

مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده تحمل به تنش‌های خشکی و شوری در مرحله جوانه‌زنی برنج

بابک ربیعی^{۱*}، زهرا مردانی^۲، حسین صبوری^۳ و عاطفه صبوری^۴
۱، ۲، ۴، استاد، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ۳، استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس.
(تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۲/۹/۱۳)

چکیده

خشکی و شوری، دو تنش غیرزیستی مهم در تولید برنج در سراسر جهان محسوب می‌شوند. تحمل به شوری و خشکی و قوی‌تر بودن اجزای جوانه در برنج، از مهم‌ترین صفات در استقرار بهتر گیاهچه در خاک‌های شور و خشک است. این پژوهش در سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۹۰ در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های تحمل به شوری و خشکی، از جمعیت $F_{2:4}$ حاصل از تلاقی رقم بومی غریب (متحمل به شوری و خشکی) و رقم اصلاح‌شده سپیدرود (حساس به شوری و خشکی) انجام گرفت. نقشه پیوستگی حاصل از ۱۰۵ نشانگر AFLP و ۱۳۱ نشانگر ریزماهواره، ۲۴۷۵/۷ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را با فاصله متوسط ۱۰/۴۸ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور پوشش داد. تجزیه QTL با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، در مجموع برای شاخص تنش جوانه‌زنی، شاخص قدرت بذر، صفات سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول کلئوریز، وزن خشک ساقه‌چه، وزن تر کلئوپتیل و وزن خشک گیاهچه تحت شرایط تنش خشکی حاصل از مانیتول (۸- بار) و تنش شوری (۸ دسی‌زیمنس) تعداد ده QTL مشترک را شناسایی کرد. از بین QTL‌های شناسایی‌شده، هفت QTL مرتبط با خشکی و هفت QTL مرتبط با شوری، بیش از ۱۵ درصد تغییرات فنوتیپی مربوط به صفات را توجیه کردند. به نظر می‌رسد که بتوان این QTL‌ها را در زمره QTL‌های مهم کنترل‌کننده صفات تحمل به خشکی و شوری محسوب نمود و در صورت تأیید از آنها در برنامه‌گزینش به کمک نشانگر استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: برنج (*Oryza sativa L.*)، تنش خشکی و شوری، جوانه‌زنی، شاخص تنش جوانه زنی.

مقدمه

به‌علت استقرار سریع‌تر پوشش گیاهی برای تولید مواد فتوسنتزی، از عملکرد بهتری نیز برخوردارند (Anbumalarmathi & Mehta, 2013). مطالعات بسیاری در زمینه تحمل به تنش شوری و خشکی در برنج صورت پذیرفته است که بیانگر اهمیت مرحله جوانه‌زنی و ارتباط آن با دیگر مراحل رشدی گیاه برنج است (Janrdhan & Yanaht, 1982; Torres & Echevarria, 1994; Islam & Karim, 2010; Yaghoubian et al., 2012).

مرحله جوانه‌زنی، از مهم‌ترین مراحل رشدی گیاه برنج به حساب می‌آید و تنش شوری و خشکی، تأثیر بسزایی بر خصوصیات جوانه‌زنی گیاه برنج دارند (Bal et al., 1984). بنابراین انتخاب گیاهان مقاوم به تنش‌های محیطی در مرحله جوانه‌زنی بذر اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا ژنوتیپ‌هایی که توانایی جوانه‌زنی بیشتری دارند، در مرحله گیاهچه‌ای، سیستم ریشه‌ای قوی‌تری دارند و

از آنجا که خشکی و شوری، مهم‌ترین تنش‌های محیطی مؤثر بر رشد و محصول‌دهی گیاهانی مثل برنج هستند، شناسایی ژن‌های درگیر و تعیین الگوهای بیان آنها در پاسخ به تنش‌ها و درک عملکرد آنها در سازگاری با تنش، بستر لازم را برای یافتن راهکارهایی کارآمدتر برای افزایش تحمل به تنش فراهم خواهد آورد (Hashemi et al., 2012).

بهبود برای تحمل به تنش‌های غیرزیستی در برنج، می‌تواند تولید را در مناطق تحت تأثیر تنش که هم‌اکنون از آنها استفاده نمی‌شود، گسترش دهد. بر همین مبنا، نیاز بیشتر به فهم چگونگی پاسخ گیاهان در شرایط مختلف با امید به توسعه مقاومت نباتات به تنش‌های محیطی جلوه‌گر می‌شود. امروزه پیشرفت تکنیک‌های ژنومیکس و پروتئومیکس و کاربرد نشانگرهای مولکولی، اصلاح برای تحمل به تنش را از طریق کارایی گزینش سرعت بخشیده و سبب‌ساز مطالعات کاربردی در زمینه تحمل به خشکی و شوری در گیاهان مختلف شده است (Park et al., 2009).

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مؤثر بر تحمل به خشکی و شوری، در ایجاد و توسعه ارقام برنج متحمل در شرایط خشک و شور بسیار راهگشا خواهد بود (Salunkhe et al., 2011).

تحقیقات متعددی در زمینه فهم اساس ژنتیکی تحمل به خشکی و شوری در برنج صورت گرفته است (Lafitte et al., 2002; price et al., 2002; Babu et al., 2003; Robin et al., 2003; Wang et al., 2011).

ژن‌های مرتبط با تحمل به خشکی Wang et al. (2005) را در حد فاصل نشانگرهای RM212-RM319 روی کروموزوم ۱ برنج تعیین کردند.

مواد و روش‌ها

جمعیت مکان‌یابی و ارزیابی‌های فنوتیپی

این پژوهش در سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۹۰ در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام گرفت. در این بررسی از ۱۴۸ خانواده F_4 حاصل از تلاقی بین رقم محلی غریب و رقم اصلاح‌شده سپیدرود استفاده شد. رقم غریب، نوعی رقم بومی متحمل به خشکی و شوری، پابلند، دانه‌کوتاه، با کیفیت پخت مناسب و عملکرد دانه کم است، درحالی‌که رقم

بهبود برای تحمل به تنش‌های غیرزیستی در برنج، می‌تواند تولید را در مناطق تحت تأثیر تنش که هم‌اکنون از آنها استفاده نمی‌شود، گسترش دهد. بر همین مبنا، نیاز بیشتر به فهم چگونگی پاسخ گیاهان در شرایط مختلف با امید به توسعه مقاومت نباتات به تنش‌های محیطی جلوه‌گر می‌شود. امروزه پیشرفت تکنیک‌های ژنومیکس و پروتئومیکس و کاربرد نشانگرهای مولکولی، اصلاح برای تحمل به تنش را از طریق کارایی گزینش سرعت بخشیده و سبب‌ساز مطالعات کاربردی در زمینه تحمل به خشکی و شوری در گیاهان مختلف شده است (Park et al., 2009).

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مؤثر بر تحمل به خشکی و شوری، در ایجاد و توسعه ارقام برنج متحمل در شرایط خشک و شور بسیار راهگشا خواهد بود (Salunkhe et al., 2011).

تحقیقات متعددی در زمینه فهم اساس ژنتیکی تحمل به خشکی و شوری در برنج صورت گرفته است (Lafitte et al., 2002; price et al., 2002; Babu et al., 2003; Robin et al., 2003; Wang et al., 2011).

ژن‌های مرتبط با تحمل به خشکی Wang et al. (2005) را در حد فاصل نشانگرهای RM212-RM319 روی کروموزوم ۱ برنج تعیین کردند.

تحقیقات متعددی در زمینه فهم اساس ژنتیکی تحمل به خشکی و شوری در برنج صورت گرفته است (Lafitte et al., 2002; price et al., 2002; Babu et al., 2003; Robin et al., 2003; Wang et al., 2011).

ژن‌های مرتبط با تحمل به خشکی Wang et al. (2005) را در حد فاصل نشانگرهای RM212-RM319 روی کروموزوم ۱ برنج تعیین کردند.

به منظور مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با خصوصیات جوانه‌زنی در برنج تحت شرایط شور، با استفاده از جمعیت $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی ارقام طارم محلی با خزر در شرایط تنش اسمتیک حاصل از سوربیتول، هفت QTL مرتبط با سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقچه‌چه را با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب تعیین کرد. (Wang et al., 2011) QTL‌های مرتبط با صفات جوانه‌زنی را تحت دو وضعیت تنش شوری و شرایط طبیعی در گیاه برنج شناسایی کردند.

شمارش n ام؛ و X_n : درصد بذره‌های جوانه‌زده در شمارش n ام است.

استخراج DNA و PCR

برای اجرای بخش ارزیابی ژنوتیپی جمعیت، از جمعیت F_2 استفاده شد. بدین منظور استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگ‌گی که از هر ۱۴۸ تک‌بوته F_2 تهیه شده بود، به روش *Saghi Maroof et al.* (1994) و با اندکی تغییر انجام گرفت. نشانگرهای ریزماهواره با توجه به نقشه ژنتیکی مک‌کوچ و همکاران (*McCouch et al.*, 2002) به‌نحوی انتخاب شد که اولاً به‌طور متوسط، ۱۰ سانتی‌مورگان از هم فاصله داشته باشند و ثانیاً روی دوازده کروموزوم برنج پراکنده شده باشند. در این پژوهش، چندشکلی والدین با استفاده از ۵۷۵ جفت نشانگر ریزماهواره و ۲۰ ترکیب از آغازگرهای AFLP پس از هضم DNA ژنومی به‌وسیله آنزیم‌های *MseI* و *EcoRI* بررسی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نشانگرهای ریزماهواره در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۱ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۴۸ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۶۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۰/۶ میکرولیتر مخلوط چهار نوکلئوتید با غلظت ۲ میلی‌مولار، ۰/۱۲ میکرولیتر آنزیم تک‌دی‌ان‌ای پلی‌مرز با غلظت ۵ واحد و ۵ میکرولیتر آب مقطر انجام گرفت. برنامه تکثیر به‌صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه و در ادامه، مرحله اول شامل ۱۰ چرخه با کاهش یک درجه سانتی‌گراد در هر چرخه برای دمای اتصال آغازگرها شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۶ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه؛ و مرحله دوم شامل ۲۶ چرخه با ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۵ ثانیه بود که پس از آن، بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

روش AFLP نیز براساس روش *Vos et al.* (1995) با اندکی تغییر صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل‌های توالی‌یاب ۶ درصد پلی‌اکریل آمید تفکیک و برای

سپیدرود، نوعی رقم اصلاح‌شده حساس به خشکی و شوری، پاکوتاه، دانه‌بلند، با کیفیت پخت ضعیف و عملکرد دانه به‌نسبت زیاد است (*Sabouri et al.*, 2007; Sabouri, 2010a). برای این منظور در بخش ارزیابی فنوتیپی، ۱۴۸ خانواده F_4 به‌همراه دو والد در دو آزمایش مجزا در مرحله جوانه‌زنی (تحت تنش خشکی و شوری) در دو تکرار بررسی شدند. هر تکرار شامل ۴۰ بذر سالم از هر دو والد و هر یک از خانواده‌های F_4 بود. بذرها با محلول ۲ درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر شست‌وشو شدند. بذرها در ظروف پتری استریل و روی کاغذهای صافی قرار داده شدند و برای اعمال تنش خشکی، ۵ میلی‌لیتر محلول مانیтол با غلظت (۸ بار) به آنها اضافه شد. در آزمایش دوم، برای اعمال تنش شوری ۵ میلی‌لیتر محلول NaCl با غلظت (۸ دسی‌زیمنس) به آنها اضافه شد (غلظت‌های به‌کاررفته در یک پیش‌آزمایش تعیین شدند). برای اندازه‌گیری صفات مورد نظر، تعداد بذره‌های جوانه‌زده هر یک از والدین و خانواده‌های F_4 ، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت پس از آغاز آزمایش شمارش شد (*Djanaguiraman et al.*, 2004). در زمان آخرین قرائت، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول کلئوریز، وزن خشک ساقه‌چه، وزن تر کلئوپتیل و وزن خشک گیاهچه، و نیز شاخص تنش جوانه‌زنی (*Bousslama & Schapaugh*, 1984) و شاخص قدرت بذر (*Abdul-Baki & Anderson*, 1973) اندازه‌گیری شد. درصد جوانه‌زنی از نسبت تعداد نهایی بذره‌های جوانه‌زده به تعداد کل بذره‌های قرارگرفته در پتری، و سرعت جوانه‌زنی نیز بر حسب جوانه‌زنی نسبی بذرها در روز به‌ترتیب بر اساس روابط ۱ و ۲ محاسبه شد (*Maguire*, 1962).

(۱)

$$PG = N_i / N \times 100$$

(۲)

$$PG = X_1 / Y_1 + (X_2 - X_1) / Y_2 \dots + (X_n - X_{n-1}) / Y_n$$

که در آن PG: درصد جوانه‌زنی؛ N_i : تعداد بذره‌های جوانه‌زده در روز n ام؛ N : تعداد کل بذرها؛ RG: سرعت جوانه‌زنی؛ Y_n : تعداد روز از شروع آزمایش تا زمان

مشاهده نوارها از رنگ آمیزی نیترات نقره به روش *Bassam et al.* (1991) استفاده شد.

تهیه نقشه پیوستگی و تجزیه QTL

قبل از تهیه نقشه پیوستگی، ابتدا نسبت های ژنوتیپی مورد انتظار ۱:۲:۱ برای نشانگرهای هم پارز و ۳:۱ برای نشانگرهای غالب در جمعیت به وسیله آزمون کای اسکور χ^2 آزمون شد. برای تهیه نقشه پیوستگی در جمعیت F_2 تحت مطالعه، از داده های ژنوتیپی ۱۳۳ نشانگر ریزماهواره و ۱۰۵ نشانگر AFLP چندشکل در دو والد استفاده و نقشه پیوستگی با استفاده از نرم افزار Map Manager (Manly & Olson *et al.*, 1999) تهیه شد. قبل از تجزیه QTL نیز ابتدا آزمون نرمال بودن داده ها (آزمون چولگی و کشیدگی) انجام گرفت و QTL های کنترل کننده صفات مربوط، پس از انتقال نقشه پیوستگی تهیه شده به نرم افزار QTL Cartographer (Basten *et al.*, 1997)، با استفاده از روش مکان یابی فاصله ای مرکب شناسایی شد. عدد آستانه LOD به وسیله آزمون تبدیل با تعداد جایگشت ۱۰۰۰ انتخاب شد.

نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین صفات به ترتیب در وضعیت تنش شوری و خشکی با وضعیت عدم تنش در جدول های ۱ و ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که از نظر همه صفات، اختلاف معناداری بین دو وضعیت آزمایش وجود داشت و تنش شوری و تنش خشکی سبب کاهش تمامی صفات مورد ارزیابی شدند. در شرایط تنش، انرژی آزاد آب کاهش می یابد و گیاه برای به دست آوردن مقدار مشخصی آب، باید انرژی حیاتی بیشتری صرف کند. از این رو بخشی از انرژی مورد نیاز گیاه برای رشد و نمو صرف می شود و به این ترتیب رشد عمومی آن کاهش

می یابد (Ali *et al.*, 1998). توزیع فراوانی صفات مطالعه شده در ۱۴۸ خانواده F_4 به همراه میانگین والدین به ترتیب تحت وضعیت تنش شوری و تنش خشکی در شکل های ۱ و ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود، توزیع فنوتیپی صفات به صورت پیوسته است و برای بیشتر صفات تفکیک متجاوز مثبت یا منفی در نتایج مشاهده شد که بیانگر آن است که آلل های هر دو والد در تظاهر صفات دخالت داشتند و ترکیب آنها، به مقادیر بیشتر یا کمتر صفات نسبت به والدین منجر شده است.

نقشه پیوستگی حاصل از ۲۳۶ نشانگر چندشکل SSR و AFLP، ۲۴۷۵/۷ سانتی مورگان از ژنوم را با متوسط فاصله ۱۰/۴۸ سانتی مورگان بین دو نشانگر مجاور پوشش داد. با استفاده از نرم افزار MapManager ۱۳۸ نشانگر به دوازده گروه پیوستگی معادل با دوازده کروموزوم برنج منتسب شدند. در مجموع ده QTL با استفاده از روش مکان یابی فاصله ای مرکب در دو وضعیت تنش خشکی و شوری روی ۱۲ کروموزوم برنج به جز کروموزوم های ۲، ۵، ۶، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ شناسایی شد (جدول ۳ و شکل ۳). برای سرعت جوانه زنی یک QTL بزرگ اثر در هر دو وضعیت تنش شوری و تنش خشکی در موقعیت ژنومی مشابهی در حد فاصل نشانگرهای RM237-RM246 روی کروموزوم ۱ مکان یابی شد. در این QTL الل والد غریب در جهت افزایش سرعت جوانه زنی عمل کرد و اثر غالبیت نیز به سمت افزایش سرعت جوانه زنی بود. برآورد درجه غالبیت نیز نشان دهنده عمل فوق غالبیت این QTL در جهت افزایش سرعت جوانه زنی بود. حضور این QTL در دو محیط نشان دهنده ثبات بیان ژن و تأثیر نپذیرفتن آن از شرایط محیطی است.

جدول ۱. مقایسه میانگین صفات تحت ارزیابی در خانواده های F_4 تحت مطالعه در دو وضعیت تنش شوری و عدم تنش

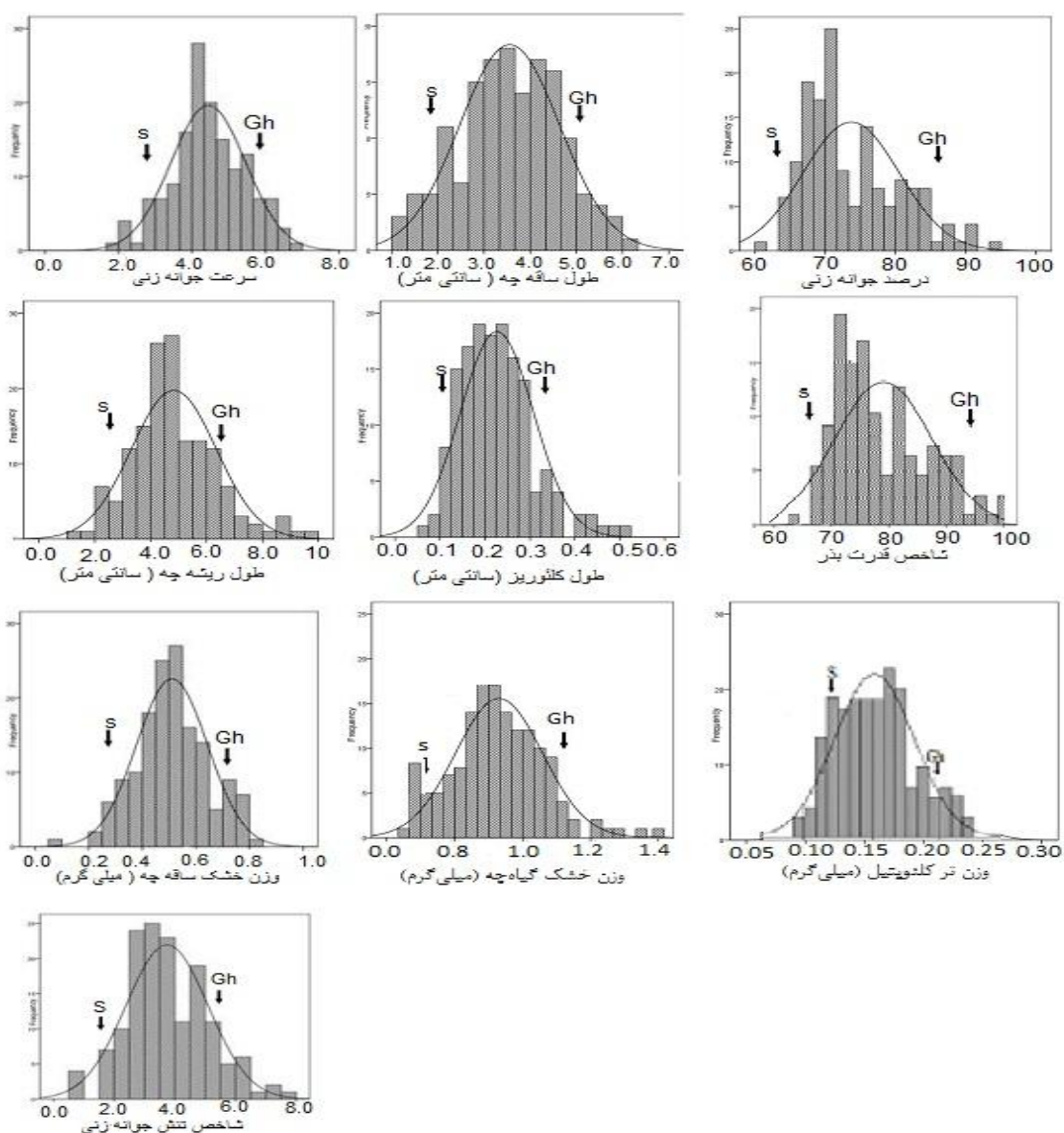
| ردیف | صفات | عدم تنش | تنش شوری | تفاوت |
|------|----------------------------|---------|----------|--------|
| ۱ | سرعت جوانه زنی | 6.14 | 5.54 | 0.60** |
| ۲ | درصد جوانه زنی | 98.92 | 95.75 | 3.17** |
| ۳ | طول ریشه چه (سانتی متر) | 4.87 | 3.28 | 1.59** |
| ۴ | طول ساقه چه (سانتی متر) | 4.26 | 2.53 | 1.73** |
| ۵ | طول کلوریز (سانتی متر) | 0.46 | 0.25 | 0.21* |
| ۶ | وزن تر کلنوپتیل (میلی گرم) | 1.05 | 0.36 | 0.69** |
| ۷ | وزن خشک ساقه چه (میلی گرم) | 4.22 | 0.62 | 3.6** |
| ۸ | وزن خشک گیاهچه (میلی گرم) | 5.27 | 1.78 | 3.49** |
| | شاخص قدرت بذر | 83.90 | 69.99 | 13.91* |

* و ** به ترتیب معنادار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

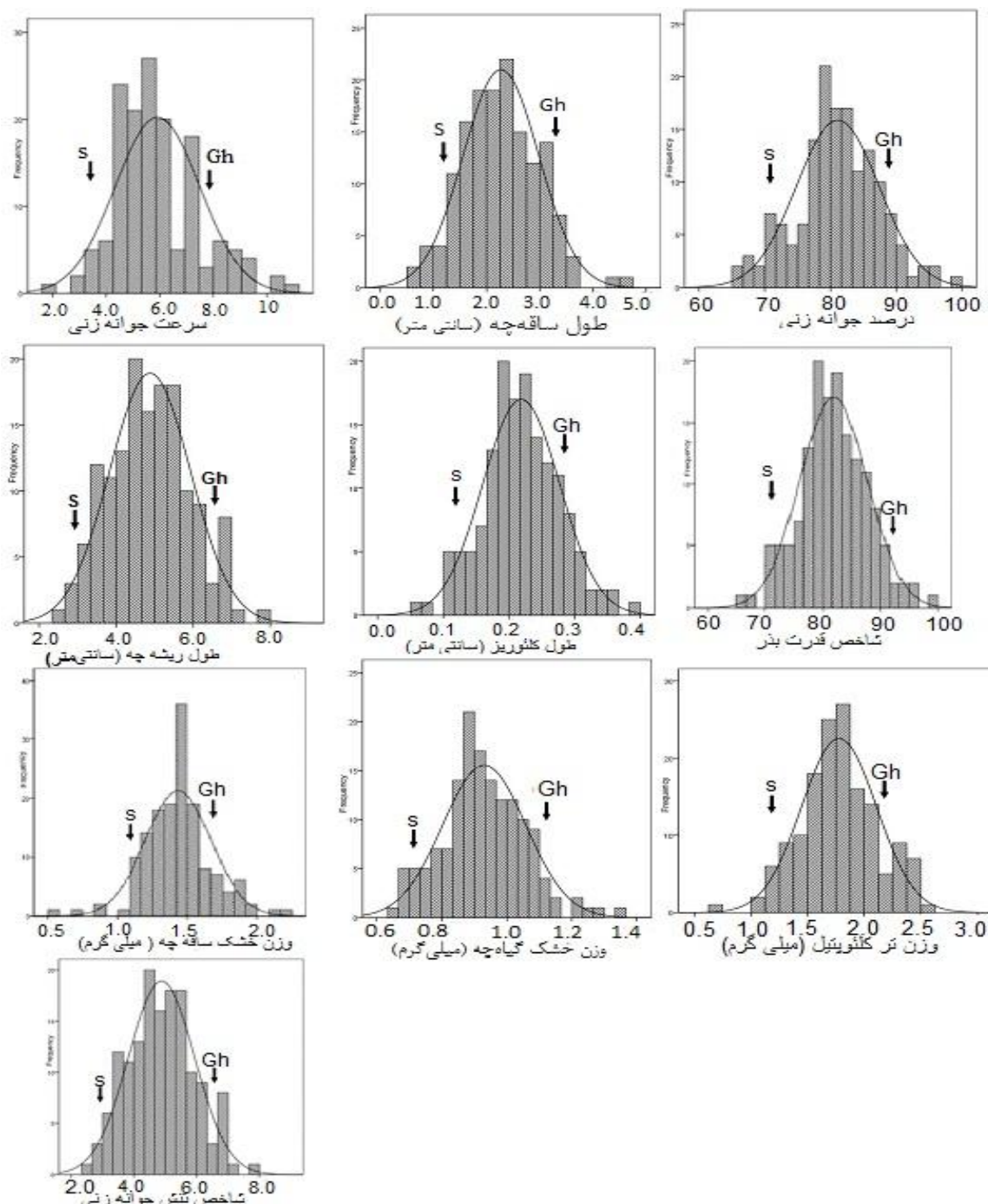
جدول ۲. مقایسه میانگین صفات تحت ارزیابی در خانواده‌های F₄ تحت مطالعه در دو وضعیت تنش خشکی و عدم تنش

| ردیف | صفات | عدم تنش | تنش خشکی | تفاوت |
|------|----------------------------|---------|----------|--------|
| 1 | سرعت جوانه‌زنی | 6.14 | 5.13 | 1.01** |
| 2 | درصد جوانه‌زنی | 98.92 | 94.53 | 4.39** |
| 3 | طول ریشه‌چه (سانتی‌متر) | 4.87 | 3.19 | 1.68** |
| 4 | طول ساقه‌چه (سانتی‌متر) | 4.26 | 2.37 | 1.89** |
| 5 | طول کلنوریز (سانتی‌متر) | 0.46 | 0.24 | 0.22* |
| 6 | وزن تر کلنوپتیل (میلی‌گرم) | 1.05 | 0.40 | 0.65* |
| 7 | وزن خشک ساقه‌چه (میلی‌گرم) | 4.22 | 1.00 | 3.22** |
| 8 | وزن خشک گیاهچه (میلی‌گرم) | 5.27 | 1.42 | 4.85** |
| 9 | شاخص قدرت بذر | 83.90 | 69.35 | 14.55* |

* و ** به ترتیب معنادار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.



شکل ۱. توزیع فراوانی صفات تحت مطالعه در جمعیت F₄ در وضعیت تنش شوری. والد‌های سپیدرود و غریب با S و Gh نشان داده شده‌اند.



شکل ۲. توزیع فراوانی صفات تحت مطالعه در جمعیت F_4 در وضعیت تنش خشکی. والد‌های سپیدرود و غریب با S و Gh نشان داده شده‌اند.

پژوهشگران نشان داد و ممکن است این QTLها با یکدیگر مرتبط باشند. به عقیده Zhang *et al.* (2006) از لحاظ مولکولی، همپوشانی‌های بسیاری بین پاسخ به خشکی، شوری و سرما و مسیر ترانس‌سای علامت آبسزیک اسید مشاهده می‌شود. در مقابل Liang *et al.* (2006) دو QTL روی کروموزوم‌های ۳ و ۱۰ برای سرعت

Zhang *et al.* (2005) QTLهای مرتبط با سرعت جوانه‌زنی را تحت وضعیت تنش سرما روی کروموزوم‌های ۱، ۴ و ۷ ردیابی کردند. QTL تعیین‌شده روی کروموزوم ۱ در حد فاصل نشانگرهای RM212-RM104 قرار داشت. QTL به‌دست‌آمده در این پژوهش از نظر موقعیت مکانی، مشابهت نزدیکی با نتایج تحقیق این

شد. نوع عمل ژن به‌صورت غالبیت ناقص در جهت کاهش درصد جوانه‌زنی و آلل‌های والد سپیدرود نیز در جهت کاهش درصد جوانه‌زنی عمل کردند. ظهور QTL اخیر در دو وضعیت مختلف آزمایشی نشان‌دهنده پایداری QTL برای تحمل به خشکی و شوری است. *Miura et al.* (2004) تحت وضعیت تنش دمایی پنج QTL برای درصد جوانه‌زنی روی کروموزوم‌های ۲، ۴، ۵ و ۱۱ (دو QTL) را به‌ترتیب با ۱۱/۹، ۱۴/۹، ۱۰/۱، ۱۰/۶، ۱۱/۵ درصد توجیه تغییرات فنوتیپی ردیابی کردند که با QTL‌های شناسایی‌شده روی کروموزوم‌های ۴ و ۵ در پژوهش حاضر مطابقت نداشتند.

جوانه‌زنی تعیین کردند که با نتایج پژوهش حاضر کاملاً متفاوت بود. Sabouri (2010) با استفاده از نقشه‌یابی فاصله‌ای برای سرعت جوانه‌زنی تحت وضعیت تنش شوری سه QTL روی کروموزوم‌های ۱ (دو QTL) و ۱۲ شناسایی کرد که یکی از QTL‌ها در حد فاصل نشانگرهای RM8144-RM466 در نزدیکی موقعیت *qGR-1* شناسایی‌شده در مطالعه حاضر قرار داشت. اثر افزایشی این ناحیه از ژنوم روی کروموزوم ۱ در هر دو مطالعه مثبت، و نوع عمل ژن به‌صورت فوق غالبیت بود. برای درصد جوانه‌زنی تنها یک QTL بزرگ‌اثر روی کروموزوم ۴ در موقعیت دقیقاً یکسانی در هر دو وضعیت تنش در حد فاصل نشانگرهای RM8213-E37-M60-3 شناسایی

جدول ۳. QTL‌های مکان‌یابی‌شده برای صفات مرتبط با جوانه‌زنی تحت شرایط تنش خشکی و شوری

| شرایط | صفات | QTL | نشانگر فواصل | Chr. | Pos ^c | LOD | اثر افزایشی | اثر غالبیت | درجه غالبیت | واریانس |
|-------|---------------------|---------------|-------------------------------|------|------------------|------|-------------|------------|-------------|---------------------------|
| | Traits ^a | | Markers interval ^b | | | | (a) | (d) | (d/ a) | فنوتیپی (R ²) |
| خشکی | GR | <i>qGR-1</i> | RM237-RM246 | 1 | 0.6 | 3.63 | 0.12 | 0.64 | 5.33 | 16.60 |
| | GP | <i>qGP-4</i> | RM8213-E37-M60-3 | 4 | 1.1 | 3.47 | -0.20 | -0.01 | -0.05 | 15.16 |
| | RL | <i>qRL-3</i> | RM6832-RM5626 | 3 | 2.4 | 3.61 | -0.25 | 0.10 | 0.40 | 5.81 |
| | PL | <i>qPL-8</i> | RM8264-E38-M61-3 | 8 | 1.5 | 3.20 | 0.09 | 0.01 | 0.11 | 18.35 |
| | COL | <i>qCOL-9</i> | RM434-E36-M59-11 | 9 | 4.2 | 2.45 | 0.05 | 0.01 | 0.20 | 8.97 |
| | CFW | <i>qCFW-8</i> | RM42-RM331 | 8 | 1.4 | 4.10 | 0.27 | 0.21 | 0.77 | 18.03 |
| | PDW | <i>qPDW-7</i> | RM5711-E36-M59-1 | 7 | 4.5 | 3.66 | 0.17 | 0.14 | 0.84 | 10.17 |
| | TDM | <i>qTDM-7</i> | RM5481-RM70 | 7 | 1.2 | 3.24 | 0.35 | 0.58 | 1.65 | 18.10 |
| | SVI | <i>qSVI-1</i> | RM237-RM1287 | 1 | 0.2 | 3.46 | 0.73 | 0.57 | 0.78 | 67.13 |
| | GSI | <i>qGSI-1</i> | RM212-RM1268 | 1 | 0.7 | 3.78 | 0.67 | 0.79 | 1.17 | 16.28 |
| شوری | GR | <i>qGR-1</i> | RM237-RM246 | 1 | 0.6 | 3.05 | 0.04 | 0.26 | 6.50 | 18.31 |
| | GP | <i>qGP-4</i> | E37-M60-3-RM8213 | 4 | 1.2 | 3.14 | -0.05 | -0.02 | -0.40 | 15.65 |
| | RL | <i>qRL-3</i> | RM6832-RM5626 | 3 | 2.2 | 2.04 | -0.45 | 0.18 | 0.40 | 7.35 |
| | PL | <i>qPL-8</i> | RM8264-E38-M61-1 | 8 | 3.9 | 3.19 | 0.14 | 0.08 | 0.57 | 16.10 |
| | COL | <i>qCOL-9</i> | RM434-E36-M59-11 | 9 | 3.9 | 2.91 | 0.01 | 0.04 | 4.0 | 8.08 |
| | CFW | <i>qCFW-8</i> | RM42-RM331 | 8 | 1.4 | 4.10 | 0.23 | 0.18 | 0.78 | 18.19 |
| | PDW | <i>qPDW-7</i> | RM5711-E36-M59-1 | 7 | 4.6 | 3.14 | 0.20 | 0.03 | 0.15 | 21.90 |
| | TDM | <i>qTDM-7</i> | RM5481-RM70 | 7 | 1.2 | 3.89 | 0.12 | 0.48 | 4.00 | 18.34 |
| | SVI | <i>qSVI-1</i> | RM237-RM1287 | 1 | 0 | 3.24 | 0.64 | 0.73 | 1.40 | 13.02 |
| | GSI | <i>qGSI-1</i> | RM212-RM1268 | 1 | 0.7 | 3.82 | 0.99 | 1.02 | 1.03 | 16.40 |

a سرعت جوانه‌زنی (GR)، درصد جوانه‌زنی (GP)، طول ریشه‌چه (RL)، طول ساقچه (PL)، وزن خشک گیاهچه (TDM)، شاخص قدرت بذری (SVI)، شاخص تنش جوانه‌زنی (GSI).

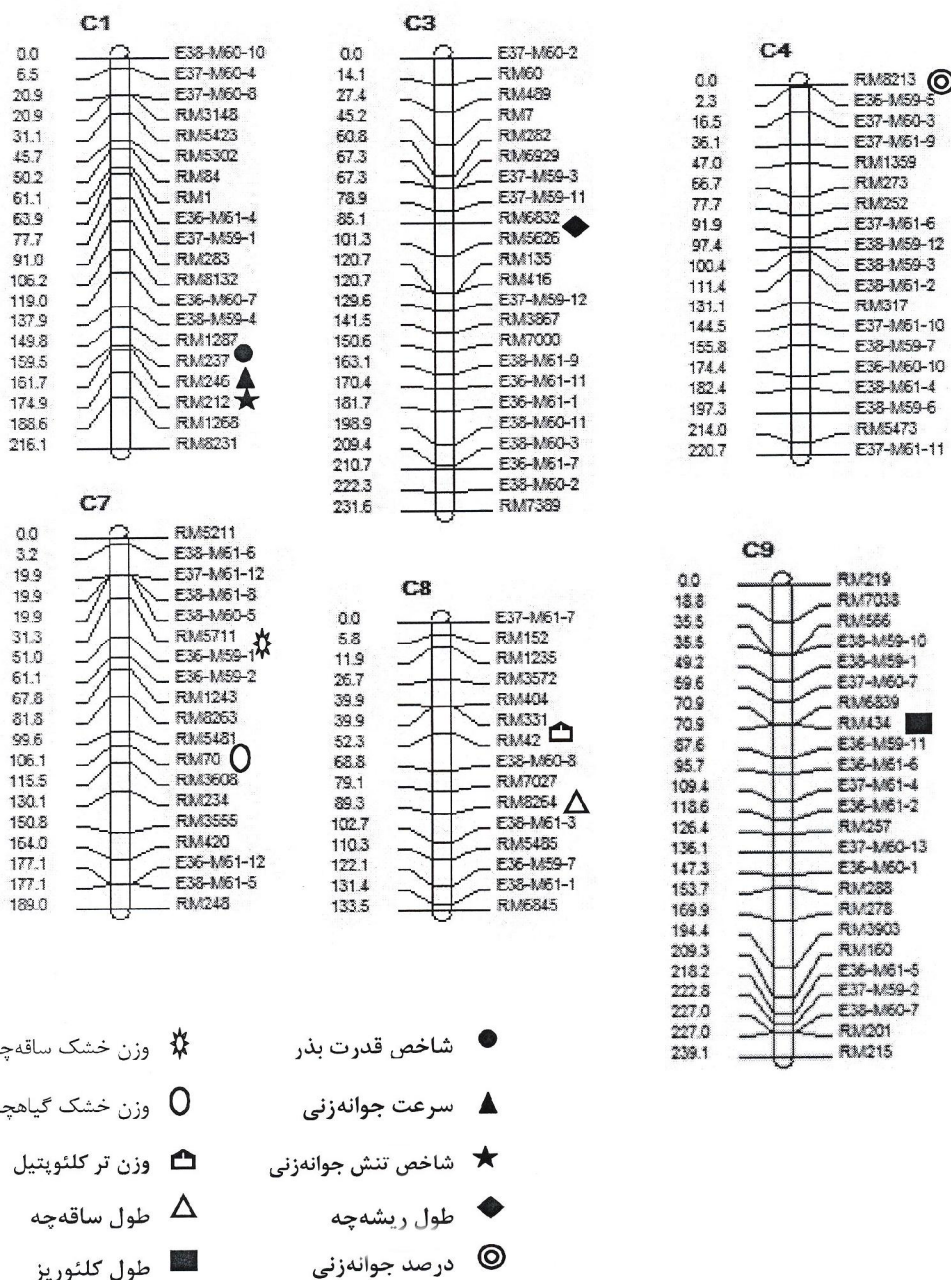
b نشانگرهایی که زیرشان خط کشیده شده به QTL مربوطه نزدیک‌ترند.

c موقعیت QTL نسبت به نزدیک‌ترین نشانگر مجاور (cM).

پژوهش *Wang et al.* (2011) برای صفت درصد جوانه‌زنی داشت که در محدوده نشانگرهای RM518-RM16535 در مجاورت QTL شناسایی‌شده در این پژوهش بود. شناسایی QTL یادشده در موقعیت ژنومی نسبتاً یکسان در مطالعه این محققان و پژوهش حاضر با زمینه ژنتیکی متفاوت، نشان‌دهنده این است که

Wang et al. (2011) با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای چندگانه، برای درصد جوانه‌زنی هفت QTL روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۴ (دو QTL)، ۷ (دو QTL) و ۱۰ تعیین کردند که تأثیر آنها از ۶/۵ تا ۱۶ درصد متغیر بود. *qGP-4* در پژوهش حاضر، تشابه زیادی با یکی از QTL‌های کروموزوم ۴ (*qGP-4-1*) مکان‌یابی‌شده در

به احتمال زیاد این نواحی از ژنوم برنج بر درصد جوانه‌زنی مؤثرند و با توجه به تأثیرات فنوتیپی آنها می‌توان از آن برای تحقیقات بعدی استفاده کرد.



شکل ۳. مکان‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به شوری و خشکی در جمعیت F_{2:4} حاصل از تلاقی غریب × سپیدرود

می‌توان QTL (*qRL-3*) را به‌عنوان QTL مؤثر در کنترل صفت طول ریشه‌چه در شرایط تنش شوری و خشکی برای گزینش به کمک نشانگر توصیه کرد. Redona & Mackill (1996) دو QTL مرتبط با طول ریشه‌چه را روی کروموزوم‌های ۵ و ۱۲ مکان‌یابی کردند که با نتایج این پژوهش کاملاً متفاوت بود. Sabouri (2010b) پنج

برای صفت طول ریشه‌چه، یک QTL مشترک روی کروموزوم ۳ تحت دو وضعیت تنش شوری و خشکی شناسایی شد. عمل‌ژن‌ها در هر دو QTL که کوچک‌اثر کنترل‌کننده این صفت بودند، به‌صورت غالبیت ناقص برآورد شد و اثر غالبیت در هر دو QTL به‌سمت افزایش طول ریشه‌چه بود. با توجه به نتایج

مجاورت QTL تعیین‌شده روی کروموزوم ۸ در مطالعه حاضر بود.

برای صفت شاخص قدرت بذر، تنها یک QTL روی کروموزوم ۱ در موقعیت یکسانی تحت شرایط تنش خشکی و شوری پیوسته با نشانگر RM1287 شناسایی شد. در هر دو وضعیت آزمایشی QTL پایدار شناسایی‌شده، کوچک‌اثر و منشأ آل‌های افزایشدهنده آن از والد غریب بود و نوع عمل ژن به‌صورت غالبیت ناقص در جهت کاهش شاخص قدرت بذر عمل کرد. (1997) Gregorio *et al.* توانستند با استفاده از جمعیت F₈ حاصل از تلاقی IR23 و Pokkali، سه QTL بزرگ‌اثر مرتبط با صفات سدیم، پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم اندام هوایی را روی کروموزوم ۱ شناسایی کنند. این قطعه در کروموزوم ۱ با نام *saltol* حدود ۶۴/۳ تا ۸۰/۲ درصد از تنوع فنوتیپی صفات مذکور را توجیه کرد، به‌طوری‌که *saltol* در پژوهش این محققان، به‌عنوان ژن اصلی مرتبط با تحمل به شوری در تحقیقات مکان‌یابی تحمل به شوری در دنیا به ثبت رسید. همچنین براساس یافته‌های پژوهش، آنها اذعان داشتند که نشانگرهای مذکور که به ناحیه *saltol* پیوسته‌اند، ممکن است در برنامه‌های گزینش به‌کمک نشانگر برای بهبود تحمل به شوری مفید باشند. با توجه به مطالعات -Mohammadi- Nejad *et al.* (2008)، نشانگر RM1287 نزدیک ناحیه *Saltol* قرار دارد. QTL به‌دست‌آمده برای شاخص قدرت بذر در مطالعه حاضر در دو وضعیت مختلف آزمایش پیوسته با نشانگر RM1287 بود. (2006) Han *et al.* تحت شرایط تنش دمایی یک QTL برای قدرت جوانه‌زنی بذر روی کروموزوم ۸ شناسایی کردند. You *et al.* (2006) QTL‌های مرتبط با قدرت جوانه‌زنی بذر را تحت شرایط تنش حاصل از اسید آبسزیک روی کروموزوم‌های ۱، ۲ و ۸ مکان‌یابی کردند.

QTL تعیین‌شده در مطالعه You *et al.* (2006) روی کروموزوم ۱ در فاصله نشانگرهای RM237-RM302 از نظر موقعیت مکانی، بسیار نزدیک به QTL شناسایی‌شده در مطالعه حاضر قرار داشت.

برای صفت وزن تر کلئوپتیل در هر دو محیط، یک QTL بزرگ‌اثر پیوسته با نشانگر RM42 روی کروموزوم ۸ شناسایی شد. اثر افزایشی این QTL به‌صورت مثبت

برای طول ریشه‌چه در وضعیت تنش شوری روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۷، ۸ و ۱۰ شناسایی کرد که با QTL‌های شناسایی‌شده در این پژوهش مطابقت نداشت. Sabouri *et al.* (2010) نیز یک QTL مرتبط با طول ریشه‌چه (*qRL-12a*) را که معادل ۲۵ درصد از تغییرات فنوتیپی کل را توجیه می‌کرد، ردیابی کردند که با QTL‌های شناسایی‌شده در این پژوهش مطابقت نداشت. برای صفت طول ساقه‌چه تحت شرایط تنش شوری و خشکی، تنها یک QTL بزرگ‌اثر در موقعیت یکسانی روی کروموزوم ۸ شناسایی شد. این QTL با نشانگر RM8264 پیوستگی داشت و به‌ترتیب بیش از ۱۸ و ۱۶ درصد تغییرات این صفت را توجیه کرد. اثر افزایشی مثبت این QTL نشان می‌دهد که آل افزایش‌دهنده طول ساقه‌چه از والد غریب به ارث رسیده است و نوع عمل ژن نیز دارای عمل غالبیت ناقص در جهت افزایش طول ساقه‌چه بود.

این QTL به‌عنوان QTL بزرگ‌اثر کنترل‌کننده طول ساقه‌چه تحت شرایط تنش خشکی و شوری شناسایی شد و برای گزینش توصیه می‌شود.

Zhang *et al.* (2005) تحت شرایط تنش دمایی

برای صفت طول ساقه‌چه، شش QTL روی کروموزوم‌های ۳ (دو مورد)، ۵، ۷ و ۸ (دو مورد) تعیین کردند. یکی از QTL‌های مکان‌یابی‌شده روی کروموزوم ۸ در مطالعه آنان، در حد فاصل نشانگرهای RM223-RM210-OSR7 در مجاورت QTL تعیین‌شده برای طول ساقه‌چه در پژوهش حاضر ردیابی شد. Sabouri *et al.* (2010) شش QTL مرتبط با طول ساقه‌چه تحت شرایط تنش اسمزی ناشی از سوربیتول روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۴، ۵، ۷ و ۱۲ شناسایی کردند. مطابقتی بین نتایج تحقیق این پژوهشگران و مطالعه حاضر دیده نشد. Sabouri (2010b) سه QTL بزرگ‌اثر برای طول ساقه‌چه تحت شرایط تنش شوری روی کروموزوم ۱ شناسایی کرد که عمل ژن در کلیه QTL‌های شناسایی‌شده به‌صورت فوق غالبیت بود که هیچ یک از این QTL‌ها در مطالعه حاضر شناسایی نشدند. Wang *et al.* (2011) برای قدرت جذب آب بذر، یک QTL بزرگ‌اثر در حد فاصل نشانگرهای RM7356-RM7556 روی کروموزوم ۸ تعیین کردند که از نظر موقعیت مکانی، این QTL در

RM212-RM319 تعیین کردند. در پژوهش حاضر نیز QTL $(qGSI-1-a)$ با نشانگر RM212 پیوسته بود. با توجه به اینکه زمینه ژنتیکی در دو مطالعه متفاوت بود، به احتمال زیاد این نواحی از ژنوم برنج روی شاخص تنش جوانه‌زنی مؤثر است و می‌توان از آن برای تحقیقات بعدی استفاده کرد.

نتایج پژوهش حاضر در برخی موارد مشابه، و در برخی موارد متفاوت با دیگر تحقیقات بود. تفاوت مشاهده‌شده را می‌توان به دلایل مختلفی نسبت داد. مهم‌ترین دلایل، وجود زمینه ژنتیکی متفاوت، استفاده از جمعیت‌های متفاوت، اندازه جمعیت، حد اشباع بودن نقشه پیوستگی استفاده‌شده، نوع و تعداد نشانگرهای به‌کاررفته و ... است. نتایج مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با شاخص‌های تحمل به خشکی و شوری در این مطالعه، به شناسایی چندین QTL بزرگ‌اثر در هر دو وضعیت تنش شوری و خشکی منجر شد. البته به‌منظور استفاده از نتایج مطالعات مکان‌یابی QTL، باید QTL‌های شناسایی‌شده و نشانگرهای پیوسته به آنها تأیید شوند که این مرحله قبل از اجرای برنامه‌های انتخاب به‌کمک نشانگر بسیار ضروری است. همچنین به‌منظور شناسایی ژن‌ها و سازوکارهای دخیل در تحمل برنج به تنش شوری و خشکی، می‌توان پس از تأیید QTL‌های بزرگ‌اثر شناسایی‌شده، با استفاده از برنامه‌های Fine mapping به کمترین فاصله از QTL رسید و همسانه‌سازی و توالی‌یابی منطقه ژنومی مربوط را انجام داد. این کار به زمان زیاد و دقت فراوان نیاز دارد، اما نتایج بلندمدت آن بسیار ارزشمند خواهد بود.

امید است نتایج این پژوهش در درازمدت و در مهندسی ژنتیک و برنامه‌های انتخاب به‌کمک نشانگر، در تولید ارقام متحمل به تنش‌های غیرزیستی و به حداقل رساندن افت محصولات زراعی در آینده مفید واقع شود.

سپاسگزاری

مقاله حاضر از طرح پژوهشی مصوب دانشگاه گیلان به شماره ۲۷-۲۷۹۶ استخراج شده است. بدین وسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان سپاسگزاری می‌شود.

در جهت افزایش وزن تر کلئوتیل و نوع عمل ژن به‌صورت غالبیت ناقص در جهت افزایش این صفت عمل کرد. با توجه به پیوستگی نزدیک این QTL با نشانگر RM42 می‌توان از این مارکر برای اصلاح صفات مرتبط با جوانه‌زنی تحت شرایط تنش خشکی و شوری استفاده کرد. برای صفت وزن خشک ساقه‌چه یک QTL در حد فاصل نشانگرهای RM5711-E36-M59-1 روی کروموزوم ۷ در دو وضعیت شوری و خشکی شناسایی شد. QTL بزرگ‌اثر مذکور را می‌توان QTL پایدار برای تحمل به خشکی و شوری معرفی کرد.

در وضعیت تنش شوری و خشکی، تنها یک QTL بزرگ‌اثر روی کروموزوم ۷ برای وزن خشک گیاهچه شناسایی شد. این QTL در موقعیت ژنومی یکسانی در فاصله نشانگری RM5481-RM70 قرار داشت که نشان‌دهنده QTL پایدار و بزرگ‌اثر در ارتباط با وزن خشک گیاهچه بود. Zhang et al. (2005) یک QTL برای وزن خشک گیاهچه روی کروموزوم ۷ در ناحیه-ای که QTL تحقیق حاضر ردیابی شد، گزارش کرده و این ناحیه را برای انتخاب به کمک نشانگر توصیه کردند. برای شاخص تنش جوانه‌زنی (GSI)، تنها یک QTL بزرگ‌اثر پیوسته با نشانگر RM212 روی کروموزوم ۱ در هر دو وضعیت تنش شوری و خشکی شناسایی شد. در این QTL آلل والد غریب سبب افزایش شاخص تنش جوانه‌زنی و عمل ژن به‌صورت فوق غالبیت برآورد شد. می‌توان QTL فوق را به‌عنوان QTL بزرگ‌اثر کنترل‌کننده شاخص تنش جوانه‌زنی معرفی و برای اجرای گزینش توصیه کرد. Farshadfar et al. (2011) نشان دادند که شاخص تنش جوانه‌زنی (GSI) را می‌توان به‌عنوان یک شاخص انتخاب سریع تحمل به خشکی به‌کار برد و ژنوتیپ‌هایی که GSI زیادی دارند، تحمل به خشکی آنها بیشتر است.

نتایج تحقیقات Lafitte et al. (2002) و Price et al. (2002) برای تحمل به خشکی بر روی جمعیت IR64×Azucena، ناحیه‌ای را روی کروموزوم ۱ در فاصله نشانگری RM212-RM319 مشخص کرد. این ناحیه نزدیک ژن مرتبط با Sd1 قرار داشت. از طرفی Wang et al. (2005) چندین ژن کاندید مرتبط با تحمل به خشکی را در جمعیت یادشده و در فاصله نشانگری

REFERENCES

1. Abdul-Baki, A. A. & Anderson, J. D. (1973). Vigour determination in soybean by multiple criteria. *Crop Science*, 13, 630-633.
2. Anbumalarmathi, J. & Mehta, P. (2013). Effect of Salt Stress on Germination of *indica* Rice Varieties. *EJBS*, 6 (1), 1-6.
3. Ali, Q., Abdullah, P. & Ibrar, M. (1998). Effects of some environmental factors on germination and growth of *Plantago ovata* Forsk. *Pakistan Journal of Forestry*, 38, 143-155.
4. Babu, R. C., Nguyen, B. D. & Gresshoff, M. (2003). Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers, association between secondary and field performance. *Crop Science*, 43, 1457-1469.
5. Bal, A. R. & Chattopadhyay, N. C. (1984). Effect of NaCl and PEG 6000 on Germination and Seedling Growth of Rice (*Oryza sativa* L.). *Biologia Plantarum* (Praha), 27 (1), 65-69.
6. Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196, 80-83.
7. Basten, C. J., Weir, B. S. & Zeng, Z. B. (1997). *QTL cartographer, A reference manual and tutorial for QTL mapping*. North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.
8. Bouslama, M. & Schapaugh, W. T. (1984). Stress tolerance in soybeans. Evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Science*, 24, 933-937.
9. Djanaguiraman, M., Senthil, A. & Ramadass, R. (2004). Mechanism of salt tolerance in rice genotypes during germination and seedling growth. *Indian J. Agric. Res.*, 38 (1), 73-76.
10. Farshadfar, E., Qaitoli, M., Haghparast, R., Yaghutipur, A. & Aghaee-Sarbarzed, M. (2011). Chromosomal localization and relationship between field and laboratory indices of drought tolerance in wheat-barley disomic addition lines. *Seed and Plant Improvement Journal*, 27, 601-616 (In Farsi).
11. Floodad, M. R., Lian, G. Y. & Chen, F. Q. (1996). Comparison of QTLs for seed germination under non-stress, cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breeding*, 118, 167-173.
12. Gregorio, G. B., Senadhira, D. & Mendoza, R. (1997). *Screening rice for salinity tolerance*. IRRI. Dis. Paper No. 22, Los Banos. Philipine.
13. Han, L. Z., Zhang, Y. Y., Qiao, Y. L., Cao, G. L., Zhang, S. Y., Kim, J. H. & Koh, H. J. (2006). Genetic and QTL Analysis for Low-Temperature of Germination in Rice. *Acta Genetica Sinica*, 33, 998-1006.
14. Hashemi, F., Shobbar, Z. S. & Majidi, M. M. (2012). Functional Analysis of *OsVPI* Using Rice Mutant Lines. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2(4), 89-102 (In Farsi).
15. Islam, M. M. & Karim, M. A. (2010). Evaluation of Rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes at Germination and Early Seedling Stage for Their Tolerance to Salinity. *The Agriculturists*, 8(2), 57-65.
16. Janrdhan, R. P. & Yanaht, R. V. (1982). Note on the salt tolerance of some rice varieties of Andhra Pradesh during germination and early seedling growth. *Indian Journal Agric Sci*, 52(7), 472-474.
17. Lafitte, H. R., Courtois, B. & Arraudeau, M. Genetic improvement of rice in aerobic systems, progress from yield to genes. (2002). *Field Crops Research*, 75, 171-190.
18. Liang, C., Lou, Q. J., Sun, Z. X., Xing, Y. Z., Yu, X. Q. & Luo, L. J. (2006). QTL Mapping of Low Temperature on Germination rate of Rice. *Rice Science*, 13, 93-98
19. McCouch, S. R., Teytelman, L., Xu, Y. B., Lobos, K. B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z. K., Xing, Y. Z., Zhang, Q. F., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom, R., DeClerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D. & Stein, L. (2002). Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res*, 9, 199-207.
20. Maguire, J. D. (1962). Seed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Science*, 2, 176-177.
21. Manly, K. F. & Olson, J. M. (1999). Overview of QTL mapping software and introduction to map manager QTL. *Mammalian Genom*, 10, 327-334.
22. Miura, k., Lin, S. Y., Araki, H., Nagamine, T., Kuroki, M., Shimizu, H., Ando, L. & Yano, M. (2004). Genetical Studies on germination of seed and seedling establishment for breeding of improved rice varieties suitable for direct seeding culture. *JARQ*, 38, 1 - 5.
23. Mohammadi-Nejad, Arzani, G. A., Rezai, A. M., Singh, R. K. & Gregorio, G. B. (2008). Assessment of rice genotypes for salt tolerance using microsatellite markers associated with the *saltol* QTL. *African Journal of Biotechnology*, 7, 730-736.
24. Ouyang, S. Q., Lin, Y. F., Lei, G., He, S. J., Zhang, W. K., Zhang, J. S. & Chen, S. Y. (2010). Receptor-like kinase OsSIL1 improves drought and salt stress tolerance in rice plant. *Plant J*, 62, 316-329.
25. Park, S. J., Kwak, K. J., Oh, T. R., Kim, Y. O. & Kang, H. (2009). Cold shock domain proteins affect seed germination and growth of *Arabidopsis thaliana* under conditions. *Plant Cell Physiology*, 50, 869-878.

26. Price, A. H., Townend, J., Jones, M. P., Audebert, A. & Courtois, B. (2002). Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice grown in the Philippines. *Molecular Biological*, 48, 683-695.
27. Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol*, 133, 1755-1767.
28. Redona, E. D. & Mackill, D. J. (1996). Genetic variation for seedling traits in rice. *Crop Science*, 36, 285-290.
29. Robin, S., Pathan, M. S., Courtois, B., Lafitte, H. R., Scarandang, C., Lanceras, S., Amante, M., Nguyen, H. T. & Li, Z. (2003). Mapping osmotic adjustment in an advanced back-cross inbred population of rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1288-1296.
30. Sabouri, A. (2010a). *Mapping QTLs related to grain quality traits in rice*. Ph. D. dissertation, University of Tabriz. Iran. Sabouri, H., Rezai, A. M., Moumeni, A., Kavousi, A., Katouzi, M. & Sabouri, A. (2009). QTLs mapping of physiological traits related to salt tolerance in young rice seedlings. *Biologia Plantarum*, 53(4), 657-662.
31. Sabouri, H. (2010b). Mapping of QTLs of germination characteristics in rice using of microsatellite markers under salin condition. *Iranian Journal of Biology*, 23, 333-342 (In Farsi).
32. Sabouri, H., Biabani, A., Sabouri, A. & Mohammad Esmaili, M. (2010). The study of QTLs related to seed vigour under stress caused by Sorbitol in rice. *Journal of Plant Production*, 17, 123-136 (In Farsi).
33. Sabouri, H., Rezai, A., Moumeni, A. & Kavousi, M. (2007). Investigation of genetic diversity of Iranian rice genotypes under salinity condition: compare means, sensitive and tolerance index. In: Bocchi, S., Ferrero, A., Porro, A. (ed.): *Proceedings of the 4th International Temperate Rice Conference*, 50-51. Tipografia Fiordo, Novara.
34. Saghai Maroof, M. A., Biyashev, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q. & Allard, R. W. (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley species diversity, chromosomal location & population dynamics. *Proc. Natl. Academy Science USA* 91, 5466-5570.
35. Salunkhe, A. S., Poornima, R., Prince, K. S., Kanagaraj, P., Amudha, K. K., Senthil, A. & Babu, R. C. (2011). Fine mapping QTL for drought resistance traits in rice (*Oryza sativa* L.) using by Bulk segregant analysis (BSA). *Molecular Biology*, 49, 90-99.
36. Tirnaz, S., Shobbar, Z. S., Mohamadi-Nejad, Gh., Shahidi Bonjar, Gh. H. (2009). Gene expression analysis of *OsPP2C5*, a candidate protein phosphatase involved in ABA signal transduction, under salt, drought and cold stress in rice. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1(2), 67-78 (In Farsi).
37. Torres, W. & Echevarria, I. (1994). Germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) at different NaCl concentrations. *Cultivos Tropicales*, 15, 44-47.
38. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
39. Wang, X. S., Zhu, J., Mansueto, L. & Bruskiwich, R. (2005). Identification of candidate genes for drought stress tolerance in rice by the integration of a genetic (QTL) map with the rice genome physical map. *Journal of Zhejiang University Science*, 6, 382-388.
40. Wang, Z. J., Wang, Y. B., Wu, Y. & Zhang, H. (2011). Quantitative trait loci controlling rice seed germination under salt stress. *Euphytica*, 178, 297-307.
41. Wen, J., Ling, J., Zhang, W. W., Zhai, H. Q. & Wan, J. M. (2008). Mapping QTL for seed dormancy in weedy rice. *Acta Agronomy Sinica*, 34(5), 737-742.
42. Yaghoobian, Y., Piradashti, H., Mottaghian, A. & Hosseini, J. (2012). Effect of fluctuating salinity at different growth stage on physiological and yield related parameters of rice (*Oryza Sativa* L.). *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2 (3), 266-276.
43. Yue, B., Xue, W., Luo, L. & Xing, Y. (2008). Identification of quantitative trait loci for four morphologic traits under water stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics and Genomics*, 35, 569-575.
44. Zhang, Z. H., QU, X. S., Wan, S., Chen, L. H. & Zhu, Y. G. (2005). Comparison of QTL Controlling Seedling Vigour under Different Temperature Conditions Using Recombinant Inbred Lines in Rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany*, 95, 423-429.
45. Zhang, J., Jia, W., Yang, J. & Ismail, A. M. (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Journal of Field Crops Research*, 97, 111-119.
46. Zhou, M. L., Ma, J. T., Pang, J. F., Zhang, Z. L., Tang Y. X. & Wu, Y. M. (2010) Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors. *Journal of Biotechnology*, 9, 9255-9279.