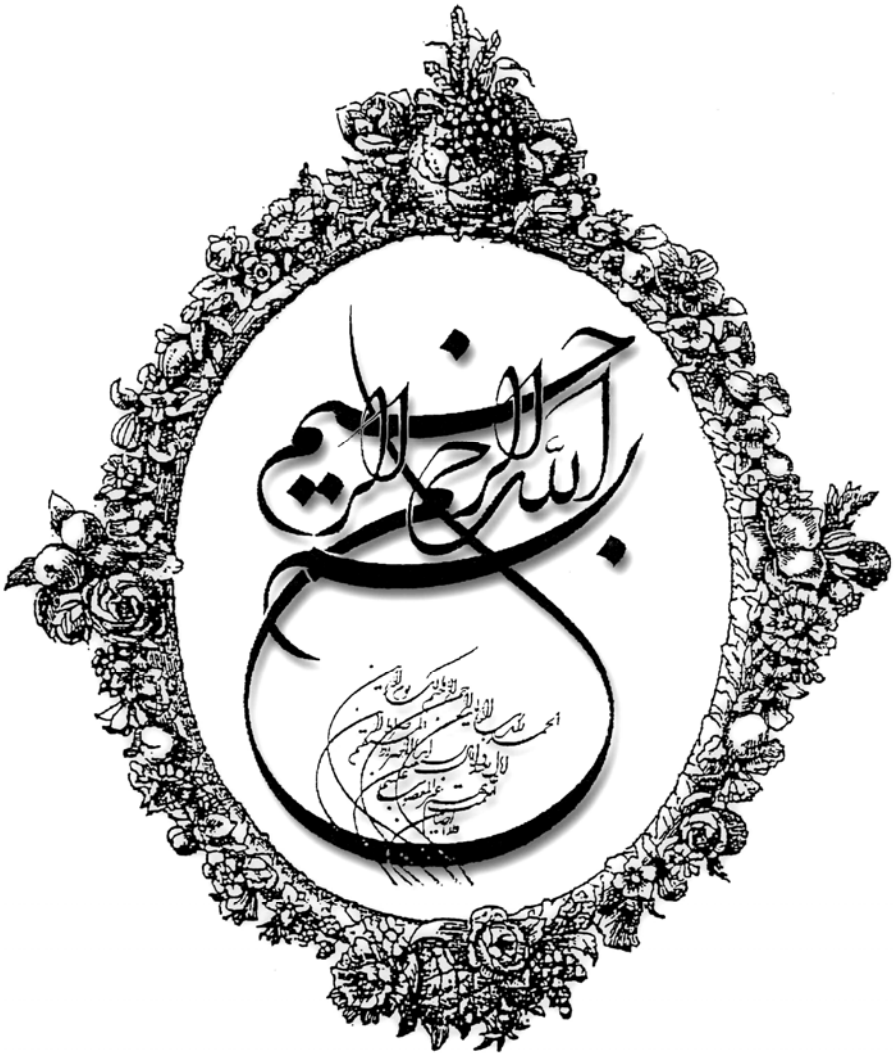
بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

شناسائی و اعتبار سنجی QTLهای کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به شوری در برنج

رساله دکتری اصلاح نباتات

قاسم محمّدی‌نژاد

اساتید راهنما
دکتر عبدالمجید رضائی
دکتر احمد ارزانی

۱۳۸٦

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

رساله دکتری رشته اصلاح نباتات آقای قاسم محمّدی نژاد

تحت عنوان

شناسائی و اعتبار سنجی QTLهای کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به شوری در برنج

در تاریخ ۱۳۸۶/۱۲/۱۵ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهائی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر عبدالمجید رضائی
۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر احمد ارزانی
۳- استاد مشاور پایان نامه	دکتر راکش کومار سینگ
۴- استاد مشاور پایان نامه	دکتر علی مؤمنی
۵- استاد مشاور پایان نامه	دکترمحمد حسین فتوکیان
۶- استاد داور	دکترحسن پاک‌نیت
۷- استاد داور	دکتر غلامرضا بلالی
۸- استاد داور	دکتر بدرالدین سید طباطبائی
۹- استاد داور	دکتر قدرت الله سعیدی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر فرشید نوربخش

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعـــات، ابتکارات و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع این پـایـــان نامه (رساله) متعلق به دانشگـــــاه صنعتـــــی اصفهان است.

تشکر و قدردانی

سپاس ابدی بر یزدان پاک که به من نعمت هستی عطا فرمود و قطره‌ای از اقیانوس ژرف و بی‌کران علم را بر من ارزانی داشت، به شکرانه این موهبت سر تعظیم بر آستان لایزالش فرود می‌آورم و در این مجال از همه بزرگوارانی که در مسیر مقصود بی دریغ مساعدت و حمایتم نمودند کمال قدردانی را دارم.

تقدیر و تشکر بی‌کران از مادر مهربانم که همیشه و در تمام مراحل زندگی‌ام پشتیبان و یاورم بوده و همچون شمعی نورش چراغ راه و حرارتش گرمابخش زندگی‌ام می‌باشد، از خداوند برایشان عمری باعزت آرزومندم.

تشکر و سپاس ویژه از سرکارخانم مهندس فاطمه ایاسه که بدون همراهی و یاری ایشان پیمودن این مسیر علمی در دوران تحصیلات تکمیلی بسیار دشوار و ناممکن بود، از خداوند بزرگ برایشان لحظاتی سبز توأم با سلامتی، سربلندی و خوشبختی در هر زمان و هرمکان خواستارم، همچنین از پدر بزرگوارشان که در نبود پدر حامی و پشتیبانم بودند سپاسگزارم.

مراتب سپاس و قدرشناسی خود را تقدیم دانشمند فرزانه جناب آقای دکتر رضائی می‌نمایم، هیچ‌گاه زحمات و راهنمائی‌های ایشان را از یاد نخواهم برد و شاگردی ایشان در دوران کارشناسی ارشد و دکترا از افتخارات بزرگ علمی‌ام می باشد.

از آقای دکتراحمد ارزانی که در راهنمائی این رساله ار هیچ کمکی دریغ نکردند و در دوران تحصیل از محضرشان کسب علم نمودم تشکر می‌کنم.

همچنین از دکتر گلن گریگوریو و دکتر راکش کومار سینگ که در طی انجام این تحقیق در مرکز تحقیقات بین المللی برنج مورد حمایت همه جانبه آنها قرار گرفتم سپاسگزارم.

این تحقیق بدون کمک و همکاری دانشمندان، محققین و کارکنان مرکز تحقیقات بین المللی برنج مقدور نبود که بدینوسیله از همه این بزرگواران تشکر می‌نمایم.

از اساتید مشاور، هیات‌محترم داوران و اساتید بزرگواری که درمحضرشان تلمذ نمودم تشکروقدردانی می-نمایم

یاد و خاطره دوستان دوران تحصیل دکترصبوری، دکترمجیدی، دکترسبزعلیان، دکترحیدری، دکتررفیعی، دکترناخدا، دکترشبّر، دکترانگجی، دکترحمیدپور وهمراهی آقایان مهندس‌علی سرحدی و مهندس امین شایسته همیشه در ذهن و همراه من خواهد ماند.

در نهایت از تمامی عزیزانی که به نحوی اینجانب را در انجام بهتر این تحقیق یاری دادند و در این مجال اندک از آنها یاد نشد ضمن پوزش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

قاسم محمّدی‌نژاد

تقدیم به زیباترین واژه‌های زندگی‌ام

مادر مهربانم

و روح آسمانی و پاک پدرم

تقدیم به اسوه مهربانی، پاکی و ایثار

سرکار خانم مهندس فاطمه ایاسه

و پدر بزرگوار ایشان

چکیده

این بررسی با هدف اعتبارسنجی و اشباع ظریف ناحیه کروموزومی کنترل‌کننده تحمل به شوری در برنج (*Saltol*)، ارزیابی تنوع هاپلوتیپی به منظور شناسائی مهم‌ترین ترکیب آللی در این ناحیه کروموزومی، نقشه‌یابی سایر QTLهای کنترل‌کننده تحمل به شوری در لاین متحمل FL478 و نهایتاً مقایسه تنوع ژنتیکی از لحاظ تحمل به شوری در مراحل گیاهچه و زایشی در مرکز تحقیقات بین المللی برنج (IRRI) از۱۳۸۴ تا ۱۳۸۶ اجرا گردید. با استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهواره و EST-SSR و جمعیت لاینهای نسبتاً ایزوژن BC_3F_4 حاصل از تلاقی Pokkali × IR29 ، ناحیه *Saltol* در کروموزوم ۱ برنج در محدوده‌ای در حدود ۱۴ سانتی‌مورگان اشباع گردید. با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی ۲۰۰۰ فرد تصادفی BC_3F_4 در سطوح شوری ۱۲ و ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر یک QTL در مکانی تقریباً یکسان مشاهده شد که به ترتیب۱۸ و ۲۴ درصد از تغییرات امتیاز تحمل به شوری را توجیه کرد. براساس یافته های این پژوهش مکان احتمالی *Saltol* در طولی حدود ۱/۲ سانتی‌مورگان در روی کروموزوم ۱ قرار داشته و با نشانگرهای RM8094 ، RM3412 وCP6224 احاطه شده است. نقشه‌یابی دقیق‌تر این ناحیه امکان ایزوله‌کردن ژن‌های مؤثر بر تحمل به شوری را فراهم خواهد ساخت. ارزیابی تنوع هاپلوتایپی با استفاده از ۸ نشانگر ریزماهواره مستقر در محدوده *Saltol* و با در نظرگرفتن آلل‌های نشانگری ، Pokkali هیجده هاپلوتایپ مختلف در ۳۶ ژنوتیپ برنج مشاهده گردید. هاپلوتایپ‌هایی که آلل نشانگر RM8094 را از والدPokkali داشتند، همگی به شوری متحمل بودند. در نتیجه این آلل به‌عنوان مفیدترین آلل جهت اصلاح به کمک نشانگر شناخته‌شد. ضمن اینکه معلوم شد نشانگر ریز ماهواره RM8094 با بیشترین تعداد آلل (۱۴) و میزان اطلاعات چندشکلی(۰/۸۸) مؤثرترین نشانگر جهت کاربرد در ارزیابی تنوع ژنتیکی است. ارزیابی فنوتیپی ۲۳۵۰ لاین BC_3F_4 حاصل از تلاقی IR29 ×FL478 برای صفات امتیاز تحمل به شوری ژنوتیپ‌ها، غلظت سدیم، غلظت پتاسیم و نسبت آنها، بر وجود تفاوت معنی‌دار بین فامیل‌های تلاقی برگشتی دلالت داشت. نتایج نشان داد که پایین بودن نسبت Na^+/K^+ در لاین FL478 عمدتاً از طریق جذب سدیم کمتر رخ می‌دهد. نتایج ژنوتیپ‌یابی انتخابی با ۵۰۰ فرد کرانه‌ای حاکی از وجود بیشترین و کمترین تعداد QTL برای غلظت‌های Na^+ و K^+بود. مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب نشان داد که علاوه بر کروموزوم ۱ کروموزم‌های ۶ ، ۸ و ۱۰ دارای QTLهای مهم و تأثیرگذار بر تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای می‌باشند. برای غلظت سدیم یک QTL در ناحیه *Saltol* مکان‌یابی شد، در حالی‌که برای امتیاز تحمل به شوری، غلظت پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم QTL تأثیرگذاری در ناحیه فوقانی *Saltol* شناسائی گردید. برای امتیاز تحمل به شوری مکان‌های ژنی بزرگ‌اثری بر روی کروموزوم‌های ۱ ،۳ و ۶ مکان‌یابی شدند. برای غلظت سدیم و نسبت سدیم به پتاسیم کروموزوم‌های ۱، ۶، ۱۰و ۱۲ دارای QTLهای بزرگ‌اثر بودند که منشاء اکثر آن‌ها FL478 بود. همچنین هیچ‌گونه اپیستازی معنی‌داری نیز بینQTLها مشاهده نشد. بنابراین در اصلاح به کمک نشانگر و با استفاده از لاین FL478 به عنوان یکی از متحمل‌ترین لاین‌های اصلاحی، لازم است هرم‌سازی QTLها مدنظر قرار گیرد. نتایج بررسی تحمل به شوری در مرحله زایشی در ۳۰ ژنوتیپ مختلف، درصد باروری دانه گرده را عامل بسیار مهمی در کاهش تعداد دانه پر و عملکرد دانه دانست و نشان داد که تحمل ژنوتیپ‌ها در مرحله زایشی با تحمل آنهادر مرحله گیاهچه‌ای ارتباطی ندارد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... هشت

فهرست جداول ..... ده

فهرست اشکال ..... یازده

فهرست پیوست‌ها ..... سیزده

چکیده ۱

فصل اول : مقدمه ۲

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- اهداف تحقیق ۴

فصل دوم : بررسی منابع ۶

۲-۱- تحمل به شوری در برنج ۶

۲-۲- ژنتیک تحمل به شوری در برنج ۸

۲-۳- مکان‌یابی ژن‌های صفات کمّی (QTLs) ۱۰

۲-۳-۱- ابزارهای مولکولی برای مکان‌یابی QTL ۱۲

۲-۳-۲- ساختار جوامع برای مکان‌یابی QTL ۱۷

۲-۳-۳- روش‌های آماری برای مکان‌یابی QTL ۲۰

۲-۳-۴- مکان‌یابی QTL برای صفات مرتبط با تحمل به شوری ۴۵

۲-۳-۵- زمینه‌سازی برای رسیدن به ژن از QTL ۴۷

فصل سوم : مواد و روش‌ها ۵۰

۳-۱- مکان‌یابی QTLهای صفات مرتبط با تحمل به شوری ۵۰

۳-۱-۱- مطالعه فنوتیپی صفات ۵۰

۳-۱-۲- مطالعه ژنوتیپی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره ۵۴

۳-۱-۳- نقشه پیوستگی و مکان‌یابی QTL ۵۶

۳-۲- اشباع نقشه ناحیه کروموزومی *Saltol* بر روی کروموزوم ۱ ..... ۵۸

۳-۲-۱ مطالعه صفات فنوتیپی ۵۸

۳-۲-۲- مطالعه ژنوتیپی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و EST-SSR ۶۰

۳-۲-۳- نقشه پیوستگی و اشباع ظریف ناحیه *Saltol* ۶۱

۳-۳- ارزیابی تنوع آللی نشانگرهای کروموزوم۱ و تنوع هاپلوتایپی ۶۱

۳-۳-۱- جمعیت گیاهی ۶۱

۳-۳-۲- ارزیابی تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای ۶۲

۳-۳-۳- مطالعه ژنوتیپی و تنوع هاپلوتایپی ۶۳

۳-۴- ارزیابی تحمل به شوری در مرحله زایشی و بررسی تنوع مورفولوژیک و مولکولی ۶۳

۳-۴-۱- مواد گیاهی و شرایط آزمایش ۶۳

۳-۴-۲- صفات مورد ارزیابی ۶۴
۳-۴-۳ – ارزیابی تنوع ژنوتیپی با نشانگرهای ریزماهواره ۶۵
فصل چهارم : نتایج و بحث ٦٦
۴-۱- مکان یابی QTLهای صفات مرتبط با تحمل به‌شوری در جمعیت FL478×IR29 ..... ۶۶
۴-۱-۱- نتایج ارزیابی‌های فنوتیپی ۶۶
۴-۱-۲- نقشه پیوستگی ۷۱
۴-۱-۳- مکان‌یابی QTLها ۷۲
۴-۲- اشباع نقشه پیوستگی ناحیه *Saltol* ۱۰۰
۴-۲-۱- نتایج فنوتیپی ۱۰۱
۴-۲-۲- نتایج ژنوتیپی و مکانیابی QTL ۱۰۲
۴-۳- ارزیابی تنوع هاپلوتایپی ۱۰۸
۴-۳-۱- ارزیابی تنوع فنوتیپی ۱۰۸
۴-۳-۲- نتایج ژنوتیپی ۱۱۰
۴-4- ارزیابی تحمل به شوری در مرحله زایشی و بررسی تنوع مورفولوژیک و مولکولی ۱۱۴
4-4-۱- ارزیابی فنوتیپی تحمل به شوری ۱۱۴
۴-۴-۲- ارزیابی تنوع مولکولی ۱۲۳
۴-۴-۳- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر مبنای داده‌های مورفولوژیک و مولکولی ۱۲۹
فصل پنجم : نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۳۲
۵-۱- نتیجه‌گیری ۱۳۳
۵-۲- پیشنهادها ۱۳۵
منابع ۱۶۲
چکیده انگلیسی ۱۷۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱ فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت تلاقی برگشتی در حالت عدم وقوع کراس‌آور مضاعف ۲۶

جدول ۳-1- نمک‌ها و عناصر غذائی برای تهیه محلول غذایی یوشیدا جهت کشت آبی گیاهچه‌های برنج ۵۳

جدول ۳-۲ -امتیاز تحمل ژنوتیپ‌ها بر اساس علائم قابل مشاهده در مرحله گیاهچه ۵۴

جدول ۳-۳- نشانگرهای مورد استفاده برای اشباع نقشه ژنتیکی *Saltol* ۶۰

جدول۳-۴ - شماره لاین و شجره ۳۶ ژنوتیپ برنج مورد استفاده جهت ارزیابی تنوع هاپلوتایپی ۶۲

جدول ۴-۱ - مقایسه میانگین‌های صفات مختلف برنج در فامیل‌های تلاقی برگشتی ۶۸

جدول ۴-۲- تجزیه واریانس صفات مختلف برنج تحت شرایط شوری ($12dSm^{-1}$) ۶۹

جدول ۴-۳- همبستگی فنوتیپی بین صفات مورد مطالعه در فامیل‌های تلاقی برگشتی در برنج ۷۰

جدول ۴-4 - ضرایب عاملی و درصد واریانس توجیه شده برای دو عامل معنی دار در تجزیه به عامل‌ها ۷۰

جدول4- 5- نشانگرهای پیوسته با QTLهای کنترل کننده صفات مختلف تحت تنش شوری ۷۴

جدول۴-۶- QTL های شناسایی شده برای صفات مرتبط با تحمل به شوری در برنج ۷۷

جدول4-7- نشانگرهای پیوسته با QTLهای امتیاز تحمل به شوری ۱۰۳

جدول۴-۸ - نتایج ارزیابی تحمل به شوری۳۶ ژنوتیپ برنج در مرحله گیاهچه ۱۰۹

جدول ۴- ۹ - تعداد آلل ، چندشکلی و طول نوار ۳۳ نشانگر ریزماهواره در ژنوتیپ‌های برنج ۱۱۱

جدول ۴-10 - هاپلوتایپ‌های حاصل از ۳۶ ژنوتیپ بر اساس نشانگرهای ریزماهواره ناحیه *Saltol* ۱۱۳

جدول ۴-۱۱- تجزیه واریانس صفات مختلف ژنوتیپهای برنج در تیمارهای مختلف شوری در مرحله زایشی ۱۱۵

جدول۴-۱۲ - میانگین های صفات مختلف ۳۰ ژنوتیپ برنج در شرایط معمول و شوری ۱۱۶

جدول ۴-۱۳ - میانگین صفات در تیمارهای شوری و شاهد و درصد کاهش ۱۱۸

جدول ۴-۱۴ - صفات مختلف لاین‌های FL478 ، Pokkali و IR29 در سطوح مختلف شوری ۱۱۹

جدول ۴-۱۵- ضرایب همبستگی بین صفات مختلف ۱۲۰

جدول۴-۱۶- مدل رگرسیون مرحله‌ای برای عملکرد دانه در بوته در شرایط معمول و میانگین تیمارهای شوری ۱۲۲

جدول ۴-۱۷ - تعداد آلل ، اطلاعات آللی و میزان اطلاعات چندشکلی برای ۹۴نشانگر ریزماهواره ۱۲۴

جدول ۴-۱۸ - اندازه نوار نشانگرهای ریزماهواره چندشکل در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل ۱۲۷

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- نتاج تلاقی برگشتی برای یک QTL و دو نشانگر مجاور ۲۸
شکل ۳-۱- نمودار تولید لاینهای تقریباً ایزوژن برای نقشه‌یابی مکانهای ژنی کنترل‌کننده تحمل به شوری در برنج ۵۱
شکل ۳-۲- نمائی از شکل ظروف استفاده شده جهت ارزیابی گیاهچه ها در تنش شوری ۵۳
شکل ۳-۳ - یک نمونه ژل تهیه شده برای مطالعه چندشکلی در والدین ۵۷
شکل ۳-۴ - نمودار تولید جمعیت نسبتاً ایزوژن برای اشباع ظریف نقشه ناحیه *Saltol* ۵۹
شکل ۳-۵ - نقشه پیوستگی نشانگرهای ناحیه کروموزومی *Saltol* بر اساس اطلاعات توالی یابی ژنوم برنج ۶۱
شکل ۳-۶ - شکل شماتیک ظروف کشت برای ارزیابی در مرحله زایشی ۶۴
شکل ۳-۷ - تصویر میکروسکوپی برای ارزیابی باروری دانه‌های گرده ۶۵
شکل ۴-۱ - توزیع فراوانی صفات اندازه‌گیری شده به منظور بیان پراکندگی فامی‌لها ۶۷
شکل ۴-۲ برازش داده‌های فنوتیپی جهت آزمون نرمال بودن با نمودار Q-Q ۶۷
شکل ۴-۳-دندروگرام تجزیه خوشه‌ای فامیل‌های تلاقی برگشتی برمبنای صفات فنوتیپی ۷۱
شکل ۴-۴ - نقشه پیوستگی ۱۰۷ نشانگر با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی ۵۰۰ فرد نسبتاً ایزوژن BC_3F_4 ..... ۷۲
شکل ۴-۵ -QTL های مکان‌یابی شده در بعضی از کروموزومها برای امتیاز تحمل به شوری در گیاهچه‌ها ۷۹
شکل ۴-۶ –QTL های مکان‌یابی شده در برخی کروموزومها برای غلظت پتاسیم در برگ چهارم ۸۱
شکل ۴-۷ – QTL های مکان‌یابی شده در برخی کروموزومها برای غلظت سدیم در برگ چهارم ۸۲
شکل ۴-۸ – QTL های مکان‌یابی شده در برخی کروموزومها برای نسبت سدیم به پتاسیم ۸۴
شکل ۴-۹- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۱ برای امتیاز تحمل گیاهچه ها به شوری ۸۶
شکل ۴- 10- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۱ برای غلظت پتاسیم در برگ چهارم ۸۶
شکل ۴-۱۱- QTL های مکان‌یابی شده درکروموزوم۱ برای غلظت سدیم در برگ چهارم ۸۷
شکل ۴-۱۲- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۱ برای نسبت سدیم به پتاسیم در برگ چهارم ۸۷
شکل ۴-۱۳- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۳ برای امتیاز تحمل گیاهچه ها به شوری ۸۹
شکل ۴-۱۴- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۳ برای غلظت سدیم در برگ چهارم ۸۹
شکل ۴-۱۵- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۶ برای امتیاز تحمل گیاهچه ها به شوری ۹۰
شکل ۴-۱۶- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۶ برای غلظت پتاسیم در برگ چهارم ۹۱
شکل ۴-۱۷- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۶ برای غلظت سدیم در برگ چهارم ۹۱
شکل ۴-۱۸- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۶ برای نسبت سدیم به پتاسیم در برگ چهارم ۹۲
شکل ۴-۱۹- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۷ برای امتیاز تحمل گیاهچه ها به شوری ۹۳
شکل ۴-۲۰- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۷ برای نسبت سدیم به پتاسیم در برگ چهارم ۹۳
شکل ۴-۲۱- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۸ برای امتیاز تحمل گیاهچه ها به شوری ۹۴
شکل ۴-۲۲- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۸ برای غلظت پتاسیم در برگ چهارم ۹۴

شکل ۴-۲۳- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم8 برای غلظت سدیم در برگ چهارم.....۹۵
شکل ۴-۲۴- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۸ برای نسبت سدیم به پتاسیم در برگ چهارم ۹۵
شکل ۴-۲۵- QTL های مکان یابی شده در کروموزوم۱۰برای غلظت سدیم در برگ چهارم.....۹۶
شکل ۴-۲۶- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۱۰ برای نسبت سدیم به پتاسیم در برگ چهارم ۹۶
شکل ۴-۲۷- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۱۲ برای امتیاز تحمل گیاهچه ها به شوری ۹۷
شکل ۴-۲۸- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۱۲برای غلظت پتاسیم در برگ چهارم.....۹۷
شکل ۴-۲۹- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۱۲برای غلظت سدیم در برگ چهارم.....۹۸
شکل ۴-۳۰- QTL های مکان‌یابی شده در کروموزوم۱۲ برای نسبت سدیم به پتاسیم در برگ چهارم ۹۸
شکل ۴-۳۱- نقشه ناحیه کروموزومی کنترل‌کننده تحمل به شوری در کروموزوم۱.....۱۰۱
شکل ۴-۳۲- توزیع فراوانی افراد جمعیت مورد ارزیابی برای نقشه یابی دقیق ناحیه *Saltol* در سطوح شوری مختلف.....۱۰۲
شکل ۴-۳۳ - نقشه پیوستگی ۱۰ نشانگر استفاده شده جهت نقشه یابی دقیق ناحیه *Saltol* ۱۰۳
شکل ۴-۳۴- QTL های مکان یابی شده ناحیه کروموزومی *Saltol* در کروموزوم ۱ .....۱۰۵
شکل ۴-۳۵ - نقشه ردیابی ژن‌های نامزد در ناحیه *saltol* در کروموزوم۱ برنج ۱۰۶
شکل ۴- ۳۶ - چندشکلی قطعات DNA تکثیریافته با نشانگر ریزماهواره RM8094 در ۳۶ ژنوتیپ برنج.....۱۱۰
شکل ۴-۳۷ - دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ۳۶ ژنوتیپ مورد ارزیابی بر اساس ۳۳ نشانگر مستقر در کروموزوم ۱ .....۱۱۲
شکل ۴-۳۸- نمودار تجزیه الگوی واکنش ژنوتیپی صفات مختلف مورد ارزیابی.....۱۲۲
شکل ۴-۳۹ - دندروگرام تجزیه خوشه ای ۳۰ ژنوتیپ مورد ارزیابی بر اساس ۹۴ نشانگر ریز ماهواره ۱۳۰
شکل ۴-۴۰- دندروگرام تجزیه خوشه ای ۳۰ ژنوتیپ برنج بر اساس داده های مورفولوژیک.....۱۳۱

فهرست پیوست‌ها

عنوان **صفحه**

پیوست ۱ – نشانگرهای چندشکل بین ژنوتیپ‌های IR29 و FL478 ..... ۱۳۷
پیوست ۲ – نشانگرهای استفاده شده برای ارزیابی تنوع مولکولی با ۳۶ ژنوتیپ ۱۴۹
پیوست ۳ – نشانگرهای مستقر بر روی کروموزم ۱ جهت تنوع هاپلوتایپی ۱۵۳
پیوست ۴- ژن‌ها یا QTL های شناخته شده برای تحمل به شوری در برنج ۱۵۵

چکیده

این بررسی با هدف اعتبارسنجی و اشباع ظریف ناحیه کروموزومی کنترل‌کننده تحمل به شوری در برنج (*Saltol*)، ارزیابی تنوع هاپلوتیپی به منظور شناسائی مهم‌ترین ترکیب آللی در این ناحیه کروموزومی، نقشه‌یابی سایر QTLهای کنترل‌کننده تحمل به شوری در لاین متحمل FL478 و نهایتاً مقایسه تنوع ژنتیکی از لحاظ تحمل به شوری در مراحل گیاهچه و زایشی در مرکز تحقیقات بین المللی برنج (IRRI) از ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۶ اجرا گردید. با استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهواره و EST-SSR و جمعیت لاین‌های نسبتاً ایزوژن BC_3F_4 حاصل از تلاقی IR29 × Pokkali ، ناحیه *Saltol* در کروموزوم ۱ برنج در محدوده‌ای در حدود ۱۴ سانتی‌مورگان اشباع گردید. با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی ۲۰۰۰ فرد تصادفی BC_3F_4 در سطوح شوری ۱۲ و ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر یک QTL در مکانی تقریباً یکسان مشاهده شد که به ترتیب۱۸ و ۲۴ درصد از تغییرات امتیاز تحمل به شوری را توجیه کرد. براساس یافته های این پژوهش مکان احتمالی *Saltol* در فاصله ۱/۸ سانتی‌مورگان از ابتدای کروموزوم ۱ قرار داشته و با نشانگرهای RM8094 ، RM3412 وCP6224 احاطه شده است. با توجه به طول این ناحیه (حدود ۳۵۰ kb)، نقشه‌یابی دقیق‌تر آن امکان ایزوله‌کردن ژن‌های مؤثر بر تحمل به شوری را فراهم خواهد ساخت. ارزیابی تنوع هاپلوتایپی با استفاده از ۸ نشانگر ریزماهواره مستقر در محدوده *Saltol* و با در نظرگرفتن آلل‌های نشانگری ، Pokkali هیجده هاپلوتایپ مختلف در ۳۶ ژنوتیپ برنج مشاهده گردید. هاپلوتایپ‌هایی که آلل نشانگر RM8094 را از والدPokkali داشتند، همگی به شوری متحمل بودند. در نتیجه این آلل به‌عنوان مفیدترین آلل جهت اصلاح به کمک نشانگر شناخته‌شد. ضمن اینکه معلوم شد نشانگر ریز ماهواره RM8094 با بیشترین تعداد آلل (۱۴) و میزان اطلاعات چندشکلی(۰/۸۸) مؤثرترین نشانگر جهت کاربرد در ارزیابی تنوع ژنتیکی است. ارزیابی فنوتیپی ۲۳۵۰ لاین BC_3F_4 حاصل از تلاقی FL478× IR29 برای صفات امتیاز تحمل به شوری ژنوتیپ‌ها، غلظت سدیم، غلظت پتاسیم و نسبت آنها، بر وجود تفاوت معنی‌دار بین فامیل‌های تلاقی برگشتی دلالت داشت. نتایج نشان داد که پایین بودن نسبت Na^+/K^+ در لاین FL478 عمدتاً از طریق جذب سدیم کمتر رخ می‌دهد. نتایج ژنوتیپ‌یابی انتخابی با ۵۰۰ فرد کرانه‌ای حاکی از وجود بیشترین و کمترین تعداد QTLبرای غلظت‌های Na^+ و K^+بود. مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب نشان داد که علاوه بر کروموزوم ۱ کروموزم‌های ۶ ، ۸ و ۱۰ دارای QTLهای مهم و تأثیرگذار بر تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای می‌باشند. برای غلظت سدیم یک QTL در ناحیه *Saltol* مکان‌یابی شد، در حالی‌که برای امتیاز تحمل به شوری، غلظت پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم QTL تأثیرگذاری در ناحیه فوقانی *Saltol* شناسائی گردید. برای امتیاز تحمل به شوری مکان‌های ژنی بزرگ‌اثری بر روی کروموزوم‌های ۱ ،۳ و ۶ مکان‌یابی شدند. برای غلظت سدیم و نسبت سدیم به پتاسیم کروموزوم‌های ۱، ۶، ۱۰و ۱۲ دارای QTLهای بزرگ‌اثر بودند که منشاء اکثر آن‌ها FL478 بود. همچنین هیچ‌گونه اپیستازی معنی‌داری نیز بینQTLها مشاهده نشد. بنابراین در اصلاح به کمک نشانگر و با استفاده از لاین FL478 به عنوان یکی از متحمل‌ترین لاین‌های اصلاحی، لازم است هرم‌سازی QTLها مدنظر قرار گیرد. نتایج بررسی تحمل به شوری در مرحله زایشی در ۳۰ ژنوتیپ مختلف، درصد باروری دانه گرده را عامل بسیار مهمی در کاهش تعداد دانه پر و عملکرد دانه دانست و نشان داد که تحمل ژنوتیپ‌ها در مرحله زایشی با تحمل آنهادر مرحله گیاهچه‌ای ارتباطی ندارد.

فصل اول
مقدمه

۱-۱- مقدمه

برنج غذای اصلی بیش از نیمی از مردم دنیا را تشکیل می‌دهد و از نظر سطح زیر کشت بعد از گندم در رتبه دوم قرار دارد. حدود ۱۵۳ میلیون هکتار از زمین‌های دنیا زیر کشت برنج است. این محصول غذای اصلی ۹۰٪ از مردم جنوب و جنوب شرق آسیاست [111]. برنج بعد از گندم غذای اصلی مردم ایران است و در سطحی معادل ۶۰۰ هزار هکتار زراعت می‌شود. متوسط عملکرد برنج در ایران ۴ تا۵ تن در هکتار است [۱]. با توجه به رشد فزاینده و تصاعدی جمعیت جهان، افزایش تولید محصولات گیاهی امری بدیهی است.

عملکرد گیاهان زراعی تحت تأثیر اثر متقابل ژنوتیپ و محیط قرار داشته و عوامل زیستی و غیر زیستی متعددی بر آن مؤثرند. شوری به‌عنوان مهم‌ترین عامل غیرزیستی تأثیرگذار بر عملکرد است [7]. حدود ۱۰ ٪ زمین‌های زراعی دنیا یعنی حدود ۱/۲ میلیارد هکتار شور هستند [111]، ضمن این‌که بیش از یک سوم خاک‌های شور دنیا در آسیا واقع شده‌است. مشکل شوری به عنوان یک معضل مهم در کشورهای آسیایی مطرح است. حتی در بسیاری از کشورهای این منطقه شوری و قلیائیت به حدی گسترش یافته است که به صورت مشکلی برای اقتصاد ملی در آمده است [110]. در قاره آسیا پس از کشورهای شوروی سابق، چین، هندوستان و پاکستان بیشترین گسترش خاک‌های شور و قلیائی در ایران وجود دارد. از کل ۱۶۵ میلیون هکتار مساحت کشور، در حدود۲۳/۵میلیون هکتار معادل ۱۴/۲درصد کل مساحت کشور به درجات متفاوت

با مسائل شوری، سدیمی(قلیایی‌بودن) و ماندابی روبروست [2] و پیش‌بینی می‌شود که در آینده این میزان تا ۷۵ درصد از کل اراضی فاریاب کشور افزایش یابد. قسمت اعظم خاک‌های شور کشور و خصوصاً اراضی زیر کشت برنج دارای غلظت بالایی از نمک‌های محلول مثل سدیم و پتاسیم هستند [6]. گرچه شوری مشکل جدی تولید محصول در استان‌های گیلان و مازندران که بیش از ۸۰ درصد شالیزارهای کشور در آن‌ها قرار دارد نیست، ولی مشکل آینده در این استان‌ها به ویژه در اراضی نزدیک دریای خزر و نیز مشکل فعلی در شالیزارهای جنوب کشور به ویژه در استان خوزستان است. علاوه بر این یکی از موانع توسعه کشت برنج در مناطق دیگر به شرط وجود آب، معضل شوری است [4].

به‌طور کلی برنج را جزو گیاهان حساس و نیمه حساس به شوری طبقه‌بندی می‌کنند[۲۳]. تنوع ژنتیکی بسیار بالائی برای تحمل به شوری در برنج موجود است، ولی درجه تحمل بسیار بالا نیست [23]. تحمل به شوری در گیاهان صفت پیچیده و برآیند تعدادی مسیر فیزیولوژیک و صفت مختلف است که هر کدام به‌نوبه خود به شدت تحت تأثیر محیط قرارمی‌گیرند. واکنش برنج به شوری در مراحل مختلف رشد متغیر است. همچنین به‌لحاظ عدم وجود تنوع ژنتیکی کافی و از طرفی فقدان روش‌های گزینش کارآ، علی‌رغم تلاش‌های زیادی که برای افزایش تحمل به شوری در برنج صورت گرفته است، اصلاح این صفت با روش‌های متداول اصلاح با مشکل مواجه بوده وموفقیّت ها در این زمینه چندان قابل توجه نبوده است [23]. روش‌های مولکولی از طریق نشانمندکردن ژن‌ها و گزینش به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی تسریع ایجادکرده است. شناسایی نشانگرهای مولکولی کاملاً پیوسته با ژن مورد نظر و مکان‌یابی آن یک هدف مهم در اصلاح برنج است که از این طریق می‌توان بر پیچیدگی‌های روش‌های اصلاحی متداول غلبه کرد [23].

از سال ۱۹۹۳ تاکنون حدود ۲۹ رقم از ۱۲ گونه برای تحمل به شوری اصلاح و معرفی شده‌اند که فقط دو رقم از آن‌ها برنج بوده است[22]. تلاش برای افزایش تحمل به شوری در برنج از طریق اصلاح به اوایل دهه ۱۹۷۰ برمی‌گردد[8] پس از شناسائی نشانگرهای مولکولی تعیین مکان ژن‌های صفات کمّی از جمله تحمل به شوری در اغلب گیاهان زراعی عملی گشته است. این نشانگرها برای انتخاب ژنوتیپ‌های مطلوب بکار گرفته می‌شوند و بدین‌ترتیب گزینش به کمک نشانگر برای صفات کمّی در طی نسل‌های در حال تفکیک [اوّلیه] و یا نسل‌های تلاقی برگشتی امکان‌پذیر خواهد شد [۸]. استفاده از نشانگرهای ریزماهواره درطی سال‌های اخیر جهت نقشه‌یابی QTL[1]ها در برنج مورد توجه فراوان قرار گرفته‌است [۷۹].

یک مکان کروموزومی بزرگ‌اثر که در تنظیم جذب سدیم، جذب پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم و تحمل به شوری در مرحله گیاهچه در برنج مؤثر است، توسط گریگوریو[29] در سال ۱۹۹۷درنسل F_8 حاصل از تلاقی Pokkali×IR29 شناسائی گردید. این ناحیه در کروموزوم یک با استفاده از جمعیت لاین-

---

۱- Quantitative Trait Loci (QTLs)

های اینبرد نوترکیب (RIL[1]) وبا استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (SSR[2] و SSLP[3]) تحت نام *Saltol* شناسائی گردید [29]. جهت یافتن نشانگرهای با پیوستگی نزدیک با ناحیه *Saltol* که در طرح‌های گزینش با کمک نشانگر (MAS4) به منظور اصلاح برای تحمل به شوری ضروری است، بونیلا و نیونس [11و87] نقشه این ناحیه از کروموزوم را با استفاده از نشانگرهای RFLP[5] و SSLP با استفاده از جوامع حاصل از تلاقی Pokkali×IR29 اشباع نمودند. نقشه‌یابی ظریف‌تر این ناحیه، مسیر را جهت یافتن نشانگرهای مطمئن‌تر جهت انجام گزینش برای تحمل به شوری به کمک نشانگر و همچنین شناسایی ژن‌های مسئول این ناحیه هموار خواهد کرد.

در پژوهش گریگوریو [۲۹] یکی از لاین‌های اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی Pokkali×IR29 ، تحمل بالاتری از والد متحمل(Pokkali) داشت و هم‌اکنون به‌عنوان والد متحمل (شاهد) در آزمایش‌های ارزیابی شوری در برنج مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی و نقشه‌یابی جوامع حاصل از این لاین (IR66946-3R-178-1-1) که FL478 نامیده می‌شود، می‌تواند به درک بهتر مکانیسم تحمل، شناسائی دقیق‌تر نقش *Saltol* در ایجاد تحمل، بررسی سایر مکان‌های ژنی مؤثر در تحمل به شوری و آثار متقابل ژنی کمک نماید و در نهایت نمایانگر مسیر دقیق‌تر انتخاب به کمک نشانگر و یا هرم‌سازی ژنی گردد.

۱-۲- اهداف تحقیق

با توجه به این مقدمه اهداف این پژوهش به شرح ذیل می‌باشند:

۱- ارزیابی لاین‌های نسبتاً ایزوژن(NIL[6]) حاصل از تلاقی Pokkali×IR29 از لحاظ درجه تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای.

۲- ارزیابی لاین‌های نسبتاً ایزوژن حاصل از تلاقی FL478×IR29 از لحاظ درجه تحمل به شوری و غلظت یون‌های Na^+ و K^+ در مرحله گیاهچه‌ای.

۳-اعتبار سنجی نشانگرهای ژنتیکی شناسایی‌شده برای ناحیه *Saltol* در جمعیت تصادفی لاین‌های نسبتاً ایزوژن حاصل از تلاقی Pokkali×IR29 وتعیین نزدیک‌ترین نشانگرهای مولکولی به آن ناحیه جهت کاربرد دربرنامه های به‌نژادی اصلاح به کمک نشانگر.

۴- بررسی تنوع آللی *Saltol* با استفاده ازتنوع هاپلوتیپی ژنوتیپ‌های متنوع از تحمل به شوری و

1- Recombinat Inbred Lines
2- Simple Sequence Repeat
3- Simple Sequence Length Polymorphism
4- Marker Assisted Selection
5- Restriction Fragment Length Polymorphism
6- Near Isogenic Lines

همچنین ارزیابی ترکیبات مختلف آللی تأثیرگذار بر تحمل به شوری در ناحیه *Saltol*.

۵-ارزیابی ژنوتیپ‌های کرانه‌ای بالاو پایین ار لحاظ تحمل به شوری در ژرم‌پلاسم برنج ایرانی از لحاظ دارا بودن ناحیه *Saltol* و بسترسازی برای انتقال این ناحیه کروموزومی از طریق برنامه‌های اصلاحی و اصلاح به کمک نشانگر (MAS).

۶- اعتبارسنجی نقش *Saltol* در بروز تحمل به شوری در لاین FL478.

۷- مکان‌یابی سایر QTLهای کننده صفات مرتبط با تحمل به شوری با استفاده از جمعیت تصادفی لاین‌های نسبتاً ایزوژن حاصل از تلاقیFL478×IR29.

۸- ارزیابی تنوع ژنتیکی در تحمل به شوری در مرحله زایشی و بررسی ارتباط تحمل در مرحله گیاهچه‌ای و مرحله زایشی در ژنوتیپ‌های برنج.

فصل دوم
بررسی منابع

۲-۱- تحمل به شوری در برنج

حدود ۱۰ درصد از زمین‌های زراعی دنیا یعنی حدود ۱/۲ میلیارد هکتار شور هستند[111]. شوری یکی از مهم‌ترین مسائل خاک در مناطق برنج‌خیز است [31] یکی ازآثار مستقیم شوری در گیاه افزایش محتوای یونی است که باعث اختلال در فعالیت‌های آنزیمی، غشاء سلولی و سایر فرآیندهای متابولیکی می‌شود. مهم-ترین اثر غیرمستقیم و قابل مشاهده شوری، کاهش آب قابل دسترس خاک می‌باشد که در اثر کاهش پتانسیل آب خاک ایجاد می‌گردد [84]. مشکلات شوری عموماً با مشکلات دیگری مثل کمبود مواد معدنی(روی و فسفر)، سمیت مواد معدنی (آهن و آلومینیوم)، غرقابی و خشکی ترکیب می‌شوند. این تنش‌ها از نظر اندازه و اثر متقابل در طول زمان و مکان متفاوت هستند. بنابراین برای اصلاح برنج در شرایط شور بایستی صفات متحمل به چند تنش مدنظر قرار گیرند. در نتیجه آگاهی از مکانیسم‌های فیزیولوژیکی این صفات، اساس بیوشیمیایی آنها، ژنتیک توارث، روش‌های ارزیابی و اندازه‌گیری کارآ برای افزایش پیشرفت برنامه اصلاحی مورد نیاز است [32،30،29].

با توجه به تغییرات آب و هوایی در اثر گرم شدن کره زمین و در نتیجه تبخیر بیشتر، بالا آمدن سطح آب دریا وکشت دراراضی حاشیه‌ای دارای تنش شوری ، مشکل شوری در آینده جدی‌تر خواهد بود [84].

علائم تنش شوری با کاهش سطح مؤثر برگ شروع و با کاهش وزن خشک ریشه و اندام هوایی و

مرگ برگ‌های پیر ادامه می‌یابد. آسیب نمک نیز از طریق سمیت یون‌های سدیم و کلرید ایجاد می‌شود [15]. یون پتاسیم که در فعال کردن آنزیم‌ها و باز و بسته‌شدن روزنه‌ها نقش اساسی دارد با تحمل به شوری مرتبط است [29]. برنج به شوری نسبتاً حساس است. شوری، گیاه برنج را در مراحل مختلف رشد از جوانه‌زنی تا رسیدن کامل به درجات مختلف تحت تأثیر قرار می‌دهد. برنج در مرحله جوانه‌زنی به شوری نسبتاً متحمل و در اوایل دوره گیاهچه‌ای (۳ برگی) بسیار حساس و مجدداً در مرحله رشد رویشی متحمل می‌باشد[32]. برنج در مرحله گرده‌افشانی و لقاح نیز به شوری حساس بوده و در مرحله رسیدگی به‌طور فزاینده‌ای متحمل می‌گردد [60 ، 61، ۸۴]. از این‌رو برای آگاهی از واکنش گیاه به شوری بهتر است آثار شوری در همه مراحل رشد به طور جداگانه مطالعه شود.

اثر شوری در برنج بیش از ۵۰ سال تحت مطالعه بوده است و تلاش برای افزایش تحمل از طریق اصلاح به اوایل دهه ۱۹۷۰ برمی‌گردد [13]. علی‌رغم تلاش‌های قابل‌توجه از طریق برنامه‌های اصلاحی ملی و بین‌المللی، پیشرفت در افزایش تحمل به شوری کند بوده و تعداد محدودی رقم جدید در این راستا معرفی گردیده‌اند [12]. بهترین راهبرد برای افزایش عملکرد در اراضی شور، استفاده از ارقام متحمل [61] و اعمال مدیریت آب و خاک است [30]. جنبه‌های مختلف اصلاح برای تحمل به شوری توسط محققین زیادی مطالعه شده است [8 ، 26، 29،32]. موفقیت‌های به دست آمده در گذشته به دلیل پیچیدگی کار برای اصلاح تحمل به شوری [137]، فقدان احساس ضرورت و فوریت واقعی برای اصلاح آن، تنوع ژنتیکی ناکافی برای تحمل به شوری، پیچیدگی آثار متقابل شوری با عوامل محیطی و فقدان روش گزینشی کارآ چندان قابل توجه نبوده است [32]. در حال حاضر با پیشرفت‌هائی که در ارزیابی ذخایر توارثی، روش‌های ارزیابی، مطالعات ژنتیکی [30 ، 104] فن‌آوری نشانگرهای مولکولی و مکان‌یابی و نیز از نظر نرم‌افزاری [46، 88] حاصل شده است، پیشرفت اصلاح برای تحمل به شوری و سایر تنش‌های غیرزیستی ساده‌تر و سریع‌تر شده است.

در برنج چند مکانیسم تحمل به شوری شناسایی شده‌اند [29،30، 32، 137] که از آن جمله می‌توان ممانعت از ورود نمک اضافی با جذب انتخابی ، جذب نمک اضافی از آوند چوبی پس از جذب اولیه و در نتیجه ممانعت از انتقال یون سدیم به اندام هوایی، ارتباط الکترولیتی زیاد ریشه با الکترولیت کم اندام هوایی برای کاهش انتقال سدیم به اندام هوایی، انتقال نمک اضافی از برگ‌های جوان به برگ‌های پیرتر، ذخیره نمک در واکوئل و رقیق نگه داشتن نمک در داخل برگ از طریق سرعت رشد بالا و محتوای آب بیشتر در برگ‌ها را نام برد. تمام این مکانیسم‌ها باعث کاهش یون سدیم در سیتوزول بافت‌های فعال و در نتیجه عدم صدمه به آنزیم‌ها و پروتئین‌های موجود درآن می‌گردند. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های تحمل به شوری در گیاهان کنترل جذب سدیم توسط ریشه است، اما به دلیل ارتباط خطی که معمولاً بین جذب سدیم و تعرق