Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره سوم ، شماره٤ ، زمستان ١٣٨٧
صفحه٥٥-٤٥

مطالعه پیوستگی بین نشانگرهای ریزماهواره (SSR) و QTLهای اجزای عملکرد در برنج(Oriza sativa)

جعفر احمدی*[1]، محمدحسین فتوکیان[2]، صدیقه فابریکی‌اورنگ[3]

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: ۸۷/۹/۲۳- تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۱۶)

چکیده

به منظور مکان‌یابی و تعیین خصوصیات QTLهای مرتبط با طول سنبله، تعداد دانه پر، تعداد دانه خالی، تعداد سنبلچه هر سنبله و عقیمی دانه جمعیتی شامل ٥٩ 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 چپرسر- تنکابن مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی چندشکلی در والدین و مطالعه ژنوتیپی جمعیت به ترتیب با ۲۳٥ و ١١٤ 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 ٨ تا برای طول سنبله، ٣ تا برای تعداد سنبلچه، ٢ تا برای تعداد دانه‌های پر، ٤ تا برای تعداد دانه‌های خالی و ٩ تا برای عقیمی دانه بود. حدود ٤٦ درصد مکان‌های ژنی شناسایی شده دارای اثر افزایشی منفی بودند. حداکثر شش QTL در کروموزم ١ مکان‌یابی شد. مکان‌یابی بیش از یک QTL برای بیشتر صفات، نشانگر چند ژنی بودن صفات مورد مطالعه است.

واژه های کلیدی

برنج ،
اجزای عملکرد ،
ریزماهواره ،
مکان‌یابی QTL

www.SID.ir

Archive of SID

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 کاملا 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 کمّی به عوامل مندلی منفرد از طریق تجزیه مکان‌یابی QTL می‌باشد. QTLها نواحی از کروموزوم‌ها هستند که صفات کمّی 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 (اپیستازی) 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[1] 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 پلیمراز[2] است دارای کاربرد فراوان در مکان‌یابی QTL در گیاهان مختلف مانند برنج می‌باشد (۱۹). به ریزماهواره‌ها توالی ساده تکرارهای [3] 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 QTLها، 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 تلاقی‌برگشتی پیشرفته[4]، جمعیت هاپلوئید مضاعف، جمعیت لینه اینبرد نوترکیب و جمعیت لینه‌های تقریبا 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 QTLهای 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 QTLهای 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 (۱۹و 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[5] و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب[6]، همه حاوی مدل‌های تک QTL بدون در نظر گرفتن اثرمتقابل QTL در مدل می‌باشند. از اینرو اطلاعات ژنتیکی

[1]. Marker Assisted Selection (MAS)
[2]. Polymerase Chain Reaction (PCR)
[3]. Simple sequence repeat (SSR)
[4]. Advanced Backcross (ABC)
[5]. Simple Interval Mapping (SIM)
[6]. Composite Interval Mapping (CIM)

Archive of SID

زیادی در مجموعه داده‌های مکان‌یابی به ویژه برای اثرمتقابل بین مکان‌های مختلف ژنی یا اپیستازی بدون کشف باقی می‌مانند (۱۲). مکان‌یابی فاصله‌ای چندگانه[1] 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 (٦) 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. ژیائو و همکاران (۳۱) با استفاده از ۱۹۴ لاین اینبرد نوترکیب 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 سنبلچه، 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 سنبلچه 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 شناسائی 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 عنوان والد دوره‌ای[2] با واریته طارم مولایی به عنوان والد دهنده[3] 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 ٤ نسل از خودگشنی جمعیت BC_2F_1 همرا 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[4] (SL)، تعداد دانه پُر[5] (FGN) ، تعداد دانه خالی[6] (EGN)، تعداد سنبلچه هر سنبله[7] (SpN)، و عقیمی دانه[8] (GS).

مطالعه فنوتیپی صفات

آزمایش مزرعه‌ای در بهار و تابستان سال ۱۳۸۵ در مزرعه تحقیقاتی ایستگاه تحقیقات برنج چپرسر- تنکابن وابسته به موسسه تحقیقات برنج کشور انجام شد. ابتدا بذور در خزانه بذرپاشی 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 سنبلچه شمارش گردید. عقیمی دانه از نسبت دانه‌های خالی به تعداد کل سنبلچه به دست آمد. در انجام محاسبات آماری میانگین ۱۰ بوته مورد استفاده قرار گرفت.

[1]. Multiple Interval Mapping (MIM)

[2]. Recurrent
[3]. Donor
[4]. Spike lenght
[5]. Full grain number
[6]. Empty grain number
[7]. Spiklet number
[8]. Grain sterility

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه ژنوتیپی

استخراج DNA

مطالعات ملکولی در آزمایشگاه ژنومیکس موسسه بین المللی برنج (IRRI) واقع در فیلیپین انجام گرفت. برای استخراج DNA ، حدود ٤ میلی‌گرم از نوک برگ گیاهچه‌های هر لاین برداشت و ۲ میلی‌گرم 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 ٦٥ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خنک شدن محلول، حدود ۷۰۰ میکرولیتر کلروفورم به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه با شیکر تکان داده شد. پس از سانتریفوژ به مدت ٤ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی[1] در لوله اپندورف ریخته شد و با ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول خالص، مخلوط و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد 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 (Tris-Hcl ۱۰ میلی مولار + EDTA یک میلی مولار) حل گردید. محلول حاصل برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۱۰۰ برابر با محلول TE رقیق گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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[2] به آن اضافه گردید. به هر چاهک یک قطره روغن معدنی اضافه شد و چاهک‌ها با آلومنیوم 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 میلی‌مولار (نسبت ۱:۱:۱:۱ از هر یک از dNTPهای رقیق شده با آب مقطر استریل به نسبت ۱:٤)، نیم میکرولیتر (µM ۱) از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پسرو و ۰/۲۵ میکرولیتر (unit 1) آنزیم تک‌پلیمراز[3]. دستگاه PCR (مدل MJ 196) به شرح زیر برنامه ریزی شد: یک چرخه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد (واسرشت سازی دو رشته DNA)، ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه (واسرشت سازی)، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد (این دما برای برخی آغازگرها ٦۱ و برای برخی دیگر ٦۷ درجه سانتی‌گراد بوده است) به مدت یک دقیقه (برای چسبیدن[4] آغازگرها به DNA)، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه (بسط اولیه[5]) و یک چرخه به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (برای کامل کردن بسط اولیه) . برای تهیه محصول PCR جهت مطالعه چندشکلی[6] در جمعیت تلاقی برگشتی از ٤ 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 ٤ میکرولیتر محلول رنگی بارگذاری [7] 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 سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به وسیله دستگاه PCR انجام گرفت. بلافاصله پس از واسرشت سازی، بارگذاری نمونه ها در ژل آکریل آمید ٤٪ 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[8] 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، ۳٤) انتخاب

[1]. supernatant
[2]. cocktail

[3]. *Taq polymerase*
[4]. annealing
[5]. primer extension
[6]. polymorphism
[7]. loading dye
[8]. parental survey

Archive of SID

شدند. در ابتدا برای تمامی نشانگرها، محصول PCR در سه دمای ۵۵،۶۱ و۶۷ 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[1] 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[2] 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[3] 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.

نتایج و بحث

توزیع فراوانی صفات

برای تمامی صفات تفکیک متجاوز[4] 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[5] 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 سنبلچه و عقیمی دانه هتروزیس مثبت قابل توجه در برخی از لینه‌ها مشاهده گردید که برای تعداد دانه پر و تعداد کل سنبلچه 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.

[1]. Walk speed
[2]. Refine
[3]. Coefficient of determination
[4]. Transgressive segregation
[5]. Skewness

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱ . برخی آماره از صفات مورد تحقیق در والدین و جمعیت مورد مطالعه

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

میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

همبستگی فنوتیپی بین صفات

همبستگی بین طول سنبله با بقیه صفات معنی‌دار نبود و این نشان می‌دهد که ژن‌های کنترل کننده طول سنبله با ژن‌های کنترل کننده سایر صفات مستقل است و توسط مجموعه ژن‌های متفاوتی کنترل می‌شوند و یا در صورت پیوستگی یا پلیوتروپی مقدار آن قابل اغماض است و از نظر بیولوژیکی یا آماری معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۲). عقیمی دانه با تعداد دانه پر و تعداد دانه خالی ارتباط معنی‌دار نشان داد و این می‌تواند گویای مستقل بودن ژن‌های کنترل کننده عقیمی دانه از طول سنبله و تعداد کل سنبلچه باشد. بیشترین مقدار ضریب همبستگی بین تعداد کل سنبلچه و تعداد دانه پُر ($r = ۰/۹۵^{**}$) و کمترین مقدار ضریب همبستگی بین طول سنبله و عقیمی دانه ($r = ۰/۳۰۰$) بدست آمد. همبستگی بین صفات می‌تواند ناشی از اثر پلیوتروپی ژن، پیوستگی بین ژن‌ها، اثر اپیستازی ژن‌ها، اثرات محیطی و یا ناشی از شانس و تصادف باشد. نتایج همبستگی می‌تواند در گزینش غیرمستقیم و در گزینش زودهنگام در مراحل گزینشی روش‌های مختلف اصلاح نباتات به ویژه در نسل‌های در حال تفرق مورد استفاده قرار گیرد. تعمیم نتایج فوق به سایر ژنوتیپ‌های برنج بایستی با احتیاط بیشتر همراه باشد (۱).

جدول۲. ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات در جمعیت مورد مطالعه.

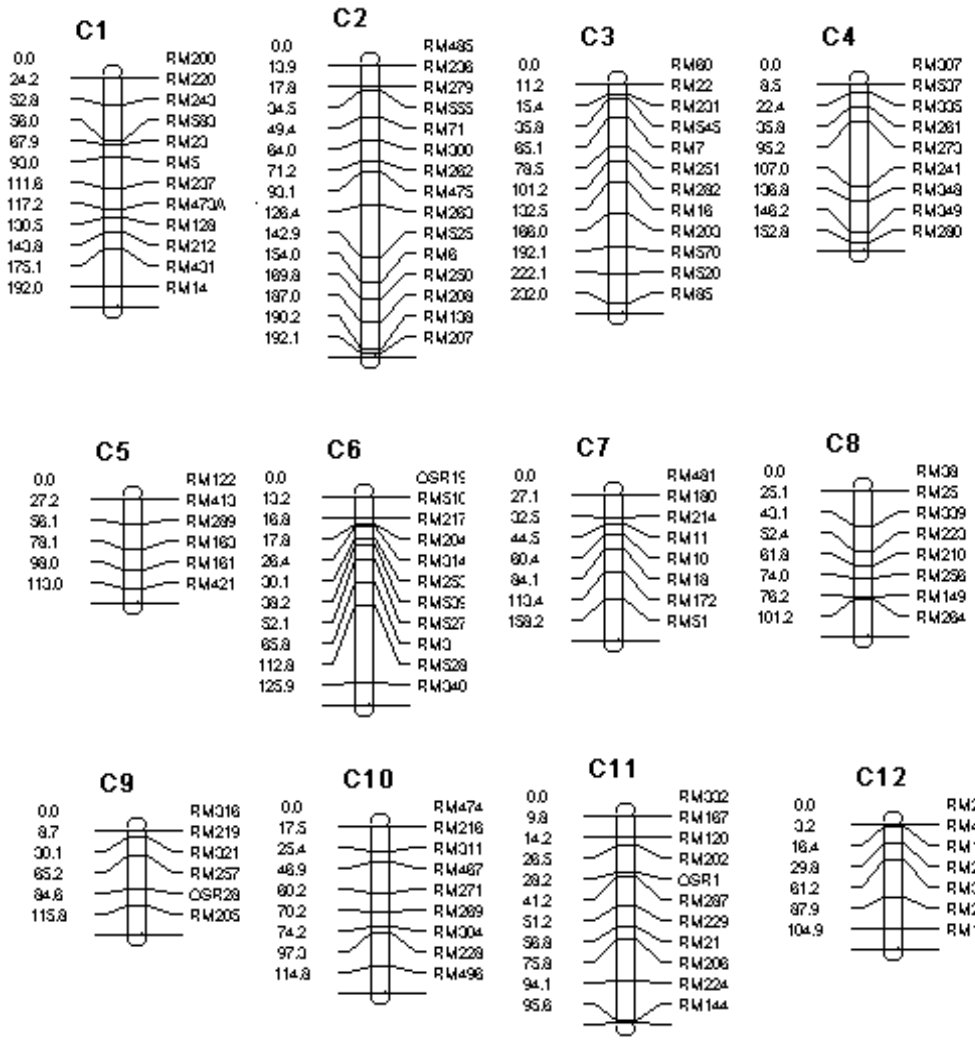
	طول سنبله	تعداد دانه پُر	تعداد دانه خالی	تعداد کل سنبلچه
تعداد دانه پُر	−۰/۲۵			
تعداد دانه خالی	−۰/۱۰	۰/۲۷*		
تعداد کل سنبلچه	−۰/۲۵	۰/۹۵**	۰/۵۷**	
عقیمی دانه	۰/۰۰۳	−۰/۲۸*	۰/۸۱**	۰/۰۴

*,**: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

Archive of SID

نقشه پیوستگی و مکان‌یابی QTL برای صفات مورد مطالعه

نقشه پیوستگی ترسیم شده به وسیله نشانگرهای انتخاب شده (شکل۱) ۱۲ کروموزوم برنج را پوشش کامل دادند. این پوشش در جمعیت مورد مطالعه برابر ۱۶۹۲/۶ سانتی‌مورگان با متوسط فاصله ۱٤/۸ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور بوده است. حداکثر طول گروه پیوستگی در کروموزوم ۳ با ۲۳۱ سانتی‌مورگان و حداقل ۹۵/۳ سانتی‌مورگان در کروموزوم ۱۱ بوده است.



شکل۱- نقشه پیوستگی ریزماهواره در برنج با استفاده از جمعیت ۵۹ لاین تلاقی برگشتی پیشرفته (*BC2F5*) از تلاقی IR64 × طارم‌مولایی

تمام QTLهای مکان‌یابی شده دارای اثرات افزایشی بودند (جدول۳). اثرات متقابل بین QTLها (اپیستازی) در هیچیک از صفات مشاهده نشد. QTLهای مکان‌یابی شده در این تحقیق در همه ۱۲ کروموزوم برنج به استثنای کروموزم‌های 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 کروموزم‌های 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 سنبلچه سه QTL (دو QTL با اثرافزایشی منفی و یک QTL با اثرافزایشی مثبت) که در کروموزم‌های ۱ و ۱۲ واقع بودند، شناسائی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

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

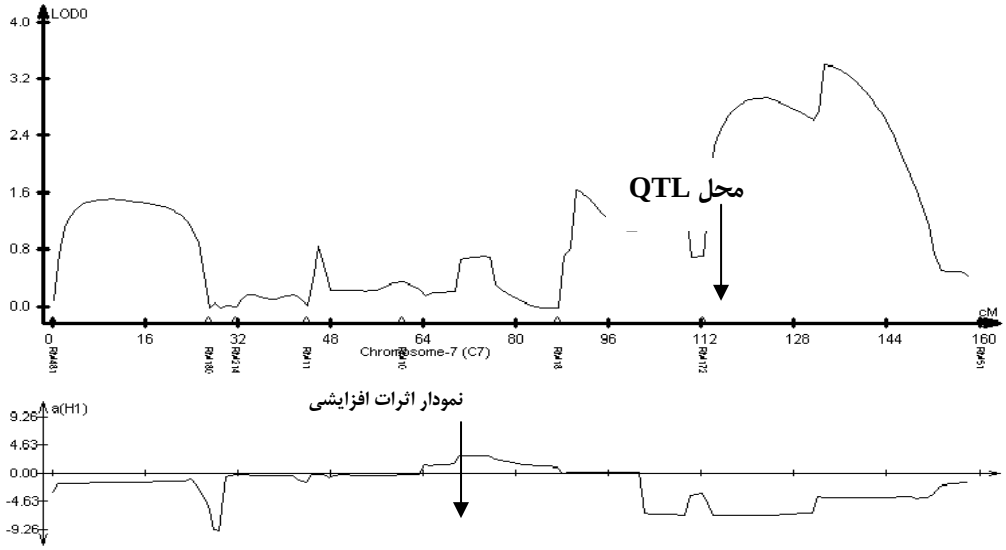
صفت	کروموزوم	(فواصل) نشانگر *	QTL	اثر افزایشی	R^{2**}	LOD
طول سنبله SL	۲	RM٤٨٥-RM٢٣٦	QP١٢a	١/٩٩	٥	٨/٥
	۲	RM٢٧٩-RM٥٥٥	QP١٢b	٠/٤١	١٠	٨
	٤	RM٢٤١-RM٣٤٨	QP١٤a	٠/٥٥	٧/٥	٢/٩٥
	٤	RM٣٤٩-RM٢٨٠	QP١٤b	٠/٩١	١٣	٤/٢٣
	١١	RM١٦٧-RM١٢٠	QP١١١a	−١/٧	٢	٣/١١
	١١	RM٢١-RM٢٠٦	QP١١١b	−١/٠٣	١١	٥/٧
	١٢	RM١٣-RM٢٣٥	QP١١٢a	−٠/٥٧	٩	٥/٤
	١٢	RM٢٣٥-RM١٧	QP١١٢b	١/٥٣	٥	٤/٩٦
تعداد کل سنبلچه SpN	١	RM٢٣٧-RM٤٧٣A	QGn١a	−٣٢	٢١/٤	٣/٤٣
	١	RM٤٣١-RM١٤	QGn١b	٢٠/١	١٥	٣/٣٣
	١٢	RM٢٣٥-RM١٧	QGn١٢	−٤٥	٢٧/٨	٤/٠٦
تعداد دانه پُر FGN	٤	RM٢٦١-RM٢٧٣	QFgn٤	١٨	١٠	٢/٥٧
	١٢	RM٢٤٧-RM٣١٣	QFgn١٢	٧١	٢٠	١/٧٥
تعداد دانه خالی EGN	١	RM٥٨٣-RM٢٣	Qegn١a	٢/٩٣	٦٠	٣/٢٥
	١	RM٤٧٣A-RM١٢٨	Qegn١b	٠/٢٣	٣/٦	٣/٣٢
	٧	RM١٧٢-RM٥١	Qegn٧	−٤	٥/٣	٣/٤
	١٠	RM٢١٦-RM٣١١	Qegn١٠	٤/٩٢	٣	٣/١٥
عقیمی دانه GS	١	RM٤٧٣A-RM١٢٨	QS١a	−٠/٣٨	٤/٨	٢/٥
	١	RM٢١٢-RM٤٣١	QS١b	−٣/٣	٠/٦	٥/١
	٢	RM٤٨٥-RM٢٣٦	QS٢a	−١/٥٢	٣١/٩	٧/٢
	٢	RM٥٢٥-RM٦	QS٢b	٥	٢٣/٩	٥/٩
	٥	RM١٦٣-RM١٦١	QS٥	٥/٧	١٠/٧	٣/٤
	٦	RM٣-RM٥٢٨	QS٦	−١/٥٢	٢	٥/٢
	٩	RM٣٢١-RM٢٥٧	QS٩	١/١	١/٦	٤/٣
	١٠	RM٣١١-RM٤٦٧	QS١٠	−١/٣٤	٣/٦	٦/٤
	١١	RM٢١-RM٢٠٦	QS١١	−٦/٨	٢	٧/٨

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

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

Archive of SID

دو QTL واقع در کروموزم 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 کروموزم‌های ۴ و ۱۲ با اثر افزایشی مثبت مکان‌یابی شد. متوسط تعداد دانه پُر در والد دوره‌ای بیش از والد دهنده بوده است (جدول۱) 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 کروموزم‌های ۱، ۷ و۱۰ 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 کروموزم ۷ مکان‌یابی شد در حالیکه انتظار می‌رفت تعداد بیشتری از آلل‌های این والد در جمعیت توزیع شده و قابل مکان‌یابی باشند. شکل۲ موقعیت QTL مربوط به تعداد دانه خالی را در کروموزوم ۷ نشان می‌دهد. برای صفت عقیمی دانه تعداد نه QTL در کروموزم‌های ۱، ۲، ۵، ۶، ۹،۱۰ و۱۱ مکان‌یابی گردید که حدود ۸۱٪ از تنوع فنوتیپی مشاهده شده در این جمعیت در شرایط اجرا شده در مزرعه ناشی از اثرات این QTLها بوده است. با توجه به ارتباطی که می‌تواند بین صفات تعداد کل سنبلچه، 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 سنبلچه را در بر می‌گیرند. در بعضی از کروموزوم‌ها مثل کروموزم‌های ۱، ۲، ٤، 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 اپیستازی 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 سنبلچه و عقیمی دانه، علت همبستگی را باید در سایر عوامل ایجاد کننده همبستگی مثل عوامل فیزیولوژیکی و یا محیطی



شکل۲. موقعیت QTL مربوط به تعداد دانه خالی (Qegn7) در کروموزم 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= ۳/۴ مکان یابی 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.

www.SID.ir

Archive of SID

جستجو کرد. البته باید توجه نمود که QTLهای 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 QTLها و وجود اپیستازی احتمالی بین آنها را در وجود این همبستگی توجیه نمود. علیرغم همبستگی خیلی معنی‌داری که بین تعداد دانه پر و تعداد کل سنبلچه مشاهده شد ولی QTL مشترک بین این صفات مکان‌یابی نشد، در نتیجه پلیوتروپی، پیوستگی بین ژن‌ها و یا اپیستازی بین QTLها 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 ٤، ٦، ٧ و١٢ در مناطقی به دلیل فقدان چندشکلی بین والدین از نظر آغازگرهای این نواحی، این پوشش کامل نبوده است. بروندانی و همکاران (٤) و نیز عارف (٣) در کروموزوم‌های ١، ٤، ٥، ٦، ٧ و١٠ چندشکلی کمتر از میزان مورد انتظار مشاهده کردند. تولید و تکثیر نشانگرهای ریزماهواره بیشتر (١٧، ١٨، ٢٣) برای افزایش تعداد نشانگرهای مکان‌یابی شده در همه کروموزوم‌ها مفید خواهد بود و نیز دقت مکان‌یابی QTL را بیشتر خواهد کرد. انتقال QTLهای موثر در این تحقیق به درون یک زمینه ژنتیکی مناسب به کمک نشانگر[1] می‌تواند روش مناسبی در اصلاح عملکرد دانه در برنج باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

١- وجود اختلاف معنی‌دار بین والدین باعث شد تا ردیابی QTL با موفقیت همراه باشد (جدول ١).

٢- در همه صفات مورد مطالعه تفکیک متجاوز مشاهده شد. در نتیجه استخراج لینه‌های امیدبخش از نظر صفات فوق و همچنین هرمی‌کردن ژن‌های مربوطه در یک زمینه ژنتیکی مناسب امکان‌پذیر است (جدول ١).

٣- 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 ٣).

٤- تعدادی از QTLها توانستند سهم قابل توجهی از واریانس فنوتیپی صفات مربوطه را توجیه کنند. به عنوان مثال QTL مربوط به تعداد دانه خالی یعنی QEgn1a ، حدود ٦٠٪ و QTL مربوط به عقیمی دانه حدود ٣١/٩٪ واریانس فنوتیپی صفات مربوطه را توجیه نمودند (جدول ٣).

منابع

١- فتوکیان، م. ح. (١٣٨٣) 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, Ganal 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 TeasdaleR 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.

[1] . marker aided introgression

Archive of SID

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* BC_2F_2 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
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 polymophism 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, Hittalmani 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.

www.SID.ir