

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی (QTLs) پیوسته با خصوصیات راتون‌زایی در برنج

علی اکبر عبادی^۱، مهرزاد اله‌قلی‌پور^۲ و ناصر شرفی^۳

۱- استادیار، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران، (نویسنده مسوول: ebadyal@yahoo.com)

۲ و ۳- استادیار و مربی پژوهشی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۴

چکیده

در گیاهان گرامینه پنجه‌زدن و تولید ساقه‌های ثانویه در صورت موجود بودن مواد غذایی و درجه حرارت مناسب یک صفت دائمی به حساب می‌آید. راتونینگ یا عملیات وارویش به صورت حفظ گیاه جهت رشد در فصل بعدی تعریف می‌گردد. در این تحقیق، به منظور شناسایی QTL های کنترل‌کننده صفات مرتبط با قابلیت راتون‌زایی از ۸۰ لاین خویش‌آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی دو رقم هاشمی و نعمت استفاده شد. برای بررسی چند شکلی بین والدین از تعداد ۵۰۰ نشانگر ریزماهوره استفاده شد که از این تعداد، ۱۷۷ نشانگر چند شکل بودند که برای تهیه نقشه پیوستگی جمعیت روی لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب مورد بررسی قرار گرفتند. نقشه پیوستگی بر اساس ۱۷۰ نشانگر ریزماهوره ترسیم شد که ۱۵۹۰ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد و فاصله متوسط بین نشانگرهای مجاور ۹/۳ سانتی‌مورگان بود. در مجموع چهارده QTL بر اساس روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب فراگیر برای صفات تعداد خوشه بارور، وزن صد دانه، باروری خوشه و عملکرد دانه راتون روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۱ شناسایی شدند. مقدار واریانس توجیهی توسط QTL های شناسایی شده برای صفات مورد ارزیابی از ۷/۶۹ تا ۲۵/۱۲ متغیر بود. برای هر کدام از صفات تعداد خوشه، وزن صد دانه و باروری خوشه در راتون یک QTL بزرگ اثر روی کروموزوم ۱ به نام‌های *qpfr1*، *qgwr1* و *qfpr1* به ترتیب با ۲۵، ۲۴ و ۲۳ درصد واریانس توجیهی قرار داشت. برای صفت عملکرد راتون بزرگ اثرترین QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۶ به نام *qyr6* با توجیه ۲۰ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت قرار داشت. برای صفت وزن صد دانه QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۸ برای صفت عملکرد دانه راتون برای اولین بار در این تحقیق شناسایی شد.

واژه‌های کلیدی: برنج، راتون‌زایی، لاین‌های نوترکیب، نقشه‌یابی QTL، نشانگر SSR

مقدمه

برنج دومین غله جهان است و غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان بخصوص کشورهای در حال توسعه را تشکیل می‌دهد. این گیاه از مهم‌ترین زراعت‌های نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری می‌باشد، به طوری که ۹۵ درصد محصول برنج دنیا در چین، هند و آسیای جنوب شرقی تولید می‌شود و در عین حال در همان کشورها هم مصرف می‌شود. این امر بیانگر نقش مهم برنج در تامین غذای مردم آسیا است (۱۳). در ایران نیز برنج جایگاه ویژه‌ای دارد، به طوری که قسمت اعظم غذای مردم ایران به‌ویژه استان‌های گیلان و مازندران را به خود اختصاص می‌دهد. سطح زیرکشت ارقام مختلف برنج در کل کشور ۵۴۰ هزار هکتار با تولید ۲/۴ - ۲/۳ میلیون تن شلتوک در سال زراعی ۹۲-۹۳ برآورد شده است. متوسط عملکرد برنج در ایران ۴/۳۶ تن شلتوک در هکتار برآورد شده و مصرف سرانه حدود ۳۸ کیلوگرم برنج سفید می‌باشد (۳).

استفاده از راتون نسبت به سایر کشت‌های دوم آسان‌تر و کاربردی‌تر است. طبق آمار سازمان جهاد کشاورزی استان گیلان سطح زیر کشت گیاه راتون برنج در سال‌های اخیر بالاترین سطح زیرکشت را به‌عنوان کشت دوم در مقایسه با سایر محصولات نظیر شبدر، ترب و کلزا داشت (۳). بنابراین پتانسیل قابل توجه‌ای برای افزایش محصول برنج از طریق استحصال راتون در شمال کشور وجود دارد که می‌بایست با استفاده از تحقیقات و مطالعات بیشتر، مدیریت بهینه برای تولید بیشتر راتون را مشخص نمود. این مسأله توجه هر چه

بیشتر برای تولید راتون در استان را ضروری می‌سازد. برداشت راتون شکل دیگری از زراعت پشت سرهم است. راتون احتمالاً از کلمه لاتین *Retonsus* منشأ گرفته که به مفهوم قطع کردن یا درو می‌باشد (۶).

راتون دارای دوره رشد کوتاهی بوده و رسیدن آن تنها در ۳۵ تا ۶۵ درصد زمان لازم برای محصول اصلی صورت می‌گیرد (۱۰). معمولاً ارتفاع گیاه راتون کمتر و تعداد پنجه‌های مؤثر کمتری تولید می‌نماید، هر چند ممکن است تعداد کل پنجه‌های تولیدی راتون بیشتر باشد (۱۰، ۱). بر اساس بررسی‌ها و گزارش‌های موجود در کشورهای مختلف، عملکرد راتون در دامنه ۰/۶۸ تا ۳/۵ تن در هکتار و در بعضی موارد تا ۷/۵ تن در هکتار هم گزارش شده است (۱۰).

تان و همکاران (۱۷) با بررسی لاین‌های دابل‌هاپلوئید حاصل از تلاقی دو رقم *Zhaiyeqin8* و *Jingxi17* با استفاده از نشانگر RFLP توانستند شش QTL برای صفات مرتبط با قابلیت راتون‌زایی برنج روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۵، ۶ (دو تا) و ۷ شناسایی کنند. ژنیو و همکاران (۲۱) با مطالعه ۱۳۳ لاین دابل‌هاپلوئید توانستند ۶ جایگاه ژنی کمی (QTLs) روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۵، ۶ و ۷ شناسایی کنند و اعلام کردند که این QTL ها بین ۸/۵ تا ۱۸/۳ درصد از واریانس فنوتیپی صفت قابلیت راتون‌زایی را توجیه می‌کنند. ایشیمارو و همکاران (۷) تعداد سه QTL برای قابلیت راتون‌زایی روی کروموزوم‌های ۵، ۶ و ۱۲ با استفاده از ۹۸ لاین حاصل از

تلاقی‌برگشتی بین دو رقم نیونباره (Nipponbare) و کاسالس (Kasalath) گزارش کردند. کای و موریشیما (۴) دو QTL برای قابلیت راتون‌زایی روی کروموزوم ۶ و ۱۱ با استفاده از جمعیت لاین‌های نوترکیب خوش‌آمیخته حاصل از تلاقی بین *Oryza rufipogon* و یک رقم ایندیکا به نام پی‌کوه (Pei-Kuh) شناسایی و گزارش کردند. یانگ و همکاران (۲۰) با مطالعه جمعیت لاین‌های نوترکیب حاصل از تلاقی یک رقم از گونه ژاپونیکا با رقمی از گونه ایندیکا با استفاده از نشانگرهای SSR، دو QTL مرتبط با صفت قابلیت راتون‌زایی روی کروموزوم‌های ۴ و ۵ را شناسایی کردند. جی و همکاران (۱۰) به‌منظور تعیین QTL‌های کنترل‌کننده صفت قابلیت راتون‌زایی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره لاین‌های خالص حاصل از تلاقی برگشتی بین یک رقم کره‌ای به نام هویئونگ (Hwayeong) با برنج *Oryza rufipogon* را مورد بررسی و ارزیابی قرار دادند و یک QTL بزرگ اثر به‌نام qRAT5 را روی کروموزوم شماره ۵ شناسایی کردند. این QTL با لوکوس ریزماهواره RM194 هم‌بسته بود و بر طبق گزارش آن‌ها ۴۴/۵ درصد از واریانس فنوتیپی صفت قابلیت راتون‌زایی توسط این QTL توجیه می‌شود. هدف از این تحقیق، مکان‌یابی ژن‌های کمی کنترل‌کننده قابلیت راتون‌زایی و تعیین نشانگرهای هم‌بسته با این ژن‌ها به‌منظور گزینش و شناسایی ارقام مناسب برنج با پتانسیل راتون‌زایی مطلوب در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۸۰ لاین نوترکیب (نسل F10) حاصل از تلاقی دو رقم هاشمی و نعمت استفاده شد. این لاین‌ها با استفاده از روش بالک تک‌بذر در موسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) تهیه شدند. رقم هاشمی یک رقم محلی است که در سطح وسیعی از مزارع استان گیلان کشت می‌شود و قابلیت راتون‌زایی بالایی دارد و رقم نعمت یک رقم اصلاح شده ایرانی است که حاصل تلاقی (IR24/حسن سرایی // سنگ طارم) بوده و قابلیت راتون‌زایی پائینی دارد (۲). لاین‌های خویش آمیخته به‌همراه دو والد هاشمی و نعمت و دو رقم حسنی و صالح به‌عنوان شاهد در قالب طرح آگمنت در سال زراعی ۱۳۹۰ در مزرعه آزمایشی موسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) کشت شدند. چهار رقم شاهد در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفتند. بذرها پس از ضدعفونی با محلول قارچ کش ویتاواکس تیرام (با غلظت ۲/۵ در هزار) در بستر خزان به‌صورت خطی قرار داده شدند. ۳۰ روز پس از بذریابی نشاءها به‌زمین اصلی منتقل شدند. مساحت هر واحد آزمایشی ۴ متر مربع، با فاصله ۲۵ سانتی‌متر بین و درون ردیف‌ها بود. بعد از برداشت محصول اصلی، آبیاری و کود پاشی جهت تولید راتون انجام شد (۱). چهار صفت مربوط به‌قابلیت راتون‌زایی شامل عملکرد دانه، وزن صد دانه، تعداد خوشه و درصد باروری خوشه در محصول راتون لاین‌ها و ارقام شاهد اندازه‌گیری شدند.

استخراج DNA از نمونه‌های برگ با روش مورای و تامپسون (۱۵) انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از دستگاه Biometra مدل T-Gradient و در حجم ۱۰ میکرولیتر برای هر واکنش شامل ۲ میکرولیتر از DNA (با غلظت تقریبی ۰/۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت (با غلظت نهایی ۰/۲۵ میکرومول)، ۱/۲ میکرولیتر مخلوط بازهای آلی dNTPs (با غلظت ۱ میلی‌مولار)، ۰/۱۴ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مرز (با غلظت ۵ یونیت در میکرولیتر)، ۰/۴۸ میکرولیتر کلرید منیزیم (با غلظت ۵۰ میلی‌مول) و ۱ میکرولیتر بافر ۱۰X و بر اساس چرخه حرارتی توضیح داده شده توسط راحمی و همکاران (۱۶) انجام شد. محصول PCR بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰٪ بارگذاری شد سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه ژل‌داک عکس‌برداری شد (۵).

تعداد ۵۰۰ نشانگر ریزماهواره که توالی پرایمرهای آن‌ها بر اساس توالی ارائه شده توسط تمیخ و همکاران (۱۸) و مک‌کوچ و همکاران (۱۴) تعیین شده بود روی والدین آزمون شد. تعداد ۱۷۷ نشانگر چندشکلی قابل امتیازدهی نشان دادند. سپس این ۱۷۷ نشانگر بر روی نتاج (لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب) آزمون شدند. بعد از تعیین ژنوتیپ ۸۰ لاین نوترکیب (باند مشابه والد نعمت A و باند مشابه والد هاشمی B در نظر گرفته شد)، از آزمون کای اسکور برای نسبت تفرق ۱ به ۱ استفاده شد. هفت نشانگر ریزماهواره از این نسبت تبعیت نکردند، بنابراین در تهیه نقشه پیوستگی و تجزیه QTL از ۱۷۰ نشانگر استفاده شد. از ماتریس داده‌های ژنوتیپی جهت تهیه نقشه پیوستگی نشانگرها با استفاده از نرم‌افزار Mapmaker/EXP 3.0 استفاده شد (۱۲). نقشه پیوستگی با LOD معادل ۳، حداکثر فاصله پیوستگی ۴۰ سانتی‌مورگان و تابع کوزامبی ترسیم شد. جهت تجزیه‌های آماری از نرم‌افزار SAS ver.9.0 استفاده شد. گروه‌های پیوستگی اولیه با استفاده از نرم‌افزارهای QTL Ici Mapping و MAPMAKER/EXP 3.0 (۱۲) و QTL Ici Mapping (۱۱، ۱۹) تشکیل شد. تجزیه QTL جهت تعیین اثرات اصلی افزایشی با استفاده از نرم‌افزار QTL Ici Mapping انجام شد. در این نرم‌افزار QTL‌ها با روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب فراگیر (۱۹، ۱۱) شناسایی می‌شوند که در واقع همان مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب به‌همراه یک اسکن دو بعدی می‌باشد. سرعت پیمایش ژنوم ۰/۵ سانتی‌مورگان در نظر گرفته شد و برای برآورد مقدار LOD آستانه از آزمون تبدیل با تعداد ۱۰۰۰ جای‌گشت و مقدار خطای نوع اول معادل ۰/۰۵ برای هر صفت تعیین شد و نرم‌افزار برای هر صفت مقدار بحرانی (آستانه) LOD را تعیین کرد. سپس منحنی‌های مربوط به پیمایش ژنوم برای هر کروموزوم جداگانه رسم شد. QTL‌هایی که بالاتر از حد آستانه بودند شناسایی شده و اطلاعات مربوط به‌موقعیت مکانی QTL‌ها، اثرات افزایشی و میزان واریانس فنوتیپی (درصد) آن‌ها توسط نرم‌افزار مشخص شد.

نتایج و بحث

تجزیه آماری داده‌های فنوتیپی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان‌داد که اختلاف بین ارقام شاهد برای چهار صفت مورد مطالعه معنی‌دار بود. اختلاف بین تکرارها معنی‌دار نشد و بنابراین نیازی به تصحیح داده‌های مربوط به لاین‌های نوترکیب که در تکرارهای مختلف قرار داشتند، نبود. ضریب تغییرات برای صفات مذکور در حد متعادل و قابل قبولی بود. نکته قابل توجه برای این آماره آن است که میزان آن برای کلیه خصوصیات به‌استثنای درصد باروری خوشه در محصول اصلی کمتر از راتون بود. علت این امر شبیه بودن ارقام از نظر صفات مورد نظر و پایین بودن میزان اشتباه آزمایشی در محصول اصلی بوده است. همچنین یکنواخت بودن عوامل محیطی طی دوره رشد محصول اصلی می‌تواند یکی از عوامل کاهش اشتباه آزمایشی و متعاقب آن پائین آمدن ضریب تغییرات باشد. بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین و کمترین عملکرد راتون به‌ترتیب مربوط به رقم محلی حسنی (۱/۳۵) تن شلتوک

در هکتار) و رقم اصلاح‌شده نعمت (۰/۲۰) تن شلتوک در هکتار) بود. کلیه خصوصیات مورد بررسی در محصول راتون نسبت به محصول اصلی از میانگین پائین‌تری برخوردار هستند (جدول ۱). این امر می‌تواند به دلیل نداشتن فرصت کافی، پایین بودن درجه حرارت و شدت نور برای احیای اندام‌های رویشی گیاه باشد همچنین بعد از برداشت محصول اصلی، به دلیل کوتاه شدن روز، گیاه سریعاً به‌رشد زایشی رفته و شروع به تولید مجدد دانه می‌کند (۱). از آنجائیکه درجه حرارت پائین است تعداد دانه کمتری تولید شده و متعاقب آن تعداد کمتری از دانه‌ها پر می‌گردند و ضمناً دانه‌های پر شده از وزن کمتری نسبت به محصول اصلی که فرصت کافی برای پر شدن داشته‌اند برخوردار می‌باشند. بنابراین محصول اصلی با دارا بودن خصوصیات زراعی مناسب و زمان بیشتر برای تکمیل دوره رشد رویشی قادر به تولید محصول بیشتری می‌باشد. پائین بودن میزان اجزای اولیه و ثانویه عملکرد دانه به دلیل کوتاه بودن دوره رشد و عدم بهینه بودن عوامل محیطی باعث شده است که میزان عملکرد دانه محصول راتون کم شود.

جدول ۱- میانگین خصوصیات مهم زراعی (اصلی و راتون) در ارقام شاهد

ردیف	ارقام	عملکرد دانه (تن در هکتار)		باروری خوشه (درصد)	تعداد خوشه (عدد)		وزن صد دانه (گرم)
		اصلی	راتون		اصلی	راتون	
۱	هاشمی	۱/۲۰	۳/۵۷	۸۸/۶	۷۰	۱۴/۹	۳/۱
۲	نعمت	۰/۲۰	۶/۶۴	۸۶/۴	۶۰/۷	۱۷/۹	۳/۵
۳	حسنی	۱/۳۵	۳/۴۰	۹۱/۶	۷۱	۱۴/۱	۳/۸
۴	صالح	۰/۳۵	۴/۵۵	۸۷	۶۵	۱۵/۳	۳/۱
	میانگین	۰/۷۸	۴/۵۰	۸۸/۴۰	۶۶/۶۸	۱۵/۵۵	۳/۲۸
	اشتباه‌معیار	۰/۵۸	۱/۴۱	۲/۳۳	۴/۷۷	۱/۶۴	۰/۳۴

بررسی در حدود میانگین والدین بود (جدول ۲). با نگاهی به محدوده صفات در جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب مشاهده می‌شود که در همه صفات برخی از لاین‌های نوترکیب نسبت به والدین ارزش بیشتر یا کمتری داشتند که بیانگر وجود پدیده تفکیک متجاوز برای همه صفات می‌باشد. وجود تفکیک متجاوز برای این صفات، مطالعه و تعیین مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مرتبط با قابلیت راتون‌زایی با استفاده از جمعیت اصلاحی فعلی را امکان‌پذیر می‌سازد. یانگ و همکاران (۲۰) با مطالعه جمعیت لاین‌های نوترکیب حاصل از تلاقی یک رقم ژاپونیکا با یک رقم ایندیکا وجود پدیده تفکیک متجاوز برای صفت قابلیت راتون‌زایی را گزارش نمودند.

میانگین و اشتباه استاندارد والدین و لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب به‌همراه دامنه تغییرات صفات مورد بررسی در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود والدین و نتاج آنها از نظر صفات مورد بررسی دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. بنابراین جمعیت انتخاب شده برای مکان‌یابی ژن‌های مربوط به صفات مورد بررسی مناسب می‌باشد. میانگین صفات عملکرد دانه، تعداد خوشه و وزن صد دانه در رقم نعمت برای محصول اصلی بیشتر از رقم هاشمی بود، در حالی که درصد باروری خوشه در محصول اصلی در راتون در رقم هاشمی بیشتر از رقم نعمت بوده است. میانگین لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب، در تمامی صفات مورد

جدول ۲- میانگین، اشتباه استاندارد و دامنه تغییرات صفات در والدین و لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب

دامنه	جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب		والدین (اشتباه استاندارد ± میانگین)		صفت
	حداکثر	حداقل	نعمت	هاشمی	
۳/۳۲	۵/۶۵	۲/۳۳	۴/۳۶±۰/۲۶۲	۶/۲۳±۰/۰۹۰	عملکرد دانه اصلی
۱/۲۰	۱/۳۵	۰/۱۵	۰/۶۸±۰/۰۲۹	۰/۲۰±۰/۰۰۴	راتون (تن در هکتار)
۱۷/۲۱	۹۲/۷۱	۷۵/۵۰	۷۸/۱۰±۰/۵۳۰	۸۸/۶±۰/۳۷۸	باروری خوشه اصلی
۳۴/۷۰	۸۵/۵۵	۵۰/۸۵	۶۸/۲۰±۰/۴۵۵	۶۰/۷۰±۰/۳۵۱	راتون (درصد)
۹/۰۰	۲۱/۵۰	۱۲/۵۰	۱۶/۳۵±۰/۶۹۴	۱۷/۹۰±۰/۲۶۴	تعداد خوشه اصلی
۶/۱۵	۱۰/۳۵	۴/۲۰	۷/۹۸±۰/۳۵۵	۵/۳۰±۰/۲۰۰	راتون (عدد)
۰/۶۰	۳/۶۵	۳/۰۵	۳/۳۲±۰/۰۴۵	۳/۵۰±۰/۲۶۵	اصلی
۰/۷۳	۱/۷۵	۱/۰۲	۱/۴۰±۰/۰۳۵	۱/۳۰±۰/۰۴۵	وزن صد دانه راتون (گرم)

از نظر خصوصیات در محصول اصلی و راتون متفاوت می‌باشد و معمولاً ارزش صفات در محصول اصلی بیشتر از راتون بوده و دارای رابطه معکوس هستند. این امر در مورد باروری خوشه صادق نیست، اگر چه اجزای اولیه مرتبط با صفت مذکور (تعداد دانه پر و پوک) همانند سایر صفات دارای رابطه عکس در محصول اصلی و راتون می‌باشند. همبستگی بین عملکرد دانه (محصول اصلی) با باروری خوشه و تعداد خوشه در محصول اصلی مثبت و معنی‌دار بود که البته در تحقیقات قبلی نیز این همبستگی مثبت و معنی‌دار گزارش شده است (۸). همچنین همبستگی بین عملکرد دانه (در محصول راتون) با باروری خوشه، تعداد خوشه و وزن صد دانه در محصول راتون نیز مثبت و معنی‌دار بود.

همبستگی بین خصوصیات محصول اصلی و راتون به استثنای درصد باروری خوشه در رتون با درصد باروری خوشه در محصول اصلی منفی و معنی‌دار است (جدول ۳). به عبارت دیگر با افزایش ارزش صفت در محصول اصلی مقدار آن در محصول راتون کاهش می‌یابد. در ارقامی که دوره رشد طولانی‌تری در محصول اصلی داشتند در راتون به دلیل برخورد دوره رشد و خصوصاً زمان گلدهی با شرایط نامساعد محیطی عملکرد کمتری داشتند. به بیان دیگر گیاه با استفاده از شرایط محیطی مناسب پتانسیل خود را از نظر کلیه صفات در دوره رشد اولیه نشان می‌دهد در حالی که با محدود شدن دوره رشد و نامناسب بودن عوامل محیطی گیاه فرصت کافی برای نشان دادن پتانسیل خود ندارد. به همین دلیل گیاه برنج

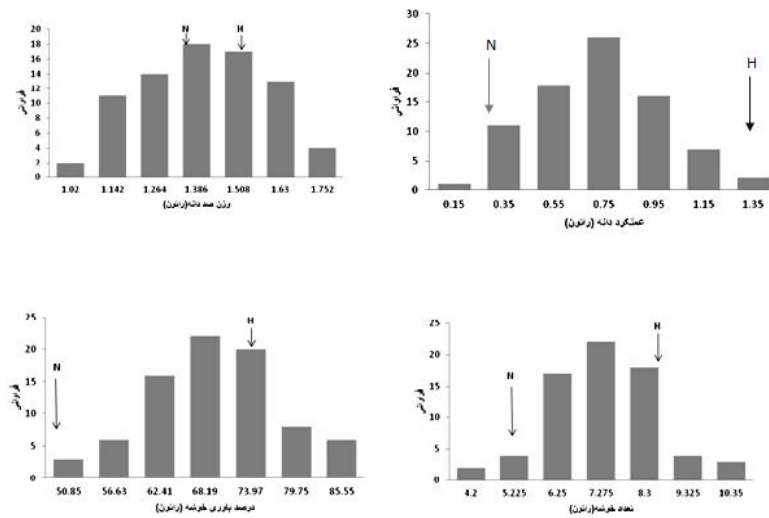
جدول ۳- ضرایب همبستگی پیرسیون بین صفات مرتبط با قابلیت راتون‌زایی در جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب
Table 3. Correlation coefficients between of ratooning ability traits in RILs population

		عملکرد دانه		باروری خوشه		تعداد خوشه		وزن صد دانه	
		اصلی	راتون	اصلی	راتون	اصلی	راتون	اصلی	راتون
عملکرد دانه	اصلی	۱	-						
	راتون	-۰/۸۸۵ ^{**}	۱						
باروری خوشه	اصلی	-۰/۷۸۵ ^{**}	-۰/۹۰۱ ^{**}	۱					
	راتون	-۰/۹۷۷ ^{**}	۰/۹۶۳ ^{**}	-۰/۸۶۵ ^{**}	۱				
تعداد خوشه	اصلی	-۰/۹۸۰ ^{**}	-۰/۸۱۸ ^{**}	-۰/۷۹۵ ^{**}	-۰/۹۳۷ ^{**}	۱			
	راتون	-۰/۹۷۸ ^{**}	۰/۹۵۷ ^{**}	-۰/۸۸۲ ^{**}	۰/۹۹۹ ^{**}	-۰/۹۴۹ ^{**}	۱		
وزن صد دانه	اصلی	-۰/۰۱۴ ^{NS}	-۰/۲۸۹ ^{NS}	۰/۶۰۶ ^{**}	۰/۱۳۱ ^{NS}	-۰/۰۴۵ ^{NS}	۰/۱۶۲ ^{NS}	۱	
	راتون	-۰/۸۴۰ ^{**}	۰/۶۹۹ ^{**}	۰/۳۸۶ ^{NS}	۰/۷۹۶ ^{**}	-۰/۷۴۵ ^{**}	۰/۷۷۰ ^{**}	-۰/۴۸۰ ^{**}	۱

ns و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح ۵ و ۱ درصد

میانگین صفات مورد بررسی در شکل ۱ نشان داده شده است. پیوسته بودن و تابعیت پراکندگی صفات از توزیع نرمال نشان‌دهنده کمی بودن صفات مورد بررسی و دخالت چندین ژن در کنترل این صفات می‌باشد.

توزیع فراوانی لاین‌های جمعیت لاین‌های خویش آمیخته مورد مطالعه برای هر کدام از صفات مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که این توزیع برای همه صفات به صورت پیوسته و نرمال بود. نمودار توزیع فراوانی لاین‌ها بر اساس



شکل ۱- توزیع فراوانی لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب برای صفات مرتبط با قابلیت راتون‌زایی

(حروف H و N به ترتیب نشان‌دهنده مقادیر والد هاشمی و نعمت در هر یک از صفات)

Figure 1. Frequently distribution of RILs for ratooning ability traits (H and N Letters showed traits value in Hashemi and Neamat)

تهیه نقشه پیوستگی نشانگرها

از تعداد ۵۰۰ نشانگر ریزماهواره مطالعه شده بر روی والدین، ۱۷۷ نشانگر چند شکلی قابل امتیازدهی نشان دادند. این نشانگرهای چندشکل روی کروموزوم‌های مختلف قرار داشتند و تعداد آنها بر روی کروموزوم‌های مختلف از ۴ تا ۲۵ عدد متفاوت بود. بعد از تعیین ژنوتیپ ۸۰ لاین نوترکیب، از ماتریس داده‌های ژنوتیپی جهت تهیه نقشه پیوستگی نشانگرها استفاده شد. ابتدا نسبت ۱ به ۱ برای هر کدام از نشانگرها با استفاده از آزمون کای اسکویر مورد بررسی قرار گرفت که تعداد ۷ نشانگر از این نسبت تبعیت نمی‌کردند که کنار گذاشته شدند. نقشه پیوستگی بر اساس ۱۷۰ نشانگر ریزماهواره ترسیم شد. نقشه پیوستگی تهیه شده حدود ۱۵۹۰ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را با میانگین ۹/۳ سانتی‌مورگان بین هر جفت نشانگر پوشش داد (شکل ۲). بیشترین تعداد نشانگر روی کروموزوم‌های ۱ و ۶ (به ترتیب ۲۶ و ۲۲ نشانگر) و کمترین تعداد نشانگر روی کروموزوم‌های ۴ و ۱۲ (به ترتیب ۶ و ۴ نشانگر) بود. مکان نشانگرها روی نقشه پیوستگی تطابق نسبتاً مناسبی با نقشه ارائه شده توسط تمینخ و همکاران (۱۸) و مک‌کوش و همکاران (۱۴) داشت. البته لازم به ذکر است که نشانگرهای استفاده شده در این تحقیق بر اساس همین دو نقشه انتخاب شده بودند.

مکان‌یابی QTL های کنترل کننده صفات

برای صفت تعداد خوشه در راتون سه QTL شناسایی شد که در مجموع ۴۶/۰۲ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند و LOD آنها از ۲/۸۵ تا ۹/۲۷ متغیر بود (جدول ۴ و شکل ۲). بزرگ‌اثرترین QTL شناسایی شده به نام *qfpr1* روی کروموزوم ۱ و در حدفاصل بین دو نشانگر *RM265-RM302* قرار داشت و ۲۵/۱۲ درصد از تنوع فنوتیپی را برای این صفت توجیه کرد و دارای اثر افزایشی منفی (۱/۶۵-) بود. دو QTL دیگر شناسایی شده یکی به نام *qfpr3* روی کروموزوم ۳ در حد فاصل نشانگرهای *RM571-RM7000* قرار داشت که با میزان LOD معادل ۴/۳۷ مقدار ۱۳/۲۱ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کرد. این QTL دارای اثر افزایشی مثبت (۱/۰۵) بود. دیگری به نام *qfpr5* روی کروموزوم ۵ در حدفاصل نشانگرهای *RM6645-RM163* با توجیه ۷/۶۹ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت، قرار داشت. QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۵ دارای اثر افزایشی مثبت (۰/۸۵) بود.

برای صفت وزن صد دانه در راتون یک QTL بزرگ اثر و دو QTL کوچک اثر شناسایی شد (جدول ۴ و شکل ۲). بزرگ‌اثرترین QTL شناسایی شده به نام *qgwr1* روی کروموزوم ۱ و در حد فاصل بین دو نشانگر *RM3520-RM104* قرار داشت و ۲۳/۴۶ درصد از تنوع فنوتیپی را برای این صفت توجیه کرد و دارای اثر افزایشی مثبت (۰/۵۵) بود. دو QTL دیگر شناسایی شده یکی به نام *qgwr6* روی کروموزوم ۶ در حد فاصل نشانگرهای *RM253-RM276* و دیگری به نام *qgwr7* روی کروموزوم ۷ در حدفاصل نشانگرهای *RM8263-RM8006* قرار داشتند.

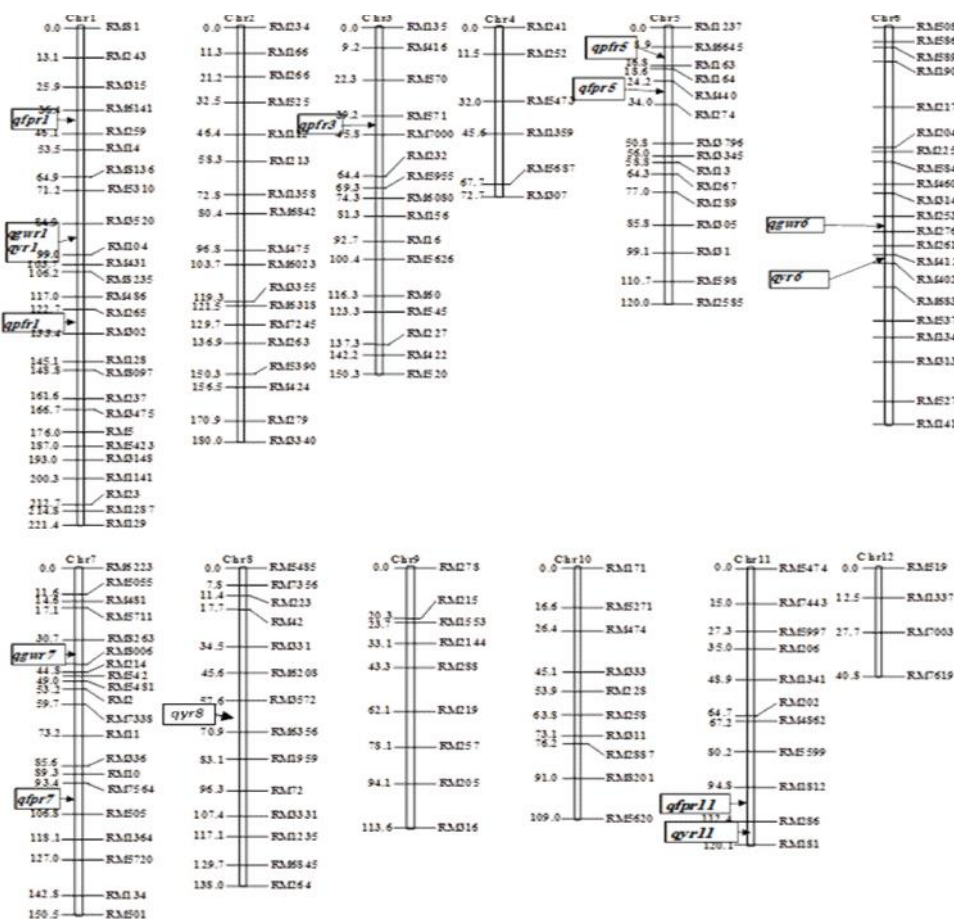
برای صفت درصد باروری در راتون یک QTL بزرگ اثر و سه QTL کوچک اثر شناسایی شد که در مجموع ۵۵/۳۷ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مذکور را توجیه کردند و LOD آنها از ۲/۸۶ تا ۸/۴۴ متغیر بود (جدول ۴ و شکل ۲). بزرگ‌اثرترین QTL شناسایی شده به نام *qfpr1* روی کروموزوم ۱ و در حدفاصل بین دو نشانگر *RM6141-RM259* قرار داشت و ۲۲/۶۴ درصد از تنوع فنوتیپی را برای این صفت توجیه کرد و دارای اثر افزایشی منفی (۶/۶۱-) بود. سه QTL دیگر شناسایی شده به نام‌های *qfpr7*، *qfpr5* و *qfpr11* به ترتیب روی کروموزوم‌های ۵، ۷ و ۱۱ قرار داشتند.

برای صفت عملکرد دانه در راتون نیز چهار QTL شناسایی شد که در مجموع ۵۳/۱۶ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه کردند و LOD آنها از ۲/۸۹ تا ۶/۸۸ متغیر بود (جدول ۴ و شکل ۲). بزرگ‌اثرترین QTL شناسایی شده به نام *qyr6* روی کروموزوم ۶ و در حدفاصل بین دو نشانگر *RM4128-RM402* قرار داشت و ۱۹/۹۵ درصد از تنوع فنوتیپی عملکرد دانه راتون را توجیه کرد و دارای اثر افزایشی منفی (۲۰/۸۴-) بود. سه QTL دیگر شناسایی شده به نام‌های *qyr1*، *qyr8* و *qyr11* به ترتیب روی کروموزوم‌های ۱، ۸ و ۱۱ قرار داشتند. QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۱ در حد فاصل نشانگرهای *RM3520-RM104* قرار داشت که با میزان LOD معادل ۲/۸۹ مقدار ۹/۶۴ درصد از واریانس فنوتیپی صفت عملکرد دانه را توجیه کرد. این QTL دارای اثر افزایشی مثبت (۱۰/۲۴) بود. QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۸ (*qyr8*) در حد فاصل نشانگرهای *RM3572-RM6356* با LOD معادل ۴/۲۱ و توجیه ۱۲/۷۰ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت، قرار داشت. این QTL دارای اثر افزایشی مثبت (۰/۸۵) بود. در نهایت QTL روی کروموزوم ۱۱ (*qyr11*) با LOD معادل ۳/۴۵ در حدفاصل دو نشانگر *RM286-RM181* قرار داشت. این QTL مقدار ۱۰/۸۷ درصد از واریانس فنوتیپی صفت عملکرد دانه در راتون را توجیه و دارای اثر افزایشی مثبت (۱۱/۸۶) بود.

در همه صفات مورد بررسی به‌منظور تعیین ژن یا ژن‌های دخیل در قابلیت راتون‌زایی حداقل یک QTL و اغلب بزرگ اثر روی کروموزوم ۱ شناسایی شد که البته QTL های شناسایی شده برای وزن صد دانه در راتون و عملکرد راتون در یک جایگاه ژنی قرار داشتند. هر چند که دو QTL دیگر شناسایی شده برای دو صفت باروری و تعداد خوشه در راتون نیز فاصله زیادی با این جایگاه نداشتند. این موضوع نشان از تاثیر کروموزوم یک (خصوصاً جایگاه بین دو نشانگر *RM3520* و *RM104*) که بر اساس نقشه پیوستگی ارائه شده در شکل ۲ در حدود وسط کروموزوم ۱ قرار دارد) در کنترل صفات موثر در قابلیت راتون‌زایی برنج دارد. به‌عبارت دیگر، ژن‌های دخیل در کنترل این صفت روی کروموزوم ۱ تجمع یافته‌اند. در اغلب تحقیقات قبلی از جمله تان و همکاران (۱۷)، ژنیو و همکاران (۲۱) در مورد تعیین ژن یا ژن‌های کنترل کننده صفات مربوط به قابلیت راتون‌زایی، حداقل یک QTL

دانه در خوشه، توسط محققین قبلی شناسایی و معرفی شده بود (۱۷ و ۲۱). ولی QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۸ برای صفت عملکرد دانه راتون برای اولین بار در این تحقیق شناسایی و گزارش می‌شود و در تحقیقات قبلی هیچ QTL روی این کروموزوم شناسایی و معرفی نشده است. از نتایج بدست‌آمده از این مطالعه خصوصا از نشانگرهای هم‌بسته با QTL‌های بزرگ اثر شناسایی شده در این تحقیق، می‌توان برای غربال ملکولی جمعیت‌های در حال تفکیک (انتخاب به کمک نشانگر) به‌منظور بهبود قابلیت راتون‌زایی در ارقام مختلف برنج استفاده نمود.

روی کروموزوم ۱ شناسایی و معرفی شده بود. روی کروموزوم‌های ۵، ۶، ۷ و ۱۱ نیز یک QTL برای حداقل دو تا از صفات موثر بر قابلیت راتون‌زایی شناسایی شد که در تحقیقات قبلی نیز از جمله تان و همکاران (۱۷) و ژنبو و همکاران (۲۱) روی کروموزوم‌های ۵، ۶ و ۷، ایشیمارو و همکاران (۷) روی کروموزوم‌های ۵ و ۶، کای و ایشیمارو (۴) روی کروموزوم‌های ۶ و ۱۱، یانگ و همکاران (۲۰) و جی و همکاران (۹) روی کروموزوم ۵ برای صفات موثر بر قابلیت راتون‌زایی شناسایی و گزارش شده بود. البته لازم به ذکر است که QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۳ برای صفت تعداد



شکل ۲- نقشه لینکازی نشانگرهای ریزماهواره روی کروموزوم‌های برنج به همراه QTL‌های شناسایی شده برای صفات مورد بررسی

Figure 2. SSR linkage maps of rice chromosomes with identified QTLs for studied traits

جدول ۴- QTL های شناسایی شده بر اساس روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب فراگیر برای صفات قابلیت راتون‌زایی برنج در جمعیت RILs
Table 4. Identified QTLs based on Inclusive composite interval mapping method for ratooning ability traits in RILs population

درصد واریانس	اثر افزایشی	LOD	LOD آستانه	نشانه‌گر	کروموزوم	QTL	صفات
۱۳/۲۱	۱/۰۵	۴/۳۷	۲/۸۰	RM571-RM7000	۳	qprf3	تعداد خوشه در راتون
۷/۶۹	۰/۸۵	۲/۸۵		RM6645-RM163	۵	qprf5	
۲۵/۱۲	-۱/۶۵	۹/۲۷		RM265-RM302	۱	qprf1	
۲۳/۶۸	۰/۵۵	۸/۹۶	۳/۰۳	RM3520-RM104	۱	qgwr1	وزن صد دانه در راتون
۱۴/۰	-۳/۵	۵/۳۱		RM253-RM276	۶	qgwr6	
۱۲/۷۴	-۰/۳۰	۳/۷۳		RM8263-RM8006	۷	qgwr7	
۲۲/۶۴	-۶/۶۱	۸/۴۴	۲/۷۸	RM6141-RM259	۱	qfpr1	باروری خوشه در راتون
۱۲/۶۵	-۴/۸۱	۴/۵۹		RM440-RM274	۵	qfpr5	
۱۰/۲۳	۳/۶۳	۳/۳۳		RM7564-RM505	۷	qfpr7	
۹/۸۵	۲/۸۲	۲/۸۶		RM1812-RM286	۱۱	qfpr11	
۱۹/۹۵	-۲/۸۴	۶/۸۸	۲/۶۸	RM4128-RM402	۶	qyr6	عملکرد دانه در راتون
۹/۶۴	۱۰/۲۴	۲/۸۹		RM3520-RM104	۱	qyr1	
۱۲/۷۰	-۱۶/۳۶	۴/۲۱		RM3572-RM6356	۸	qyr8	
۱۰/۸۷	۱۱/۸۶	۳/۴۵		RM286-RM181	۱۱	qyr11	

می‌دانند از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و مؤسسه تحقیقات برنج کشور که هزینه اجرای این پژوهش را تقبل نموده‌اند، صمیمانه تشکر نمایند.

تشکر و قدردانی
پژوهش حاضر برگرفته از پروژه تحقیقاتی مصوب به شماره ۱۳۱-۹۱-۰۴-۰۴-۰۴ می‌باشد. نگارندگان بر خود لازم

منابع

- Akhgari, H. 1996. Determination of ratoon yield potential in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. M.Sc Thesis, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran (In Persian).
- Allahgholipour, M., A.J. Ali, F. Alinia, T. Nagamine and Y. Kojima. 2006. Relationship between rice grain amylose and pasting properties for breeding better quality rice varieties. *Plant Breeding*, 125: 357-362.
- Anonymous. 2015. Agricultural statistics, the first volume agricultural crops 2013-2014. Ministry of Agriculture, Department of Planning and Economy, Office of Statistics and Information Technology, (In Persian).
- Cai, H.W. and H. Morishima. 2002. QTL clusters reflect character associations in wild and cultivated rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1217-1228.
- Ebadi, A. A., E. Farshadfar and B. Rabiei. 2013. Mapping QTLs controlling cooking and eating quality indicators of Iranian rice using RILs across three years. *Australian Journal of Crop Science*, 10: 1494-1502.
- Hashemi Dezfoli, A., A. Kochaki and M. Benayan Avval. 1995. Increasing crop yield. Mashhad Jahad Daneshgahi Press. First edition, 287 pp (In Persian).
- Ishimaru, K., M. Yano, N. Aoki, K. Ono, T. Hirose, S. Y. Lin, L. Monna, T. Sasaki and R. Ohsugi. 2001. toward the mapping of physiological and agronomic characters on a rice function map: QTL analysis and comparison between QTLs and expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 793-800.
- Jahani M., G. Nematzadeh and G. Mohammadi Nejad. 2016. Evaluation of Agronomic Traits Associated with Grain Yield in Rice (*Oryza sativa*) Using Regression and Path Analysis. *Journal of Crop Breeding*, 7: 115-122 (in Persian).
- Ji, S., X. Luo and S.N. Ahn. 2014. Mapping QTL for ratooning ability in advanced backcross lines from an *Oryza sativa* x *O. rufipogon* cross. *CNU Journal of Agricultural Science*, 41: 1-7.
- Kashalaei, M., N. Sharafi, R. Erfani and Gh. Nematzadeh. 1997. The potential for increased rice production as a function ratoon and studies. The publication Rice Research Institute. First edition. 55 pp (In Persian).
- Li, H., J.M. Ribaut, Z. Li and J. Wang. 2008. Inclusive composite interval mapping (ICIM) for digenic epistasis of quantitative traits in biparental populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 243-260.
- Lincoln, S. E., M.J. Daly and E.S. Lander. 1990. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER: a tutorial and reference manual. Technical Report. Cambridge, MA: Whitehead Institute for Biomedical Research.
- Lu, B.R. and A. A. Snow. 2005. Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *Biology Science*, 55: 669-678.
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Y.B. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z.K. Li, Y.Z. Xing, Q.F. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) DNA Research. 9: 199-207.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant. *DNA Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325.
- Rahemi M. R., Kazemitabar S.K., A. Moumeni and A.A. Ebadi, 2009. Evaluation of Genetic Diversity by Using of Link Maker for Amylose Content of Some Iranian Local Rice Cultivars. *Journal of Crop Breeding*, 1:1-10 (in Persian).
- Tan, Z.B., L.S. Shen, Z.L. Yuan, C.F. Lu, Y. Chen, K.D. Zhou and L.H. Zhu. 1997. Identification of QTLs for ratooning ability and grain yield traits of rice and analysis of their genetic effects. *Acta Agronomica Sinica*, 23: 289-295.
- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y.G. Cho, T. Ishii, and S.R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.) *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 697-712.
- Wang, J.K. 2009. Inclusive composite interval mapping of quantitative trait genes. *Acta Agronomica Sinica*, 35: 239-245.
- Yang, C.H., Y.P. Wang T.U. Bin, L.I. Ting, H.U. Liang and L.I. Shi-Gu. 2012. QTL analysis of rice Ratooning ability and related agronomic traits by using RILs Populations. *Acta Agronomica Sinica*, 7: 1240-1246.
- Zhenbo, T., S. Lishuang, Y. Zuolian, L. Chaofu, C.Ying, Z. Kaida and Z. Lihuang. 1997. Identification of QTLs for rationing ability and grain yield traits of rice and analysis of their genetic effects. *Acta Agronomica Sinica*, 23: 289-295.

Analysis of Quantitative Trait Loci for Ratooning Ability in Rils Population of Rice

Ali Akbar Ebadi¹, Mehrzad Allahgholipour² and Naser Sharafi³

1- Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, (Corresponding Author: ebady_al@yahoo.com)

2 and 3- Assistant Professor and Instructor, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht

Received: November 30, 2015

Accepted: September 25, 2016

Abstract

Tillering and secondary stems in graminea plants are permanent characters, whereas there were being food matters and proper temperature for regeneration. Ratooning or regeneration phase is explained to remain of plant for growing in next season. Recombinant inbred lines (RILs) consisting of 80 lines, derived from a cross between Hashemi and Nemat were used to analyze the genetic basis ratooning ability of rice. Recombinant inbred lines were tested with 177 polymorphic microsatellite markers. Linkage map were constructed with 170 microsatellite markers and its total lengths was 1590 cM which the mean space between markers was 9.3 cM. Using of Inclusive composite interval mapping (ICIM) method, 14 QTLs were detected on chromosomes 1, 3, 5, 6, 7, 8 and 11 for the panicle number, hundred grain weight, fertility percentage and grain yield of ratoon. Among these mapped QTLs, *qpfr1* for panicle number, *qgwr1* for hundred grain weight and *qfpr1* for fertility percentage of ratoon, controlled 25.12 %, 23.46 % and 22.64 % of the phenotypic variance, respectively. The *qyr6* was the major QTL for grain yield of ratoon on chromosome 6, controlled 19.95 % of the phenotypic variance. One new QTLs were identified for grain yield of ratoon which was located on chromosome 8.

Keywords: Rice, Ratooning ability, RILs, QTL mapping, SSR Markers