



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

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

- استادیار، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران، (نویسنده مسؤول): ebady_al@yahoo.com

^۲- استادیار و مرتبی پژوهشی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۹

چکیده

در گیاهان گرامینه پنجه‌زدن و تولید ساقه‌های ثانویه در صورت موجود بودن مواد غذائی 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 کنترل کننده 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 ریزماهواره استفاده شد که از این تعداد، ۱۷۷ نشانگر چند شکل بودند که برای تهیه نقشه پیوستگی روی لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب مورد بررسی قرار گرفتند. نقشه پیوستگی بر اساس ۱۵۹۰ نشانگر ریزماهواره ترسیم شد که ۱۷۰ سانتی‌مترگان از ژنوم برنج را پوشش داد و فاصله متوسط بین نشانگرهای مجاور ۹/۳ سانتی‌مترگان بود. در مجموع چهارده QTL بر اساس روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب فرآیند برای صفات تعداد خوشة با روزه، وزن صداته، باروری خوشة و عملکرد دانه راتون روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۵، ۷، ۸، ۱۱ و ۱۲ شناسایی شدند. مقدار واریانس توزیع QTL های شناسایی شده برای صفات مورده ارزیابی از ۷/۴۹ تا ۲۵/۱۲ متغیر بود. برای هر کدام از صفات تعداد خوشة، وزن صد دانه و باروری خوشه در راتون یک QTL بزرگ اثر روی کروموزوم ۱ بدنام‌های qfpr1، qgwr1، qpfpr1 به ترتیب با ۲۵، ۲۴ و ۲۳ درصد واریانس توجیهی قرار داشت. برای صفت عملکرد راتون بزرگ اثر ترین QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۶ بدنام qyr6 با توجهی ۲۰ درصد از واریانس فوتیبی 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

بیشتر برای تولید راتون در استان را ضروری می‌سازد. برداشت راتون شکل دیگری از زراعت پشت سرهم است. راتون احتمالاً از کلمه لاتین Retonus 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 دابل‌هایپولوئید حاصل از تلاقی دو رقم Jingxi17 و Zhaiyiqin8 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 دابل هایپولوئید 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 فوتیبی 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

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 تأمین غذای مردم آسیا است.^(۱۳) در ایران نیز برنج جایگاه و پیزه‌ای دارد، به طوری که قسمت اعظم غذای مردم ایران به ویژه استان‌های گیلان و مازندران را به خود اختصاص می‌دهد. سطح زیر کشت ارقام مختلف برنج در کل کشور ۵۴۰ هزار هکتار با تولید ۲/۳-۲/۴ میلیون تن شلتوك در سال زراعی ۹۳-۹۲ برآورد شده است. متوسط عملکرد برنج در ایران ۴/۳۶ تن شلتوك 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 زیر کشت را به عنوان کشت دوم در مقایسه با سایر محصولات نظیر شبدر، ترب و کلزا داشت.^(۳) بنابراین پتانسیل قابل توجهی برای افزایش محصول برنج از طریق استحصال راتون در شمال کشور وجود دارد که می‌باشد با تولید بیشتر راتون را مشخص نمود. این مسأله توجه هر چه

استخراج DNA از نمونه‌های برگی با روش مورای و تامپسون (۱۵) انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه Biometra مدل T-Gradient DNA 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 dNTPs میکرومول)، ۱/۲ میکرولیتر مخلوط بازهای آلی (با غلظت ۱ میلی‌مولار)، ۱/۴ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مراز (با غلظت ۵ یونیت در میکرولیتر)، ۰/۴۸ میکرولیتر کلرید منزیم (با غلظت ۵۰ میلی‌مول) و ۱ میکرولیتر بافر X ۱۰ و بر اساس چرخه حرارتی توضیح داده شده توسط راحمی و همکاران (۱۶) انجام شد. محصول PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید 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 تمینیخ 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 ژنتوتیپ 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 تعیین نکردند، بنابراین در تهییه نقشه پیوستگی و تجزیه QTL از ۱۷۰ نشانگر استفاده شد. از ماتریس داده‌های ژنتوتیپی جهت تهییه نقشه پیوستگی نشانگرها با استفاده از نرم‌افزار Mapmaker/EXP 3.0 معادل ۳، حدکثر فاصله پیوستگی ۴۰ سانتی‌مترگان و تابع کوزامی ترسیم شد. جهت تجزیه‌های آماری از نرم‌افزار SAS ver.9.0 استفاده شد. گروههای پیوستگی اولیه با استفاده از نرم‌افزارهای QTLIciMapping (۱۲) و MAPMAKER/EXP 3.0 (۱۹، ۱۱) تشکیل شد. تجزیه QTL جهت تعیین اثرات اصلی افزایشی با استفاده از نرم‌افزار QTLIciMapping انجام شد. در این نرم‌افزار QTL‌ها با روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب فراگیر (۱۹، ۱۱) شناسایی می‌شوند که در واقع همان مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب به همراه یک اسکن دو بعدی می‌باشد. سرعت پیمایش ژنوم ۰/۵ سانتی‌مترگان 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 کروموزم جداگانه رسم شد. QTL‌هایی که بالاتر از حد آستانه بودند شناسایی شده و اطلاعات مربوط به موقعیت مکانی QTL‌ها، اثرات افزایشی و میزان واریانس فوتیپی (درصد) آن‌ها توسط نرم‌افزار مشخص شد.

تلاقی‌برگشتی بین دو رقم نیپونباره (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) (۲۰) با مطالعه جمعیت لاین‌های نوترکیب ایندیکا به نام 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 کنترل کننده صفت قابلیت راتون‌زایی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره لاین‌های خالص حاصل از تلاقی برگشتی بین یک رقم Oryza rufipogon (Hwayeong) با برنج QTL را مورد بررسی و ارزیابی قرار دادند و یک 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 فوتیپی صفت قابلیت راتون‌زایی توسط این QTL توجیه می‌شود.

هدف از این تحقیق، مکان‌یابی ژن‌های کمی کنترل کننده 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) تهییه 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 خویش‌آمیخته به‌همراه دو والد هاشمی و نعمت و دو رقم حسنی و صالح به عنوان 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. بدزهای پس از ضدغوفونی با محلول قارچ کش ویتاواکس تیرام (با غلظت ۲/۵ در هزار) در بستر خزانه به صورت خطی قرار داده شدند. ۳۰ روز پس از بدزهای شاهد 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 به قابلیت راتون‌زایی شامل عملکرد دانه، وزن صد دانه، تعداد خوشة و درصد باروری خوشه در محصول راتون لاین‌ها و ارقام شاهد اندازه‌گیری شدند.

در هکتار) و رقم اصلاح شده نعمت (۲۰/۰ تن شلتونک در هکتار) بود. کلیه خصوصیات مورد بررسی در محصول راتون نسبت به محصول اصلی از میانگین پائین تری برخوردار هستند (جدول ۱). این امر می تواند به دلیل نداشتن فرصت کافی، پایین بودن درجه حرارت و شدت نور برای احیای اندام های رویشی گیاه باشد همچنین بعد از برداشت محصول اصلی، به دلیل کوتاه شدن روز، گیاه سریعاً پره رشد زایشی رفته و شروع به تولید مجدد دانه می کند (۱). از آنجاییکه درجه حرارت پائین است تعداد دانه کمتری تولید شده و متعاقب آن تعداد کمتری از دانه ها پر می گردند و ضمناً دانه های پر شده از وزن کمتری نسبت به محصول اصلی که فرصت کافی برای پر شدن داشته اند برخوردار می باشند. بنابراین محصول اصلی با دارا بودن خصوصیات زراعی مناسب و زمان بیشتر برای تکمیل دوره رشد رویشی قادر به تولید محصول بیشتری می باشد. 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.

نتایج و بحث

جزیه آماری داده‌های فنوتیپی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف بین ارقام شاهد برای چهار صفت مورد مطالعه معنی دار بود. اختلاف بین تکرارها معنی دار نشد و بنابراین نیازی به تصحیح داده های مربوط به لاین های نوتریک ب 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 بادستنای درصد باروری خوش در محصول اصلی کمتر از راتون بود. علت این امر شیبیه بودن ارقام از نظر صفات مورد نظر و پایین بودن میزان اشتیاه آزمایشی در محصول اصلی بوده است. همچنین یکنواخت بودن عوامل محیطی طی دوره رشد محصول اصلی می تواند یکی از عوامل کاهش اشتیاه آزمایشی و متعاقب آن پائین آمدن ضریب تغییرات باشد.

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

Table 1. Means of important agronomical traits of ratooning and main crop in control varieties

ردیف	ارقام	عملکرد دانه									
		بازوی خوشة (درصد)	تعداد خوشة (عدد)	وزن صد دانه (گرم)							
۱	هاشمی	۴/۵۷	۱/۲۰	۸/۸۶	۷۰	۱۴/۹	۸/۷	۳/۱	۱/۵	۰/۱	۰/۱۰
۲	نعمت	۶/۵۴	۰/۲۰	۸/۶۴	۶-۷	۱۷/۹	۵/۳	۲/۵	۱/۳	-۰/۱	-۰/۱۴
۳	حسنی	۳/۴۰	۱/۳۵	۹/۱۶	۷۱	۱۴/۱	۹/۳	۳/۸	۱/۴	-۰/۱	-۰/۱۴
۴	صالح	۴/۵۵	۰/۳۵	۸/۷	۶۵	۱۵/۳	۷	۳/۱	۱/۴	-۰/۱	-۰/۱۴
	میانگین	۴/۵۰	-۰/۷۸	۸/۸۴۰	۶۶/۶۸	۱۵/۵۵	۷/۵۸	۳/۳۸	۱/۴۰	-۰/۱	-۰/۱۴
	آشیاه میار	۱/۴۱	-۰/۵۸	۲/۳۳	۴/۷۷	۱/۶۴	۱/۸۰	-۰/۳۴	-۰/۱	-۰/۱	-۰/۱۴

بررسی در حدود میانگین والدین بود (جدول ۲). با نگاهی به محدوده صفات در جمیعت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب مشاهده می‌شود که در همه صفات برخی از لاین‌های نوترکیب نسبت به والدین ارزش پیشتر یا کمتری داشتند که بیانگر وجود پدیده تفکیک متجاوز برای همه صفات می‌باشد.

وجود تفکیک متجاوز برای این صفات، مطالعه و تعیین مکان‌های ظنی کنترل کننده صفات مرتبط با قابلیت راتون زایی با استفاده از جمیعت اصلاحی فعلی را امکان‌پذیر می‌سازد. یانگ و همکاران (۲۰) با مطالعه جمیعت لاین‌های نوترکیب حاصل از تلاقی یک رقم ژاپونیکا با یک رقم ایندیکا وجود پدیده تفکیک متجاوز برای صفت قابلیت راتون زایی را گزارش نمودند.

میانگین و اشتباه استاندارد والدین و لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب به همراه 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 معنی داری می‌باشند. بنابراین جمعیت انتخاب شده برای مکان یابی ژن‌های مربوط به صفات مورد بررسی مناسب می‌باشد. میانگین صفات عملکرد داده، تعداد خوش و وزن صد داده در رقم نعمت برای محصول اصلی بیشتر از رقم هاشمی بود، در حالی که درصد باروری خوش در محصول اصلی در والد نعمت کمتر بود. مقادیر این خصوصیات برای محصول راتون در رقم هاشمی بیشتر از رقم نعمت بوده است. میانگین لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب، در تمامی صفات مورد

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

Table 2. Means, standard error and variation range of traits in parents and recombinants inbred lines (RILs)

جمعیت لاین های خویش آمیخته نوتکب				والدین (استثنای استاندارد \pm مانگین)				صفت
دامنه	حداکثر	حداقل	اشتباه استاندارد \pm مانگین	نهمت	هاشمی	نهمت	اصلی	
۳/۲۲	۵/۶۵	۲/۳۳	۴/۳۶ \pm ۰/۲۶۲	۶/۲۲ \pm ۰/۹۰	۳/۵۷ \pm ۰/۳۴	۰/۲۲ \pm ۰/۰۴	اصلی	عملکرد دانه
۱/۲۰	۱/۳۵	۰/۱۵	۰/۶۸ \pm ۰/۰۲۹	۰/۲۰ \pm ۰/۰۴	۱/۲۰ \pm ۰/۰۴۳	۰/۲۰ \pm ۰/۰۴	راتون	(تن در هکتار)
۱۷/۱۱	۹۲/۷۱	۷۸/۵۰	۷۸/۱۰ \pm ۰/۰۳۰	۸۷/۴۰ \pm ۰/۰۷	۸۸/۹ \pm ۰/۰۷۸	۸۷/۴۰ \pm ۰/۰۷	اصلی	پارورو خوش
۳۴/۷۰	۸۵/۵۵	۵۰/۸۵	۶۸/۲ \pm ۰/۰۴۵	۶۰/۷۰ \pm ۰/۰۵۱	۷۰/۰۰ \pm ۰/۰۴۹	۷۰/۰۰ \pm ۰/۰۴۹	راتون	(درصد)
۹/۰۰	۲۱/۰۵	۱۲/۵۰	۱۶/۳ \pm ۰/۰۹۴	۱۷/۹۰ \pm ۰/۰۶۴	۱۴/۹۰ \pm ۰/۰۳۵	۱۷/۹۰ \pm ۰/۰۶۴	اصلی	تعداد خوش
۶/۱۵	۱/۱۵	۴/۲۰	۷/۹۳ \pm ۰/۰۳۵	۵/۳۰ \pm ۰/۰۲۰	۸/۷۰ \pm ۰/۰۳۴	۵/۳۰ \pm ۰/۰۲۰	راتون	(عدد)
۰/۶۰	۳/۶۵	۲/۰۵	۳/۲۲ \pm ۰/۰۴۵	۳/۵ \pm ۰/۰۲۶۵	۳/۱۰ \pm ۰/۰۳۲	۳/۱۰ \pm ۰/۰۳۲	اصلی	وزن سد دانه
۰/۷۳	۱/۷۵	۱/۰۲	۱/۴۰ \pm ۰/۰۳۵	۱/۳۰ \pm ۰/۰۴۵	۱/۵۰ \pm ۰/۰۵۸	۱/۵۰ \pm ۰/۰۵۸	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 معنی دار بود که البته در تحقیقات قبلی نیز این همبستگی مثبت و معنی دار 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 معنی دار بود.

همبستگی بین خصوصیات محصول اصلی و راتون به استثنای درصد باروری خوشه در راتون با درصد باروری خوشه در محصول اصلی منفی و معنی دار 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 گله‌دهی با شرایط نامساعد محیطی عملکرد کمتری داشتند. بهیان 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. بهمین دلیل گیاه برجج

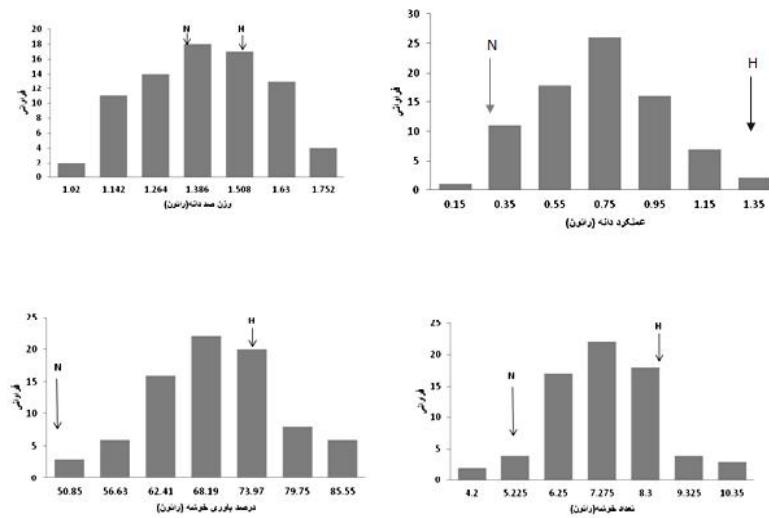
جدول ۳- ضرایب همبستگی پیرسیون بین صفات مرتبط با قابلیت راتون زایی در جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب

		عملکرد دانه		باروری خوشه		تعداد خوشه		وزن صد دانه	
		راتون	اصلی	راتون	اصلی	راتون	اصلی	راتون	اصلی
عملکرد دانه	اصلی	۱	-	-	-	-	-	-	-
	راتون	-/۰.۸۵**	۱	-	-	-	-	-	-
باروری خوشه	اصلی	۰/۷۸۷**	-	۰/۹۰۱**	۱	-	-	-	-
	راتون	-/۰.۷۷**	-	۰/۹۶۳**	-/۰.۸۵**	۱	-	-	-
تعداد خوشه	اصلی	۰/۹۸۰**	-	-/۰.۸۱**	-/۰.۷۹۵**	-/۰.۹۳۷**	۱	-	-
	راتون	-/۰.۹۷۸**	-	۰/۰۵۷**	-/۰.۸۸۲**	۰/۰۹۹**	-/۰.۹۴۲**	۱	-
وزن صد دانه	اصلی	۰/۰۱۴ns	-	۰/۲۸۹ns	۰/۶۰۵**	۰/۱۳۱ns	-/۰.۴۵ns	۰/۰۱۶ns	۱
	راتون	-/۰.۸۴۰**	-	۰/۸۹۹**	-/۰.۳۸۴ns	-/۰.۷۹۶**	-/۰.۷۴۵**	-/۰.۷۷۰**	-/۰.۴۸۰**

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

میانگین صفات مورد بررسی در شکل ۱ نشان داده شده است. پیوسته بودن و تابعیت پراکنده‌گی صفات از توزیع نرمال نشان‌دهنده کمی بودن صفات مورد بررسی و دلالت 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 بهصورت پیوسته و نرمال بود. نمودار توزیع فراوانی لاین‌ها بر اساس



شکل ۱- توزیع فراوانی لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب برای صفات مرتبط با قابلیت راتون زایی (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)

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 فنتوپیی صفت مذکور را توجیه کردند و LOD آنها از ۲/۸۶ تا ۸/۴۴ متغیر بود (جدول ۴ و شکل ۲). بزرگ‌ترین QTL شناسایی شده بهنام روی qfpr1 کروموزوم ۱ و در حدفاصل بین دو نشانگر کروموزوم ۲۲/۶۴ درصد از تنوع RM6141-RM259 قرار داشت و بزرگ‌ترین QTL شناسایی شده بهنام روی qfpr5 فنتوپیی را برای این صفت توجیه کرد و دارای اثر افزایشی منفی (۶/۶۱) بود. سه QTL دیگر شناسایی شده بهنام‌های qfpr7، qfpr5 و qfpr11 بهترتیب روی کروموزوم‌های ۷، ۵ و ۱۱ قرار داشتند.

برای صفت عملکرد دانه در راتون نیز چهار QTL شناسایی شد که در مجموع ۵۳/۱۶ درصد از تنوع فنتوپیی این صفت را توجیه کردند و LOD آنها از ۲/۸۹ تا ۶/۸۶ متغیر بود (جدول ۴ و شکل ۲). بزرگ‌ترین QTL شناسایی شده بهنام (qyr6) روی کروموزوم ۶ و در حدفاصل بین دو نشانگر RM4128-RM402 قرار داشت و ۱۹/۹۵ درصد از تنوع فنتوپیی عملکرد دانه راتون را توجیه کرد و دارای اثر افزایشی منفی (۲۰/۸۴) بود. سه QTL دیگر شناسایی شده بهنام‌های qyr11، qyr8 و qyr1 فنتوپیی را توجیه کردند و ۱۱ قرار داشتند. QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۱ در حدفاصل نشانگرهای RM3520-RM104 قرار داشت که با میزان LOD معادل ۹/۶۴ مقدار ۲/۸۹ درصد از واریانس فنتوپیی صفت عملکرد دانه را توجیه کرد. این QTL دارای اثر افزایشی مثبت (۱۰/۲۴) بود. QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۸ (qyr8) در حدفاصل نشانگرهای RM3572-RM6356 با LOD معادل ۴/۲۱ و توجیه ۱۲/۷۰ درصد از واریانس فنتوپیی 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 فنتوپیی 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 بهته QTL های شناسایی شده برای وزن صد دانه در راتون و عملکرد راتون در یک جایگاه ژنی قرار داشتند. هر چند که دو دیگر QTL شناسایی شده برای دو صفت باروری و تعداد خوش در راتون نیز فاصله زیادی با این جایگاه نداشتند. این موضوع نشان از تاثیر کروموزوم یک (خصوصاً جایگاه بین دو نشانگر RM104 و RM3520) که بر اساس نقشه پیوستگی ارائه شده در شکل ۲ در حدود وسط کروموزوم ۱ (قرار دارد) در کنترل صفات موثر در قابلیت راتون‌زایی برجنچ دارد. به عبارت دیگر، ژن‌های دخیل در کنترل این صفت روی کروموزوم ۱ تجمع یافته‌اند. در اغلب تحقیقات قبلی از جمله تان و همکاران (۱۷)، ژنبو و همکاران (۲۱) در مورد تعیین ژن یا ژن‌های کنترل کننده صفات مربوط به قابلیت راتون‌زایی، حداقل یک QTL

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 تا ۸۰ عدد متغیر 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 اسکویور 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 برجنچ را با میانگین ۹/۳ سانتی‌مورگان بین هر جفت نشانگر پوشش داد (شکل ۲). بیشترین تعداد نشانگر روی کروموزوم‌های ۱ و ۶ (بهترتبه ۲۶ و ۲۲ نشانگر) و کمترین تعداد نشانگر روی کروموزوم‌های ۴ و ۱۲ (بهترتبه ۶ و ۴ نشانگر) بود. مکان نشانگرها روی نقشه پیوستگی تطابق نسبتاً مناسبی با نقشه ارائه شده توسط تمثیخ 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.

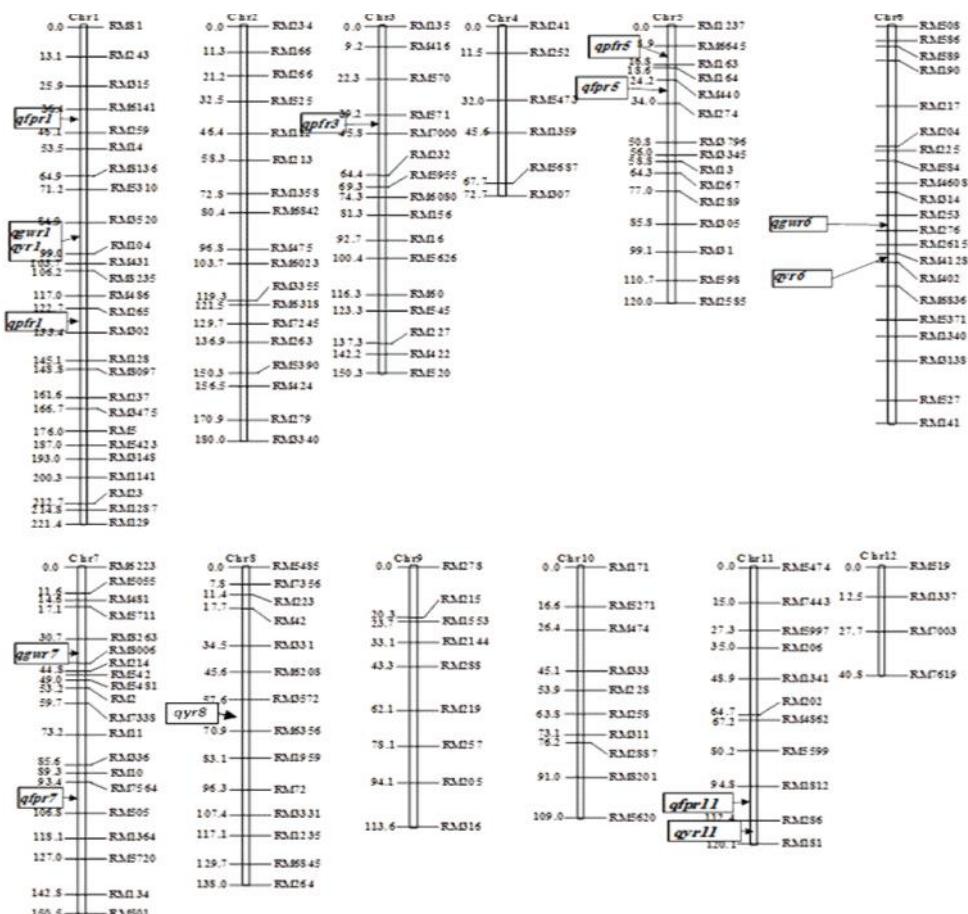
مکان‌بایی QTL‌های کنترل کننده صفات

برای صفت تعداد خوش در راتون سه QTL شناسایی شد که در مجموع ۴۶/۲ درصد از تنوع فنتوپیی را توجیه کردند و LOD آنها از ۲/۸۵ تا ۲/۲۷ ۹/۶۴ متغیر بود (جدول ۴ و شکل ۲). بزرگ‌ترین QTL شناسایی شده بهنام روی کروموزوم ۱ و در حدفاصل بین دو نشانگر RM265-RM302 قرار داشت و ۲۵/۱۲ درصد از تنوع فنتوپیی را برای این صفت توجیه کرد و دارای اثر افزایشی منفی (۱/۶۵) بود. دو QTL دیگر شناسایی شده یکی بهنام روی کروموزوم ۳ در حدفاصل نشانگرهای qpfra3 RM571-RM7000 قرار داشت که با میزان LOD معادل ۴/۳۷ مقدار ۱۳/۲۱ درصد از واریانس فنتوپیی را توجیه کرد. این QTL دارای اثر افزایشی مثبت (۰/۰۵) بود. دیگری بهنام qpfra5 روی کروموزوم ۵ در حدفاصل نشانگرهای RM6645-RM163 با توجیه ۷/۶۹ درصد از واریانس فنتوپیی این صفت، قرار داشت. QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۵ دارای اثر افزایشی مثبت (۰/۰۸۵) بود.

برای صفت وزن صد دانه در راتون یک QTL بزرگ اثر و دو QTL کوچک اثر شناسایی شد (جدول ۴ و شکل ۲). بزرگ‌ترین QTL شناسایی شده بهنام qgwr1 روی کروموزوم ۱ و در حدفاصل بین دو نشانگر RM3520-RM104 قرار داشت و ۲۳/۴۶ درصد از تنوع فنتوپیی را برای این صفت توجیه کرد و دارای اثر افزایشی مثبت (۰/۰۵۵) بود. دو QTL دیگر شناسایی شده یکی بهنام روی کروموزوم ۶ در حدفاصل نشانگرهای qgwr6 RM253-RM276 و دیگری بهنام qgwr7 روی کروموزوم ۷ در حدفاصل نشانگرهای RM8263-RM8006 قرار داشتند.

دانه در خوش، 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 بدست آمده از این مطالعه خصوصاً از نشانگرهای همیسته با QTL‌های بزرگ اثر شناسایی شده در این تحقیق، می‌توان برای غربال ملکولی جمعیت‌های در حال تفکیک (انتخاب به کمک نشانگر) به منظور بهبود قابلیت راتون‌زایی در ارقام مختلف برنج استفاده نمود.

روی کروموزوم ۱ شناسایی و معرفی شده بود. روی کروموزوم‌های ۵، ۶ 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 زنبو و همکاران (۲۱) روی کروموزوم‌های ۵، ۶، 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 ۴-۶ QTL های شناسایی شده بر اساس روش مکان‌بایی 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

صفات	درصد واریانس	ائز افزایشی	LOD	آستانه LOD	نمانگر	کروموزوم	QTL
تعداد خوش در راتون	۱۳/۲۱	+۰/۵	۴/۳۷	۲/۸۰	RM571-RM7000	۳	qprf3
	۷/۶۹	+۰/۰۵	۲/۸۵		RM6645-RM163	۵	qprf5
	۲۵/۱۲	-۱/۶۵	۹/۲۷		RM265-RM302	۱	qprf1
وزن صد دانه در راتون	۱۳/۶۸	+۰/۰۵	۸/۰۶	۲/۰۳	RM3520-RM104	۱	qgwr1
	۱۴/۰	-۳/۳۵	۵/۳۱		RM253-RM276	۶	qgwr6
	۱۲/۷۴	-۰/۳۰	۳/۷۳		RM8263-RM8006	۷	qgwr7
باروری خوش در راتون	۲۲/۶۴	-۶/۶۱	۸/۴۴	۲/۷۸	RM6141-RM259	۱	qfpr1
	۱۲/۶۵	-۴/۸۱	۴/۵۹		RM440-RM274	۵	qfpr5
	۱۰/۲۳	۳/۵۳	۳/۲۳		RM7564-RM505	۷	qfpr7
عملکرد دانه در راتون	۹/۸۵	۲/۸۲	۲/۸۶		RM1812-RM286	۱۱	qfpr11
	۱۹/۹۵	-۲/۸۴	۶/۸۸	۲/۶۸	RM4128-RM402	۶	qyr6
	۹/۶۴	۱۰/۲۴	۲/۸۹		RM3520-RM104	۱	qyr1
عملکرد دانه در راتون	۱۲/۷۰	-۱۶/۳۶	۴/۲۱		RM3572-RM6356	۸	qyr8
	۱۰/۸۷	۱۱/۸۶	۳/۴۵		RM286-RM181	۱۱	qyr11

تشکر و قدردانی پژوهش حاضر برگرفته از پژوهه تحقیقاتی مصوب به شماره ۱۳۱-۹۱-۰۴-۰۴-۰۴-۰۴ می باشد. نگارندهان بر خود لازم تقبل نموده‌اند، صمیمانه تشکر نمایند.

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.
 - Karbalaei, 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. Teitelman, 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., Kazemtabar S.K., A. Moumeni and A.A. Ebadi, 2009. Evaluation of Genetic Diversity by Using of Link Maker for Amylase 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 Agricultura 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 Agricultura 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 Agricultura Sinica, 7: 1240-1246.
 - Zhenbo, T., S. Lishuang, Y. Zuolian, L. Chaofu, C.Ying, Z. Kaida and Z. Lihuang. 1997. Identification of QTLs for ratooning ability and grain yield traits of rice and analysis of their genetic effects. Acta Agricultura Sinica, 23: 289-295.

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

Ali Akbar Ebadi¹, Mehrzad Allahgholipour² and Naser Sharifi³

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, qprf1 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