دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات
سال چهارم/ شماره اول/ ۱۳۹۳ (۶۸-۵۹)

مکان‌یابی QTLهای کنترل کننده تحمل به سرما در برنج

دینا کبریایی[۱]، علی اعلمی[۲*]، حبیب‌الله سمیع‌زاده لاهیجی[۳] و مهرزاد اله‌قلی‌پور[۴]

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، استادیار و دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ۴- استادیار پژوهش موسسه تحقیقات برنج کشور، رشت

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۱۳- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱۴)

چکیده

به منظور شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با تحمل به دماهای پایین در برنج، یک جمعیت F_2 متشکل از ۱۲۴ بوته حاصل از تلاقی لاین PR27137-CR153 (متحمل به سرما) و رقم دمسیاه (حساس به سرما) مورد ارزیابی قرار گرفت. نقشه پیوستگی با استفاده از ۲۰ نشانگر SSR و ۸۱ نشانگر چندشکل AFLP تشکیل شد و در مجموع ۳۱۱۱ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را با متوسط فاصله ۳۱/۶۷ سانتی‌مورگان تحت پوشش قرار داد. برای شناسایی QTLها از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب استفاده شد که در مجموع تعداد ۱۳ فاصله نشانگری واجد QTL برای ۴ صفت تحمل به پژمردگی (CIWT)، تحمل به نکروزه شدن (CINT)، تحمل به زرد شدن (CIYT) و تحمل به سرما (CT) مکان‌یابی شدند. از این تعداد، سه جایگاه QTL برای صفت CIWT روی کروموزوم‌های ۲، ۸ و ۱۲، پنج جایگاه QTL برای صفت CINT روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۳، ۱۰ و ۱۲، سه جایگاه QTL مربوط به صفت CIYT روی کروموزم‌های ۱، ۲ و ۸ و دو جایگاه QTL برای صفت CT روی کروموزوم‌های ۳ و ۱۲ مکان‌یابی شدند. در این تحقیق دو QTL بزرگ اثر *qCIWT12* و *qCINT12* روی کروموزوم ۱۲ و در مجاورت نشانگرهای RM7200 و E64-M59-5 شناسایی شدند که سهم قابل توجهی از واریانس فنوتیپی را بیان کردند.

واژه‌های کلیدی: برنج، سرما، مکان‌یابی ژن‌های کمی، نشانگرهای ریزماهواره

* نویسنده مسئول: ali_aalami@guilan.ac.ir; ali_aalami@yahoo.com

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین غلات به شمار می‌رود که در بخش عظیمی از قاره‌ی آسیا بیش از ۸۰ درصد کالری و ۷۵ درصد از پروتئین مصرفی مردم را تأمین می‌کند. سطح زیر کشت برنج در دنیا کمتر از گندم است اما مقدار تولید آن تقریباً برابر گندم بوده و غذای اصلی بیش از نیمی از مردم کره‌ی زمین را فراهم می‌کند (FAOSTAT data, 2010). این گیاه گرما دوست و مخصوص نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری است که در درجه حرارت ۳۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد مطلوبی دارد و معمولاً به حرارت کمتر از ۱۵ درجه حساس است به همین دلیل کاهش دما می‌تواند سبب اختلال در چرخه‌ی فتوسنتزی و خسارت به برنج شود (Yoshida, 1981).

سرما یکی از تنش‌های محیطی مهم است که رشد و تولید بسیاری از محصولات کشاورزی به خصوص برنج را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار داده است به طوری که بیش از ۱۵ میلیون هکتار از اراضی برنج کاری در جهان تحت تنش سرما قرار دارد که از این سطح، حدود ۷ میلیون هکتار در جنوب و جنوب شرقی آسیا قرارگرفته است (Sthapit *et al.*, 1995). در ایران نیز ۶۲ درصد از مساحت کشور تحت پوشش اقلیم‌های سرد و فرا سرد است و عملاً تولید اکثر محصولات کشاورزی را با محدودیت روبرو کرده است و در بعضی از سال‌ها نیز خسارات فراوانی را وارد می‌سازد (Khalili *et al.*, 1991).

تنوع گسترده و وجود ژنوتیپ‌های متحمل، زمینه مناسبی برای تحقیق در زمینه اصلاح ژنتیکی برنج فراهم نموده است. شناساییQTL ها و ژن‌های دخیل در سازوکار تحمل به سرما یکی از جنبه های مهم مطالعات ژنتیکی این گیاه است. آندیا و مکیل (Andaya and Mackill, 2003a) در بررسی صفات تحمل به سرما در برنج QTLهایی مهمی را شناسایی کردند. به عنوان نمونه برای صفت تحمل به پژمردگی در سرما (Cold-Induced Wilting Tolerance: CIWT) یک QTL روی کروموزوم ۱۲ شناسایی شد که حدود ۴۵/۶ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه می‌کرد. در مطالعه ای دیگر لاین های نوترکیب حاصل از تلاقی آسومینوری (ژاپونیکا) و IR24 (هندی) در مرحله‌ی جوانه‌زنی یک QTL بزرگ اثر روی کروموزوم شماره یک برای صفت درصد جوانه زنی در شرایط سرما شناسایی شد که ۲۴/۵۱ درصد از تغییرات فنوتیپی را با LOD معادل ۴/۱ توجیه می کرد (Jiang *et al.*, 2008). همچنین در یک جمعیت دابل هاپلوئید حاصل از تلاقی ۲ رقم ژاپونیکا و ایندیکا، برای تحمل به سرما، تعدادی QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۴ مشخص شد که در بین آن‌ها یک QTL روی کروموزوم ۱، به نام qSCT-1، ۱۲/۱ درصد از تنوع فنوتیپی را برای صفت تحمل به سرما توجیه نمود و بین دو نشانگر RG233-RG345 قرار داشت (Qian *et al.*, 2000).

همچنین مطالعه دیگری که روی جمعیت F_3 به روش بالک و نشانگر SNP حاصل از توالی‌یابی صورت گرفت، شش QTL برای تحمل سرما در مرحله نهالچه‌ای برنج روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۵، ۸ و ۱۰ شناسایی شدند که در QTLهایی که روی کروموزوم ۱، ۲ و ۸ قرار داشتند قبلاً در مطالعات قبلی شناسایی شده بودند (Yang *et al.*, 2013). در تحقیقی دیگر که روی ۸۰ اینبرد لاین نوترکیب برای مکان‌یابی صفت تحمل به سرما در برنج در مرحله‌ی نهالچه‌ای بر اساس تغییر در صفت سبزینه‌گی انجام شد تعداد چهار QTL برای این صفت مرتبط با تحمل به سرما شناسایی شد که بین ۵ تا ۱۶ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه می‌کرد (Park *et al.*, 2013).

وقوع سرما که به طور معمول در استان‌های شمالی کشور در اوایل بهار رخ می‌دهد، می‌تواند کشت به موقع ارقام برنج را با مشکل مواجه نماید. این مسئله باعث می‌شود هر سال زارعین برنج کار خسارت زیادی از بابت سرمای بهاره در خزانه متحمل شوند و گاهی مبادرت به تهیه خزانه و کشت مجدد نمایند. از طرف دیگر کشت مجدد باعث تأخیر در زمان کشت و در نتیجه برخورد با بارندگی‌های شدید و خسارت ناشی از کرم ساقه خوار برنج در اواخر تابستان شده که از این بابت نیز شالی‌کاران هرساله خسارت زیادی متحمل می‌شوند ضمن اینکه فرصت کافی برای کشت دوم نیز ممکن است میسر نشود. بر این اساس شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات مرتبط به تحمل به سرما و اصلاح ژنتیکی برنج به منظور دستیابی به ارقام متحمل با توجه به شرایط آب و هوایی در استان‌های شمالی کشور حایز اهمیت است. از این‌رو این تحقیق با هدف شناسایی نشانگرهای مرتبط و همچنین مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط به تحمل به

سرما در یک جمعیت F_2 حاصل از تلاقی لاین PR27137-CR153 و رقم محلی و مرغوب دمسیاه با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR و AFLP طراحی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۱۲۴ بوته تصادفی F_2 حاصل از تلاقی ۲ والد دمسیاه (والد حساس به سرما) و PR27137-CR153 (والد مقاوم به سرما) بود (Allahgholipour, 2006) که در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۹ در مزرعه‌ی آزمایشی موسسه تحقیقات برنج شمال کشور واقع در ۴۹ درجه و ۳۶ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۱۶ درجه عرض شمالی کاشته شد. دمسیاه، واریته محلی، خوش کیفیت، با عطر و طعم مطلوب و مورد پسند ذائقه ایرانیان و حساس به سرما است و ژنوتیپ PR27137-CR153، واریته معرفی شده از سوی فیلیپین و متحمل به سرما است (Allahgholipour, 2006).

ارزیابی فنوتیپی: بر اساس دستورالعمل موسسه برنج کشور واقع در رشت، بذور خانواده های F_3 به صورت جداگانه در داخل پتری‌هایی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد روز/شب در داخل اتاقک رشد سبز شدند و پس از جوانه‌زنی و سبز شدن در داخل گلدان‌هایی کوچک کاشته شدند و به مدت ۱۴ روز پس از جوانه‌زنی، گلدان‌ها به داخل اطاقک رشد برای ارزیابی صفات تحمل به سرما در رژیم دمایی ۱۱ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند (دمای اطاقک رشد در روز/شب ۱۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و میزان رطوبت ۵±۹۰ درصد و میزان تشعشع ۱۲۳۰۰ لوکس بود) به محض مشاهده اولین علائم پژمردگی اقدام به اندازه‌گیری صفت تحمل به پژمردگی (CIWT) شد و بدین منظور در پایان ۸ روز ابتدایی، و ظهور علائم پژمردگی بر طبق استاندارد ایری (Standard Evaluation System for Rice, 2002) به بوته‌ها از مقدار ۱ تا ۹ به ترتیب از مقاوم تا حساس داده شد و به همین صورت پس از شروع علائم نکروزه شدن، صفت تحمل به نکروزه شدن (Cold-Induced Necrosis Tolerance: CINT) نمره‌دهی شد و بعد از اتمام ۱۸ روز و مشاهده‌ی علامت زرد شدن روی برگ‌ها شاخص تحمل به زرد شدن (Cold-Induced Yellowing Tolerance: CIYT) اندازه‌گیری شد و در نهایت در انتهای ۲۰ روز بر طبق ارتفاع و میزان رشد و بنیه گیاه به شاخص تحمل به سرما (Cold Tolerance: CT) مقادیر مربوطه اختصاص داده شد. کلیه زمان‌ها، روش‌های ارزیابی و نمره‌دهی بر اساس دستورالعمل استاندارد ایری انجام شد، کلیه ارزیابی‌ها روی ۵ بوته در هر تکرار (سه تکرار) برای هر کدام از خانواده های F_3 انجام شد.

ارزیابی ژنوتیپی: DNA ژنومی والدین و بوته‌های F_2 به روش CTAB (Rogers and Bandich, 1985) از برگ‌های جوان گیاهچه‌های برنج در مرحله حداکثر پنجه-زنی استخراج شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA به روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد تعیین شد. از نمونه‌های DNA پس از تعیین غلظت، نمونه‌هایی با غلظت یکسان ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تهیه شدند و برای واکنش زنجیره‌ای پلی مراز استفاده شدند. جهت تهیه‌ی نقشه‌ی ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل-کننده‌ی صفات مورد نظر، تعداد ۴۵ نشانگر ریزماهواره که دارای پراکندگی مناسب در کل ژنوم بودند، انتخاب و چندشکلی آن‌ها روی والدین مورد ارزیابی قرار گرفت که از این تعداد، ۲۰ نشانگر الگوی نواربندی متفاوتی بین دو والد نشان دادند. برای تهیه‌ی محلول PCR به حجم ۱۰ میکرولیتر، از ۲ میکرولیتر DNA با غلظت نهایی ۱۰ نانوگرم، ۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر، ۰/۶ میکرولیتر dNTP ۲ میلی مولار، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰ میکرومول، ۰/۴۸ میکرولیترکلرید منیزیوم ۵۰ میلی مولار و ۰/۱۲ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase استفاده شد. برنامه تکثیر به صورت ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه برای واسرشته سازی اولیه، و متعاقب آن به روش Touch down PCR، مرحله‌ی اول شامل ۱۲ چرخه با کاهش تدریجی دمای اتصال و مرحله‌ی دوم شامل ۲۵ چرخه با مشخصات واسرشته سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ °C، اتصال آغازگرها به قطعات DNA با دمای مناسب معرفی شده در پایگاه اینترنتی گرامینه (http://www.gramene.org/)، بسط قطعات در ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. در چرخه آخر مرحله بسط در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. جهت اشباع نقشه ایجاد شده از نشانگر AFLP نیز استفاده شد که برای این منظور ابتدا هر دو والد با استفاده از تعدادی ترکیب آغازگری موجود، مورد تکثیر قرار گرفتند و سپس با توجه به نتایج از ۷ جفت آغازگر

جدول ۱- ارزش‌های فنوتیپی صفات مورد مطالعه در والدین و جمعیت F_3

Table 1. Phenotypic values of studied traits in the parents and F_3 population

Traits	صفات	لاین PR PR Line (m ± Sx)	دمسیاه Domsiah (m ± Sx)	جمعیت F_3 F_3 population (m ± Sx)	مقدار t t-value (P_1-P_2)	کشیدگی Kurtosis	چولگی Skewness
Cold induced necrosis tolerance	تحمل به نکروزه شدن	1±0.1	7.1±0.1	6.46±0.6	8.6**	-1.02	0.21
Cold induced yellowing tolerance	تحمل به زرد شدن	1±0.2	6.9±0.2	5.11±0.6	4.3**	-0.94	0.15
Cold induced wilting tolerance	تحمل به پژمردگی	1±0.1	7.9±0.2	5.02±0.9	7.8**	-1.2	0.23
Cold tolerance	تحمل به سرما	1±0.1	6.7±0.2	3.57±0.4	6.4**	-1.0	0.05

** Significant at 1% probability level. **معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

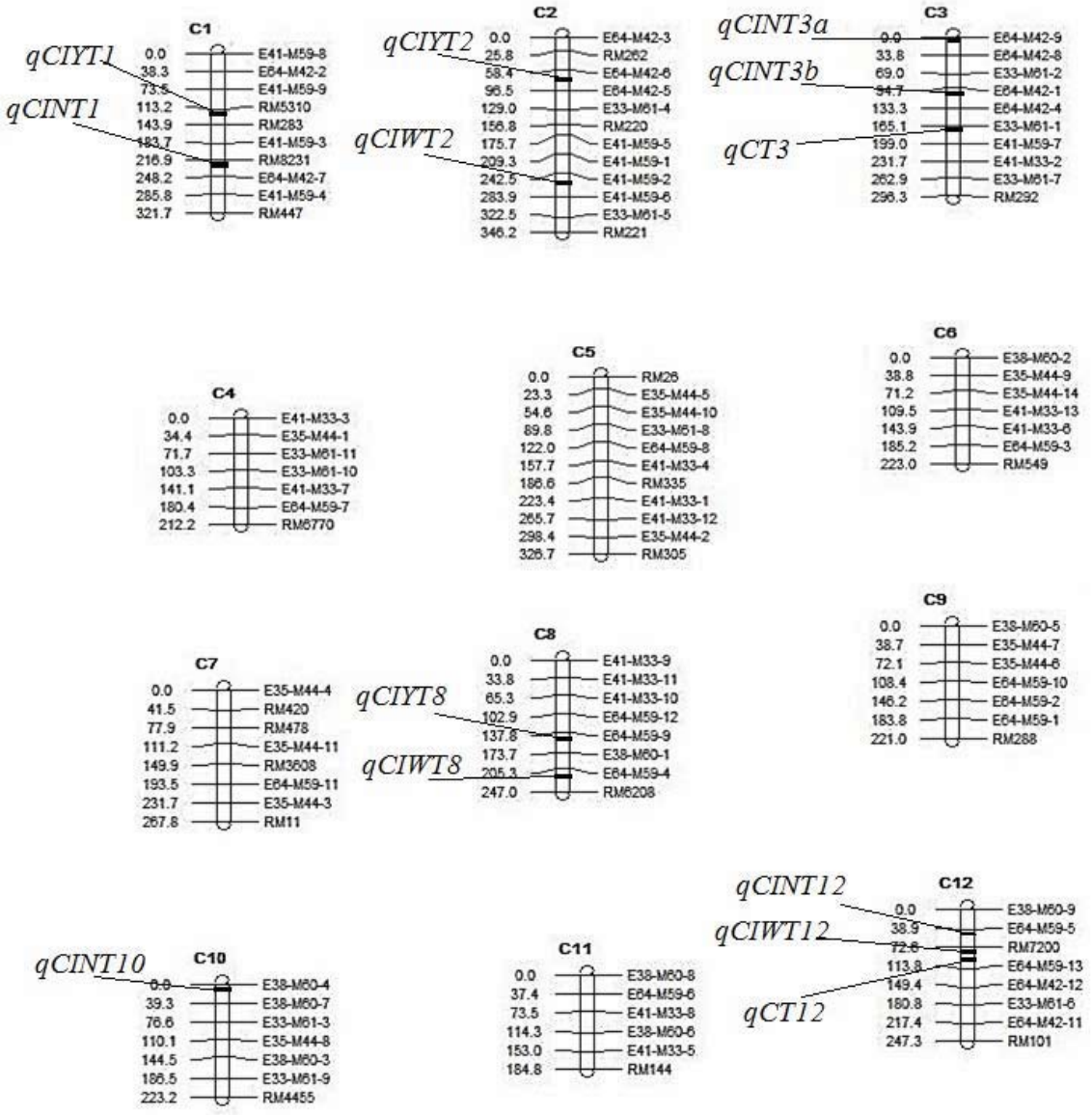
AFLP برای بررسی جمعیت F_2 استفاده شدند. روش AFLP مطابق روش وس و همکاران (Vos *et al*., 1995) انجام شد. تفکیک و آشکارسازی فراورده‌های تکثیر روی ژل‌های پلی آکریل آمید ۵ درصد و رنگ آمیزی نیترات نقره (Creste *et al*.,2001) یا آگاروز ۳ درصد و اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

تجزیه آماری و مکان‌یابی QTL ها: بعد از تعیین فنوتیپ کلیه ژنوتیپ‌ها، برای محاسبه توزیع فراوانی صفات از نرم افزار Excel و محاسبه ضریب همبستگی فنوتیپی پیرسون از نرم افزار SPSS (SPSS, 2010) استفاده شد. تهیه نقشه پیوستگی به کمک نرم افزار MapMaker (Lincoln *et al.* 1993)، و تجزیه QTL با استفاده از Win QTL Cartogerapher انجام گرفت (Basten *et al.*, 2001). به منظور شناسایی QTL های کنترل کننده صفات مورد مطالعه از روش مکان یابی فاصله‌ای (Interval mapping) (Lander and Botstein, 1989) و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (Composite interval mapping) (Zeng, 1994) استفاده شد. برای نام‌گذاری QTLها نیز از روش نام‌گذاری استاندارد (McCouch and CGSNL, Committee on Gene Symbolization, Nomenclature and Linkage, 2008) استفاده شد.

نتایج و بحث

توزیع فراوانی صفات: ارزش‌های فنوتیپی والدین شامل دمسیاه و PR27137-CR153 و خانواده های F_3 حاصل از تلاقی آن‌ها برای صفات مرتبط با تحمل به سرما (CIWT، CIYT، CINT و CT)، در جدول ۱ ارایه شده است. مقایسه مقادیر خصوصیات فنوتیپی برای صفات مذکور بین والدین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد که نشان دهنده اختلاف معنی‌دار دو والد برای صفت تحمل به سرما است. همچنین نتایج آزمون چولگی نشان داد جمعیت مورد بررسی دارای توزیع فنوتیپی متقارن و پیوسته است که البته برای این صفات اندکی کشیدگی به صورت منفی مشاهده می‌شود (جدول ۱). نتایج آزمون همبستگی نشان داد صفت CIWT با CT ($p< ۰/۰۱$، $r=۰/۶۷$) و صفات CIYT با CINT ($p< ۰/۰۱$، $r=۰/۵۸$) دارای همبستگی مثبت معنی‌داری با یکدیگر هستند. آندیا و ماکیل (Andaya and Mackill, 2003a) در بررسی جمعیت لاین‌های نوترکیب برای تحمل به سرما در برنج، وجود همبستگی را بین صفات CINT و CIWT و صفات CT و CIWT مشاهده کردند. همچنین بین دو صفت CINT و CIWT نیز همبستگی متوسطی وجود داشت.

تجزیه مولکولی: از مجموع ۴۵ نشانگر ریزماهواره، تعداد ۲۰ نشانگر و از ۲۰ ترکیب آغازگرهای اختصاصی AFLP، ۷ ترکیب پرایمری با تولید ۸۱ باند چندشکل بین والدین مشاهده شد که در مجموع ۱۰۱ جایگاه چندشکل ایجاد و برای تهیه نقشه پیوستگی مورد استفاده قرار گرفت. نشانگرها در ۱۲ گروه پیوستگی قرار گرفتند که در مجموع، نقشه حاصل ۳۱۱۱/۵ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را تحت پوشش قرار داد و فاصله هر دو نشانگر مجاور از یکدیگر به طور متوسط ۳۱/۶۷ سانتی مورگان برآورد شد (شکل ۱).



شکل ۱- QTLهای شناسایی شده برای صفات تحمل به سرما به روش CIM در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی ارقام دمسیاه و لاین PR27137-CR153 .

Figure 1. QTLs identified for cold tolerance characteristics using CIM method in F_2 population derived from a cross between PR27137-CR153 and Domsiah.

در مجموع ۱۳ فاصله نشانگری واجد QTL برای هر ۴ صفت مورد بررسی، مکان‌یابی شد. از این تعداد، سه جایگاه QTL برای صفت تحمل به پژمردگی (CIWT)، پنج جایگاه QTL برای صفت تحمل به نکروزه شدن (CINT)، سه جایگاه QTL مربوط به صفت تحمل به زرد شدن (CIYT) و دو جایگاه QTL برای صفت تحمل به سرما (CT) مکان یابی شد (جدول ۲ و شکل ۱).

برای صفت CIWT، سه QTL مکان‌یابی شد که روی کروموزوم‌های ۲، ۸ و ۱۲ قرار داشتند. QTL بزرگ اثر *qCIWT12*، روی کروموزوم ۱۲ در فاصله نشانگری

RM7200-E64-M59-13 مکان‌یابی شد و با LOD ۹/۳۳، مقدار ۳۲/۳۵ درصد از کل واریانس فنوتیپی صفت مذکور را توجیه نمود (جدول ۲ و شکل ۱). اثر افزایشی این QTL برابر با ۰/۱۷- و اثر غالبیت آن ۰/۴۶ بود. درجه غالبیت آن نیز برابر ۲/۷ برآورد شد. دومین QTL به نام *qCIWT2*، روی کروموزوم ۲ در فاصله نشانگری E41-M59-2-E41-M59-6 مکان‌یابی شد و با LOD ۵/۷۴ و مقدار ۱۱/۴۷ درصد واریانس فنوتیپی، را توجیه نمود. اثر افزایشی این QTL برابر با ۰/۱۳- و اثر غالبیت آن ۰/۴۴ بود. درجه غالبیت آن نیز برابر با ۳/۳۸ برآورد شد. آندیا و ماکیل (Andaya and Mackill, 2003a) ۱۹۱ لاین اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی رقم متحمل به سرما (M-202) و رقم حساس به سرما (IR50) برای صفات متحمل به سرما در مرحله‌ی رویشی در شرایط استرس سرما در دمای ۹ درجه سانتی‌گراد به وسیله ۱۸۱ نشانگر ریز ماهواره ارزیابی و QTLهای پاسخ‌گو به تنش سرما را روی کروموزوم‌های ۱، ۴، ۶، ۸، ۱۰،۱۱ و ۱۲ را مکان یابی نمودند. آن‌ها پنج QTL برای CIWT روی کروموزوم‌های ۴، ۶، ۸، ۱۱ و ۱۲ با LOD ۴/۷۹، ۳/۵۴، ۵/۲۹، ۳/۸۱ و ۲۰/۳۴ شناسایی کردند که ۱۱/۵، ۸/۷، ۱۲/۷، ۹/۴ و ۴۰/۶ درصد از کل واریانس فنوتیپی را کنترل می‌کرد. نکته شایان توجه اینکه QTL مکان‌یابی شده روی کروموزوم ۱۲ در مطالعه آندیا و ماکیل (Andaya and Mackill, 2003a) نیز بزرگ اثر و ۴۱ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه می‌نمود که با نتایج تحقیق حاضر هم-خوانی داشت.

برای صفت CINT، پنج QTL مکان‌یابی شد که روی کروموزوم‌های ۱، ۳ (دو QTL)، ۱۰ و ۱۲ قرار داشتند. QTL بزرگ اثر *qCINT12*، مجدداً روی کروموزوم ۱۲ در فاصله نشانگری E64-M59-5-RM7200 مکان‌یابی شد که با LOD ۲/۵۴، مقدار ۲۳/۲۳ درصد از کل واریانس فنوتیپی صفت مذکور را توجیه نمود. اثر افزایشی این QTL برابر با ۰/۱۳ و اثر غالبیت آن ۰/۳۷ بود (جدول ۲ و شکل ۱). درجه غالبیت آن نیز برابر ۲/۸۴ برآورد شد. دومین QTL *qCINT10*، روی کروموزوم ۱۰ با LOD ۳/۶ در فاصله نشانگری E38-M60-4-E38-M60-7 حدود ۱۶/۱۶ درصد از تغییرات این صفت را توجیه نمود و با اثر افزایشی ۰/۱۵- و اثر غالبیت ۰/۱۹- برآورد شد که در این حالت درجه غالبیت ۱/۲- به دست آمد. در مطالعه آندیا و ماکیل (Andaya and Mackill, 2003a) برای صفت CINT سه QTL روی کروموزوم‌های ۸، ۱۱ و ۱۲ مکان‌یابی شد که به ترتیب دارای LODهای ۴/۴۱، ۴/۷۷، ۱۸/۵۱ و ۱۲/۷، ۱۳/۰ و ۴۱/۷ درصد از تغییرات این صفت را توجیه می‌کردند. موقعیت *CIWT12* و *CINT12* در تحقیق حاضر و مطالعه آندیا و ماکیل (Andaya and Mackill, 2003a) هر دو در مجاورت یکدیگر و روی بازوی کوچک کروموزوم نزدیک سانترومر مشخص شد.

برای صفت CIYT، سه QTL مکان‌یابی شد که روی کروموزوم‌های ۱، ۲ و ۸ قرار داشتند. QTL بزرگ اثر *qCIYT2* روی کروموزوم ۲ در فاصله نشانگری E64-M42-6-E64-M42-9 مکان‌یابی شد و با LOD ۳/۷ و مقدار ۱۶/۷۳ درصد واریانس فنوتیپی، را توجیه نمود (جدول ۲ و شکل ۱). اثر افزایشی این QTL برابر با ۰/۱۶-، اثر غالبیت آن ۰/۳۴ و درجه غالبیت آن نیز برابر با ۲/۱۲ برآورد شد. همچنین QTL *qCIYT8* روی کروموزوم ۸ با LOD ۴/۶۴ در فاصله نشانگری E64-M59-9-E38-M60-1 شناسایی شد که ۱۲/۰۴ درصد از تغییرات این صفت را بیان می‌کرد. اثر افزایشی این QTL ۰/۱۴ و اثر غالبیت آن ۰/۲۶- برآورد شد و میزان درجه غالبیت ۱/۸۵- به دست آمد. در مطالعه‌ی آندیا و ماکیل (Andaya and Mackill, 2003a)، برای صفت CIYT روی کروموزم ۴ تنها یک QTL شناسایی شد که در فاصله نشانگری RM241-RM317 قرار گرفت و با LOD ۵/۳۰ توانست ۱۴/۲ درصد از تغییرات این صفت را توجیه کند. از این‌رو در تحقیق حاضر QTL های جدیدی برای این صفت شناسایی شد.

برای صفت CT، دو QTL مکان‌یابی شد که روی کروموزوم‌های ۳ و ۱۲ قرار داشتند. *qCT3*، روی کروموزوم ۳ در فاصله نشانگری E33-M61-1-E41-M59-7 مکان‌یابی شد که با LOD ۳/۰۹، مقدار ۸/۷۶ درصد از کل واریانس فنوتیپی صفت مذکور را توجیه نمود (جدول ۲ و شکل ۱). اثر افزایشی این QTL برابر با ۰/۱۰۷ و اثر غالبیت آن ۰/۱۷ بود. درجه‌ی غالبیت آن نیز برابر ۱/۵۸ برآورد شد. دومین QTL مکان‌یابی شده *qCT12*، روی کروموزوم ۱۲ در فاصله نشانگری RM7200-E64-M59-13 مکان‌یابی شد که با LOD ۲/۶۲، مقدار ۹/۷۸ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کرد. آندیا و ماکیل (Andaya and Mackill, 2003a)،

جدول ۲- موقعیت و مشخصات نشانگرهای پیوسته با QTLهای کنترل کننده صفات مرتبط با تحمل به سرما در جمعیت حاصل از تلاقی دمسیاه و لاین PR27137-CR153

Table 2. Position and characteristics of linked markers with QTLs controlling traits related to cold tolerance in the population derived from cross between Domsiah and PR27137-CR153

Traits	صفت	QTLs	نشانگرهای مجاور Flanking markers	موقعیت QTLs QTLs position	فاصله از نشانگر مجاور Distance from Flanking markers(CM)	کروموزوم Chromosome	LOD	اثر افزایشی Additive effect	اثرغالبیت Dominant effect	اثرQTL QTL effect(%)
Cold tolerance	تحمل به سرما	*qCT3*	E33-M61-1-E41-M59-7	168.3	4.3	3	3.09	0.107	0.17	8.76
		qCT12	RM7200-E64-M59-13	85.3	18.1	12	2.62	0.104	-0.24	9.78
Cold induced necrosis tolerance	تحمل به نکروزه شدن	*qCINT1*	E41-M59-3-RM8231	216.6	3.1	1	2.59	0.085	0.21	5.75
		qCINT3a	E64-M42-9-E64-M42-8	5.26	2.6	3	2.95	-0.019	0.23	2.7
		qCINT3b	E64-M42-1-E64-M42-4	98.4	12	3	2.6	-.012	0.37	11.63
		qCINT10	E38-M60-4-E38-M60-7	9.21	8	10	3.6	-0.15	-0.19	16.16
		qCINT12	E64-M59-5-RM7200	40.31	5.3	12	2.54	0.13	0.37	23.23
Cold induced wilting tolerance	تحمل به پژمردگی	*qCIWT2*	E41-M59-2-E41-M59-6	251.29	16.1	2	5.74	-0.13	0.44	11.47
		qCIWT8	E64-M59-4-RM6208	233.4	10.6	8	5.12	-0.015	0.44	1.4
		qCIWT12	RM7200-E64-M59-13	75.45	6.6	12	9.33	-0.17	0.46	32.35
Cold induced yellowing tolerance	تحمل به زرد شدن	*qCIYT1*	RM5310-RM283	113.45	4.9	1	2.43	0.083	-0.14	8.43
		qCIYT2	E64-M42-6-E64-M42-5	71.67	16.9	2	3.7	-0.16	0.34	16.73
		qCIYT8	E64-M59-9-E38-M60-1	149.54	9.9	8	4.64	-0.14	-0.26	12.04

برای صفت CT، QTLهایی را روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ مکان‌یابی کردند که به ترتیب دارای LOD ۳/۵۳، ۵/۲۸، ۸/۳۶، ۶/۰۱، ۵/۶۸ و ۳/۹۸ بودند. شناسایی QTL بزرگ اثر برای صفات CIWT، CINT و CIYT به عنوان عوامل موثر در تحمل به سرما در مطالعات دیگر نیز تایید شده‌اند. آندیا و ماکیل (Andaya and Mackill, 2003b) جمعیت حاصل از تلاقی رقم متحمل به سرما (M-202) و رقم حساس به سرما (IR50) را در مرحله تشکیل خوشه که حساس‌ترین مرحله سرما برای گیاه برنج است را ارزیابی و مجدداً روی کروموزم شماره ۱۲ در مجاورت سانترمر یک QTL با LOD برابر ۳/۹ تشخیص داند. بر همین اساس آندیا و تیا (Andaya and Tai, 2006) qCTS12 را به عنوان یک QTL اصلی در تحمل سرما در مرحله رویشی برنج به وسیله اشباع بازوی کوچک کروموزوم شماره ۱۲ برای مکان یابی دقیق مورد ارزیابی قرار دادند و نشان دادند RM7003 نزدیک‌ترین نشانگر SSR به این QTL است. باره و همکاران (Baruah *et al.*, 2009) در بررسی QTL های پاسخگو به تنش سرما در جمعیت حاصل تلاقی یک رقم ژاپنی با برنج وحشی *Oryza rufipogon* وجود QTL پاسخگو به سرما را در کروموزوم شماره ۱۲ شناسایی نمودند.

با توجه به اهمیت و ضرورت اصلاح برنج برای تحمل به سرما به واسطه شرایط آب و هوایی مناطق کشت این گیاه در کشور، این تحقیق به عنوان اولین مطالعه در زمینه مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده تحمل به سرما در برنج صورت گرفت. به این ترتیب، نتایج حاضر می‌تواند مقدمه‌ای برای ادامه این پژوهش یا پژوهش‌های مشابه با استفاده از تعداد نشانگر بیشتر و توسعه جمعیت به سمت لاین‌های نوترکیب خالص (RIL) یا لاین‌های خویشاوند نزدیک (NIL) برای ارزیابی‌های دقیق‌تر باشد. شناسایی دو QTL بزرگ اثر *CIWT12* و *CINT12* روی کروموزوم ۱۲ که با LOD بالا، سهم قابل توجهی از واریانس فنوتیپی تحمل به سرما را توجیه کردند، پس از تایید در نسل‌های پیشرفته‌تر، می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی با هدف افزایش تحمل به سرما مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، پس از نقشه‌یابی دقیق این ناحیه می‌توان نسبت به همسانه‌سازی و توالی‌یابی آن اقدام و برای شناسایی ژن‌های تأثیرگذار در تحمل به سرما با هدف اصلاح مولکولی ارقام برنج استفاده نمود. بی شک شناسایی نشانگرهای پیوسته با QTLهای بزرگ اثر برای تحمل به سرما می‌توانند در برنامه‌های گزینش به عنوان معیار انتخاب سبب تسریع برنامه‌های به‌نژادی برای این صفت باشند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت و پرسنل موسسه تحقیقات برنج کشور که نهایت همکاری را در اجرای این تحقیق داشتند، سپاسگزاری می‌شود. از حوزه پژوهشی دانشگاه گیلان به خاطر تأمین هزینه‌های مربوطه و از ریاست دانشکده علوم کشاورزی به خاطر فراهم نمودن تجهیزات آزمایشگاهی آزمایشگاه‌های ژنومیکس و بیوتکنولوژی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

Allahgholipour, M. 2006. Evaluation and selection of low-temperature tolerant genotypes in rice segregating population. Final Report of Research Project. Rice Research Institute of Iran. (In Persian).

Andaya, V. C. and Tai, T. H. 2006. Fine mapping of the *qCTS12* locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. **Theoretical and Applied Genetics** 113: 467-475.

Andaya, V. C. and Mackill, D. J. 2003a. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. **Experimental Botany** 54: 2579-2585.

Andaya, V. C. and Mackill, D. J. 2003b. QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a *japonica*3 *indica* cross. **Theoretical and Applied Genetics** 106:1084-1090.

Baruah, A. R., Ishigo-Oka, N., Adachi, M., Oguma, Y., Tokizono, Y., Onishi, K. and Sano, Y. 2009. Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. **Euphytica** 165: 459-470.

Basten, C. J., Weir, B. S. and Zeng, Z. B. 2001. QTL cartographer, version 1.15. Department of statistics, North Carolina state university. Raleigh, NC. USA.

Creste, S., Tulmann Neto, A. and Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter** 19: 299-306.

FAO. 2010. FAO Stat, Agriculture and Food Trade. Retrieved June 10, 2012, from www.faostat.fao.org.

Jiang, L., Xun, M., Wang, J. and Wan, J. 2008. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombination inbred lines. **Journal of Cereal Science** 48: 173-179.

Khalili, A., Hajam, S. and Irannejad, P. 1991. The comprehensive water country project (Climate Knowing of Iran- Climatic divisions). Ministry of Energy Publication. pp: 274. (In Persian).

Lander, E. and Botstein, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** 121: 185-199.

Lincoln, S. E., Daly, M. J., and Lander, E. S. 1993. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP Version 3.0: A tutorial and reference manual. Third eds. A Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report, Whitehead Institute, Cambridge, MA**.**

McCouch, S. R. and CGSNL. 2008. Gene nomenclature system for rice. **Rice** 1: 72-84.

Park, I. K., Oh, C. S., Kim, D. M., Yeo, S. M. and Ahn, S. N. 2013. QTL mapping of cold tolerance at the seedling stage using introgression lines derived from an inter sub specific cross in rice. **Plant Breeding and Biotechnology** 1: 1-8.

Qian, Q., Dali, Z., Ping, H., Xianwu, Z., Ying, C. and Lihuang, Z. 2000. QTL analysis of the rice seedling cold tolerance in a double haploid population derived from anther culture of a hybrid between indica and japonica rice. **Chinese Science Bulletin** 45: 448-453.

Rogers, S. O. and Bandich, A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular and Biology** 5: 69-76.

SES. 2002. Standard Evaluation System for Rice. Manila, Philippines: International Rice Research Institute.

SPSS. 2010. IBM SPSS statistics 19 core system user's guide. SPSS Inc., IBM Company Headquarters.

Sthapit, B. R., Witcombe, J. R., and Wilson, J. M. 1995. Methods of selection for chilling tolerance in Nepalese rice by chlorophyll fluorescence analysis. **Crop Science** 35: 90-94.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** 23: 4407-4414.

Yang, Z., Huang, D., Tang, W., Zheng, Y., Liang, K., Cutler, A. J., and Wu, W. 2013. Mapping of quantitative trait Loci underlying cold tolerance in rice seedlings via high-throughput sequencing of pooled extremes. **PloS ONE** 8 (7): e68433.

Yoshida, S. 1981. Fundamentals of rice crop science. International Rice Research Institute.

Zeng, Z. B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics** 136: 1457-1468.

Mapping of QTLs controlling cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)

Dina Kebriyaee[1], Ali Aalami[2*], Habibollah Samizadeh[3] and Mehrzad Allahgholipour[4]

1, 2 and 3. Former Graduate Student of Plant Breeding, Assist. Prof. and Assoc. Prof., respectively, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan,
4. Research Assist. Prof., Rice Research Institute of Iran, Rasht, Iran

(Received: August 4, 2013- Accepted: February 3, 2014)

Abstract

In this research, 124 individuals of an F_2 population derived from a cross between Domsiah variety (cold susceptible) and PR27137-CR153 line (cold resistant) were evaluated to identify the QTLs controlling cold tolerance in rice. Linkage map were established using 20 polymorphic SSRs and 81 AFLP markers which totally covered 3111 cM of the rice genome with an average distance of 31.67 cM. Composite interval mapping was used to determine the association between markers and traits that overall 13 QTLs were found for cold induced wilting tolerance (CIWT), cold induced necrosis tolerance (CINT), cold induced yellowing tolerance (CIYT) and cold tolerance (CT) traits. Three QTLs on chromosomes 2, 8 and 12 for CIWT, 5 QTLs on chromosomes 1, 3, 3, 10 and 12 for CINT, 3 QTLs on chromosomes 1, 2 and 8 for CIYT and 2 QTLs on chromosomes 3 and 12 for CT were mapped. Two major QTLs, *qCIWT12* and *qCINT12* on chromosome 12 revealed a significant contribution of phenotypic variance and also markers RM7200 and E64-M59-5 were nearly two QTLs.

Keywords: Cold, Microsatellite markers, Quantitative trait mapping, Rice

*Corresponding author: ali_aalami@guilan.ac.ir; ali_aalami@yahoo.com