Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 1، بهار 1392)

ردیابی ژن عامل طول دانه برنج (*GS3*) در جمعیتهای تلاقی مرکب با استفاده از نشانگرهای مولکولی

کاملیا کتالانی*[1]، قربانعلی نعمت زاده[2]، غفار کیانی[3]، سید حمید رضا هاشمی[4]

1- کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

2- استاد و محقق ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

3- استادیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

4- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت 90/9/7، تاریخ پذیرش 1391/02/05

چکیده

کیفیت ظاهری دانه برنج عمدتا شامل طول دانه و نسبت طول به عرض می‌باشد و سهم به سزایی در بازارپسندی محصول دارد. با توجه به اینکه تعیین فنوتیپ شکل دانه در مراحل اولیه رشد گیاه میسر نمی‌باشد انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی گامی اساسی در جهت بهبود صفات کمی و کیفی برنج می‌باشد. در این تحقیق به منظور ترمیم صفات کمی و کیفی رقم جدید قائم، از دو رقم محلی شصتک و دمسیاه و دو رقم اصلاح شده فجر و نعمت به عنوان والد در تلاقی‌ها استفاده گردید. جهت اجرای MAS در لاین‌های حاصل از تلاقی‌های مرکب، ابتدا کارایی نشانگر *GS3* به کمک مطالعات بیوانفورماتیکی (*In silico*) و بررسی همبستگی الگوی باندی با فنوتیپ والدین تایید گردید. بدین نحو که رقم شصتک با خصوصیات دانه گرد، نسبت به سایر والدین الگوی باندی منحصر به فردی ایجاد نمود. از الگوی باندی نشانگر *GS3* در تلاقی‌های مرکب شماره 1 (فجر / قائم// شصتک / قائم)، تلاقی شماره 3 (نعمت /قائم// شصتک /قائم) و تلاقی شماره 4 (شصتک / قائم // دمسیاه/ قائم) جهت تمایز بوته‌های هتروزیگوس دارای آلل شصتک (نامطلوب) از سایر بوته‌ها (دانه کشیده) استفاده گردید. شایان ذکر است برای دستیابی به لاین‌های خالص، بوته‌های دانه بلند انتخابی می‌بایست در نسل-های پیشرفته‌تر مورد بررسی قرار گیرند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که از نشانگر مکان ژنی *GS3* می‌توان به عنوان روشی سریع و کم هزینه جهت بهبود کیفیت طول دانه استفاده نمود.

کلمات کلیدی: *طول دانه، برنج، تلاقی مرکب، انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS).*

* نویسنده مسئول: کاملیا کتالانی تلفن: ۰۹۳۶۸۳۷۸۱۰۲ Email: katalanik@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

طول دانه یکی از صفات مهم کیفی برنج می‌باشد که بر وزن دانه و عملکرد محصول تاثیرگذار است (Liu *et al.*., 2004). طول دانه و شکل آن یکی از عوامل اصلی بازارپسندی برنج بوده و تاثیر به سزایی بر روی پخت و فرآیند تبدیل برنج دارد (Fan *et al.*, 2009). دانه های برنج سفید از نظر طول (میلی‌متر) به دانه های خیلی بلند (بیش از 7/5)، بلند (7/5-6/61)، متوسط (6/6-5/5) و کوتاه (5/5 و یا کمتر) تقسیم می‌شوند(Dela Cruz *et al.*, 2000). طول دانه صفتی کمی است. یک QTL اصلی برای طول دانه در اطراف ناحیه پری سانترومریک کروموزوم 3 به نام *GS3* شناسایی شده که 80 - 90 درصد تنوع طول دانه را به خود اختصاص داده است و تاثیر منفی بر روی طول دانه دارد (Fan *et al.*,2006). مقایسه توالی ژنوتیپ‌های دانه بلند و دانه کوتاه نشان داده است که اگزون شماره 2 لوکوس *GS3* یک چند شکلی تک نوکلئوتیدی[1] دارد که شکل دانه به واسطه آن تغییر می‌کند. این SNP در سطح پروتئین کدون سیستئین را (TGC) به کدون پایان (TGA) تغییر می‌دهد. آلل غالب C، پروتئینی 232 آمینو اسیدی را رمز می‌کند که باعث ایجاد دانه کوتاه شده و آلل A که مغلوب بوده، پروتئینی با 178 آمینو اسید و بدون ویژگی های عملکردی را رمز کرده و سبب ایجاد دانه بلند می‌شود (Fan *et al.*, 2006).

با توجه به اینکه تعیین شکل دانه در مراحل اولیه رشد گیاه امکان پذیر نمی‌باشد، همچنین اهمیت شکل دانه برای مصرف کنندگان، محققان را به این امر واداشت تا نشانگرهایی که با ژن مورد نظر پیوسته هستند، به منظور تعیین طول دانه در مراحل اولیه رشد برنج طراحی نموده و به کار گیرند. اولین نشانگرهای RFLP پیوسته با ژن طول دانه (RZ562 و RZ323)، به علت فاصله زیاد از ژن مورد نظر در برنامه های انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS[2]) کاربردی نبودند (Ahn *et al.*, 1993). نشانگرهای SSR نیز از قابلیت چندانی در تشخیص این صفت برخوردار نبودند (Biswas *et al.*, 2004). پس از آن نشانگرهایی دقیق تر بر مبنای جهش تک نوکلئوتید مورد بررسی قرار گرفتند. با کمک نشانگرهای حاصل از مکان های چند شکلی تک نوکلئوتیدی(SNP) می‌توان بر مشکل نوترکیبی و پیوستگی که در مورد نشانگرهای حاصل از QTL وجود دارد، فائق آمد (Fan *et al.*, 2009). در پژوهشی Fan *et al.* (2009) یک نشانگر CAPS[3]، بر مبنای جهش تک نوکلئوتیدی در اگزون دوم این ژن طراحی کردند، اما این نشانگر به علت هضم بعد از PCR و استفاده از ژل اکریل آمید و رنگ آمیزی نقره، در MAS هزینه بالا و وقت زیادی را به خود اختصاص می‌داد. در همین راستا محققان دیگری نیز از نشانگرهای مربوط به این ژن در

1- Single Nucleotide Polymorphism

2 - Marker Assisted Selection

3 - Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

www.SID.ir

Archive of SID

برنامه های اصلاحی استفاده کردند (Yan *et al.*, 2009)، از جمله Ramkumar *et al* (2010) نشانگری جدید را برای ژن *GS3* بر مبنای SNP معرفی کردند که قادر به تفکیک در ژل آگارز بوده و ازاین رو در برنامه‌های MAS قابل استفاده می-باشد. محققان زیادی بر اساس داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی کیفیت ارقام زراعی را بهبود بخشیده و موفق به ترکیب این ویژگی‌ها در یک رقم شده اند (Jairin *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2009). هدف از این تحقیق مطالعه ردیابی ژن طول دانه (*GS3*) در جوامع حاصل از تلاقی های مرکب، و ردیابی آن با استفاده از نشانگرهای مولکولی بوده است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از چهار رقم مختلف برنج از جمله ارقام محلی دمسیاه و شصتک و ارقام اصلاح شده پرمحصول فجر و نعمت بعنوان پایه‌های پدری، و رقم قائم بعنوان پایه ثابت مادری استفاده گردید. کلیه تلاقی‌های ممکن یک‌طرفه در سال 1387 به صورت دستی انجام و بذور F_1 که شامل تلاقی‌های فجر/ قائم ، دمسیاه / قائم ، شصتک / قائم و نعمت / قائم بودند در سال 1388 کشت شدند. در سال زراعی 1388 تلاقی‌های بین F_1 ها انجام (جدول 1) و بذور تلاقی‌های مرکب جمع آوری و در سال زراعی 1389 در مزرعه پژوهشی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان کشت شدند. مطالعات بیوانفورماتیکی ژن طول دانه

به منظور بررسی بیوانفورماتیکی ژن طول دانه و در نتیجه انتخاب نشانگر مناسب در این تحقیق، از پایگاه‌های اطلاعاتی و نرم افزارهای مربوطه استفاده گردید، که از جمله می‌توان به BLAST و Clustal W اشاره نمود.

نمونه‌های برگی 43 بوته انتخابی از مجموع 190 بوته تلاقی‌های مرکب (با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی و تیپ مناسب بوته) برداشت و استخراج DNA آنها به روش دلاپورتا و همکاران (1983) انجام شد. نشانگرهای همبسته با صفت مورد نظر طبق جدول 2 انتخاب و به کار گرفته شدند (جدول 2). شرایط PCR برای ژن مورد مطالعه بر اساس استاندارد متداول شرایط PCR برای نشانگرهای SSR بوده است فرآورده‌های PCR به وسیله الکتروفورز ژل آگارز 2/5-2 درصد جداسازی و در اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- ارقام والدینی مورد استفاده و تلاقی های انجام شده برای تولید جمعیت های مرکب.

Table 1- Parental varieties and crosses that were used for the production of composite populations.

والدین پدری Paternal parents	تلاقی‌های یک طرفه (سال 1387) Single crosses	تلاقی_های مرکب(سال 1388) Composite crosses
شصتک Shastak	شصتک / قائم Shastak/Ghaem	فجر / قائم // شصتک / قائم **(1)** Fajr/Ghaem// Shastak/Ghaem
دمسیه Domsiah	دمسیاه / قائم Domsiah /Ghaem	نعمت / قائم // دمسیه / قائم **(2)** Nemat/Ghaem// Domsiah /Ghaem
فجر Fajr	فجر / قائم Fajr/Ghaem	نعمت / قائم // شصتک / قائم **(3)** Nemat/Ghaem// Shastak/Ghaem
نعمت Nemat	نعمت / قائم Nemat/Ghaem	شصتک / قائم // دمسیاه/قائم **(4)** Shastak/Ghaem// Domsiah /Ghaem
		فجر / قائم // نعمت /قائم **(5)** Fajr/Ghaem// Nemat/Ghaem
		فجر / قائم // دمسیاه / قائم **(6)** Fajr/Ghaem// Domsiah /Ghaem

جدول 2- نشانگرهای مولکولی همبسته با شکل دانه برنج که در این تحقیق استفاده شده‌اند.

Table 2- Molecular markers linked to the rice grain length used in this research.

نام نشانگر Marker Name	نوع نشانگر Type of marker	محل کروموزومی/صفت Locus/Trait	توالی رفت Forward	توالی برگشت Reverse	منبع refrence
RM411	SSR	3-grain length	acaccaactcttgcctgcat	tgaagcaaaaacatggctagg	Fan *et al.* (2006)
GS09	Indel	GS3	gcaaccaagtccacgctaat	tagccgaagatcagcctcct	Fan *et al.* (2006)

نتایج

مطالعات بیوانفورماتیکی

با توجه به مطالعات گسترده‌ای که در زمینه شناسایی ژن‌های دخیل در طول دانه برنج صورت گرفته، شناسایی یک نشانگر مولکولی ایده‌آل جهت استفاده در برنامه انتخاب به کمک نشانگر (MAS) ضروری بنظر می‌رسد. از اینرو جهت انتخاب یک نشانگر کارا، ژن‌های کاندید دخیل در شکل دانه

www.SID.ir

Archive of SID

شامل *GS3*, *GW2*, *qSW5*،*gl-3* و *GW5* (Wan *et al.*., 2006, Fan *et al.*., 2006, Song *et al.*., 2007, Shomura *et al.*., 2008, Weng *et al.*., 2008) در پایگاه های BLAST و Clustal W مورد بررسی قرار گرفتند. از این میان بلوک ژنی GS3 بشماره ژن بانک DQ355996 انتخاب گردید. در این بررسی با استفاده از نرم افزار BLAST و Clustal w و مقایسه توالی‌های موجود در بانک-های اطلاعاتی، کلون BAC[1] به شماره ژن بانک AC13486.5 به عنوان کلونی حاوی ژن *GS3* مشخص و مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج حاصل از ترادف و همردیفی نرم افزاری، نشانگر GS09 در فاصله 37/5 کیلو جفت باز یا 0/145 سانتی مورگان (با فرض هر سانتی مورگان در برنج معادل حدودی 258/5 کیلو جفت باز (Semang *et al.*,2006) از ژن طول دانه، قرارگرفته است (شکل1). نشانگر GS09 به دلیل وجود توالی تکراری $(ATT)_n$ از اندازه باندی متفاوتی در ژنوتیپ‌های مختلف برخوردار می‌باشد. که با توجه به فاصله نزدیک آن با اگزون شماره 2 ژن *GS3*، مکان ژنی GS09 جهت ردیابی تغییرات ایندل مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز مولکولی و ارزیابی جمعیت تلاقی مرکب

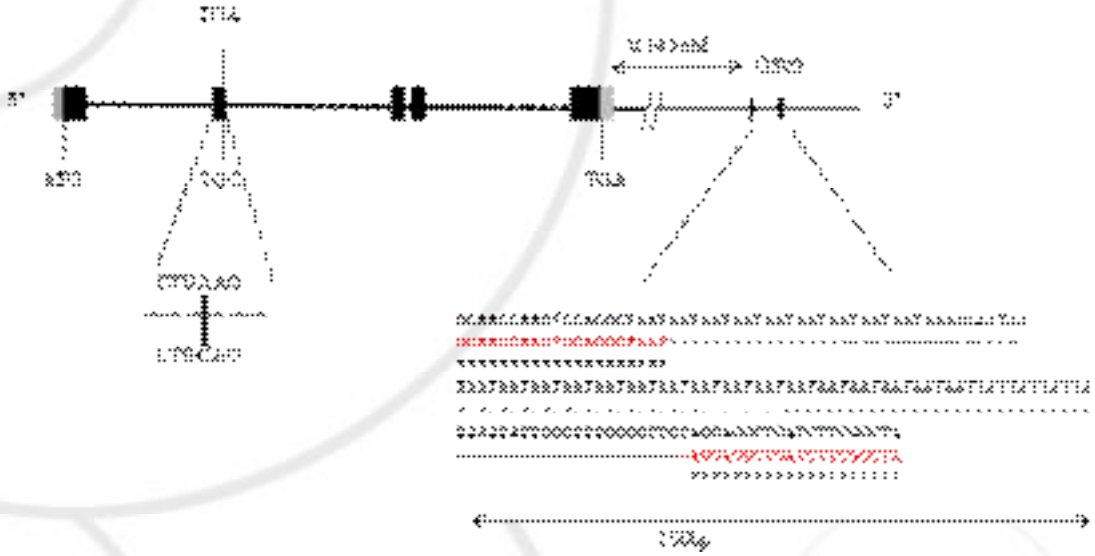
نتایج آزمایش نشان داده است که نشانگر ریز ماهواره RM411 علی‌رغم فاصله 5 سانتی مورگان با ژن مورد نظر (*GS3*) قادر به تفکیک طول دانه در این تحقیق نبود، در حالی که نشانگر GS09 از این قابلیت برخوردار بوده و به خوبی توانست شصتک را که رقمی با شکل دانه کوتاه بطول 8/60 میلی متر می‌باشد (شکل 2) از سایر ارقام والدینی (فجر:10/86، قائم: 11/07، نعمت: 11/97 و دمسیاه: 11/03) متمایز نماید (شکل3). باند تکثیری حاصل از این نشانگر به وزن 156 جفت باز در رقم شصتک (شکل 3) و مطابقت با باند مورد انتظار حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی (شکل 1)، نشان‌دهنده صحت استفاده از این نشانگر در بررسی های MAS می-باشد. علاوه بر این نتایج حاصل از نشانگر SNP رامکومار و همکاران (2010) نیز رقم شصتک را از سایر ارقام متمایز نموده است. همچنین چندشکلی حاصل از این نشانگر نشان دهنده پیوستگی بین طول دانه کوتاه و ژن *GS3* می‌باشد (شکل 4). آزمون این نشانگر در نسل در حال تفکیک فجر / قائم // شصتک / قائم(تلاقی1) نشان داده است که از تعداد 11 بوته،2 بوته هموزیگوت غالب (دانه کوتاه) و الگوی باندی شصتک را داشته و 6 بوته هتروزیگوت (با یک باند شصتک)، و مابقی بوته‌ها الگوی باندی مشابه با والدین دانه بلند خود داشتند، به علت تفاوت در اندازه باندی والد دمسیاه نسبت به سایر ارقام در تلاقی نعمت / قائم // دمسیاه / قائم (تلاقی2)، از تعداد 10 بوته 5 بوته هتروزیگوت (با یک باند

[1] Bacterial Artificial Chromosome

www.SID.ir

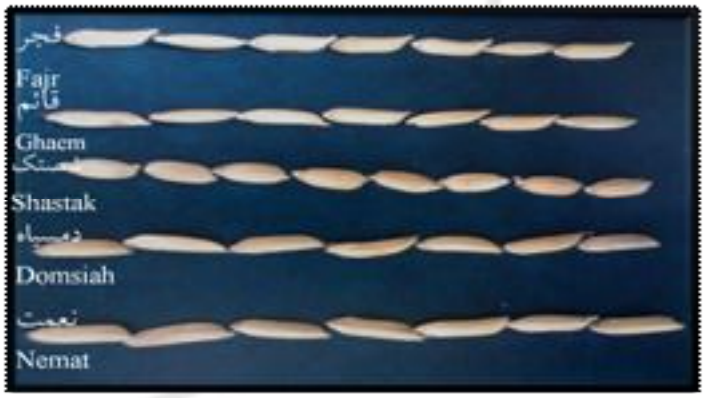
Archive of SID

دمسیاه) و مابقی باند هموزیگوس مغلوب (دانه بلند) داشتند.



شکل 1- نمای شماتیکی از ژن *GS3* و موقعیت نسبی نشانگر GS09 از این ژن و قطعه تکثیر شده توسط این نشانگر. بلوک های سیاه :نواحی کد کننده، بلوک های خاکستری '3 و '5 UTR ، کدون شروع (ATG)، کدون پایان (TGA) و جهش تک نوکلئوتیدی (C/A) در دومین اگزون نشان داده شده است.

Figure 1- Organization of *GS3* gene and relative position of GS09 primer for amplifying a segment of 156 bp in PCR. The position of coding regions (black boxes), 5' and 3' UTR (ashen boxes), translation start codon (ATG) , translation stop codon (TGA) and the SNP (C/A) in the second exon are indicated.



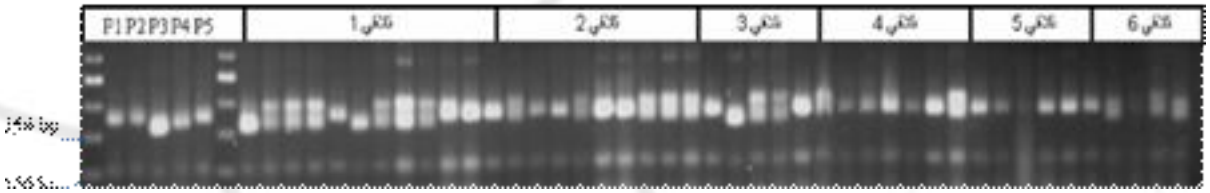
شکل 2- اندازه دانه ارقام والدینی به میلی متر. شصتک، کوتاهترین طول (9/60 میلی متر) را در بین ارقام دیگر دارد.

Figure 2- Grain size of parent cultivars to mm, Shastak is shorter than others.

www.SID.ir

Archive of SID

در تلاقی نعمت / قائم // شصتک / قائم (تلاقی3)، 2 بوته هتروزیگوت مربوط به شصتک، 1 بوته هموزیگوت غالب و 2 بوته هموزیگوت مغلوب بودند. در تلاقی شصتک/قائم// دمسیاه/ قائم(تلاقی4)، 1 بوته هتروزیگوت شصتک و 1 بوته هتروزیگوت با یک باند دمسیاه و 5 بوته هموزیگوت مغلوب بوده و در تلاقی فجر / قائم // نعمت / قائم (تلاقی5)، هر 5 بوته هموزیگوت مغلوب بودند. از تعداد 5 بوته تلاقی فجر / قائم // دمسیاه / قائم (تلاقی6)، نیز 4 بوته هتروزیگوت و 1 بوته هموزیگوت مغلوب بوده است.



شکل 3- نشانگر GS09، چندشکلی حاصل در والدین و جمعیت حاصل از تلاقی مرکب : فجر قائم//شصتک/ قائم (1). نعمت / قائم // دمسیاه / قائم (2). نعمت / قائم // شصتک / قائم (3). شصتک / قائم // دمسیاه/ قائم (4). فجر / قائم // نعمت / قائم(5). فجر / قائم // دمسیاه / قائم(6)، و ارقام والدینی شامل: P_1 ; فجر، P_2 ; قائم ، P_3 :شصتک ; P_4 : دمسیاه ; P_5 : نعمت.

Figure 3- GS09 primer, Polymorphism in parent and population from composite cross: Fajr / Ghaem // Shastak / Ghaem (1). Nemat / Ghaem // Domsia / Ghaem (2). Nemat / Ghaem // Shastak / Ghaem (3). Shastak / Ghaem // Domsia / Ghaem (4). Fajr / Ghaem // Domsia / Ghaem (5). Fajr / Ghaem // Domsia / Ghaem (6). Parents including: P_1: Fajr, P_2: Ghaem, P_3: Shastak, P_4: Domsia. P_5: Nemat.

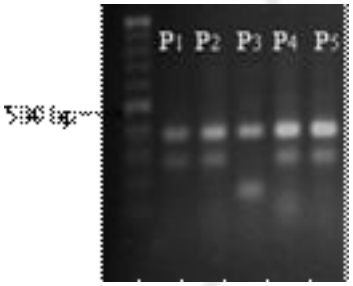
جدول 3- نمایی از قطعه های تکثیر شده توسط نشانگر GS09 که در شکل 3 نشان داده شده است.

Table 3- Imagery of amplified segments by GS09 primer which was shown in figure 3.

		Parent					Cross 1										Cross2										Cross3					Cross4							Cross5					Cross6				
	bp	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	180	-	-			-		-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	170				-														-			-					-					-	-	-	-	-	-								-	-	-	-
3	156			-			-	-	-	-		-	-	-	-													-	-	-								-										

www.SID.ir

Archive of SID



شکل4- چند شکلی حاصل ازنشانگر SNP رامکومار و همکاران. ارقام والدینی شامل: P_1: فجر، P_2 : قائم، P_3 : شصتک ، P_4 : دمسیاه ، P_5 : نعمت.

Figure 4- Polymorphism in parental cultivar by SNP marker. Parents including: P_1: Fajr, P_2: Ghaem, P_3: Shastak, P_4: Domsiah, P_5: Nemat.

بحث

در این تحقیق از رقم دمسیاه با عطر و طعم بالا و شصتک زودرس (60 روزه در شصتک و 123 روزه در قائم) و با تراکم دانه بسیار بالا، فجر با کیفیت متوسط و نعمت با طول خوشه بلند (31/5 سانتی متر طول خوشه در نعمت و 28 سانتی متردر قائم) به منظور انتقال صفات کاندید شده در آنها، به رقم قائم استفاده گردید. در این بین شصتک با وجود صفات مطلوب ذکر شده دارای طول دانه بسیار کوتاه می‌باشد. به منظور رفع این مشکل تنها بوته هایی که از نظر طول دانه بلند بودند، برای مطالعات بعدی انتخاب گشتند. با درنظر گرفتن وجود رقم شصتک در تلاقی 1 (فجر / قائم // شصتک / قائم) ، تلاقی 3 (نعمت / قائم // شصتک / قائم) و تلاقی 4 (شصتک / قائم // دمسیاه/ قائم)، نشانگر مورد استفاده در این تحقیق، باندهای هموزیگوت و هتروزیگوت مربوط به شصتک را مشخص نموده است. به دلیل غالب بودن صفت کوتاهی طول دانه ، وجود والد شصتک در هر یک از تلاقی‌ها سبب انتقال این ژن به جمعیت در حال تفکیک شده و ژنوتیپ افراد جمعیت تلاقی مرکب با توجه به الگوی باندی حاصل از این نشانگر مشخص گردید و ژنوتیپ‌های هموزیگوت مغلوب جهت بررسی‌های بیشتر از نظر سایر ژن‌های دخیل در کیفیت انتخاب شدند. چون طول دانه به طور کمی به ارث می‌رسد و با توجه به اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط در صفات کمی، اصلاح برنج با روش‌های سنتی کار دشواری می‌باشد. بنابراین استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن هدف یا QTL های اصلی کمک زیادی به اصلاح کننده در انتخاب ژنوتیپ مطلوب در نسل های اولیه می‌نماید. کشف جهش تک نوکلئوتیدی در ژن *GS3* پایه و اساس طراحی نشانگرهای مولکولی ژن طول دانه بوده است. فاصله بسیار اندک نشانگر GS09 با جهش تک نوکلئوتیدی در اگزون 2 ژن *GS3*، تنوع بین ارقام والدینی را به خوبی نشان می‌دهد که نشان

www.SID.ir

Archive of SID

دهنده پیوسته بودن این نشانگر با SNP لوکوس GS3 می‌باشد. بر اساس گزارش مائو و همکاران (2010) مبنی بر وجود آلل‌های مختلف در لوکوس *GS3* در این تحقیق نیز والد شصتک اندازه آللی متفاوتی نسبت سایر والدین داشته (شکل3 و 4) که بیانگر وجود آلل های مختلف در واریته ها و ایجاد فنوتیپ های متفاوت می-باشد. همچنین بر اساس گزارشی از وانگ و همکاران (2010) علاوه بر جهش تک نوکلئوتیدی در اگزون 2، وجود توالی‌های تکراری در اینترون 2 (SR17) و آخرین اینترون (RGS1) و آخرین اگزون (RGS2) ژن *GS3* نیز سبب تغییر در طول دانه در سایر ارقام برنج (*O. rufipogon* , *O. glaberrima*) می‌شود (Wang *et al.*, 2010). نشانگر ریزماهواره RM411، در بین والدین هیچ چندشکلی نشان نداد، در مقابل نشانگر GS09 Indel، فنوتیپ طول دانه در جمعیت تلاقی مرکب را به خوبی تفکیک نمود. فنوتیپ دانه بلند به وسیله آلل مغلوب کنترل شده در حالیکه هموزیگوت غالب و هتروزیگوت هر دو موجب شکل کوتاه دانه می-گردند. از این گذشته تشخیص بوته‌های هتروزیگوت در برنامه‌های اصلاحی جز با نشانگر مولکولی امکان پذیر نمی‌باشد (Fan *et al.*, 2006). در این بررسی کارایی نشانگر GS09در بررسی های مولکولی و MAS مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصله کاملا با خصوصیات فنوتیپی لاین‌های والدینی و در حال تفکیک مطابقت داشت. همچنین در مطالعات مختلف و نیز در این تحقیق نشانگرهایی که بر مبنای جهش تک نوکلئوتیدی و پیوسته با ژن اصلی طراحی شده اند از صحت بیشتری در ارزیابی‌های مولکولی به منظور تعیین ژنوتیپ، برخوردار بودند (Mao *et al.*, 2010. Fan *et al.*, 2009, Ramkumar *et al.*, 2010). با در نظر گرفتن توالی‌های تکراری حاصل از نشانگر GS09 و پیوستگی آن با ژن اصلی، این نشانگر قادر به تمایز بین فنوتیپ ارقام والدینی بوده است. لذا با توجه به نتایج بدست آمده این انتظار می‌رود که در نسل‌های پیشرفته با تهیه لاین‌های خالص امیدبخش و با ترکیب یا هرمی ساختن ژن‌های دخیل در کیفیت دانه برنج، می‌توان به ارقام اصلاحی با صفات کمی و کیفی مناسب دست یافت علاوه بر این به علت عدم نیاز این نشانگر به ژل اکریل آمید و هضم بعد از PCR از آن می‌توان به عنوان ابزاری کاربردی در MAS استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از مجموعه مدیریت پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان که اعتبار لازم را برای انجام این پروژه فراهم نموده‌اند، قدردانی به عمل می‌آید.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Ahn SN, Bollich CN, McClung AM, Tanksley SD (1993) .RFLP analysis of genomic regions associated with cooked kernel elongation in rice. Theorical Apply Genetic 87: 27–32.

Biswas S, Dey N, Ray CT, Dey SR, De M, Prasad M, Ghose TK (2004). Identification of major QTL for cooked kernel elongation on chromosome 8 of rice (*O. sativa L.*). *In*: Proceedings of symposium on comparative and functional genomics, Hyderabad, India, p 31.

Dela Cruz N, Khush GS (2000). Rice grain quality evaluation procedures.15-29.In: Singh RK, Singh US and Khush GS (eds.), Aromatic rices. Science Publishers, Inc.,Enfield,NH,USA ,Printed in India, p 289.

Dellaporta SL, Wood J, Tickes J (1983). A plant molecular DNA minipreparation version II. 1: 19-21.

Fan CC, Yu SB, Wang CR, Xing YZ (2009). A causal C–A mutation in the second exon of *GS3* highly associated with rice grain length and validated as a functional marker. Theorical Apply Genetic. 118:465–472.

Fan CC, Xing YZ, Mao HL, Lu TT, Han B, Xu CG, Li XH, Zhang QF (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. Theorical Apply Genetic 112:1164–1171.

Jairin J, Teangdeerith S, Leelagud P, Khothcharerk J, Tooiinda T (2009). Development of rice introgression lines with brown planthopper resistance and KDML105 grain quality characteristics through marker assisted selection. Field Crops Research 110: 263-271.

Jin L, Lu Y, Shao Y, Zhang G, Xiao P, Shen S, Corke H, Bao J (2010). Molecular marker assisted selection for improvement of the eating, cooking and sensory quality of rice *(Oryza sativa L.)*. Journal Cereal Science 51: 159-164.

Luo YK, Zhu ZW, Chen N, Duan BW, Zhang LP (2004). Grain types and related quality characteristics of rice in China. Chinese Journal Rice Science 18:135–139.

Mao H, Sun S, Yao J, Wang C, Yu S, Xu C, Li X, Zhang Q (2010). Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice. PNAS, plant biology 107:19579-19584.

Ramkumar G, Sivaranjani AKP, Manish AKP, Pandey K, Sakthivel K, Sundaram RM, Viraktamath B C, Madhav MS (2010). Development of a PCR-based SNP marker system for effective selection of kernel length and kernel elongation in rice. Molecular Breeding 26:735–740

Semagn K, Bjornstad A, Ndjiondjop MN (2006). Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. African Journal of Biotechnology 5:2569-2587.

Shao G, tang S, Lou J, Jiao G, Wei X, Tang A, Wu J, Hu P (2010). Mapping of qGL7-2, a grain length QTL on chromosome 7 of rice. Journal of Genetic and Genomics 37:523-531.

Wang C, Chen S, Yu S (2010). Functional markers developed from multiple loci in GS3 for fine marker assisted selection of grain length in rice. Theorical Apply Genetic 125: 372-401.

Yan CG, Yan S, Yang Y, Zeng X, Fang YW, Zeng SY, Gu YW (2009). Development of gene-tagged markers for quantitative trait loci underlying rice yield components. Euphytica 169:215-226.

Yi M, Than New K, Vanavichit A, Chai-arree W, Toojinda T (2009). Marker assisted backcross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. Field Crops Research 113:178-186.

www.SID.ir

Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 1، بهار 1392)

Monitoring of grain length gene (*GS3*) in composite cross populations of rice by molecular marker

Katalani K.*[1], Nematzadeh Gh.[2], Kiani Gh.[3], Hashemi S.H.[4]

1- M.Sc in Agricultural Biotechnology, Genetic & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.
2- Prof. in plant genetics, Genetic & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
3- Assistant professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
4- M.Sc in plant breeding, Genetic & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

Abstract

Grain appearance quality mainly, is defined by grain length, grain width and long to width rations, which have an important role in marketability. Since determination of grain shape in the early stage of growth is not possible, marker assisted selection is a basic step to improve the quantitative and qualitative traits in rice. In this study, two local high quality rice cultivars (Shastak and Domsiah) and two improved high yielding rice varieties (Fajr and Nemat) were used to improve the quality-related traits in new released variety (Ghaem), through classical methods and MAS. For the MAS, firstly the accuracy of the GS09 primer was confirmed by utilizing *in silico* studies and analyzing correlation of banding pattern with parental phenotype. Thus shastak variety with short grain phenotype created unique banding patterns than other parents. Banding patterns of *GS3* in the cross 1 (Fajr / Ghaem // Shastak / Ghaem), cross 3 (Nemat / Ghaem // Shastak / Ghaem) and cross 4 (Shastak / Ghaem // Domsia / Ghaem) were used for distinction the heterozygous plants containing shastak allele (unfavorable) from other plants. Therefore, long grain plants should be studied for achieving pure lines in progressive generations. The results indicated that the *GS3* locus markers can be used as a quick and inexpensive method to improve the quality of grain length.

Keywords: *grain length, Rice, Composite cross, Marker assisted selection (MAS)*

* Corresponding Author: Katalani Kamelia. Tel: 09368378102 Email: katalanik@yahoo.com

www.SID.ir