

مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده محتوای کلروفیل برگ در مراحل

گیاهچه و زایشی تحت تنش شوری در برنج

حسین صبوری^۱، عاطفه صبوری^۲، مجید نحوی^۳، احمدرضا 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 برنج کشور

۴- کارشناس زراعت

۵- کارشناس ارشد زراعت

چکیده

واژه‌های کلیدی

برنج،

نشانگر ریزماهواره،

نشانگرهای مولکولی،

محتوای کلروفیل،

مکان‌یابی QTL

برنج 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 برنج در مناطق غیر قابل کشت را ایجاب می‌نماید. سطوح شوری بالاتر از حد بحرانی برای رشد برنج در این مناطق، نیاز به محصولات گیاهی متحمل به تنش شوری و تحقیقات بیشتر در این زمینه را بیش از پیش ضروری‌تر 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 ژنومی 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 مکان یابی فاصله ای مرکب، یک QTL در فاصله دو نشانگر RM1022-RM6283 در کروموزوم ۳ مکان یابی شد. این QTL (qCLS-3) 40/14 درصد از تغییرات مربوط به محتوای کلروفیل را در مرحله گیاهچه ای توجیه نمود. نتایج حاصل از این آزمایش می‌تواند ژنوتیپ‌های برتر برای برنامه‌های انتخاب بر مبنای نشانگر مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

برنج یکی از مهمترین گیاهان زراعی جهان است که غذای نیمی از جمعیت جهان را فراهم می‌کند. 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 می‌باشد. این مناطق حاشیه دریا دارای سطوح شوری بالاتر از حد بحرانی برای رشد برنج هستند (۱ و ۳). محققین در مطالعات متعددی صفات موثر بر عملکرد برنج را در شرایط تنش شوری تشخیص داده‌اند (۷، ۱۱، ۱۳ و ۱۴). محتوای کلروفیل برگ یکی از مهمترین صفات فیزیولوژیک مرتبط با توانایی فتوسنتزی در برنج و تحت تنش شوری است (۹). از آنجاکه اکثر صفات مهم مرفولوژیک و فیزیولوژیک موثر بر عملکرد مانند محتوای کلروفیل کمی است و بلوک‌های ژنی در بروز آنها نقش دارند، ژنتیک کلاسیک قادر نیست نحوه رفتار ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی را به صورت ژن‌های مجزا مورد بررسی قرار دهد. با پیشرفت تکنولوژی نشانگرهای مولکولی، تهیه نقشه پیوستگی و نرم افزارهای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی، ابزارهای قدرتمندی جهت بررسی مولکولی صفات کمی فراهم شده است (۵، ۶، ۱۷، ۲۶ و ۲۸). ژن‌های کنترل‌کننده صفات مهم و موثر بر عملکرد برنج در تنش شوری در چندین مطالعه مکان‌یابی شده‌اند (۱۱، ۱۳ و ۱۴). همچنین نحوه کنترل ژنتیکی محتوای کلروفیل برگ در شرایط نرمال نیز بررسی شده است (۹، ۲۸، ۳۰ و ۳۱)، اما تاکنون گزارشی از نحوه کنترل ژنتیکی محتوای کلروفیل برگ در شرایط تنش شوری منتشر نشده است. تنگ و همکاران (۲۹) QTL‌های موثر بر محتوای کلروفیل برگ را در مرحله پنجه زنی، ایشیمورا و همکاران (۹) در مرحله پنج روز پس از گلدهی و زو و همکاران (۳۴) در مراحل حداکثر پنجه زنی، گلدهی و گیاهچه‌های ۴۵ روزه‌ای شناسایی نمودند. وانگ و همکاران (۳۰) محتوای کلروفیل برگ را در برنج با استفاده از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب چندگانه و در ۱۳۱ لاین نوترکیب حاصل از تلاقی دو برنج ایندیکا با نشانگرهای

RFLP و AFLP 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 برگ‌ها کنترل نمودند. وانگ و همکاران (۳۰) گزارش نمود که QTL‌های کنترل‌کننده 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 کنترل می‌کنند. ایشیمورا و همکاران (۹) گزارش نمودند که QTL‌های مرتبط با توانای فتوسنتزی مانند محتوای کلروفیل با QTL‌های مرتبط با عملکرد همپوشانی ندارند. ساتو و همکاران (۲۷) محتوای کلروفیل برگ را در شرایط تنش اشعه ماوراء بنفش مکان‌یابی نمودند. آنها سه QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۳ و ۱۰ برای صفت مذکور ردیابی نمودند. QTL روی کروموزوم ۳ موجب افزایش محتوای کلروفیل و QTL‌های مربوط به کروموزوم‌های ۱ و ۱۰ آنرا کاهش دادند. چاو و همکاران (۴) QTL‌های مربوط به توانایی سبز ماندن گیاه را که بستگی به میزان دوام کلروفیل و پروتئین‌ها در برگ دارد، مکان‌یابی نمودند. آنها گزارش نمودند که ژن مرتبط با فنوتیپ سبز گیاه ($sgr(t)$) یک ژن هسته‌ای بوده و با نشانگرهای RFLP، RG662 و C985 پیوستگی دارد. از آنجاکه محتوای کلروفیل از مهمترین صفات فیزیولوژیک موثر بر عملکرد در شرایط تنش می‌باشد، مطالعه حاضر با هدف شناسایی QTL‌های موثر بر محتوای کلروفیل برگ در شرایط تنش شوری انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی:

جهت مکان‌یابی ژنتیکی محتوای کلروفیل برگ در شرایط شور از ۱۹۲ فرد از جمعیت $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی ارقام متحمل (طارم محلی) و حساس (خزر) استفاده شد. والدین تلاقی از نتایج حاصل از برنامه‌گزینش ارقام برای تحمل به تنش‌های اسمتیک مانند تحمل به شوری طی سالهای ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۵ انتخاب شدند

(۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴ و ۲۵). بوته های مذکور با فاصله ۲۵ سانتی متر 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 F₃ حاصل از افراد F₂ جهت اندازه گیری کلروفیل در مراحل گیاهچه و رویشی در شرایط فایوترون و گلخانه در سال ۱۳۸۶ استفاده شد.

اندازه گیری محتوای کلروفیل برگ در مرحله گیاهچه:

محتوای کلروفیل برگ در ۸۰ فرد از هر خانواده F₃ به روش گریگوریو و همکاران (۸) ثبت شد. برای استفاده از شرایط کنترل شده اتاقک رشد، از صفحه های یونیلیت، با ابعاد ۱۰×۲۰×۳۵ سانتی متر و سینی هایی به حجم ۴ لیتر استفاده شد. محلول غذایی هر ۷ روز تعویض شد. pH محلول، هفته ای ۳ بار کنترل شده، و در ۵/۵ pH ثابت نگه داشته شد. شرایط کنترل شده ۲۵°C در روز و ۲۱°C در شب و رطوبت ۷۰ درصد بود. بذور جوانه زده ای که با حرارت ۵۰°C به مدت ۵ روز از خواب خارج شده بودند، به داخل هر سوراخ و شبکه نایلونی انتقال داده شدند. در هر سوراخ ۲ بذور جوانه زده، نشاء شد. تا سه روز پس از انتقال، بذور از آب مقطر استفاده کردند، سپس محلول غذایی پوشیدا (۳۳) به سینی ها انتقال داده شد. گیاهچه های برنج تا ۱۴ روز از محلول غذایی غیر شور استفاده نمودند. سپس ابتدا یک هفته شوری ۶ دسی زیمنس بر متر و سپس شوری ۱۲ دسی زیمنس بر متر به مدت دو هفته اعمال شد و نهایتاً 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 ظرف های پلاستیکی استفاده شد. ابتدا به کمک سوراخ کن، سوراخ هایی به ابعاد ۳ الی ۴ میلی متر و با فاصله ۲ سانتی متر روی ظروف پلاستیکی ایجاد شد، به صورتی که بالاترین سوراخ ها، حداقل ۳ سانتی متر از لبه ظرف فاصله داشت. طبق دستورالعمل موسسه بین المللی تحقیقات برنج (۸) از

خاک حاوی ۵۰N، ۲۵P و ۲۵K میلی گرم بر کیلوگرم خاک، استفاده شد. سطح خاک ۱ سانتی متر بالاتر از بالاترین سوراخ ظرف بود. ظرف ها پس از اینکه سطح خاک آنها تسطیح شد، در سینی های بزرگ قرار داده شدند و سینی های بزرگ با آب معمولی پر شدند، تا وقتی که سطح آب با سطح خاک یکی شد. خاک با جذب آب در داخل ظرف ها پایدار شد. برای ثابت ماندن سطح آب، بعد از ۱ الی ۲ روز در صورت لزوم آب اضافه شد. همزمان با تهیه مواد مذکور، جوانه زنی 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 سانتی متر بالاتر از سطح خاک بود. سطح آب روزانه کنترل شد. هنگامی که گیاهچه ها ۲۱ روزه شدند، کل آب خارج شد و ۲۴ ساعت به همین صورت باقی ماند و سپس با آب شوری ۶ دسی زیمنس بر متر سینی های پلاستیکی پر شدند. به تدریج شوری آب افزایش یافته و در نهایت به ۱۲ دسی زیمنس بر متر رسانده شد. در طول آزمایش، هر هفته به وسیله زهکش همه آب خارج شده و سپس سینی ها با آب شور که شوری مناسب را تأمین می کرد، پر شدند. برای اطمینان از اینکه فقط تنش شوری روی گیاه اعمال شده است، گیاهان در طی آزمایش از هر گونه آفت و بیماری محافظت شدند. محتوای کلروفیل بوته ها پس از ۶۵ روز و در مرحله گلدهی ثبت شد.

تهیه نقشه ژنتیکی و مکان یابی ژن های 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 F₂ استفاده گردید. برای اینکار از ژل های پلی اکریلامید واسرشته ساز ۶ درصد استفاده گردید. با ۷۴ نشانگر و ۱۹۲ فرد F₂، ماتریس داده های ژنوتیپی به ابعاد ۷۴×۱۹۲ 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 نسبت های مندلی در هر مکان نشانگر استفاده گردید. از مکان یابی فاصله ای (۱۰) و فاصله

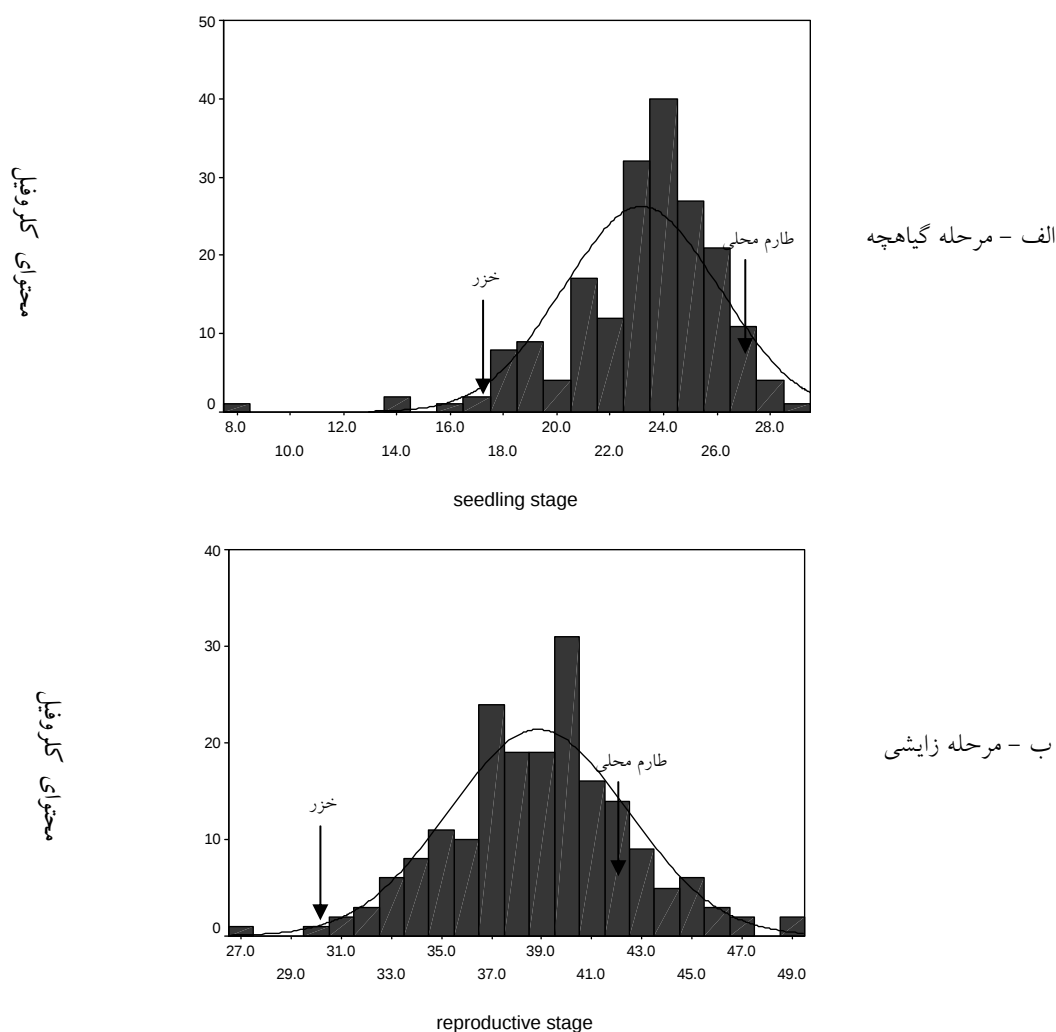
شوری نشان می‌دهد. تغییرات پیوسته در هر دو مرحله برای محتوای کلروفیل در خانواده های F_3 و در شرایط شور مشاهده شد. تغییرات پیوسته نشان می‌دهد که محتوای کلروفیل صفت کمی است که به وسیله تعداد زیادی ژن و با آثار کم کنترل می‌شود. اگرچه محتوای کلروفیل در مرحله گیاهچه دارای چولگی بود، اما این چولگی معنی دار نبود. بهر حال جهت مکان‌یابی 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 مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده محتوای کلروفیل برگ استفاده گردید. مکان‌یابی QTL‌ها به کمک نرم افزار QTL Cartographer (۲) انجام شد.

نتایج

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

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 شوری

مکان یابی QTL های کنترل کننده محتوای کلروفیل برگ:

از ۳۶۵ جفت آغازگر SSR مورد مطالعه، ۸۵ جفت آغازگر (۲۳/۲۵ درصد) الگوی نواریندی متفاوتی برای والدین به نمایش گذاشتند. از بین ۸۵ جفت آغازگر ۷۴ جفت نشانگر الگوی نواریندی قابل امتیاز دهی داشتند. نتایج آزمون χ^2 برای بررسی انحراف فراوانی های اللی و ژنوتیپی هر مکان نشانگر نشان داد که از ۷۴ نشانگر موجود در نقشه ژنتیکی، ۱۵ نشانگر (۲۰/۲۷ درصد) دارای فراوانی های اللی و ژنوتیپی متفاوت و معنی داری ($p < 0.05$) از فراوانی های مورد انتظار ۱:۲:۱ بودند. با توجه به نتایجی که در 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 نشانگرهای 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 ليو (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 بوتستین (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، ۱۶ و ۲۸) نشان داد که در تمامی گروه های پیوستگی، فاصله بین نشانگرها متفاوت با نتایج سایر نقشه های موجود بود (شکل ۳-۲۳) از آنجا که 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 disortion

تغییر در ترتیب نشانگرها نیز روی کروموزوم های ۲ و ۸ دیده شد که احتمال می رود ناشی از ناهنجاریهای ساختمانی کروموزومی مانند معکوس شدن^۲ باشد. از آنجا که ارقام طارم محلی و خزر از جهات مرفولوژیکی 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 و ۲۵). 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. آل 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 غالبیت ناقص بود که غالبیت 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 آل 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 غالبیت 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

² Inversion

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 QTL 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 هر می کردن این QTL ها یکی از اهداف برنامه های اصلاحی مرتبط با افزایش تحمل به شوری در جمعیت حاضر در نظر گرفت.

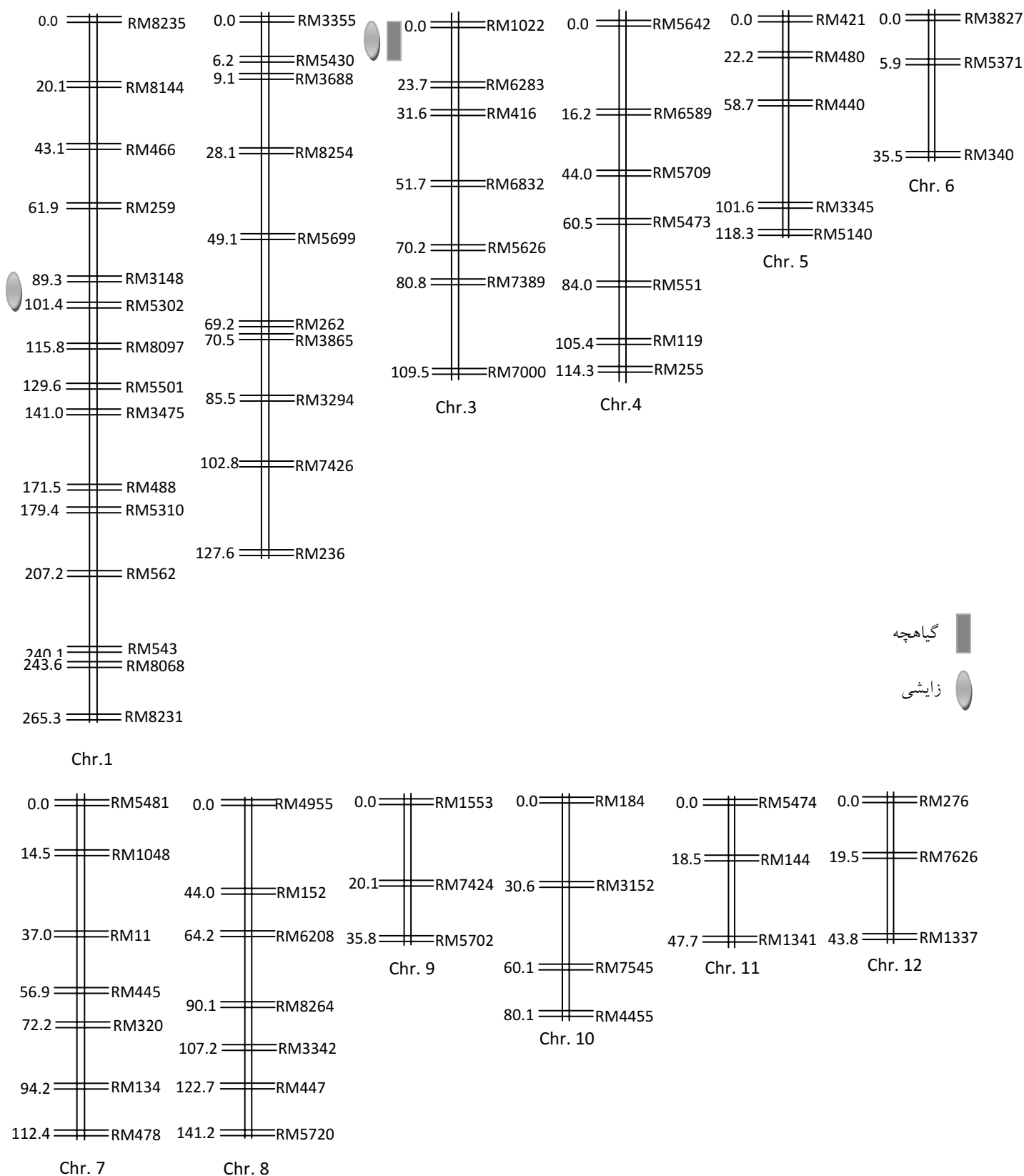
مکان یابی فاصله ای مرکب برای محتوای کلروفیل برگ در مرحله زایشی یک QTL روی کروموزوم ۱ و با حد بحرانی ۱۱/۴ نسبت درستنمایی شناسایی کرد، این QTL ۱۰/۵۶ درصد از تغییرات محتوای کلروفیل را توجیه نمود. ساتو و همکاران (۲۷) QTL های کاهش دهنده محتوای کلروفیل را در شرایط تنش اشعه ماوراء بنفش روی کروموزوم ۲ ردیابی 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 ۲۰/۳۹ ، ۱۴/۰۴ درصد از تغییرات مربوط به محتوای کلروفیل

برگ را در مرحله گیاهچه ای کنترل نمود. صبوری و بیابانی (۲۲) QTL های مرتبط با ارتفاع بوته، طول خوشه 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 خوشه 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 خوشه بالاتر بتوانند میزان کلروفیل خود را تا مراحل رسیدگی در سطح بالایی نگه داشته و با درصد فتوسنتز بالاتر بتوانند نسبت به تنش شوری متحمل 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 روی کروموزوم ۱) و برخی نیز در هر دو مرحله ثابت هستند (QTL های روی کروموزوم ۳). وجود همبستگی بین صفات می-تواند به وسیله آثار پلیوتروپی 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 (۲۳، ۲۲ و ۲۶). ارتباط بین محتوای کلروفیل برگ در مراحل گیاهچه و زایشی در این مطالعه نیز معنی دار بود (**۰/۳۷۳). 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 ژنوتیپ های برتر برای برنامه های انتخاب بر مبنای نشانگر و برنامه های هر می کردن ژن ها مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۱- QTL های شناسایی شده برای محتوای کلروفیل به روش مکان یابی فاصله ای و مکان یابی فاصله ای مرکب.

مرحله	QTL	کروموزوم	نشانگرهای مجاور	موقعیت	LR	اثر افزایشی	اثر غالبیت	درجه غالبیت	درصد واریانس
مکان یابی فاصله ای									
گیاچه	qCLS-۳	۳	RM1022-RM6283	۸	۱۸/۷۱	-۱/۵۴	-۰/۰۵۲	-۰/۰۳۳	۱۱/۶۰
زایشی	qCLS-۳	۳	RM1022-RM6283	۱۸	۱۹/۱۳	۱/۳۳	-۱/۴۵	-۱/۰۹	۶
مکان یابی فاصله ای مرکب									
گیاچه	qCLS-۳	۳	RM1022-RM6283	۴	۲۰/۳۹	-۱/۴۶	-۰/۰۵	-۰/۰۳۴	۱۴/۰۴
زایشی	qCLS-۱	۱	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 تلاقی ♂ طارم محلی / خزر ♀

منابع

1. Akbar M, Gunawardena IE and Ponnampurna 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, Qiun Q, Zeng D, Kunihiro Y, Fujimoto K, Huang D and Zhu L (2004) QTL analysis of leaf photosynthetic 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.