

مطالعه پیوستگی بین نشانگرهای ریزماهواره (SSR) و QTL های

اجزای عملکرد در برنج (*Oriza sativa*)

جعفر احمدی*^۱، محمدحسین فتوکیان^۲، صدیقه فابریکی اورنگ^۳

۱- استادیار، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی قزوین

۲- استادیار، دانشگاه شاهد

۳- کارشناس ارشد، دانشگاه تربیت مدرس

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: njahmadi910@yahoo.com

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

به منظور مکان‌یابی و تعیین خصوصیات QTL های مرتبط با طول سنبله، تعداد دانه پر، تعداد دانه خالی، تعداد سنبله هر سنبله و عقیمی دانه جمعیتی شامل ۵۹ لاین تلاقی برگشتی پیشرفته (BC2F5) که از تلاقی واریته‌های برنج IR64 به عنوان والد دوره‌ای و طارم‌مولایی به عنوان والد دهنده به دست آمده بود، در ایستگاه تحقیقات برنج چپر سر- تنکابن مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی چندشکلی در والدین و مطالعه ژنوتیپی جمعیت به ترتیب با ۲۳۵ و ۱۱۴ نشانگر ریزماهواره انجام شد. برای تمامی صفات تفکیک متجاوز مثبت و یا منفی در جمعیت مشاهده گردید. با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای چندگانه، تعداد بیست و شش QTL مکان‌یابی شد که ۸ تا برای طول سنبله، ۳ تا برای تعداد سنبله، ۲ تا برای تعداد دانه‌های پر، ۴ تا برای تعداد دانه‌های خالی و ۹ تا برای عقیمی دانه بود. حدود ۴۶ درصد مکان‌های ژنی شناسایی شده دارای اثر افزایشی منفی بودند. حداکثر شش QTL در کروموزوم ۱ مکان‌یابی شد. مکان‌یابی بیش از یک QTL برای بیشتر صفات، نشانگر چند ژنی بودن صفات مورد مطالعه است.

واژه‌های کلیدی

برنج ،
اجزای عملکرد ،
ریزماهواره ،
مکان‌یابی QTL

مقدمه

برنج بعد از گندم غذای اصلی مردم ایران است و در سطحی معادل ۶۰۰ هزار هکتار زراعت می‌شود (۱). دانش دقیق از رفتار ژنتیکی و اصلاحی صفات پیچیده به اصلاح واریته‌های مطلوب کمک خواهد کرد. شناسایی نشانگرهای مولکولی کاملاً پیوسته با ژن مورد نظر و مکان‌یابی آنها یکی از اهداف مهم در اصلاح برنج است. پیشرفت سریع در ژنتیک مولکولی بویژه در زمینه نشانگرهای مولکولی به محققین در اصلاح واریته‌های برنج با عملکرد بالا و کیفیت دانه برتر کمک خواهد کرد (۳). یکی از مهمترین کاربردهای نشانگرهای DNA و نقشه پیوستگی مولکولی، تجزیه واریانس ژنتیکی صفات کمی به عوامل مندلی منفرد از طریق تجزیه مکان‌یابی QTL می‌باشد. QTL ها نواحی از کروموزوم‌ها هستند که صفات کمی را کنترل می‌کنند و شامل انواع مختلف ژن و یا گروه‌های ژنی متفاوت از هم می‌باشند (۱۳). مکان‌یابی QTL شامل پیدا کردن تعداد و محل ژنومی QTL، اثرات QTL، اثر متقابل آلل‌های QTL در درون (غالبیت) و بین (ایستازی) مکان‌های ژنی، اثرات پلیوتروپی QTL و اثر متقابل QTL با محیط از طریق طرح آزمایش‌های مناسب و تجزیه آماری جمعیت در حال تفرق می‌باشد (۳۶). هدف مهم مکان‌یابی QTL شناسایی نشانگرهای DNA دارای پیوستگی با صفت مورد نظر و استفاده از آن برای گزینش به کمک نشانگر^۱ است (۱۳). با توسعه سریع تکنولوژی مولکولی DNA، حدود ۲۰ نوع نشانگر مولکولی از سال ۱۹۸۰ توسعه یافت و برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مطالعه مکان‌یابی QTL مورد استفاده قرار گرفتند (۱۴). در میان نشانگرهای مولکولی، نشانگر ریزماهواره که مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۲ است دارای کاربرد فراوان در مکان‌یابی QTL در گیاهان مختلف مانند برنج می‌باشد (۱۹). به ریزماهواره‌ها توالی ساده تکرارهای^۳ نیز می‌گویند و شامل تکرارهای مرتب شده و پشت سر هم هستند که از یک یا تعداد محدودی نوکلئوتید مثل (TG)_n یا (AAT)_n تشکیل شده‌اند و تکرارها در واحدهای ۱۰ یا بیش از ۱۰ واحدی متغیر می‌باشند (۲۴). در برنج

به طور بالقوه ۵۷۰۰ الی ۱۰۰۰۰ توالی ریزماهواره با واحدهای تکراری ۲، ۳ و یا ۴ نوکلئوتیدی متفاوت وجود دارد (۳، ۱۸). مک‌کوچ و همکاران (۱۷) توانستند نقشه‌ای شامل ۲۲۴۰ نشانگر ریزماهواره تهیه نمایند که تمام ژنوم برنج را پوشش می‌دهد. این نشانگرها در برنج قادرند چندشکلی را در بین واریته‌ها و یا در درون واریته‌ها شناسایی نمایند (۲۰، ۳۲).

برای به دست آوردن نقشه پیوستگی نشانگرهای DNA و شناسایی QTL ها، لازم است در یک جمعیت ویژه مطالعه ژنوتیپی و فنوتیپی انجام گیرد. چند نوع جمعیت که معمولاً از تلاقی بین دو لاین مختلف تشکیل می‌شوند، برای مکان‌یابی QTL در گیاهان مورد استفاده هستند که عبارتند از، جمعیت F_2 یا خانواده‌های F_3 ، جمعیت تلاقی برگشتی و یا تلاقی برگشتی پیشرفته^۴، جمعیت هاپلوئید مضاعف، جمعیت لینه اینبرد نو ترکیب و جمعیت لینه‌های تقریباً ایزوژنیک (۲۹). جمعیت تلاقی برگشتی از تلاقی افراد F_1 با یکی از دو والد به دست می‌آید. تجزیه QTL به همراه تلاقی برگشتی روشی توأم برای ترکیب تجزیه QTL و اصلاح واریته است. در این روش با تلاقی برگشتی عمل کشف و انتقال QTL های با ارزش از لینه‌های دهنده ناسازگار مثل نژادهای بومی و گونه‌های وحشی به درون لینه‌های اصلاحی انجام می‌گیرد (۸، ۲۵).

راهبرد مکان‌یابی QTL در جمعیت تلاقی برگشتی پیشرفته به طور موفقیت‌آمیزی در کشف و انتقال QTL های با ارزش از ذخایر توارثی ناسازگار به درون لینه‌های اصلاحی الیت در گیاهان زراعی مثل گوجه فرنگی (۲۲، ۲۵)، گندم (۸)، ذرت (۲۵) و برنج (۱۹) و (۲۳) استفاده شده است. با توسعه نشانگرهای DNA تعداد زیادی از روش‌های آماری با درجات متفاوت کاربردهای عملی و نظری برای مکان‌یابی QTL توسعه یافته‌اند (۷، ۹، ۲۸، ۳۰، ۳۵). بیشتر روش‌های مورد استفاده برای مکان‌یابی QTL نظیر آزمون t ، رگرسیون خطی ساده، مکان‌یابی فاصله‌ای ساده^۵ و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب^۶، همه حاوی مدل‌های تک QTL بدون در نظر گرفتن اثر متقابل QTL در مدل می‌باشند. از اینرو اطلاعات ژنتیکی

^۴ . Advanced Backcross (ABC)

^۵ . Simple Interval Mapping (SIM)

^۶ . Composite Interval Mapping (CIM)

^۱ . Marker Assisted Selection (MAS)

^۲ . Polymerase Chain Reaction (PCR)

^۳ . Simple sequence repeat (SSR)

عنوان والد دوره‌ای^۲ با واریته طارم مولایی به عنوان والد دهنده^۳ تهیه شده بود. برای بدست آوردن این جمعیت، ابتدا F_1 حاصل از تلاقی، دو بار با والد دوره‌ای تلاقی برگشتی داده شد. سپس جمعیت مورد مطالعه طی ۴ نسل از خودگشتی جمعیت BC_2F_1 همراه با گزینش افراد و لینه‌های مناسب در نسل‌های در حال تفرق به دست آمد. صفات مورد مطالعه در این تحقیق عبارت بودند از: طول سنبله^۴ (SL)، تعداد دانه پُر^۵ (FGN)، تعداد دانه خالی^۶ (EGN)، تعداد سنبله‌ها هر سنبله^۷ (SpN)، و عقیمی دانه^۸ (GS).

مطالعه فنوتیپی صفات

آزمایش مزرعه‌ای در بهار و تابستان سال ۱۳۸۵ در مزرعه تحقیقاتی ایستگاه تحقیقات برنج چپر-تنکابن وابسته به موسسه تحقیقات برنج کشور انجام شد. ابتدا بذور در خزانه بذریاشی شدند و سپس وقتی که ارتفاع نشاء‌ها به حدود ۱۵ سانتیمتر رسید، به زمین اصلی منتقل گردیدند. برای هر رقم تعداد ۲۰ عدد تک نشاء با فواصل ۲۵×۲۵ سانتیمتر در ۲ ردیف، نشاءکاری صورت گرفت، به طوری که در هر ردیف تعداد ۱۰ تک نشاء کشت شد. عملیات کاشت و داشت به صورت معمول در منطقه انجام گرفت. این آزمایش در دو تکرار اجرا شد و از هر لاین در هر تکرار تعداد ۱۰ بوته از قسمت میانی لاین‌ها به طور تصادفی انتخاب و طول سنبله مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. سنبله اصلی هر بوته انتخاب و از قسمت پایین گره سنبله جدا گردید و در آزمایشگاه تعداد دانه پر، تعداد دانه خالی و تعداد کل سنبله‌ها شمارش گردید. عقیمی دانه از نسبت دانه‌های خالی به تعداد کل سنبله‌ها به دست آمد. در انجام محاسبات آماری میانگین ۱۰ بوته مورد استفاده قرار گرفت.

زیادی در مجموعه داده‌های مکان‌یابی به ویژه برای اثرمتقابل بین مکان‌های مختلف ژنی یا اپیستازی بدون کشف باقی می‌ماند (۱۲). مکان‌یابی فاصله‌ای چندگانه^۱ یک روش QTL چندگانه می‌باشد که در این روش از چند فاصله نشانگر به طور همزمان برای طراحی QTL چندگانه در مدل برای مکان‌یابی استفاده می‌کند. این روش توانمندتر و دقیق‌تر از روش‌های IM و CIM است (۱۰).

در ۱۲ سال گذشته، مطالعات زیادی در مورد مکان‌یابی QTL در برنج انجام گرفته است و QTLهای موثر در طیفی از فنوتیپ‌ها شناسایی شده‌اند. پس از طراحی اولین نقشه RFLP در برنج (۱۶) صدها ژن و QTL مکان‌یابی شده‌اند (۲۷). گائو (۶) با استفاده از نشانگر RFLP در جمعیتی شامل ۱۲۳ لاین دبل‌هاپلوئید توانست برای ارتفاع گیاه تعداد ۲۲ مکان ژنی و برای طول خوشه تعداد ۱۹ مکان ژنی شناسایی نماید. این QTLها دارای اثرات افزایشی بودند و برخی از آنها اثرات اپیستازی نشان دادند. ژیانو و همکاران (۳۱) با استفاده از ۱۹۴ لاین اینبرد نو ترکیب توانستند برای تعداد دانه و طول خوشه به ترتیب ۴ و ۲ QTL شناسایی نمایند. ژوانگ و همکاران (۳۶) با بررسی ۱۷۱ جمعیت F_2/F_3 برای باروری سنبله‌ها، تعداد دانه و طول خوشه به ترتیب ۳، ۶ و ۷ QTL شناسایی نمودند. لو و همکاران (۱۵) با ارزیابی ۱۳۲ لاین دبل‌هاپلوئید برای باروری سنبله‌ها و تعداد دانه در خوشه به ترتیب ۳ و ۲ QTL گزارش نمودند. یانو و ساساکی (۳۳) با استفاده از ۱۸۶ بوته F_2 برای تعداد دانه در خوشه و طول خوشه به ترتیب ۵ و ۶ QTL شناسایی نمودند. ربیعی و همکاران (۲۱) نیز با استفاده از توده‌های F_2 و ۹۹ نشانگر SSR برای صفات طول دانه، عرض دانه و شکل دانه به ترتیب ۵، ۷ و ۶ مکان QTL شناسایی نمودند.

مواد و روش‌ها

جمعیت گیاهی و صفات مورد مطالعه

جمعیت گیاهی مورد تحقیق شامل ۵۹ لینه تلاقی برگشتی پیشرفته (BC_2F_5) بود که از تلاقی واریته زراعی برنج IR64 به

^۱. Multiple Interval Mapping (MIM)

۲. recurrent
۳. donor
۴. spike lenght
۵. full grain number
۶. empty grain number
۷. spiklet number
۸. grain sterility

مطالعه ژنوتیپی

استخراج DNA

مطالعات ملکولی در آزمایشگاه ژنومیکس موسسه بین المللی برنج (IRRI) واقع در فیلیپین انجام گرفت. برای استخراج DNA، حدود ۴ میلی گرم از نوک برگ گیاهچه‌های هر لاین برداشت و ۲ میلی گرم از آن در ۸۰۰ میکرولیتر محلول ۲٪ از CTAB (حاوی NaCl, EDTA, Tris, C-TAB, PVP) در هاون چینی کاملاً له گردید. ۷۰۰ میکرولیتر از مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از خنک شدن محلول، حدود ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه با شیکر تکان داده شد. پس از سانتریفوژ به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی^۱ در لوله اپندورف ریخته شد و با ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول خالص، مخلوط و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. عمل سانتریفوژ به شرح فوق مجدداً انجام گرفت. توده DNA به دست آمده با اتانول ۷۰٪ شسته و پس از خشک شدن در هوای آزمایشگاه، در ۵۰ میکرولیتر محلول TE (۱۰ Tris-HCl میلی مولار + EDTA یک میلی مولار) حل گردید. محلول حاصل برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ۱۰۰ برابر با محلول TE رقیق گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و الکتروفورز

برای تهیه محصول PCR به حجم ۱۰ میکرولیتر جهت بررسی ژنوتیپی لینه‌های دو توده، ابتدا سه میکرولیتر محلول DNA (۲۵ ng/μl) در ته چاهک‌های ظروف PCR قرار گرفت. سپس مقدار ۷ میکرولیتر از کوکتل^۲ به آن اضافه گردید. به هر چاهک یک قطره روغن معدنی اضافه شد و چاهک‌ها با آلومینیوم فویل پوشانده شدند. اجزاء تشکیل دهنده کوکتل برای هر چاهک یا نمونه به شرح زیر است: ۳/۷۵ میکرولیتر آب مقطر یونزدایی شده، یک میکرولیتر بافر PCR (10x)، یک میکرولیتر dNTP یک میلی مولار (نسبت ۱:۱:۱:۱ از هر یک از dNTPهای رقیق شده با

آب مقطر استریل به نسبت ۱:۴)، نیم میکرولیتر (۱ μM) از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پسرو و ۰/۲۵ میکرولیتر (1 unit) آنزیم تک‌پلیمرز^۳. دستگاه PCR (مدل MJ 196) به شرح زیر برنامه ریزی شد: یک چرخه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد (واسرشت سازی دو رشته DNA)، ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه (واسرشت سازی)، دمای ۵۵ درجه سانتی گراد (این دما برای برخی آغازگرها ۶۱ و برای برخی دیگر ۶۷ درجه سانتی گراد بوده است) به مدت یک دقیقه (برای چسبیدن^۴ آغازگرها به DNA)، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه (بسط اولیه^۵) و یک چرخه به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (برای کامل کردن بسط اولیه). برای تهیه محصول PCR جهت مطالعه چندشکلی^۶ در جمعیت تلاقی برگشتی از ۴ میکرولیتر محلول DNA و ۲/۷۵ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد و بقیه ترکیبات همانند موارد فوق بود. قبل از بارگذاری نمونه‌ها در ژل آگارز ۲٪، مقدار ۴ میکرولیتر محلول رنگی بارگذاری^۷ به محصول PCR اضافه شد. قبل از عملیات واسرشت سازی DNA، به محصول PCR در هر چاهک سه میکرولیتر محلول بافر بارگذاری اضافه شد و این عملیات در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه به وسیله دستگاه PCR انجام گرفت. بلافاصله پس از واسرشت سازی، بارگذاری نمونه‌ها در ژل آکرل امید ۴٪ یا در ژل آگارز انجام گرفت. در هنگام تهیه ژل آگارز، اتیدیوم بروماید به محلول ژل اضافه شد و رویت نوارهای DNA با اشعه ماوراء بنفش انجام گرفت.

مطالعه چندشکلی در والدین

برای مطالعه چندشکلی^۸ در والدین تعداد ۲۳۵ نشانگر ریزماهواره بر اساس نقشه‌های ژنتیکی موجود (۳، ۵، ۱۷، ۱۹)، توزیع یکنواخت در سطح ژنوم و بررسی منابع (۲، ۲۳، ۳۴) انتخاب

۳. Taq polymerase
۴. annealing
۵. primer extension
۶. polymorphism
۷. loading dye
۸. parental survey

۱. supernatant
۲. cocktail

نتایج و بحث

توزیع فراوانی صفات

برای تمامی صفات تفکیک متجاوز^۴ مثبت و یا منفی مشاهده گردید (جدول ۱). والدین از نظر صفات مورد مطالعه دارای تنوع قابل توجه بودند. در جمعیت مورد مطالعه، توزیع همه صفات دارای چولگی^۵ به سمت والد دوره‌ای یعنی IR64 بود. در تمام صفات مورد مطالعه به استثنای تعداد دانه پر، متوسط والد دهنده از والد دوره‌ای بیشتر بوده است. در جمعیت مورد مطالعه برای تعداد دانه پر، تعداد کل سنبلیچه و عقیمی دانه هتروزیس مثبت قابل توجه در برخی از لینه‌ها مشاهده گردید که برای تعداد دانه پر و تعداد کل سنبلیچه این مقدار در بعضی از لینه‌ها حدود دو برابر بود (جدول ۱). اختلاف فنوتیپی بین والدین از نظر صفات مورد مطالعه نیز معنی‌دار بود. با توجه به وجود تفکیک متجاوز در صفات مورد مطالعه می‌توان نسبت به استخراج لینه‌های امیدبخش از نظر صفات مرتبط با عملکرد، و در نتیجه انتقال و هرمی کردن ژن‌های مربوطه اقدام کرد.

شدند. در ابتدا برای تمامی نشانگرها، محصول PCR در سه دمای ۵۵، ۶۷ و ۶۹ درجه سانتی‌گراد (دمای چسبیدن آغازگرها به رشته DNA) تهیه گردید و سپس عمل بارگذاری در هر دو ژل اکریل‌آمید ۵٪ و آگارز ۳٪ برای تمام نشانگرها انجام گرفت. براساس وجود چندشکلی و وضوح نوارها در ژل‌های رنگ‌آمیزی شده، تعداد ۷۲ نشانگر برای الکتروفورز در ژل اکریل‌آمید و ۴۲ نشانگر برای الکتروفورز در ژل آگارز انتخاب گردیدند و آزمایش‌های بررسی ژنوتیپی انجام گرفت.

طراحی نقشه پیوستگی و تجزیه آماری مکان‌یابی QTL

برای تهیه نقشه پیوستگی، از ۱۱۴ نشانگر SSR که در جمعیت مورد مطالعه چندشکلی واضح نشان داده بودند استفاده شد. تهیه نقشه ژنتیکی به کمک نرم افزار Mapmaker/EXP (۱۱) با استفاده از تابع کوسامبی و با فرض فاصله کمتر از ۵۰ سانتی‌مورگان و LOD بزرگتر یا مساوی ۳ انجام گرفت. شناسایی QTLها و تعیین خصوصیات آنها به کمک نرم‌افزار QTL cartographer ver. 2.5 و با روش مکان‌یابی فاصله‌ای چندگانه (MIM) انجام شد (۲۶). سرعت پیمایش^۱ بر روی کروموزوم‌ها برای محاسبه جزء نوترکیبی و محاسبه LOD برابر ۰/۵ سانتی‌مورگان بود. QTLهای به دست آمده از نظر تعیین مکان دقیق پالایش^۲ شدند و پارامترهای مربوط به QTLها مثل اثر افزایشی و جزء نوترکیبی با نشانگرهای مجاور آزمون گردیدند. عملیات جستجو برای QTL بیشتر، مجدداً انجام گرفت. در مرحله بعد پس از تثبیت QTLهای به دست آمده، برای اثر متقابل اپیستازی دو ژنی جستجو انجام شد و ضریب تبیین^۳ QTLها برای مدل برآورد گردید. نام‌گذاری QTLها بر اساس روش مک‌کوچ و همکاران (۱۸) انجام گرفت. ترسیم نمودارها و محاسبه توزیع فراوانی صفات با نرم‌افزار Excel و محاسبه ضریب همبستگی فنوتیپی پیرسون با نرم‌افزار SPSS انجام شد.

^۴ . transgressive segregation

^۵ . skewness

^۱ . walk speed

^۲ . refine

^۳ . coefficient of determination

جدول ۱. برخی آماره از صفات مورد تحقیق در والدین و جمعیت مورد مطالعه

میانگین والدین		جمعیت BC_2F_5			صفات مورد مطالعه
طارم مولایی (والد دهنده)	IR64 (والد دوره ای)	میانگین $\pm$ انحراف معیار	حداکثر	حداقل	
۳۲ a	۲۴b	۲۵/۶۶± ۲/۴۵	۳۲/۱۷	۱۹/۵	طول سنبله
۸۴/۷ a	۱۱۰/ ۳ b	۱۰۶/۳۹± ۳۹/۹	۲۶۸/۷	۵۸	تعداد دانه پُر
۷۸a	۳۷b	۲۳/۳۳± ۱۵/۸۵	۷۴/۶	۵/۷	تعداد دانه خالی
۱۶۲/۷ a	۱۴۷/۳ b	۱۲۹/۷± ۴۶/۸	۳۲۴/۷	۷۵	تعداد کل سنبلچه
۰/۴۸ a	۰/۲۵ b	۰/۱۷± ۰/۰۸	۰/۴۱	۰/۰۵	عقیمی دانه

میانگین های دارای حروف مشابه، اختلاف آماری معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

همبستگی فنوتیپی بین صفات

همبستگی بین طول سنبله با بقیه صفات معنی دار نبود و این نشان می دهد که ژن های کنترل کننده طول سنبله با ژن های کنترل کننده سایر صفات مستقل است و توسط مجموعه ژن های متفاوتی کنترل می شوند و یا در صورت پیوستگی یا پلیوتروپی مقدار آن قابل اغماض است و از نظر بیولوژیکی یا آماری معنی دار نمی باشد (جدول ۲). عقیمی دانه با تعداد دانه پر و تعداد دانه خالی ارتباط معنی دار نشان داد و این می تواند گویای مستقل بودن ژن های کنترل کننده عقیمی دانه از طول سنبله و تعداد کل سنبله باشد. بیشترین مقدار ضریب همبستگی بین تعداد کل سنبله و

تعداد دانه پُر ($r = 0.95^{**}$) و کمترین مقدار ضریب همبستگی بین طول سنبله و عقیمی دانه ($r = 0.300$) بدست آمد. همبستگی بین صفات می تواند ناشی از اثر پلیوتروپی ژن، پیوستگی بین ژن ها، اثر اپیستازی ژن ها، اثرات محیطی و یا ناشی از شانس و تصادف باشد. نتایج همبستگی می تواند در گزینش غیرمستقیم و در گزینش زوددهنگام در مراحل گزینشی روش های مختلف اصلاح نباتات به ویژه در نسل های در حال تفرق مورد استفاده قرار گیرد. تعمیم نتایج فوق به سایر ژنوتیپ های برنج بایستی با احتیاط بیشتر همراه باشد (۱).

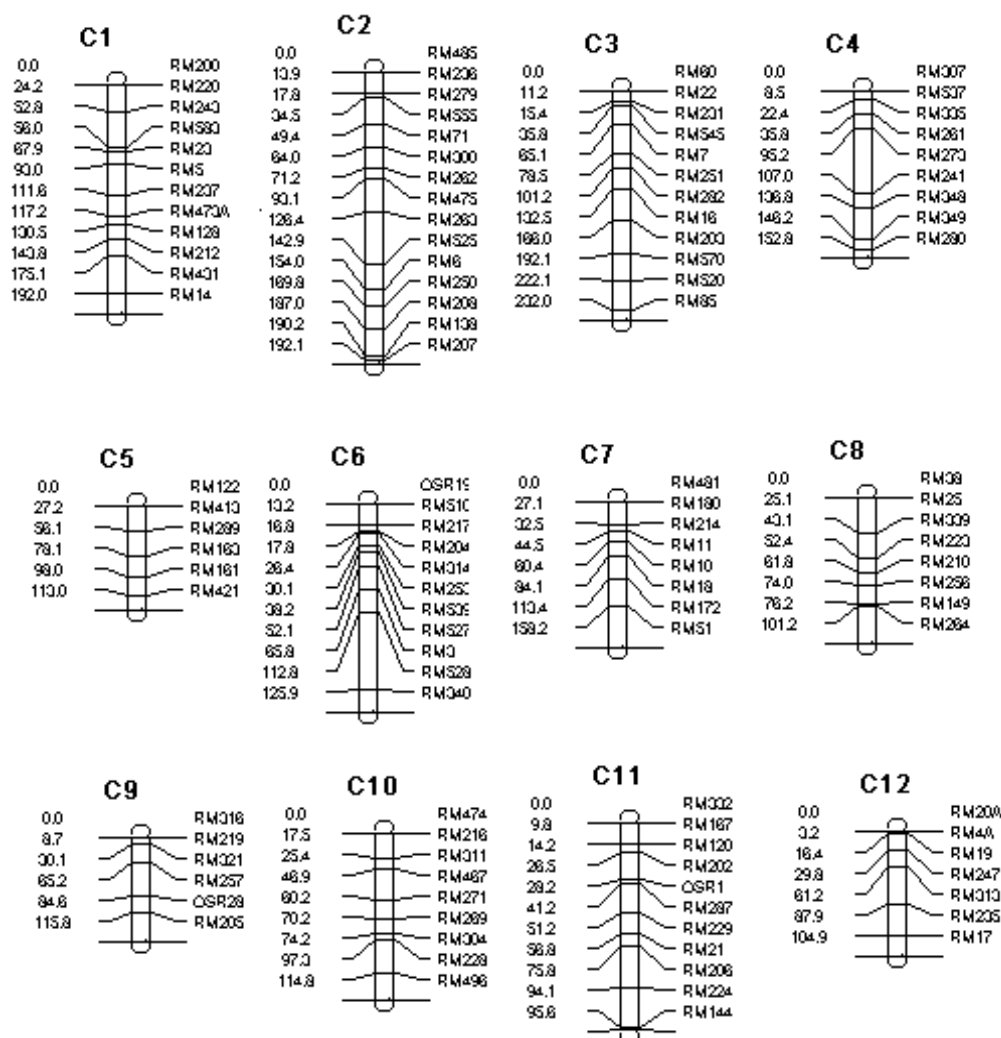
جدول ۲. ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات در جمعیت مورد مطالعه.

تعداد کل سنبله	تعداد دانه خالی	تعداد دانه پُر	طول سنبله
تعداد دانه پُر			-۰/۲۵
تعداد دانه خالی		۰/۲۷*	-۰/۱۰
تعداد کل سنبله	۰/۵۷**	۰/۹۵**	-۰/۲۵
عقیمی دانه	۰/۸۱**	-۰/۲۸*	۰/۰۰۳

*, **, * به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

فاصله ۱۴/۸ سانتی مورگان بین دو نشانگر مجاور بوده است. حداکثر طول گروه پیوستگی در کروموزوم ۳ با ۲۳۱ سانتی مورگان و حداقل ۹۵/۳ سانتی مورگان در کروموزوم ۱۱ بوده است.

نقشه پیوستگی و مکانیابی QTL برای صفات مورد مطالعه نقشه پیوستگی ترسیم شده به وسیله نشانگرهای انتخاب شده (شکل ۱) ۱۲ کروموزوم برنج را پوشش کامل دادند. این پوشش در جمعیت مورد مطالعه برابر ۱۶۹۲/۶ سانتی مورگان با متوسط



شکل ۱- نقشه پیوستگی ریزماهواره در برنج با استفاده از جمعیت ۵۹ لاین تلاقی برگشتی پیشرفته (*BC2F5*) از تلاقی IR64 × طارم مولایی

کروموزومهای ۲، ۴، ۱۱ و ۱۲ تعداد دو QTL مکانیابی شدند که تعداد اثرات افزایشی مثبت بیشتر از اثرات منفی بوده است. همچنین حدود ۶۲٪ از واریانس طول سنبله در جمعیت مورد مطالعه ناشی از اثر این QTLها بوده است. برای تعداد سنبله سه QTL (دو QTL با اثرافزایشی منفی و یک QTL با اثرافزایشی مثبت) که در کروموزومهای ۱ و ۱۲ واقع بودند، شناسایی شد.

تمام QTLهای مکانیابی شده دارای اثرات افزایشی بودند (جدول ۳). اثرات متقابل بین QTLها (اپیستازی) در هیچیک از صفات مشاهده نشد. QTLهای مکانیابی شده در این تحقیق در همه ۱۲ کروموزوم برنج به استثنای کروموزومهای ۳ و ۸ حضور داشتند و بخش قابل توجهی از واریانس فنوتیپی صفات مطالعه شده به آنها نسبت داده شد. برای طول سنبله در هر یک از

جدول ۳. QTLهای صفات مورد مطالعه در جمعیت حاصل از تلاقی واریته IR64 با واریته طارم مولایی

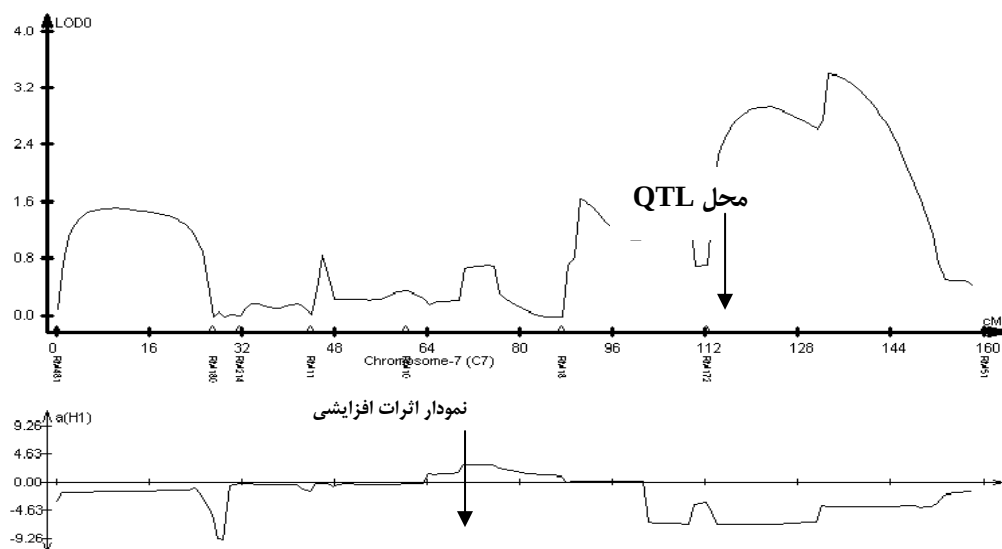
LOD	R ² **	اثر افزایشی	QTL	(فاصله) نشانگر *	کروموزوم	صفت
۸/۵	۵	۱/۹۹	QP۱۲a	RM۴۸۵-RM۲۳۶	۲	طول سنبله SL
۸	۱۰	۰/۴۱	QP۱۲b	RM۲۷۹-RM۵۵۵	۲	
۲/۹۵	۷/۵	۰/۵۵	QP۱۴a	RM۲۴۱-RM۳۴۸	۴	
۴/۲۳	۱۳	۰/۹۱	QP۱۴b	RM۳۴۹-RM۲۸۰	۴	
۳/۱۱	۲	-۱/۷	QP۱۱۱a	RM۱۶۷-RM۱۲۰	۱۱	
۵/۷	۱۱	-۱/۰۳	QP۱۱۱b	RM۲۱-RM۲۰۶	۱۱	
۵/۴	۹	-۰/۵۷	QP۱۱۲a	RM۱۳-RM۲۳۵	۱۲	
۴/۹۶	۵	۱/۵۳	QP۱۱۲b	RM۲۳۵-RM۱۷	۱۲	تعداد کل سنبله SpN
۳/۴۳	۲۱/۴	-۳۲	QGn۱a	RM۲۳۷-RM۴۷۳A	۱	
۳/۳۳	۱۵	۲۰/۱	QGn۱b	RM۴۳۱-RM۱۴	۱	
۴/۰۶	۲۷/۸	-۴۵	QGn۱۲	RM۲۳۵-RM۱۷	۱۲	تعداد دانه پُر FGN
۲/۵۷	۱۰	۱۸	QFgn۴	RM۲۶۱-RM۲۷۳	۴	
۱/۷۵	۲۰	۷۱	QFgn۱۲	RM۲۴۷-RM۳۱۳	۱۲	تعداد دانه خالی EGN
۳/۲۵	۶۰	۲/۹۳	Qegn۱a	RM۵۸۳-RM۲۳	۱	
۳/۳۲	۳/۶	۰/۲۳	Qegn۱b	RM۴۷۳A-RM۱۲۸	۱	
۳/۴	۵/۳	-۴	Qegn۷	RM۱۷۲-RM۵۱	۷	
۳/۱۵	۳	۴/۹۲	Qegn۱۰	RM۲۱۶-RM۳۱۱	۱۰	عقیمی دانه GS
۲/۵	۴/۸	-۰/۳۸	QS۱a	RM۴۷۳A-RM۱۲۸	۱	
۵/۱	۰/۶	-۳/۳	QS۱b	RM۲۱۲-RM۴۳۱	۱	
۷/۲	۳۱/۹	-۱/۵۲	QS۲a	RM۴۸۵-RM۲۳۶	۲	
۵/۹	۲۳/۹	۵	QS۲b	RM۵۲۵-RM۶	۲	
۳/۴	۱۰/۷	۵/۷	QS۵	RM۱۶۳-RM۱۶۱	۵	
۵/۲	۲	-۱/۵۲	QS۶	RM۳-RM۵۲۸	۶	
۴/۳	۱/۶	۱/۱	QS۹	RM۳۲۱-RM۲۵۷	۹	
۶/۴	۳/۶	-۱/۳۴	QS۱۰	RM۳۱۱-RM۴۶۷	۱۰	
۷/۸	۲	-۶/۸	QS۱۱	RM۲۱-RM۲۰۶	۱۱	

*: نشانگرهایی که زیرشان خط کشیده شده به QTL مربوطه نزدیک تر هستند.

** : واریانس فنوتیپی قابل توجیه توسط QTL یا ضریب تبیین.

QTLها بوده است. با توجه به ارتباطی که می‌تواند بین صفات تعداد کل سنبلیچه، تعداد دانه پر، تعداد دانه خالی و عقیمی دانه وجود داشته باشد در این تحقیق هیچ QTL پلیوتروپ مشاهده نشد و این نشان می‌دهد که هر یک از صفات فوق خصوصیتی از ویژگی‌های مربوط به تعداد سنبلیچه را در بر می‌گیرند. در بعضی از کروموزوم‌ها مثل کروموزوم‌های ۱، ۲، ۴، ۱۰، ۱۱، ۱۲ بیش از یک QTL برای بعضی از صفات مشاهده شد. برای همه صفات مورد مطالعه بیش از یک QTL مکان‌یابی شد که نشانگر چند ژنی بودن این صفات است. پلیوتروپی و پیوستگی ژنی به همراه اپستازی و اثرات محیطی و فیزیولوژیکی از عوامل همبستگی صفات هستند (۱۵). در صفات مطالعه شده در این تحقیق هیچگونه اثر پلیوتروپی مشاهده نشد ولی پیوستگی بین QTLها در تعدادی از حالات، حاصل همبستگی معنی‌دار بوده است. به عنوان مثال همبستگی بین تعداد دانه خالی با عقیمی دانه نشانه‌ای از تاثیر پیوستگی ژن‌ها در ایجاد همبستگی بین صفات مربوطه می‌باشند. برای صفاتی که همبستگی بین آنها معنی‌دار بود ولی نتوانستیم QTL مشترک یا QTLهای پیوسته شناسایی کنیم مثل همبستگی معنی‌دار بین تعداد دانه پر با تعداد دانه خالی، تعداد کل سنبلیچه و عقیمی دانه، علت همبستگی را باید در سایر عوامل ایجاد کننده همبستگی مثل عوامل فیزیولوژیکی و یا محیطی

دو QTL واقع در کروموزوم ۱ حدود ۶۲ سانتی مورگان از یکدیگر فاصله داشتند. از آنجائی که ارزش فنوتیپی این صفت در والد دهنده بیش از والد دوره‌ای بوده است انتظار ما مبنی بر بیشتر بودن اندازه اثر افزایشی منفی در مقایسه با نوع مثبت در نتایج این پژوهش به تحقق پیوست. برای تعداد دانه پُر، دو QTL در کروموزوم‌های ۴ و ۱۲ با اثر افزایشی مثبت مکان‌یابی شد. متوسط تعداد دانه پُر در والد دوره‌ای بیش از والد دهنده بوده است (جدول ۱) و در نتیجه بیشتر بودن اثر افزایشی مثبت در مقایسه با نوع منفی دور از انتظار نبوده است. برای تعداد دانه خالی، چهار QTL در کروموزوم‌های ۱، ۷ و ۱۰ با اثر افزایشی شناسایی شدند. این QTLها توانستند حدود ۷۲٪ از تنوع فنوتیپی صفت فوق را در جمعیت مورد مطالعه به خود اختصاص دهند. با توجه به اینکه تعداد دانه خالی در والد دهنده بیش از والد دوره‌ای بوده است تنها یک آلل والد دهنده در کروموزوم ۷ مکان‌یابی شد در حالیکه انتظار می‌رفت تعداد بیشتری از آلل‌های این والد در جمعیت توزیع شده و قابل مکان‌یابی باشند. شکل ۲ موقعیت QTL مربوط به تعداد دانه خالی را در کروموزوم ۷ نشان می‌دهد. برای صفت عقیمی دانه تعداد نه QTL در کروموزوم‌های ۱، ۲، ۵، ۶، ۱۰، ۹ و ۱۱ مکان‌یابی گردید که حدود ۸۱٪ از تنوع فنوتیپی مشاهده شده در این جمعیت در شرایط اجرا شده در مزرعه ناشی از اثرات این



شکل ۲. موقعیت QTL مربوط به تعداد دانه خالی (Qegn7) در کروموزوم ۷ در جمعیت مورد مطالعه. این QTL در فاصله نشانگرهای RM172-RM51 با اثر افزایشی منفی (۴-) در فاصله ۱۳۳/۱ سانتی مورگان مکان‌یابی شده است. این QTL با $LOD = 3/4$ مکان‌یابی شد و ۵/۳ درصد واریانس فنوتیپی تعداد دانه خالی در جمعیت مورد مطالعه را توضیح می‌دهد. اثرات افزایشی منفی این QTL در نمودار زیرین نشان داده شده است.

۴- تعدادی از QTL ها توانستند سهم قابل توجهی از واریانس فنوتیپی صفات مربوطه را توجیه کنند. به عنوان مثال QTL مربوط به تعداد دانه خالی یعنی QEgn1a، حدود ۶۰٪ و QTL مربوط به عقیمی دانه حدود ۳۱/۹٪ واریانس فنوتیپی صفات مربوطه را توجیه نمودند (جدول ۳).

منابع

۱- فتوکیان، م. ح. (۱۳۸۳) تجزیه مکان‌های ژنی (QTL) تحمل به شوری و کیفیت دانه در برنج. رساله دکتری اصلاح نباتات، گرایش ژنتیک بیومتری. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

2-Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A and Fujimura T (1996) Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 93:1071-1077.

3-Arif M (2002) Molecular mapping of genes/QTLs affecting resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* and grain quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). Ph.D thesis. University of Philippines in Los Banos. Philippines.

4-Brondani C, Brondani R P V, Rangei P H N and Ferreira M E (2001) Development and mapping of *Oryza glumaepatula* derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *Oryza sativa*. Hereditas 134:59-71.

5-Chen X, Temnykh S, Cho YG and McCouch S R (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice. Theor. Appl. Genet. 95:553-567.

6- Gao G (2000) QTL analysis of epistatic and conditional effects for some agronomic traits in rice (*Oryza sativa* L.). PhD thesis. Zhejiang university, Hangzhou, China.

7-Haley C S and Knott S A (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in the crosses using flanking marker. Heredity 69:315-324.

8-Huang X Q, Coster H, Ganai M V and Roder M S (2003) Advanced backcross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 106:1379-1389.

9-Jansen, R C (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. Genetics 135:205-211.

10-Kao C H, Zeng Z B and Teasdale R D (1999) Multiple interval mapping for quantitative trait loci. Genetics 152:1203-1216.

11-Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J and Newbug L (1987) Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.

12-Li Z K (1998) Molecular analysis of epistasis. In: Paterson A.H.(ed.) Molecular dissection of complex traits. CRC press. LLC, Boca Raton, New York. PP:119-130.

جستجو کرد. البته باید توجه نمود که QTL های دارای LOD کمتر از ۳ که اثر افزایشی آنها از ۴ کمتر بود از جدول ۳ حذف شدند، در نتیجه شاید بتوان با لحاظ نمودن سهم این QTL ها و وجود اپیستازی احتمالی بین آنها را در وجود این همبستگی توجیه نمود. علیرغم همبستگی خیلی معنی داری که بین تعداد دانه پر و تعداد کل سنبلیچه مشاهده شد ولی QTL مشترک بین این صفات مکان‌یابی نشد، در نتیجه پلیوتروپی، پیوستگی بین ژن‌ها و یا اپیستازی بین QTL ها عامل این همبستگی نبوده است. گرچه در جمعیت مورد مطالعه نشانگرهای به کار رفته کل ژنوم برنج را پوشش دادند ولی در بعضی نواحی و در بعضی از کروموزوم‌ها مثل کروموزوم‌های ۴، ۶، ۷ و ۱۲ در مناطقی به دلیل فقدان چندشکلی بین والدین از نظر آغازگرهای این نواحی، این پوشش کامل نبوده است. برون‌دانی و همکاران (۴) و نیز عارف (۳) در کروموزوم‌های ۱، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۱۰ چندشکلی کمتر از میزان مورد انتظار مشاهده کردند. تولید و تکثیر نشانگرهای ریزماهواره بیشتر (۱۷، ۱۸، ۲۳) برای افزایش تعداد نشانگرهای مکان‌یابی شده در همه کروموزوم‌ها مفید خواهد بود و نیز دقت مکان‌یابی QTL را بیشتر خواهد کرد. انتقال QTL های موثر در این تحقیق به درون یک زمینه ژنتیکی مناسب به کمک نشانگر^۱ می‌تواند روش مناسبی در اصلاح عملکرد دانه در برنج باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

۱- وجود اختلاف معنی‌دار بین والدین باعث شد تا ردیابی QTL با موفقیت همراه باشد (جدول ۱).

۲- در همه صفات مورد مطالعه تفکیک متجاوز مشاهده شد. در نتیجه استخراج لینه‌های امیدبخش از نظر صفات فوق و همچنین هرمی کردن ژن‌های مربوطه در یک زمینه ژنتیکی مناسب امکان‌پذیر است (جدول ۱).

۳- به طور متوسط برای هر صفت، پنج QTL مکان‌یابی شد. حداکثر تعداد QTL برای عقیمی دانه با نه QTL و حداقل دو QTL برای تعداد دانه پر مشاهده شد (جدول ۳).

^۱ . marker aided introgression

associations, and genetic. *Genome Research* 11(8):1441-1452.

24-Thomas M R and Scott N S (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites. *Theor. Appl. Genet.* 86:985-990.

25- Vicente, M. and Tanksley, S. D. (1993) QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics*, 134: 585- 596.

26-Wang S, Basten C J and Zeng Z B (2004) Windows QTL Cartographer 2.0. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.

27-Wang Z Y, Second G and Tanksley S D (1992) Polymorphism and polygenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLP's. *Theor. Appl. Genet.* 83: 565-581.

28-Weller J I (1986) Maximum likelihood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. *Biometrics* 42:627-641.

29-Williams J G K, Kubelik A R, Livak K G, Rafalski J A and Tingey S V(1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18(22):6531-6535.

30-Wu P, Zhang G, Huang N and Ladha J K(1995) Non-allelic interaction conditioning spikelet sterility in F_2 population of *indica/japonica* cross in rice. *Thero. Appl. Genet.* 91: 825-829.

31- Xiao J, Li J, Yang P and Tanksley S D(1995) Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. *Theor. Appl. Genet.* 92: 230-244.

32-Yang G P, Saghai Maroof M A, Xu C G, Zhang Q and Biyashew R M(1994) Comparative analysis of microsatellited DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol. Gen. Genet.* 245:187-194.

33-Yano M, and Sasaki T(1997) Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. *Plant Mol. Biol.* 35:145-153.

34-Zaman F U, Prasad A B and Siddiq E A(1985) Genetical analysis of gel consistency in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian J. Genet. Plant Breed.* 45(1):111-118.

35-Zeng Z B(1994) The precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457-1468.

36-Zhuang J Y, Lin H X, Lu J, Qian H R, Hitalmani S, Huang N and Zheng K L(1997) Analysis of QTL x environment interaction for yield components and plant height in rice. *Theor. Appl. Genet.* 95:799-808.

13-Li Z K(2001) QTL mapping in rice : a few critical considerations. In: Khush G.S., D.S. Brar, and B. Hardy(eds.). *Genetics IV*. Science publisher Inc. PP:153-171.

14-Liu B H(1988) Statistical genomics, Linkage, Mapping and QTL analysis. CRC press, Boca Raton, New York.

15-Lu C, Shen L, Tan Z, Xu Y, Chen Y and Zhu L(1997) Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments using a doubled-haploid population. *Thero. Appl. Genet.* 93: 1211-1217.

16-McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, Wang Z Y, Khush G S, Coffman W R and Tanksley S D(1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Thero. Appl. Genet.* 76: 815-829.

17-McCouch S R, Teytelman L, Xu Y, Lobos K B, Clare K, Walton M, Maghirang R, Ware Y D and Stein L(2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice(*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 9:199-207 and 257-279.

18-McCouch S R, Chen X, Panaud O, Xu Y G, Cho N, Ishii T and Blair M(1997) Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology* 35: 89-99.

19-Moncada P, Martinez C P, Borrero J, Chatel M, Gauch H and McCouch S R(2001) Quantitative trait loci for yield and yeild components in an *Oryza sativa* x *Oryza rufipogon* BC₂F₂ population evaluated in an upland environment. *Theor. Appl. Genet.* 102:41-52.

20-Olufowote J O, Xu Y, Chen X, Park W O, Beachell H M, Dilday R H, Goto M and McCouch S R(1997) Comparative evaluation of within cultivar variation of rice using microsatellite and RFLP markers. *Genome* 40:370-378.

21-Rabiei B, Valizadeh M, Ghareyazie B, Moghaddam M and Ali A J (2004) Identification of Qtls for rice grain size and shape of Iranian cultivars using SSR markers. *Euphytica*.

22-Tanksley S D, Granddillo S, Fulton T M, Zamir D, Eshed T, Petiard V and Beck-Bunn T(1996) Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet.* 92: 213-224.

23-Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S and McCouch S R(2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon

