investigation of genetic diversity of Iranian rice genotypes under salinity condition: compare means, sensitive and tolerance index. Proc. of 4th int. temperate rice conf. Novara. Italy. 25-28 June.
20. Sabouri H, Rezai A, Moumeni A, kavousi M (2007b) Investigation of genetic diversity of Iranian rice genotypes under salinity condition: multivariate analysis. Proc. of 4th int. temperate rice conf. Novara. Italy. 25-28 June.
21. Sabouri H, Rezai A, Moumeni A, kavousi M, Katouzi M (2007c) Study the variation of physiological and agronomical characters Iranian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars in seedling and vegetative stages under salinity condition. Proc. of 4th int. temperate rice conf. Novara. Italy. 25-28 June.
22. Sabouri H, Biabani A (2008) Toward the mapping of agronomic characters on a rice genetic map: QTL analysis under saline condition. Biotechnology (accepted, In press)
23. Sabouri H, and Sabouri A (2008). New evidence of QTLs attributed to salinity tolerance in rice. African Journal of Biotechnology (accepted, In press).
24. Sabouri H, Rezai A, Moumeni A (2008) Evaluation of Salt Tolerance in Iranian Landrace and Improved Rice Cultivars. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources: Isfahan University of Technology. (accepted, In Press).
25. Sabouri H, and Nahvi M (2009) Identification of Major and Minor Genes for Heading Date in *indica* × *indica* crosses of Rice (*Oryza Sativa* L.). International Journal of Plant Production (accepted, In press).
26. Sabouri H, Rezai A, Moumeni A, Kavousi M, Katouzi M, Sabouri A (2009) QTLs Mapping of Physiological Traits Related to Salt Tolerance at Young Seedling Rice (*Oryza sativa* L.). Biologia Plantarum (accepted, In press).
27. Saghi Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q and Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics. Proceeding of the National Academy of Sciences, USA. 91. 5466-5570.

28. Sato T, Ueda T, Fukuta Y, Kumagai T, and Yano M (2003) Mapping of quantitative trait loci associated with ultraviolet-B resistance in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 170:1003-1008
29. Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho YG, Ishii T and McCouch SR (2000) Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 697–712.
30. Teng S, Qiu N, Zeng D, Kunihiro Y, Fujimoto K, Huang D and Zhu L (2004) QTL analysis of leaf photoynthetic rate and related physiological traits in rice (*Oryza sativa* L.) *Euphytica*, 135:1-7
31. Wang B, Lan T, Wu WR, Li WM (2003) Mapping of QTLs controlling Chlorophyll content in rice. *Agriculture Since in China*. 30:1127-23.
32. Xiao J, Li J, Yuan L, and Tanksley SD (1996) Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from subspecific rice cross. *Theor. Appl. Genet.* 92: 230–244.
33. Yoshida S, Forno DA, Cock JH and Gomez KA (1976) Laboratory manual for physiological studies of rice. IRRI, Los Babos, Philippines.
34. Zeng ZB (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457–1468.
35. Zuo H, Xiao K, Dong Y, Xu J, Lu Z, Luo L and Mei H (2007) Molecular detection of quantitative trait loci for leaf chlorophyll content at different growth stage of rice (*Oryza sativa* L.) *Asian Journal of Plant Science*, 6(3):518-522
36. Zhao X, Wu T, Xie Y and Wu R (1989) Genome-specific respective sequence in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* 78: 201-209.