دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

# بررسی تجمیع ژن های مهم کنترل کننده صفات کمی و کیفی در برنج با استفاده از نشانگرهای مولکولی (MAS)

**ک. کتالانی[۱]، ق. ع. نعمت زاده[۲]، غ. کیانی[۳] و س. ح. ر. هاشمی[۴]**

۱، ۲ و ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴- کارشناس ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۷

**چکیده**

**صفات مختلفی در کیفیت و بازارپسندی برنج موثرند که مهمترین آنها شامل عطر و طعم (fgr)، درصد آمیلوز (AC)، قوام ژل (GC)، دمای ژلاتینه شدن (GT) و شکل دانه می‌باشند. در این تحقیق برای ترمیم صفات کمی و کیفی رقم جدید برنج بنام قائم، از دو رقم محلی شصتک و دمسیاه و دو رقم اصلاح شده فجر و نعمت استفاده گردید. کلیه تلاقی‌های ممکن یکطرفه بین رقم قائم بعنوان پایه مادری و بقیه ارقام بعنوان پایه پدری انجام گرفت. سپس کلیه تلاقی‌های مرکب بین $F_1$ها انجام و پس از کشت آنها بصورت تک بوته، انتخاب تیپ‌های برتر براساس صفات فنوتیپی صورت گرفت. پس از آن با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های هدف اقدام به مطالعه تفکیک و ترکیب ژن‌های موثر موردنظر گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که تلاقی‌های مرکب شصتک/ قائم// دمسیاه/ قائم و فجر/ قائم// نعمت/ قائم از قابلیت ترکیب‌پذیری خوبی (بدلیل دارا بودن هر چهار ژن مورد نظر در یک گیاه) در مقایسه با سایر تلاقی‌های مرکب برخوردار بوده و دو بوته از مجموع بوته‌های انتخابی، توأمان دارای ژن‌های هموزایگوس عطر و طعم و شکل دانه بوده‌اند. از سوی دیگر بسیاری از بوته‌ها، اکثر ژن‌های مورد مطالعه را بصورت هتروزایگوس دارا بودند. برای بررسی ژن‌های مختلف موثر در کیفیت و کمیت و رسیدن به لاین خالص جدید با ویژگی‌های موثر در کیفیت پخت و خوراک، می‌بایست بوته‌های انتخابی را برای رسیدن به لاین‌های خالص، در نسلهای پیشرفته‌تر مورد بررسی قرار داد.**

**واژه های کلیدی: برنج، رقم قائم، انتخاب به کمک نشانگر مولکولی (MAS)، شاخص های کیفیت**

## مقدمه

کیفیت پخت و خوراک برنج برای مصرف‌کنندگان ایرانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۲). کیفیت پخت و خوراک در برنج تحت تاثیر برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی از جمله میزان آمیلوز (AC)،

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

قوام ژل (GC) و دمای ژلاتینه شدن (GT) قرار دارد (۵، ۱۳،۱۸،۱۷ و ۱۹). اگرچه *Wx* به عنوان یک ژن اصلی برای AC عمل می‌نماید اما برای GC و GT بعنوان ژن فرعی محسوب می‌شود، درحالیکه *SSII-3* به عنوان یک ژن اصلی کنترل کننده GT بوده و برای AC و GC بعنوان ژن فرعی به حساب می‌آید (۱۰، ۲۸ و ۳۱). برنج با GT پایین به انرژی کمتری برای پخت نیاز دارد (۱۰، ۲۹، ۳۰ و ۳۲). اصولا واریته‌های با آمیلوز متوسط و GC متوسط تا بالا (۱۰۰-۴۰ میلی متر) بیشتر مورد توجه مصرف‌کننده‌ها می‌باشد (۲۸). عطر و طعم نیز یکی دیگر از معیارهای کیفی برنج است. در میان ترکیبات موثر در عطر و طعم، ماده شیمیایی ۲- استیل ۱- پیرولین[1] (2AP) به عنوان مهمترین آنها در ارقام معطر شناخته شده است (۱۱ و ۲۱). ژن مغلوب (*fgr*) مسئول عطر بوده و بوسیله سطح AP مشخص می‌گردد (۶ و ۲۱). اگرچه روش‌های شیمیایی مختلفی برای اندازه‌گیری عطر و طعم در برنج وجود دارد اما بدلیل وقت‌گیر و پرهزینه بودن این روش‌ها، انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS) می‌تواند به عنوان روشی موثر و قابل اعتماد، جایگزین روش‌های شیمیایی گردد (۲۱ و ۲۵).

علاوه بر کیفیت پخت و عطر، کیفیت ظاهری دانه نیز بر بازارپسندی محصول تاثیر بسزایی دارد. ژن GS3 یک QTL اصلی برای طول و وزن دانه و در عین حال یک QTL فرعی برای عرض و ضخامت دانه محسوب می‌شود که در کروموزوم شماره ۳ مکان یابی شده است (۹). بر پایه گزارش‌های منتشره امکان ادغام و انتخاب چند ژن از جمله دو ژن *Gn1* و *Sd1* با استفاده از MAS تایید گردید (۱ ، ۲ و ۲۶)، به اینگونه لاین‌ها اصطلاحا لاین هرمی گفته می‌شود. مطالعات بسیاری مبنی بر استفاده از هرمی کردن ژن‌ها برای اصلاح مقاومت به آفات و بیماری‌ها با کمک MAS با موفقیت انجام شده است (۷، ۱۴، ۱۶، ۲۴ و ۲۷)، از جمله جیانگ و همکاران (۱۴) موفق به هرمی کردن ژن‌های Xa21 و Bt (ژن های مقاومت به آفات و حشرات) با استفاده از انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی در رقم Minghui 63 شدند. جوزف و همکاران نیز (۱۶) با استفاده از انتخاب به کمک نشانگر به همراه انتخاب فنوتیپی مقاومت به بلایت باکتریایی و خصوصیات کیفی مناسب را در برنج ترکیب کردند. آنها از هرم چندین ژن مقاومت استفاده کردند، که باعث موفقیت در ایجاد مقاومت پایدار در برنج گردید.

جیرین و همکاران (۱۲) با انتخاب به کمک نشانگر و ارزیابی‌های فنوتیپی لینکاژ بین ژن مقاومت به زنجره و آمیلوز بالا را شکسته و لاین‌های مقاوم به آفت و دارای آمیلوز متوسط را تولید کردند. زو و همکاران (۳۴) با استفاده از برنامه تلاقی برگشتی به کمک نشانگر، آمیلوز بالا و قوام ژل سخت و دمای ژلاتینه شدن پایین و آندوسپرم گچی را در رقم Zhenshan 97 اصلاح نمودند. لی و همکاران (۲۰) بمنظور اصلاح آمیلوز در دو لاین نگهدارنده با استفاده از نشانگر مربوط به ژن *wx*، دمای ژلاتینه شدن و قوام ژل

1- 2- Acetyl 1- Pyrolin

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

لاین‌های مورد نظر را نیز اصلاح نمودند. جین و همکاران (۱۵) با استفاده از نشانگرهای مولکولی کیفیت پخت، خوراک و عطر و طعم را در لاین II-32B با استفاده از ۳ ژن مهم *wx, SSIIa, fgr* اصلاح کردند و موفق به ترکیب عطر، آمیلوز پایین و دمای ژلاتینه شدن پایین در این رقم شدند.

هدف از این تحقیق مطالعه تجمیع یا هرمی شدن ژن‌های کیفیت در رقم قائم با استفاده از تلاقی‌های مرکب و انتخاب به کمک نشانگرهای (MAS) مولکولی بوده است.

## مواد و روشها

### مواد گیاهی

در این تحقیق از چهار رقم مختلف برنج از جمله رقم دمسیاه (با عطر و طعم بالا و کیفیت مناسب) و شصتک (زودرس و با تراکم دانه بسیار بالا)، فجر (با کیفیت مناسب) و نعمت (با طول خوشه بلند) بعنوان پایه های پدری و رقم قائم بعنوان پایه ثابت مادری استفاده گردید. کلیه تلاقی‌های لازم یک‌طرفه در سال ۱۳۸۷ بصورت دستی انجام و بذور $F_1$ در سال زراعی ۱۳۸۸ کشت شدند. در سال زراعی ۱۳۸۸ تلاقی های بین $F_1$ ها (بصورت دای آلل یکطرفه، P(P-1)/ 2 )) انجام و بذور تلاقی‌های مرکب جمع آوری و در سال زراعی ۱۳۸۹ در مزرعه پژوهشی پژوهشکده برنج و مرکبات کشت گردیدند (جدول ۱). سپس در مرحله گلدهی بوته‌های مطلوب از نظر فنوتیپ (طول خوشه، ارتفاع بوته، زمان گلدهی و تعداد پنجه) انتخاب و برگ‌های آنها برای استخراج DNA جهت آنالیز مولکولی برداشت شدند.

جدول ۱- تلاقی دای آلل یکطرفه (P(P-1) /2) و جمعیت حاصل از تلاقی‌های مرکب بین آنها

| والدین | تلاقی‌های یکطرفه (سال ۱۳۸۷) | تلاقی مرکب (سال ۱۳۸۸) |
|---|---|---|
| فجر | شصتک/ قائم | فجر/ قائم// شصتک/ قائم (۱) |
| قائم | دمسیاه/ قائم | نعمت/ قائم// دمسیاه/ قائم (۲) |
| شصتک | فجر/ قائم | نعمت/ قائم// شصتک/ قائم (۳) |
| دمسیاه | نعمت/ قائم | شصتک/ قائم// دمسیاه/ قائم (۴) |
| نعمت | | فجر/ قائم// نعمت/ قائم (۵) |
| | | فجر/ قائم// دمسیاه/ قائم (۶) |

### استخراج DNA و نشانگرهای مورد استفاده

نمونه‌های برگی ۴۳ بوته انتخابی از مجموع ۱۹۰ بوته تلاقی‌های مرکب (با توجه به خصوصیات مرفولوژیکی و تیپ مناسب بوته) برداشت و استخراج DNA آنها به روش دلاپورتا و همکاران (۸) انجام شد. نشانگرهای همبسته با صفات مورد نظر طبق جدول ۲ انتخاب و بکار گرفته شدند.

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

جدول ۲- نشانگرهای مولکولی همبسته با صفات مورد مطالعه کیفی برنج که در این تحقیق استفاده شده‌اند.

| نوع نشانگر | نام نشانگر | محل کروموزومی/ صفت | توالی رفت | توالی برگشت | منبع |
|---|---|---|---|---|---|
| RM411 | SSR | طول دانه- وزن دانه،۳ | acaccaactcttgcctgcat | tgaagcaaaaacatggctagg | Fan et al.(2006) |
| RM190 | SSR | ۶ -AG,GC,GT | gctacaaatagccacccacacc | caacacaagcagagaagtgaagc | Jairin etal.(2009) |
| RM204 | SSR | ۶ -AC/GC | gtgactgacttggtcatagg | gctagccatgctctcgtacc | Yi et al.(2009) |
| ESP | SNP | FGR | ttgtttggagcttgctgatg | - | Bradbury et al.(2005) |
| IFAP | SNP | FGR | cataggagcagctgaaatatatacc | - | Bradbury et al.(2005) |
| EAP | SNP | FGR | agtgctttacaaagtcccgc | - | Bradbury et al.(2005) |
| INSP | SNP | FGR | ctggtaaaaagattatggcttca | - | Bradbury et al.(2005) |
| GT11 | STS | ۶/GT | cgagcgagggtttactgttc | ggaggaaacagcagcaactc | Jairin et al.(2009) |
| GS09 | Indel | GS3 | gcaaccaagtccacgctaat | tagccgaagatcagcctcct | Fan et al.(2006) |
| Gn1a-M1 | STS | تعداد دانه در خوشه | ctcttgcttcattatcaatc | aaactacacaagaatctgct | Yan et al.(2009) |
| Gn1a-M2 | STS | تعداد دانه در خوشه | tgaggatgccgtggaagacg | ttcgtgttcgcgcaggacgt | Yan et al.(2009) |
| RM44 | SSR | ری آمدن- ۸ | acgggcaatccgaacaacc | tcgggaaaacctaccctacc | Jain et al. (2006) |
| RM137 | SSR | ری آمدن- ۸ | gacatcgccaccagcccaccac | cgggtggtccccgaggatcttg | Jain et al. (2006) |
| RM331 | SSR | ری آمدن- ۸ | gaaccagaggacaaaaatgc | catcatacatttgcagccag | Jain et al. (2006) |

**شرایط PCR و انجام الکتروفورز**

برای ارزیابی ژنتیکی عطر و طعم از نشانگر اختصاصی (ASA)[1] برادبری و همکاران (۳) استفاده شد. نشانگر اختصاصی بصورت چندگانه[2] بوده و از ترکیب دو به دوی آنها ۳ باند به اندازه‌های ۵۸۰، ۳۵۵ و ۲۵۷ جفت باز تولید می‌شود. شرایط PCR برای عطر و طعم عبارتند از: مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10 ×، µl ۰/۵ از dNTPs (۱۰ میلی مولار)، µl ۱ از $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، µl ۰/۵ از هر پرایمر (µl ۱۰)، ۰/۵ واحد آنزیم تک‌پلیمراز و ۵۰-۱۰۰ نانوگرم از DNA نمونه بوده است. شرایط دمایی شامل ۹۴ درجه برای ۲ دقیقه و ۳۰ چرخه به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، و در پایان ۱ سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گرادی به مدت ۵ دقیقه بوده است. شرایط PCR برای سایر ژن‌های مورد مطالعه نیز براساس استاندارد متداول شرایط PCR برای نشانگرهای SSR بوده است. فرآورده‌های PCR بوسیله الکتروفورز ژل آگارز ۲/۵-۲ درصد جداسازی و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و سپس به مطالعه باندها پرداخته شد.

## نتایج و بحث

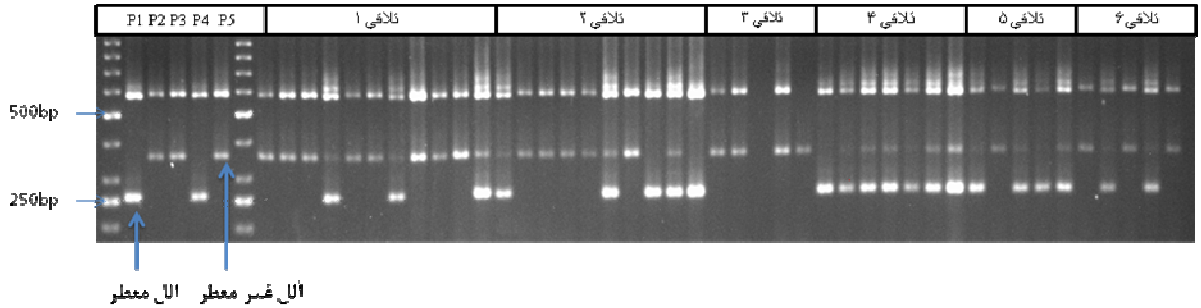
**ارزیابی مولکولی ژن عطر و طعم**

نتایج آزمایش نشان داده است که دو نشانگر ESP و EAP به عنوان کنترل داخلی عمل نموده و باندی به وزن ۵۸۰ جفت باز را تولید می نمایند. ترکیب نشانگرهای INSP و EAP باندی به وزن ۳۵۵ جفت باز را در ژنوتیپ غیرمعطر و ترکیب نشانگرهای IFAP و ESP باندی به وزن ۲۵۷ جفت باز را در ژنوتیپ‌های معطر تولید نمودند (۴). لذا ارقام والدینی فجر و دمسیاه دارای آلل‌های معطر و ارقام نعمت و شصتک و قائم فاقد باند معطر بودند (شکل ۱ و جدول ۳).

1- Allele-specific amplification

2- Multiplex

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]




شکل ۱- تعیین ژنوتیپ عطر و طعم به کمک نشانگر برادبری و همکاران در جمعیت حاصل از تلاقی مرکب: فجر/ قائم// شصتک / قائم (۱). نعمت/ قائم// دمسیاه/ قائم (۲). نعمت/ قائم// شصتک/ قائم (۳). شصتک / قائم// دمسیاه/ قائم (۴). فجر / قائم // نعمت / قائم (۵). فجر / قائم // دمسیاه / قائم (۶)، و ارقام والدینی شامل: $P_1$: فجر، $P_2$: قائم، $P_3$: شصتک، $P_4$: دمسیاه و $P_5$: نعمت.

جدول ۳- خصوصیات کیفی ارقام والدینی

| صفت / نام رقم | میزان آمیلوز | قوام ژل | دمای ژلاتینه شدن | عطر و طعم |
|---|---|---|---|---|
| فجر | متوسط | متوسط | متوسط | معطر |
| قائم | متوسط | سخت | پایین | غیر معطر |
| شصتک | متوسط | سخت | متوسط | غیر معطر |
| دمسیاه | متوسط | نرم | متوسط | معطر |
| نعمت | بالا | متوسط | پایین | غیر معطر |

در تلاقی نعمت/ قائم// دمسیاه/ قائم از تعداد ۱۰ بوته، ۲ بوته دارای ژن هموزیگوس معطر و ۳ بوته نیز برای ژن معطر هتروزیگوس و مابقی بوته‌ها فاقد ژن معطر بودند. همچنین آزمون این نشانگر در تلاقی مرکب فجر/ قائم// شصتک/ قائم نشان داد که از تعداد ۱۱ بوته ۳ بوته هتروزیگوس و ۸ بوته فاقد آلل معطر (*fgr*) می‌باشند. در تلاقی شصتک/ قائم// دمسیاه/ قائم نیز از مجموع ۷ بوته، ۱ بوته دارای ژن هموزایگوس *fgr* و مابقی هتروزیگوس بودند. در تلاقی فجر/ قائم// نعمت/ قائم، ۱ بوته دارای ژن خالص معطر و ۴ بوته هتروزیگوس بودند و در تلاقی فجر/ قائم // دمسیاه / قائم، ۲ بوته هتروزیگوس و ۳ بوته فاقد آلل معطر، و در تلاقی نعمت/ قائم// شصتک / قائم بدلیل اینکه هیچیک از والدین تلاقی، معطر نبودند در آزمایش نیز هیچ گونه آلل معطری مشاهده نگردید (شکل ۱).

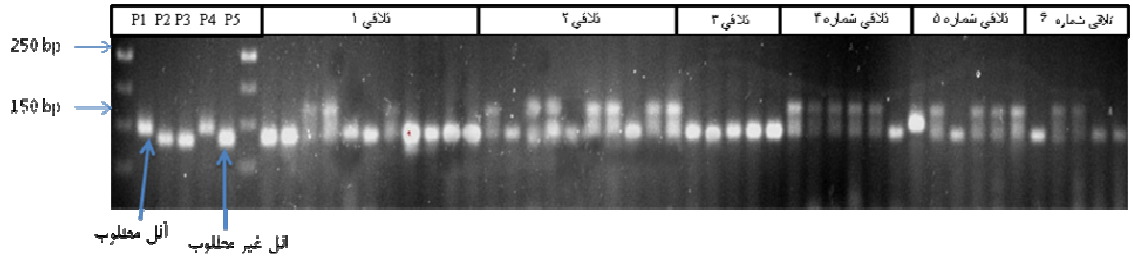
**ارزیابی مولکولی برای AC,GC,GT**

از سه نشانگر مورد استفاده در ارزیابی آمیلوز، قوام ژل و دمای ژلاتینه شدن (GT11, RM190, RM 204)، نشانگر GT11

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

هیچ‌گونه چندشکلی در بین والدین نشان نداد، لذا از ادامه بررسی حذف گردید، در حالی که نشانگرهای RM190 و RM204 در بین والدین چندشکلی مناسبی نشان دادند. نشانگر RM190 که با ۳ ویژگی پخت (میزان آمیلوز، دمای ژلاتینه شدن و قوام ژل) همبستگی دارد (۱۲ و ۲۸)، ارقام کیفی فجر و دمسیاه را از سایر ارقام غیر کیفی کاملا متمایز نمود (شکل۲ و جدول ۳). همچنین آزمون این نشانگر در نسل در حال تفکیک فجر/ قائم// شصتک/ قائم نشان داد که از تعداد ۱۱ بوته، ۳ بوته هتروزیگوس بوده و مابقی فاقد آلل‌های مطلوب ارقام کیفی بودند. در تلاقی نعمت/ قائم// دمسیاه / قائم، ۷ بوته هتروزیگوس و ۳ بوته فاقد هر گونه آلل مطلوبی بودند. در تلاقی نعمت/ قائم// شصتک / قائم هیچ آلل مطلوبی مشاهده نشد، در حالیکه در تلاقی شصتک/ قائم// دمسیاه/ قائم از مجموع ۷ بوته، ۵ بوته هتروزیگوس و دو بوته فاقد آلل مطلوب بودند. در تلاقی فجر/ قائم// نعمت / قائم از مجموع ۵ بوته، ۴ بوته هتروزیگوس و ۱ بوته بدون آلل مطلوب شناسایی شدند. همچنین در تلاقی فجر/ قائم// دمسیاه/ قائم دو بوته هتروزیگوس و ۳ بوته بدون آلل مورد نظر بودند (شکل ۲).

نشانگر RM204 مربوط به نسبت آمیلوز به قوام ژل (AC/GC) می‌باشد (۳۳). این نشانگر نیز با توجه به چندشکلی بین والدین، شصتک و دمسیاه را از سایر والدین متمایز نمود، و به علت مشابه بودن نتایج با نشانگر RM190 در متمایز نمودن والد کیفی دمسیاه، از ادامه بررسی حذف گردید.



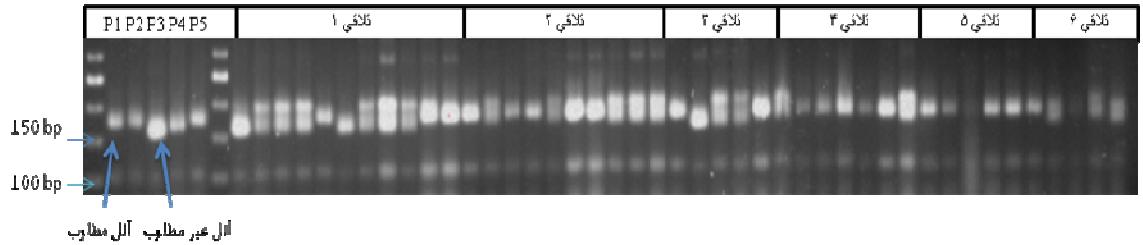

شکل ۲- چند شکلی RM190 در بین والدین و تفرق حاصل از این نشانگر در تلاقی‌های مرکب : فجر/ قائم// شصتک/ قائم (۱). نعمت/ قائم// دمسیاه/ قائم (۲). نعمت/ قائم// شصتک/ قائم (۳). شصتک/ قائم// دمسیاه/ قائم (۴). فجر/ قائم// نعمت/ قائم (۵). فجر/ قائم // دمسیاه/ قائم (۶) و ارقام والدینی شامل: $P_1$: فجر، $P_2$: قائم، $P_3$: شصتک، $P_4$: دمسیاه و $P_5$: نعمت.

**ارزیابی مولکولی طول دانه**

به منظور تعیین ژنوتیپ های هموزیگوس دانه بلند و کوتاه و نیز افراد هتروزیگوس در جمعیت تلاقی مرکب از ۲ نشانگر در این بررسی استفاده شده است. نتایج آزمایش نشان دادند که نشانگر RM411 علی رغم فاصله کم (۵ سانتی مورگان) آن با ژن مورد نظر (*GS3*) (۹) قادر به تفکیک کامل نسبت طول به عرض

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

دانه در این تحقیق نمی‌باشد، در حالیکه نشانگر GS09 از این قابلیت برخوردار بوده و بخوبی توانست شصتک را که رقمی با شکل دانه گرد و پهن می‌باشد، از سایر ارقام والدینی متمایز نماید (شکل ۳). آزمون این نشانگر در جمعیت تلاقی مرکب نشان داده است که از میان ۴۳ بوته مطالعه شده، ۳ بوته دارای باند هموزیگوس خالص شصتک، ۱۴ بوته هتروزیگوس با یک باند شصتک و ۵ بوته هتروزیگوس با یکی از باندهای دمسیاه می‌باشد، مابقی بوته‌ها دارای باندی مشابه با فجر، نعمت و قائم بودند. نشانگرهای همبسته با صفات تعداد دانه در خوشه (Gn1a-M1, Gn1a-M2) و طول دانه بعد از پخت (RM44, RM137, RM331) (جدول ۲) قادر به تفکیک این صفات در بین والدین نبودند.




شکل ۳- پرایمر GS09، چندشکلی حاصل در والدین و جمعیت حاصل از تلاقی مرکب : فجر/ قائم// شصتک/ قائم (۱). نعمت/ قائم// دمسیاه/ قائم (۲). نعمت / قائم // شصتک / قائم (۳). شصتک / قائم// دمسیاه/ قائم (۴). فجر/ قائم// نعمت/ قائم (۵). فجر/ قائم// دمسیاه/ قائم (۶)، و ارقام والدینی شامل: $P_1$: فجر، $P_2$: قائم، $P_3$ :شصتک، $P_4$: دمسیاه و $P_5$: نعمت.

بهبود شاخص‌های تولید (عملکرد) و کیفیت در ارقام برنج جزء اصلی‌ترین برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. اگرچه جین و همکاران در سال ۲۰۱۰ اصلاح موفقیت‌آمیز و همزمان کیفیت پخت و عطر و طعم در برنج را گزارش نمودند ولیکن در این مطالعه علاوه بر صفات یاد شده طول دانه بعد از پخت، شکل دانه و تعداد دانه در خوشه نیز مورد بررسی قرار گرفته اند. نشانگرهای مولکولی مرتبط با طول دانه بعد از پخت و تعداد دانه در خوشه قادر به تفکیک این صفات در بین والدین نبودند و از ادامه بررسی بازماندند. همانگونه که سایر محققین (۱۲، ۱۵، ۲۰، ۳۳ و ۳۴) گزارش نموده اند، نتایج حاصل از ارزیابی‌های فنوتیپی و مولکولی در این تحقیق روی والدین و جمعیت تلاقی‌های مرکب، مبتنی بر استفاده از نشانگرهای مولکولی نشان داد که از ترکیب روش‌های کلاسیک و مولکولی می‌توان به‌عنوان روشی دقیق، موثر و سریع به منظور اصلاح لاین‌هایی با تجمیع ژن‌های مهم استفاده نمود. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که از مجموع تلاقی‌های مرکب، تلاقی ۴ (دمسیاه/ قائم// شصتک/ قائم) و تلاقی ۵ (فجر/ قائم// نعمت/ قائم) و تلاقی ۲

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

(نعمت/ قائم// دمسیاه/ قائم)، به ترتیب دارای بیشترین تعداد بوته‌هایی با ژن‌های مورد نظر می‌باشند. علاوه بر این نتایج بدست آمده مؤید آن است که استفاده از ارقام کیفی دمسیاه و فجر (جدول ۳) نقش عمده‌ای در کارایی تلاقی‌ها داشته‌اند. در بررسی مشابه زو و همکاران (۳۴) نیز از رقم کیفی Minghui 63 که دارای آمیلوز متوسط، قوام ژل نرم و دمای ژلاتینه شدن بالا بوده برای بهبود ویژگی‌های کیفی رقم Zhenshan 97 استفاده کرده‌اند.

جدول ۳- نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ در جمعیت حاصل از تلاقی مرکب با استفاده از نشانگرهای مولکولی

| شماره تلاقی | جمعیت تلاقی های مرکب | تعداد کل بوته‌های مورد مطالعه | تعداد بوته‌های انتخابی در مزرعه | وضعیت عطر | | وضعیت آمیلوز | | وضعیت طول دانه | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | وضعیت عطر (معطر) (٪) | وضعیت عطر (غیر معطر) (٪) | وضعیت عطر (٪هتروزیگوت) | وضعیت AC.GC.GT بوته‌های هتروزیگوت (٪) | وضعیت AC.GC.GT هموزیگوتی غالب (غیر انتخابی) (٪) | بوته‌های دانه کشیده (٪) (هموزیگوت غالب) | بوته‌های هتروزیگوت (٪) | بوته‌های دانه گرد (٪) (هموزیگوت مغلوب) |
| ۱ | فجر/ قائم // شصتک/ قائم | ۴۱ | ۱۱ | - | ۷۲/۳۷ | ۲۷/۲۷ | ۲۷/۲۷ | ۷۲/۷۳ | ۲۷/۲۷ | ۵۴/۵۵ | ۱۸/۱۹ |
| ۲ | نعمت/ قائم // دمسیاه/ قائم | ۳۷ | ۱۰ | ۲۰ | ۵۰ | ۳۰ | ۷۰ | ۳۰ | ۵۰ | ۵۰ | - |
| ۳ | نعمت/ قائم// شصتک/ قائم | ۵۰ | ۵ | - | ۱۰۰ | - | - | ۱۰۰ | ۴۰ | ۴۰ | ۲۰ |
| ۴ | شصتک/ قائم// دمسیاه/ قائم | ۲۲ | ۷ | ۱۴/۲۹ | - | ۸۵/۷۱ | ۷۱/۴۲ | ۲۸/۵۸ | ۷۱/۴۳ | ۲۸/۵۷ | - |
| ۵ | فجر/ قائم// نعمت/ قائم | ۱۰ | ۵ | ۲۰ | - | ۸۰ | ۸۰ | ۲۰ | ۱۰۰ | - | - |
| ۶ | فجر/ قائم // دمسیاه/ قائم | ۳۰ | ۵ | - | ۶۰ | ۴۰ | ۶۰ | ۴۰ | ۲۰ | ۸۰ | - |

بدلیل اهمیت موضوع عطر و طعم در برنج و بمنظور افزایش سرعت و کارایی انتخاب در بررسی‌های مولکولی، ابتدا ارزیابی بر مبنای ژن *fgr* (عطر و طعم) انجام گرفت و سپس افراد هموزیگوس و هتروزیگوس سایر ژن‌ها مشخص گردیدند. از آنجایی که هدف از این پروژه تحقیقی، مطالعه تجمیع ژن‌های عطر و طعم، کیفیت پخت و خوراک و اندازه دانه می‌باشد، لذا بوته ۸-۲-۸۹ از تلاقی نعمت/ قائم// دمسیاه/ قائم و بوته ۲-۵-۸۹ حاصل از تلاقی فجر/ قائم// نعمت/ قائم، اگرچه دارای ژن خالص *fgr* بوده‌اند ولیکن بدلیل عدم وجود یا فاقد خالص بودن سایر ژن‌های کنترل کننده کیفیت پخت و خوراک از جمله آمیلوز، قوام ژل و دمای ژلاتینه شدن از برنامه اصلاحی حذف شدند و بررسی مجدد آنها نیازمند نسل‌های پیشرفته‌ای می‌باشد (جدول ۴). بوته‌های شماره ۱۰-۲-۸۹ و ۱-۴-۸۹ (با در نظر گرفتن هتروزیگوس بودن در برخی از مکان‌های ژنی) حاکی از تجمیع موفقیت آمیز ژن عطر و طعم و ژن‌های مربوط به کیفیت پخت و شکل دانه در رقم قائم است. همانگونه

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

که در جدول ۴ آمده اکثر بوته‌هایی که از نظر ژن عطر هتروزیگوس بودند از نظر شکل دانه نیز دارای فرم دانه کشیده هستند. علاوه بر انتخاب بوته‌هایی با ژن‌های هموزایگوس مورد نظر سعی گردید بوته‌هایی که دارای ژن‌های مورد نظر اما هتروزایگوس بودند نیز انتخاب، تا در نسل‌های پیشرفته وضعیت تفکیک آنها مورد بررسی بیشتر قرار گیرد (جدول ۴)، بعنوان مثال می‌توان از بوته‌های ۶-۲-۸۹ و ۲-۶-۸۹ از تلاقی نعمت/ قائم// دمسیاه/ قائم و فجر/ قائم// دمسیاه/ قائم نام برد. براساس گزارش ریبوت و هوسینگتون (۲۳) با استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه اصلاحی می‌توان زمان اصلاح روش‌های کلاسیک را کوتاه نمود، بطوریکه جین و همکاران (۱۵) با دو نسل تلاقی برگشتی و سه نسل خودگشنی موفق به انتخاب افرادی با هموزیگوسیتی در سه لوکوس AC, GC, *fgr* شدند.

جدول ۴- بوته های انتخابی بر مبنای داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی. نمره‌دهی بوته‌ها براساس علامت ستاره روی هر ژنوتیپ مشخص شده است. ۴ بوته‌ی اول به عنوان بوته‌هایی که دارای ژن عطر هموزیگوس بوده و از سایر بوته‌ها متمایز می‌باشند.

| کد بوته‌های انتخابی | *Fgr* | AC,GC,GT | اندازه دانه |
|---|---|---|---|
| ۸۹-۲-۸ | + | – | ± |
| ۸۹-۲-۱۰† | + | ± | ± |
| ۸۹-۴-۱† | + | ± | ± |
| ۸۹-۵-۲ | + | – | + |
| ۸۹-۱-۴*** | ± | ± | ± |
| ۸۹-۱-۷*** | ± | ± | ± |
| ۸۹-۱-۱۱ *** | ± | – | + |
| ۸۹-۲-۱*** | ± | ± | + |
| ۸۹-۲-۶**** | ± | ± | + |
| ۸۹-۲-۹*** | ± | ± | ± |
| ۸۹-۴-۲*** | ± | ± | + |
| ۸۹-۴-۳*** | ± | ± | + |
| ۸۹-۴-۴*** | ± | ± | + |
| ۸۹-۴-۵*** | ± | ± | + |
| ۸۹-۴-۶** | ± | – | + |
| ۸۹-۴-۷** | ± | – | ± |
| ۸۹-۵-۱*** | ± | ± | + |
| ۸۹-۵-۳*** | ± | ± | + |
| ۸۹-۵-۴*** | ± | ± | + |
| ۸۹-۵-۵*** | ± | ± | + |
| ۸۹-۶-۲**** | ± | ± | ± |
| ۸۹-۶-۴*** | ± | – | ± |

بوته‌هایی که با علامت † مشخص شده به عنوان بوته های هرمی در نظر گرفته شده‌اند. علامت + یعنی آن دسته ژنوتیپ هایی که از نظر صفت مورد نظر هموزیگوس می‌باشند، ± هتروزیگوس و - یعنی فاقد آلل مطلوب صفت مورد نظر می‌باشند.

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

یی و همکاران (۳۳) نیز از چهار نسل تلاقی برگشتی و یک نسل خودگشنی برای ترکیب و انتقال آلل‌های ژن عطر و طعم و *Wx* در رقم Manawthukha استفاده کردند. این گزارش، اولین گزارش بررسی توأمان مورفولوژیکی و مولکولی تجمیع ژن‌های مهم برنج در رقم قائم با استفاده از تلاقی‌های مرکب می‌باشد. خوشبختانه نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که در اولین نسل مطالعه شده استفاده از نشانگرهای مولکولی (MAS)، بوته‌های هموزیگوس از نظر عطر و طعم و شکل دانه و هتروزیگوس از نظر کیفیت پخت (آمیلوز متوسط، قوام ژل و دمای ژلاتینه شدن متوسط) مورد شناسایی قرار گرفتند، لذا با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان انتظار داشت که در نسل‌های پیشرفته با تهیه لاین‌های خالص امید بخش با ترکیب و یا هرمی ساختن ژن‌ها، به ارقام اصلاحی با صفات کمی و کیفی مناسب دست یافت.

## تشکر و قدردانی

از مجموعه مدیریت پژوهشکده برنج و مرکبات که اعتبار لازم را برای انجام این پروژه فراهم نموده‌اند، قدردانی بعمل می‌آید.

## منابع

1. Ashikari, M. and M. Matsuoka. 2006. Identification isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. Trends. Plant. Sci., 7: 344-350.
2. Ashikari, M., A. Sasaki, M. Ueguchi-Tanka, H. Itoh, A. Nishimura, S. Detta, K. Ishiyama, T. Saito, M. Kobayashi, G.S. Khush, H. Kitano and M. Matsuoka. 2002. Mutation in a gibberellin biosynthetic gene, GA20 oxidase, contributed to the rice "Green Revolution". Breed. Sci., 52: 143-150.
3. Bradbury, L.M.T., T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q.S. Jin and D.L.E. Waters. 2005a. The gene for fragrance in rice. Plant. Biotech. J., 3: 363-370.
4. Bradbury, L.M.T., R.J. Henry, Q.S. Jin, R.F. Reinke and D.L.E. Waters. 2005b. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. Molecul. Breed. 16: 279-283.
5. Cagampang, G.B., C.M. Perez and B.O. Juliano. 1973 . A gel consistency test for eating quality of rice. J. Sci. Food. Agric., 24: 1589-1594.
6. Chen, S., XH. Lin, C.G. Xu and Q. Zhang. 2000. Improvement of bacterial blight resistance of 'Minghui 63', an elite restorer line of hybrid rice, by marker-assisted selection. Crop. Sci., 40: 239-244.
7. Chen, S., Y. Yang, W. Shi, Q. Ji, F. He, Z. Zhang, Z. Cheng, X. Liu and M. Xu. 2008c. Badh2, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. The Plant Cell. 20: 1850-1861.
8. Dellaporta, S.L., J. Wood and J. Tickes. 1983. A plant molecular DNA minipreparation version II. 1: 19-21.
9. Fan, C.C., Y.Z. Xing, H.L. Mao, T.T. Lu and B. Han. 2006. GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. Theor. Appl. Genet. 112: 1164-1171.

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

10. Gao, Z.Y., D.L. Zeng, X. Cui, Y.H. Zhou, M. Yan, D. Huang, J.Y. Li and Q. Qian. 2003. Map-based cloning of the ALK gene, which controls the GT of rice. Sci. China. C- Life. Sci., 46: 661-668.
11. Grosch, W. and P. Schieberle. 1997. Flavor of cereal products a review. Cereal. Chem., 74: 91-97.
12. Jairin, J., S. Teangdeerith, P. Leelagud, J. Khothcharerk and T. Tooiinda. 2009. Development of rice introgression lines with brown planthopper resistance and KDML105 grain quality characteristics through marker assisted selection. Field. Crop. Rese. 110: 263-271.
13. Jangsutthivorawat, S. and H. Volkaert. 2009. Nucleotide polymorphism of starch synthesis genes in Thai rice. Nat. Sci., 43: 154-163.
14. Jiang, G.H., G.C. Xu, M.J. Tu, X.H. Li, Q.Y. He and Q.F. Zhang. 2004. Pyramiding of insect- and disease-resistance genes into an elite indica, cytoplasm male sterile restorer line of rice, Minghui 63.Plant Breed. 123: 112-116.
15. Jin, L., Y. Lu, Y. Shao, G. Zhang, P. Xiao, S. Shen, H. Corke and J. Bao. 2010. Molecular marker assisted selection for improvement of the eating, cooking and sensory quality of rice (*Oryza sativa* L.). Jorn. Cereal. Sci., 51: 159-164.
16. Joseph, M., S. Gopalakrishnan, R.K. Sharma, V.P. Singh, A.K. Singh, N.K. Singh and T. Mohapatra. 2004. Combining bacterial blight resistance and Basmati quality characteristics by phenotypic and molecular marker-assisted selection in rice. Mol. Breed. 00: 1-11.
17. Juliano, B.O. 1985. Criteria and test for rice grain quality in rice chemistry and technology. Saint Paul, America Association of Cereal Chemists. pp: 443-513.
18. Juliano, B.O. and B. Duff. 1991. Rice grain quality as an emerging priority in national rice breeding programs. *In*: Rice grain marketing and quality issues. Los Baons, Laguna, IRRI. pp: 55-64 .
19. Little, R., G. Hilder and E. Dawson. 1958. Differential effect of dilute alkali on 25 varieties of milled white rice. Cereal. Chem., 35: 111-126.
20. Liu, Q., Q. Li, X. Cai, H. Wang, S. Tang, H. Yu, Z. Wang and M. Gu. 2006. Molecular marker-assisted selection for improved cooking and eating quality of two elite parents of hybrid rice. Crop. Sci., 46: 2354-2360.
21. Lorieux, M., M. Petrov, N. Huang, E. Guiderdoni and A. Ghesquiere. 1996. Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. Theor. Appl. Gene., 93:1145-1151.
22. Nematzadeh, Gh.A., M.T. Karbalaie, F. Farrokhzad and B. Ghareyazie. 2000. Aromatic Rices. Edited by Singh, R.K., U.S. Singh, and G.S. Khush, Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Dehli, Calcatta. pp: 191-200.
23. Ribaut, J.M. and D. Hoisington. 1998. Marker assisted selection: new tools and strategies. CIMMYT. 3: 236-239.
24. Sharma, P.N., A. Torii, S. Takumi, N. Mori and C. Nakamura. 2004. Marker-assisted pyramiding of brown planthopper (*Nilaparvata lugens Sta˚ l*) resistance genes Bph1 and bph2 on rice chromosome 12. Hereditas. 140: 61-69.
25. Sood, B.C. and E.A. Siddiq. 1978. A rapid technique for scent determinations in rice. Indian J. Genet. Plant Breed. 38: 268-271.
26. Spielmeyer, W., M.H. Ellis and P.M. Chandler. 2002. Semidwarf (*sd-1*), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 9043-9048.

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

27. Sun, L., C. Wang, C. Su, Y. Liu, H. Zhai and J. Wan. 2006. Mapping and marker-assisted selection of a brown planthopper resistance gene bph2 in rice (*Oryza sativa* L.). Acta. Gentica. Sin., 33: 717-723.
28. Tian, Z., Q. Qian, Q. Liu, M. Yan, X. Liu and C. Yan. 2009. Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities. PNAS. 106: 21760-21765.
29. Umemoto, T. and N. Aoki. 2005. Single-nucleotide polymorphisms in rice starch synthase IIa that alter starch gelatinization and starch association of the enzyme. Func. Plan. Bio., 32: 763-768.
30. Umemoto, T., N. Aoki, H.X. Lin, Y. Nakamura, N. Inouchi, Y. Sato, M. Yano, H. Hirabayashi and S. Maruyama. 2004. Natural variation in rice starch synthase IIa affects enzyme and starch properties. Func. Plan. Bio., 31: 671-684.
31. Umemoto, T., M. Yano, H. Satoh, A. Shomura and Y. Nakamura. 2002. Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties. Theor. Appl. Gene., 104: 1-8.
32. Waters, D.L.E., R.J. Henry, R.F. Reinke and M.A. Fitzgerald. 2006. Gelatinization temperature of rice explained by polymorphisms in starch synthase. Plant. Biotechnol. J., 4: 115-122.
33. Yi, M., K. Than New, A. Vanavichit, W. Chai-arree and T. Toojinda. 2009. Marker assisted backcross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. Fiel. Crop. Rese., 113: 178-186.
34. Zhou, P.H., Y.F. Tan, Y.Q. He, C.G. Xu and Q. Zhang. 2003. Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. Theor. Appl. Genet., 106: 326-331.

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]

# Study of Combining Rice Quantitative and Quality Important Genes Via Marker Assisted Selection (MAS)

**K. Katalani[1], Gh.A. Nematzade[2], Gh. Kiani[3] and S.H.R. Hashemi[4]**

1, 2 and 3- Former M.Sc. Students, Professor and Assistant Professor of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
4- M.Sc. of Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan

**Abstract:**

Different characters influence the marketing of rice in which aroma, amylose content, gelatinization temperature, gel consistency and grain shape are the most important ones. Two local quality (Shastak and Domsia) and two improved rice varieties (Nemat and Fajrr) were used to pyramid the qualitative genes into new released Ghaem variety through classical methods and marker aided selection. Ghaem variety was used as a recipient parent and crossed with others mentioned varieties. Then, composite crosses were made between $F_1$ and after growing single plan, phenotypically desirable individual plant were selected. Followed by molecular analysis were used for study on segregation and combination of target genes using linked markers. The results indicated that Ghaem/ Domsia// Ghaem/ Shastak and Ghaem/ Nemat// Ghaem/ Fajr are the suitable crosses due to having most of the qualitative controlled genes, particularly aroma and grain shape. Mean while it is recommended that the final figures come out after doing advance generations and study the promising lines.

**Keywords:** Rice, Ghaem variety, MAS, Quality index

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03 ]