

مکان یابی QTL‌های کنترل کننده عملکرد در جمعیت F_2 دو رقم برنج ایرانی

صادق موافق^۱، بابک ربیعی^۲، احمد زارع فیض آبادی^۲، قدیر طاهری^۴

چکیده

به منظور شناسایی QTL‌های کنترل کننده عملکرد برنج از جمعیت F_2 حاصل از تلاقی بین ارقام گرده و دم سفید استفاده گردید. والد گرده و دم سفید به ترتیب دارای متوسط عملکرد ۳۱/۵۵ و ۴۳/۲۵ گرم در بوته بودند که با استفاده از آزمون t -استیوندت تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۱ نشان دادند. ژنوتیپ ۱۹۴ بوته F_2 با استفاده از ۱۱۷ نشانگر AFLP تعیین شد و نقشه پیوستگی جمعیت با استفاده از نرم افزار Map Manager v2.6.5 تهیه گردید. طول نقشه بدست آمده ۱۲۱۲ سانتی مورگان با متوسط فاصله ۱۱/۸۸ سانتی مورگان بود. برای تشخیص ارتباط بین ژنوتیپ نشانگر و ارزش صفت در افراد F_2 ، تجزیه QTL با استفاده از دو روش مکان یابی فاصله‌ای ساده و مکان یابی فاصله‌ای مرکب انجام گرفت. در جمعیت F_2 یک QTL پیوسته با عملکرد روی گروه پیوستگی ۲ شناسایی شد. تنوع فنوتیپی همبسته با این QTL در حدود ۸/۳ درصد و اثر افزایشی این QTL در حدود ۲/۶۲ گرم در بوته بود. در QTL شناسایی شده آل‌های والد گرده باعث افزایش عملکرد دانه در بوته‌های F_2 شدند.

واژه‌های کلیدی: برنج، نقشه پیوستگی، نشانگرهای AFLP، تجزیه QTL

مقدمه

یکی از اهداف مهم برنامه‌های به نژادی برنج افزایش عملکرد در واحد سطح می باشد. به دلیل کمی بودن این صفت مهم و کنترل آن به وسیله چندین ژن و تأثیر شدید عوامل محیطی روی آن مطالعه ژنتیکی آن بسیار مشکل است. در صورتی که بتوان با اعمال روش‌های مناسب، تعداد ژن‌ها، جایگاه ژنومی و سهم هر یک از آنها را در کنترل تنوع فنوتیپی عملکرد دانه مشخص نمود، شاید بتوان همانند صفات تک ژنی به اصلاح این صفت پرداخت. روش‌های تجزیه^۱ QTL راهکاری جدید و مناسب برای رسیدن به این هدف بوده و می‌توان از نتایج آن به خوبی در برنامه‌های به نژادی آینده استفاده نمود.

تشخیص لینکاژ بین QTL‌ها و نشانگرها، تعیین محل آنها

روی کروموزوم‌ها و برآورد اثر آنها روی صفت کمی به وسیله محققین زیادی در برنج مورد مطالعه قرار گرفته است (۵، ۱۴، ۱، ۱۳، ۳ و ۴). لی و همکاران (۸) تحقیقی را به منظور بررسی ژنتیکی سرعت رشد گیاهان زراعی و ارتباط آن با عملکرد و اجزای عملکرد در برنج روی ۲۵۸ لاین اینبرد نوترکیب (RIL) حاصل از تلاقی رقم Lemont و Teqing انجام دادند. سرعت رشد گیاه یک خصوصیت دینامیکی بوده که عملکرد نهایی را در غلات تعیین می‌کند. آنها هشت QTL برای سرعت رشد گیاه در چهار دوره متوالی شناسایی کردند که روی کروموزوم‌های ۳، ۵ (دو QTL)، ۸ (دو QTL)، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ قرار داشتند. برای عملکرد دانه نیز دو QTL شناسایی نمودند که روی کروموزوم‌های ۸ و ۱۱ برنج قرار داشتند.

۱- کارشناس ارشد اصلاح نباتات، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی^۲ - استادیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ۳- دانشیار زراعت، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، ۴- هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور

1- Quantitative trait loci

2- Recombinant inbred line

با استفاده از خانواده‌های BC_۲F_۲ و نشانگرهای ریزماهواره انجام دادند. آنها در مجموع هفتاد QTL در یک محیط و شش و شش QTL در محیط دوم با استفاده از تجزیه تک نشانگری شناسایی نمودند که هیجده QTL در نواحی کروموزومی مشابهی در هر دو محیط قرار داشتند. در روش مکان یابی فاصله‌ای، تعداد هشت صفت با کروموزوم ۷ در محیط اول و تعداد هفت صفت با کروموزوم ۵ در محیط دوم پیوسته بودند. به علاوه، با این روش چهل و یک QTL در محیط اول و سی و شش QTL در محیط دوم شناسایی شدند که بیست QTL در نواحی کروموزومی مشابهی در هر دو محیط مشخص شدند. آنها در بررسی خود در یک محیط تعداد هفت QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۴ (سه) و ۷ برای صفت عملکرد در گیاه شناسایی کردند که ۱۲/۹ تا ۳۹/۱۱ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه نمودند و در محیط دیگر تعداد یازده QTL را ردیابی نمودند که هر یک ۱۲/۲۹ تا ۲۳/۸۳ درصد از تنوع فنوتیپی عملکرد در گیاه را توجیه می‌نمودند. زیانو و همکاران (۱۷ و ۱۸) نیز برای صفت عملکرد تنها دو QTL روی کروموزوم‌های ۱ و ۲ شناسایی کردند که هر یک در حدود ۱۸ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه نمودند.

هدف از انجام این تحقیق تهیه نقشه پیوستگی نشانگرهای AFLP در جمعیت F_۲ حاصل از تلاقی رقم‌های برنج دم سفید و گرده، مکان‌یابی QTL های کنترل کننده عملکرد دانه روی نقشه پیوستگی تهیه شده در جمعیت F_۲ و برآورد نوع عمل ژن و سهم هر یک از QTL های شناسایی شده در تبیین تنوع فنوتیپی عملکرد دانه بوده است.

مواد و روش‌ها

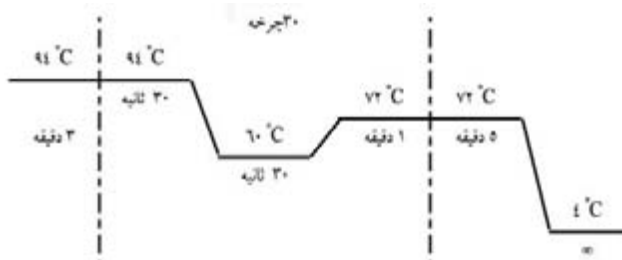
این تحقیق در خرداد ماه سال ۱۳۸۵ در آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور در رشت انجام شد. جمعیت تهیه نقشه تحقیق حاضر شامل ۱۹۲ بوته F_۲ حاصل از تلاقی دو رقم برنج ایرانی به اسامی دم سفید (یک رقم بومی گیلان با ارتفاع بلند، کیفیت خوب و عملکرد پایین) و گرده (یک رقم بومی زنجان با ارتفاع کم، کیفیت پایین و عملکرد متوسط تا زیاد) به همراه

یون و همکاران (۱۹) مکان یابی QTL های کنترل کننده اجزای عملکرد و برخی صفات مورفولوژیکی را در یک جمعیت BC_۲F_۲ حاصل از تلاقی *O. grandiglumis* و *O. sativa* رقم Hwaseongbyeol با استفاده از ۵۱ نشانگر SSR انجام دادند. آنها برای عملکرد دانه در بوته تنها یک QTL روی کروموزوم ۲ شناسایی نمودند که ۱۱/۵ درصد تنوع فنوتیپی این صفت را کنترل می‌کرد.

ماری و همکاران (۱۲) از لاین‌های بک کراس پیشرفته برای مکان یابی QTL های مرتبط با عملکرد دانه استفاده نمودند و با مکان یابی فاصله‌ای (IM) و مکان یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) تعداد سی و نه QTL برای ۱۳ صفت زراعی شناسایی کردند. آنها با کاربرد ۸۰ نشانگر SSR با روش CIM تعداد بیست و پنج QTL و با روش IM تعداد سی و یک QTL شناسایی کردند که هفده QTL در هر دو روش شناسایی شد. این سی و نه QTL در روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۸ و ۹ مکان یابی شدند. در این بررسی مشخص شد که ال‌های *O. rufipogon* اثر مثبتی روی ۷۴ درصد از QTL های شناسایی شده برای عملکرد و اجزای عملکرد دارند. آنها هفت QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲ و ۸ (پنج) برای صفت عملکرد و سه QTL روی کروموزوم‌های ۲ (دو QTL) ۹ برای صفت عملکرد دانه در بوته شناسایی نمودند. از هفت QTL شناسایی شده برای عملکرد، شش QTL در تحقیقات قبلی توسط ژوانگ و همکاران (۲۳)، لی و همکاران (۹)، زیانو و همکاران (۱۷) و یو و همکاران (۲۰) شناسایی شده بود.

سپتی نینگ سی و همکاران (۱۴) به منظور شناسایی QTL های عملکرد و اجزای عملکرد در یک جمعیت بک کراس پیشرفته حاصل از تلاقی رقم زراعی IR64 و رقم وحشی *O. rufipogon*، از ۱۶۵ نشانگر SSR و ۳۴ نشانگر RFLP استفاده نمودند. آنها با دو روش مکان یابی فاصله‌ای ساده و مکان یابی فاصله‌ای مرکب سه QTL روی کروموزوم‌های ۱ (دو QTL) و ۲ برای صفت عملکرد در بوته شناسایی کردند.

بروندانی و همکاران (۵) مکان یابی QTL ها را برای صفات وابسته به عملکرد در دو محیط



شکل ۱: برنامه دمایی مربوط به مرحله پیش تکثیر

مرحله تکثیر انتخابی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی سازگارهای Pst I و Mse I صورت گرفت. توالی این آغازگرها در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

با استفاده از این آغازگرها در مجموع ده ترکیب آغازگری مختلف برای انجام تکثیر انتخابی تشکیل شد. مخلوط ۱۵ میکرولیتری برای انجام این مرحله حاوی دو میکرولیتر از محصول PCR رقیق شده مرحله قبل، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی، ۰/۶ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر (۱۰ X)، ۰/۳ میکرولیتر مخلوط چهار نوع نوکلئوتید با غلظت ۱۰ میلی مولار و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز ۵ واحد بود. مخلوط فوق جهت تکثیر انتخابی تحت برنامه‌ای دو مرحله‌ای شامل ۱۲ چرخه و ۲۳ چرخه در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت (شکل ۲).

به منظور انجام الکتروفورز، ابتدا ۵ میکرولیتر مخلول رنگی بارگذاری فرماید به محصول PCR حاصل از تکثیر انتخابی مرحله قبل افزوده شد و به مدت سه دقیقه در دمای ۹۶ سانتیگراد به منظور انجام عمل واسرشته سازی قرار گرفت و سپس سریعاً روی یخ منتقل گردید. چهار میکرولیتر از این مخلوط روی ژل پلی اکریلامید ۶ درصد

جدول ۱: توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای انجام تکثیر انتخابی DNA

P51 Primer	5	-GACTGCGTACATGCAGCCA-3
P70 Primer	5	-GACTGCGTACATGCAGGTT-3
M36 Primer	5	-GATGAGTCCTGAGTAAACC-3
M47 Primer	5	-GATGAGTCCTGAGTAAACAA-3
M48 Primer	5	-GATGAGTCCTGAGTAAACAC-3
M49 Primer	5	-GATGAGTCCTGAGTAAACAG-3
M50 Primer	5	-GATGAGTCCTGAGTAAACAT-3
M51 Primer	5	-GATGAGTCCTGAGTAAACCA-3
M54 Primer	5	-GATGAGTCCTGAGTAAACCT-3

دو والد بود که قبلاً توسط ربیعی و همکاران (۱۳) تهیه شده بود.

روش AFLP همانند روش وس و همکاران (۱۵) با تغییرات اندکی انجام شد. ۲۰۰ نانو گرم از DNA ژنومی با استفاده از دو آنزیم محدودگر Pst I و Mse I در محلول واکنش ۴۰ میکرولیتری حاوی بـا فـر (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM R KCl and 0.1 mg/ml BCA) که این دو آنزیم در آن تا حدود ۱۰۰ درصد فعالیت دارند، به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مورد هضم قرار گرفتند. بعد از انجام مرحله گوارش، محلول ۱۰ میکرولیتری شامل سازگارهای (آداپتورهای) Pst I و Mse I به ترتیب با غلظت‌های ۵ و ۵۰ پیکومول و بافر اتصال (حاوی ATP) تهیه و به محلول واکنش این مرحله افزوده گردید.

و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دو ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا سازگارها به پایانه‌های برش یافته متصل گردند. سازگارهای مورد استفاده دارای توالی زیر بودند:

سازگار Mse I 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

3'-TACTCAGGACTCAT-5'

سازگار Pst I 5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3'

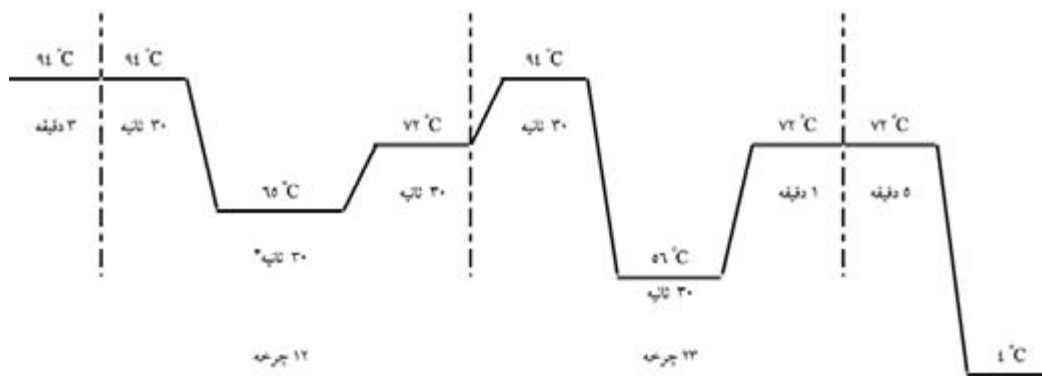
3'-CATCTGACGCATGT-5'

مرحله پیش تکثیر با استفاده از آغازگرهای Pst I و Mse I بدون نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳' انجام گرفت و دارای توالی زیر بودند:

آغازگر M00 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

آغازگر P00 5'-GACTGCGTACATGCAG-3'

مخلوط واکنش شامل دو میکرولیتر محلول DNA هضم شده و اتصال یافته با سازگارها (رقیق شده به نسبت ۵:۱)، یک میکرولیتر از هر یک از دو آغازگر فوق با غلظت ۶۰ نانوگرم در میکرولیتر، یک میکرولیتر کلرید منیزیم ۲ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر (۱۰ X)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط چهار نوع نوکلئوتید با غلظت ۱۰ میلی مولار و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز DNA (۵ واحد) بود. تیوب‌های حاوی مخلوط فوق، جهت انجام پیش تکثیر تحت یک برنامه دمایی ۳۰ چرخه‌ای در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند (شکل ۱).



شکل ۲: برنامه دمایی مورد استفاده برای انجام تکثیر انتخابی

در جمعیت F_2 به کمک نرم افزار Win QTL Cartographer (۲) مکان یابی گردیدند. برای انتخاب حداقل مقدار LOD یا LRT به منظور تعیین QTL های معنی دار از آزمون تبدیل^۱ استفاده گردید.

نتایج و بحث

ارزش های فنوتیپی مربوط به عملکرد والدین، نتاج F_1 و بوته های F_2 در جدول ۲ نشان داده شده است. انجام آزمون t-استیودنت که به منظور مقایسه میانگین بین والدین صورت پذیرفت و وجود تفاوت معنی داری را در سطح احتمال یک درصد برای عملکرد دانه نشان داد. این تفاوت بسیار معنی دار بین والدین، استفاده از آنها را برای مکان یابی QTL ها تسهیل می نمود. همان طور که در جدول ۲ نشان داده شد عملکرد والد دم سفید به میزان ۱۱/۷ گرم در بوته کمتر از والد گرده است. میانگین عملکرد نتاج F_1 ۵۴/۱۴ گرم در بوته بوده و از میانگین عملکرد هر دو والد بیشتر بود که می تواند دلیلی بر وجود هتروزیس در بوته های F_1 باشد.

بارگذاری و با توان ۸۵ وات به مدت یک ساعت و نیم الکتروفورز شد. برای رنگ آمیزی ژل ها از روش نیترات نقره استفاده گردید.

پس از اتمام مراحل آزمایشگاهی امتیاز دادن افراد F_2 بر اساس نوارهای (باندهای) چند شکل انجام شد. در این مرحله ابتدا نوارهای چند شکل در بین دو والد مشخص شدند و سپس همان نوارها در افراد F_2 ردیابی گردیدند. نحوه کار بدین صورت بود که به والدی که دارای یک نوار بود امتیاز ۱ و والد دیگر که فاقد آن نوار بود امتیاز ۰ تعلق گرفت. همین قاعده در مورد افراد F_2 نیز پیاده گشت.

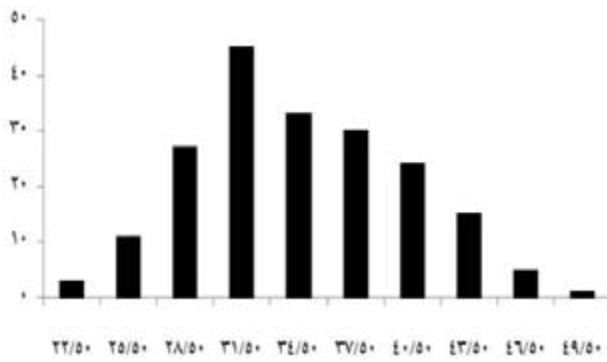
بعد از تعیین ژنوتیپ کلیه افراد F_2 از نظر این نشانگرها، داده های حاصل به صورت یک ماتریس 117×194 تنظیم و نقشه پیوستگی با استفاده از نرم افزار Map Manager v2.6.5 (۱۱) ترسیم و سپس مکان یابی QTL ها برای عملکرد دانه انجام گرفت. برای تجزیه QTL از روش های مکان یابی فاصله ای ساده (۷) و مکان یابی فاصله ای مرکب (۲۱ و ۲۲) استفاده گردید. QTL های کنترل کننده عملکرد دانه در بوته

جدول ۲: ارزش های فنوتیپی والدین و نسل های F_1 و F_2 و آزمون t برای مقایسه بین والدین

F_2 ($\bar{F}_2 \pm S_{\bar{F}_2}$)	F_1 ($\bar{F}_1 \pm S_{\bar{F}_1}$)	ارزش t $ \bar{P}_1 - \bar{P}_2 $	والدین		صفت عملکرد دانه
			گرده ($\bar{P}_2 \pm S_{\bar{P}_2}$)	دم سفید ($\bar{P}_1 \pm S_{\bar{P}_1}$)	
۳۴/۴۹±۰/۷۷	۵۴/۱۴±۰/۵۲	۱۳/۲۳**	۴۳/۲۵±۰/۶۶	۳۱/۵۴۹±۰/۵۷	

** معنی دار در سطح احتمال ۱٪.

1- Permutation test



شکل ۳: توزیع فراوانی ارزش‌های فنوتیپی عملکرد دانه در بوته‌های F_2 ، D و G به ترتیب ارزش فنوتیپی والدین دم‌سفید و گرده را نشان می‌دهد

آغازگری P70-M49 با ۱۷ نوار چند شکل دارای بیشترین چند شکلی و ترکیب‌های آغازگری P70-M54 و P51-M49 هر یک با ۸ نوار چند شکل دارای کمترین در بین کلیه ترکیب‌های آغازگری مورد مطالعه بودند. متوسط تعداد نوارهای چند شکل نیز ۱۱/۷ به ازای هر ترکیب آغازگری بود.

به منظور بررسی وجود یا عدم وجود انحراف فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی مشاهده شده از نسبت مندلی مورد انتظار (نسبت ۳:۱)، از آزمون χ^2 استفاده گردید. نتایج حاصل بیانگر این مطلب بود که از بین ۱۱۵ نشانگری که وارد نقشه شدند، ۳۲ نشانگر (۲۷/۸ درصد) از نسبت تفرق مورد انتظار مندلی (۳:۱) تبعیت نمی‌کنند و در واقع فراوانی آللی و ژنوتیپی آنها حداقل در سطح ۵ درصد متفاوت از آن چیزی بود که مورد انتظار می‌باشد. علت این امر را می‌توان بدین صورت بیان کرد که نشانگرهای AFLP تا اندازه‌ای از خود حالت همبازری نیز نشان می‌دهند که تنها در سطح پیشرفته‌ای می‌توان آن را شناسایی نمود و در واقع در مورد تعدادی از آنها حالت همبازری و به تبع آن نسبت ۱:۲:۱ بایستی مشاهده می‌شد که در اکثر موارد از این واقعیت چشم‌پوشی گردید و از آنجایی که این همبازری قابل تشخیص نبود باعث بروز مقداری خطا نیز شده است.

بعلاوه اشتباه استاندارد نتاج F_1 کمتر از هر دو والد می‌باشد و می‌تواند دلیلی بر هموستازی افراد هتروزیگوت F_1 در مقابل اثر عوامل نامساعد محیطی باشد. همچنین متوسط عملکرد بوته‌های F_2 به میزان ۱۹/۶۵ گرم در بوته نسبت به نتاج نسل F_1 کاهش داشت، در حالی که تنوع فنوتیپی مشاهده شده در آنها بیشتر از والدین و نسل F_1 بود. این موضوع مورد انتظار نیز بود، چرا که بوته‌های نسل F_2 از نظر ژنتیکی تفاوت داشته و تنوع مشاهده شده در آنها ناشی از عوامل ژنتیکی و غیر ژنتیکی است، اما والدین و نسل F_1 گروه‌های یکنواخت ژنتیکی بوده و تنوع آنها تنها به دلیل اثر عوامل محیطی است.

جدول ۳ نیز برخی از پارامترهای ژنتیکی مربوط به عملکرد از قبیل واریانس‌های فنوتیپی، ژنوتیپی و محیطی و وراثت پذیری عمومی را در والدین و نسل‌های F_1 و F_2 نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد سهم بیشتری از تنوع فنوتیپی مشاهده شده در عملکرد دانه توسط عوامل محیطی کنترل شده و سهم عوامل ژنتیکی تنها ۴۰ درصد است.

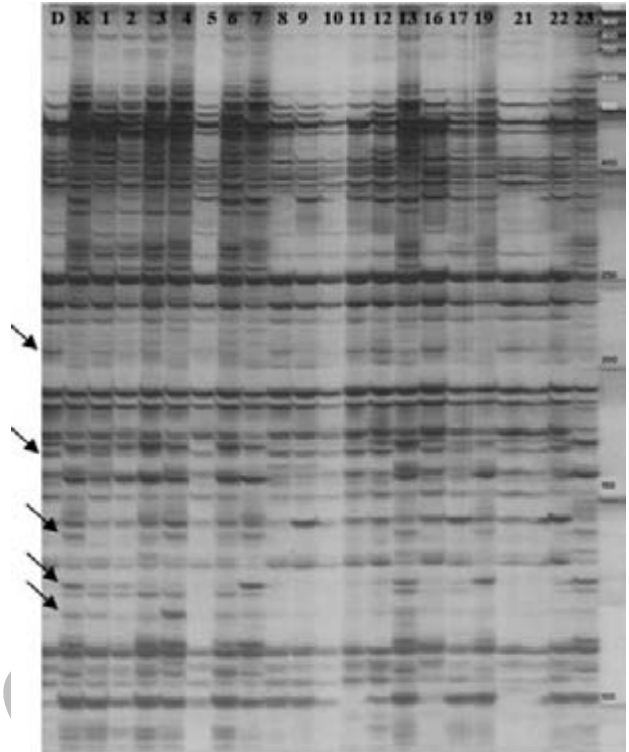
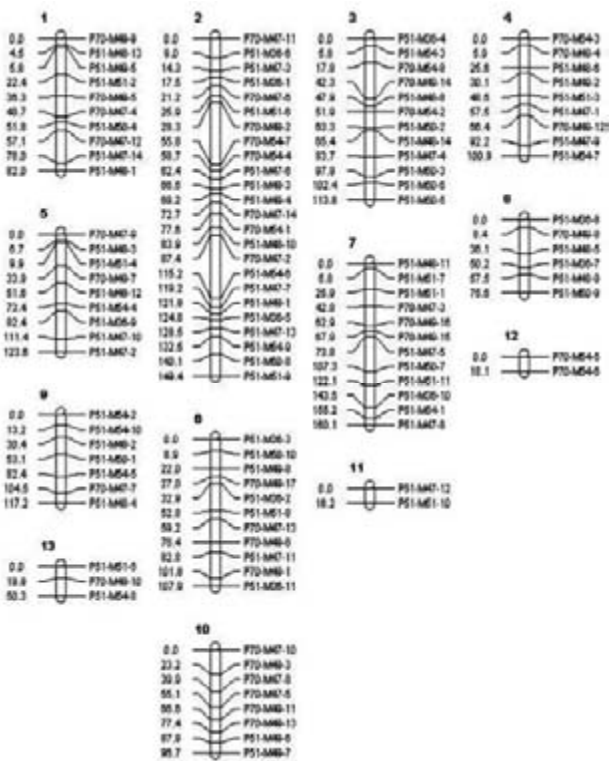
توزیع فراوانی ارزش‌های فنوتیپی مربوط به عملکرد در نتاج F_2 در شکل ۳ نشان داده شده است. انجام آزمون‌های چولگی و کشیدگی نشان داد که توزیع فنوتیپی پیوسته و تقریباً نرمالی در نتاج F_2 وجود دارد که احتمالاً دلیلی بر کمی بودن صفت مورد مطالعه می‌باشد.

جستجوی چند شکلی در بین والدین و نتاج F_2

در این تحقیق با استفاده از ده ترکیب آغازگری مختلف در مجموع ۱۱۷ نوار چند شکل در بین دو والد شناسایی شد و با استفاده از همین نوارها ژنوتیپ والدین و افراد F_2 مشخص شد. شکل ۴ الکتروفورز محصول PCR ترکیب آغازگری P70-M47 تعدادی از افراد را روی ژل پلی‌اکریلامید ۶٪ نشان می‌دهد. مقایسه چند شکلی در ترکیب‌های آغازگری مورد مطالعه نشان داد که ترکیب

جدول ۳: واریانس‌های فنوتیپی، ژنتیکی و محیطی و وراثت پذیری عمومی عملکرد دانه

وراثت پذیری عمومی	واریانس ژنتیکی	واریانس محیطی	واریانس فنوتیپی				صفت عملکرد دانه
			F_2	F_1	P_2	P_1	
۰/۴	۱۲/۲۳	۱۷/۶۷	۲۹/۹	۱۴/۵۴	۲۲/۱۲	۱۶/۳۵	عملکرد دانه



شکل ۵: نقشه پیوستگی ۱۱۷ نشانگر AFLP در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی گرده×دمسفيد. در سمت راست گروه‌های پیوستگی، اسامی نشانگرها و در سمت چپ آنها فاصله ژنتیکی بین نشانگرها بر اساس تابع کوسامبی نشان داده شده است.

شکل ۴: نمایی از ژل مربوط به الکتروفورز تعدادی از افراد با ترکیب آغازگری P70-M47 به ترتیب از چپ به راست، الگوی توربندی والد دم‌سفید، والد گرده، ۲۰ بوته F_2 و در نهایت DNA استاندارد (Fermentas, 50 bp) را نشان می‌دهند. پیکان‌ها محل نوارهایی را نشان می‌دهند که چند شکلی خوبی در بین والدین و افراد F_2 نشان دادند.

پیوسته نبودند و به عنوان نشانگرهای ناپیوسته شناسایی شدند.

مکان یابی QTL های کنترل کننده عملکرد

به منظور ردیابی QTL های کنترل کننده عملکرد از دو روش مکان یابی فاصله‌ای ساده (SIM) ^۱ و مکان یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) استفاده شد. برای این منظور از نرم افزار Win QTL Cartographer (۲) استفاده گردید و QTL های کنترل کننده عملکرد دانه در جمعیت F_2 شناسایی شدند. برای انتخاب آستانه معنی داری LOD ^۳ یا LRT ^۴ از آزمون تبدیل استفاده گردید و نرم افزار Win QTL Cartographer حداقل $LRT=9$ را محاسبه نمود.

مکان یابی فاصله‌ای ساده (SIM)

به منظور شناسایی موقعیت ژنومی QTL ها ابتدا از روش

بایستی متذکر شد که نشانگرهای AFLP در گروه نشانگرهای غالب قرار می‌گیرند و تکنیک مربوط به آنها نیز بر همین اساس پایه ریزی شده است و امکانات موجود نیز تنها همین حالت غالب را نشان می‌دهند.

تهیه نقشه پیوستگی

نقشه پیوستگی ۱۱۷ نشانگر چند شکلی مورد مطالعه در شکل ۵ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود ۱۱۷ نشانگر در ۱۳ گروه پیوستگی قرار گرفتند. نقشه حاصل ۱۲۱۲ سانتی مورگان از ژنوم برنج را تحت پوشش قرار داد و فاصله هر دو نشانگر مجاور از یکدیگر به طور متوسط ۱۱/۸۸ سانتی مورگان برآورد شد (شکل ۵). بعلاوه دو نشانگر P70-M47-1 و P51-M48-7 با هیچ یک از نشانگرها

1- Simple Interval Mapping

2- Log-likelihood

3- Likelihood Ratio Test

جدول ۴: QTL های شناسایی شده برای عملکرد دانه برنج به روش مکان یابی فاصله‌ای ساده (SIM) و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) در جمعیت F_۲

روش	QTL	گروه پیوستگی	نشانه‌های مجاور	موقعیت * (cM)	LOD	R ^۲	اثر افزایشی
SIM	gy2	۲	P51-M38-1/P70-M47-6	۱۷/۴۹	۲	۴/۸	۲/۶۲
CIM	gy2	۲	P51-M38-1/P70-M47-6	۱۷/۴۹	۳/۷۷	۸/۳	۴/۷۴

a- فاصله داده شده، فاصله QTL را از ابتدای گروه پیوستگی نشان می‌دهد. b- درصد واریانس فنوتیپی توجیه شده به وسیله QTL مورد نظر را بیان می‌کند.

شناسایی شده در جمعیت F_۲ در این روش دارای LOD برابر با ۳/۷۷ بود و در حدود ۸/۳ درصد از تنوع فنوتیپی عملکرد دانه در بوته را توجیه کرد. این QTL بر روی گروه پیوستگی ۲ و در حد فاصل بین نشانه‌های P70-M47-6 و P51-M38-1 قرار داشته و اثر افزایشی آن ۴/۷۴ گرم در بوته بود و در آن الل‌های والد گرده باعث افزایش عملکرد دانه در بوته می‌شوند.

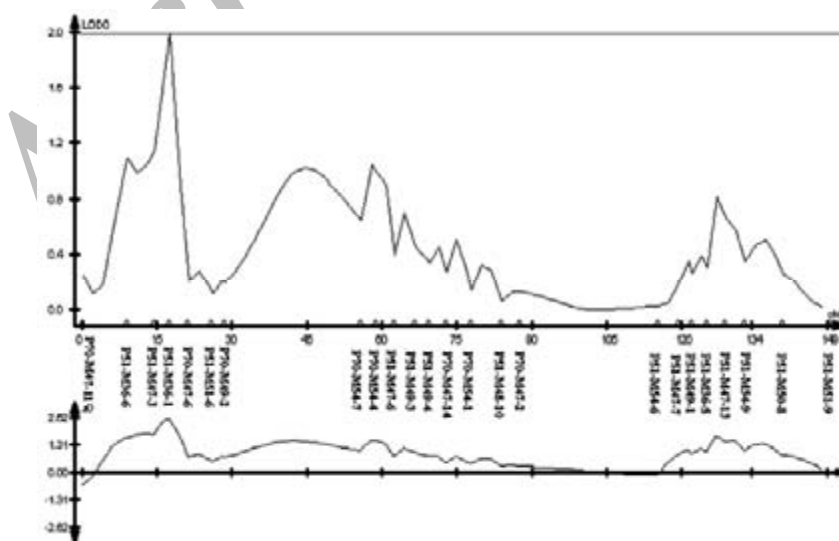
مقایسه دو منحنی LOD گروه پیوستگی دوم مربوط به دو روش مختلف مورد استفاده تفاوت‌هایی را نسبت به هم نشان داد. در منحنی LOD مربوط به روش مکان‌یابی فاصله‌ای ساده (شکل ۶)، QTL شناسایی شده دارای مقدار LOD برابر با ۲ و اثر فنوتیپی ۴/۸ درصد بود، در حالی که QTL شناسایی شده در روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (شکل ۷) با اینکه دقیقاً در همان محل شناسایی گردید دارای LOD برابر با ۳/۷۷ و اثر فنوتیپی ۸/۳ درصد بود. اگر به شکل ۶ توجه شود مشاهده می‌گردد که این منحنی دارای نقاط پیک دیگر غیر از محل QTL شناسایی شده می‌باشد

مکان یابی فاصله‌ای ساده (۷) استفاده گردید. در جمعیت F_۲ تنها یک QTL کنترل کننده عملکرد دانه شناسایی شد که روی گروه پیوستگی ۲ و بین نشانه‌های P51-M38-1 و P70-M47-6 قرار داشت و ۴/۸ درصد از تنوع فنوتیپی عملکرد دانه در بوته را توجیه نمود (جدول ۴ و شکل ۶). اثر افزایشی این QTL در حدود ۲/۶۲ گرم در بوته و LOD آن برابر با ۲ بود و در آن الل‌های والد گرده باعث افزایش عملکرد دانه شدند.

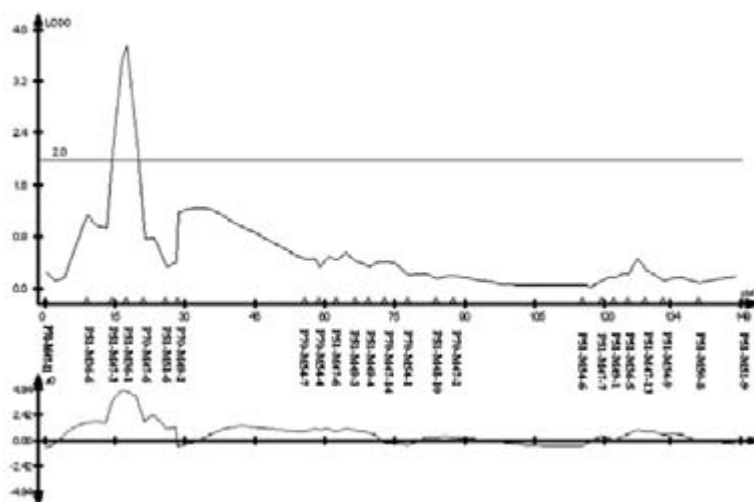
مکان یابی فاصله‌ای مرکب (CIM)

در این روش یک آزمون فاصله‌ای برای ردیابی QTL در یک فاصله انجام می‌شود و اثر سایر QTL ها به عنوان متغیرهای کوواریت از اثر اصلی جدا شده و در پی آن اشتباه آزمایشی کاهش یافته و مکان یابی QTL ها با دقت بیشتری صورت می‌گیرد (۱).

نتایج حاصل از این تجزیه در جدول ۴ نشان داده شده است. همان طور که در جدول نیز مشاهده می‌شود QTL



شکل ۶: منحنی LOD مربوط به گروه پیوستگی ۲ و نمودار اثر افزایشی مربوطه با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای ساده (SIM) در جمعیت F_۲



شکل ۷: منحنی LOD برای ردیابی QTL در روش مکان یابی فاصله‌ای مرکب برای صفت عملکرد دانه و نمودار اثر افزایشی مربوطه در روی گروه پیوستگی شماره ۲ در جمعیت F_۲

که نسبت به نقاط همجوار خود نقطه پیک محسوب می‌شوند. از آنجایی که این نقاط پیک ثانوی در روش CIM به عنوان متغیر کواریت وارد مدل رگرسیون چند گانه می‌شوند و اثر آنها به عنوان QTL های ثانوی از اثر QTL فوق جدا می‌گردد (۱)، لذا به نظر می‌رسد که اثر QTL های همجوار باعث کاهش LOD نقطه پیک و اثر فنوتیپی آن در روش SIM شده و در مقابل جدا کردن اثر آنها باعث افزایش LOD و اثر فنوتیپی QTL در روش CIM شده است.

مقایسه نتایج حاصله از آنالیز داده‌ها با نتایج محققین دیگر نکات جالبی را روشن می‌نماید. همان طور که زیانو و همکاران (۱۶)، لین و همکاران (۱۰) و بن موسی و همکاران (۴) نیز بیان کرده‌اند که تعداد QTL های کمی برای عملکرد قابل شناسایی است. لی و همکاران (۸) وراثت پذیری عملکرد دانه را ۶۰/۱ درصد برآورد نمودند. آنها با استفاده از روش CIM در یک جمعیت ۲۵۸ لاینی RIL دو QTL روی کروموزوم‌های ۸ و ۱۱ شناسایی کردند که اثر افزایشی آنها به ترتیب ۳/۲۹ و ۲/۴۵ بود. این دو QTL به ترتیب ۱۶/۴ و ۹/۱ درصد از تنوع فنوتیپی عملکرد دانه را توجیه کردند. یون و همکاران (۱۹) با به کارگیری نشانگرهای SSR در یک جمعیت F_۲ توانستند یک QTL روی کروموزوم ۲ شناسایی کنند که ۱۱/۵ درصد از تنوع فنوتیپی را در کنترل داشت. همان طور که ملاحظه می‌شود آنها نیز اثر فنوتیپی پایینی برای QTL فوق برآورد کردند، اما اثر افزایشی QTL

بسیار زیاد و حدود ۳۰/۵ گرم در بوته بود. ماری و همکاران (۱۲) با استفاده از ۲۵۱ خانواده تست کراس و با به کارگیری ۸۰ نشانگر SSR برای صفت عملکرد دانه در واحد بوته به روش SIM سه QTL روی کروموزوم‌های ۲ (دو QTL) و ۹ با اثرهای افزایشی به ترتیب برابر ۳/۷۹، -۲/۷ و -۳/۸۴ ردیابی نمودند که به ترتیب ۱۴/۲، ۷/۰۵ و ۲۳/۲ درصد از تنوع فنوتیپی عملکرد دانه در بوته را در کنترل داشتند. این محققین به روش CIM تنها یک QTL روی کروموزوم ۲ شناسایی نمودند که دارای اثر افزایشی ۳/۵۸ بوده و ۱۲/۲۱ درصد از تنوع فنوتیپی صفت عملکرد در گیاه را توجیح می‌نمود. بعلاوه، برای صفت عملکرد در واحد کرت به روش SIM شش QTL و با روش CIM چهار QTL را مکان یابی نمودند که در روش SIM دو QTL دارای اثر فنوتیپی کمتر از ۱۰ درصد بودند و غیر از یک QTL، اثر افزایشی سایر QTL ها بسیار بالا بود. دامنه تأثیر این مکان‌های ژنی روی توزیع فنوتیپی صفت از ۵/۸۶ تا ۲۰/۲۴ درصد متغیر بود. QTL هایی که به روش CIM ردیابی شدند به جز یکی از آنها، بقیه زیر ۱۰ درصد از تنوع فنوتیپی عملکرد در واحد کرت را در کنترل داشتند. سپتی نینگ سی و همکاران (۱۴) با استفاده از ۲۸۵ خانواده BC_۲F_۲ و به کمک ۱۶۵ نشانگر SSR و ۳۴ نشانگر RFLP توانستند با استفاده از هر دو روش SIM و CIM سه QTL روی کروموزوم‌های ۱ (دو QTL) و ۲ برای صفت عملکرد دانه در بوته شناسایی کنند که در هر دو روش همچون تحقیق

QTL‌های بزرگ اثر تلقی نمود. تنها در بررسی برون‌دانی و همکاران (۵) تعدادی از QTL‌ها بیش از ۲۰ درصد از تنوع فنوتیپی عملکرد گیاه را بر عهده داشتند. در مجموع تفاوت‌های مشاهده شده حاصل از مقایسات انجام گرفته را به دلایل مختلفی می‌توان نسبت داد از جمله اینکه صفت عملکرد همان طور که انتظار می‌رود از لحاظ بیولوژیکی بسیار پیچیده بوده و همان گونه که بررسی‌های مختلف نشان می‌دهند وراثت پذیری این صفت چندان بالا نیست و از آن جایی که QTL‌های مختلف روی کروموزوم‌های مختلف ردیابی شده‌اند می‌توان این واقعیت را نتیجه گیری کرد که ژن‌های کنترل کننده عملکرد در تمامی محیط‌ها به یک اندازه بیان نمی‌شوند و ممکن است یک ژن یا QTL در یک محیط تظاهر یافته و قابل ردیابی باشد، در حالی که در محیط دیگر اثر خود را بروز نداده و در نتیجه قابل شناسایی نباشد. از سوی دیگر در مطالعات مختلف از جمعیت‌های متنوعی با زمینه‌های ژنتیکی متفاوت استفاده شده است که هر یک ویژگی‌های خاص خود را داشته و متعاقباً نتایج متفاوتی را نیز بدست می‌دهند. در ضمن نباید فراموش کرد که ابزار دیگر این پژوهش‌ها یعنی نشانگرهای مورد استفاده نیز نقش به‌سزایی در حصول نتیجه دارند و از آنجایی که در تحقیق حاضر از نشانگرهای غالب AFLP استفاده شد و در گزارش‌های آورده شده از محققین دیگر از نشانگرهای دیگری نظیر نشانگرهای RFLP و SSR استفاده شده است، عدم انطباق کامل نتایج دور از انتظار نیست. به هر حال برای اینکه یک نتیجه قطعی در مورد QTL‌های کنترل کننده عملکرد دانه در برنج بدست آید، لازم است تحقیقات بیشتری در جمعیت‌های مختلف با زمینه‌های ژنتیکی متفاوت و در شرایط محیطی مختلف صورت گیرد تا با مقایسه نتایج مختلف ایده بیشتری از QTL‌ها و اثرات آنها بدست آید.

حاضر هر یک از QTL‌ها کمتر از ۱۰ درصد از تنوع فنوتیپی عملکرد دانه را در کنترل داشتند. اثر افزایشی QTL‌ها نیز در روش SIM در دامنه ۱/۰۱ تا ۲/۳۰ و در روش CIM در دامنه ۲/۶۳ تا ۳/۲۳ گرم در بوته قرار داشت. در بررسی آنها نیز همچون پژوهش حاضر کلیه QTL‌های شناسایی شده در روش SIM به روش CIM نیز شناسایی گردید و تنها پارامترهای برآورده شده به دلایلی که قبلاً ذکر شد تغییر نمود. مطالعه آنها نیز نشان داد که صفت عملکرد بیش از آنکه تحت تأثیر عوامل ژنتیکی باشد، تحت تأثیر فاکتورهای محیطی است. برون‌دانی و همکاران (۵) در بررسی خود از یک جمعیت BC_۲F_۲ در دو شرایط محیطی مختلف استفاده کردند و با استفاده از ۱۵۷ نشانگر SSR و STS، در یک محیط تعداد هفت QTL کنترل کننده عملکرد دانه شناسایی کردند که روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۴ (سه QTL) و ۷ قرار داشتند و ۱۲/۹ تا ۳۹/۱۱ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه نمودند. در محیط دوم تعداد یازده QTL ردیابی نمودند که هر یک ۱۲/۲۹ تا ۲۳/۸۳ درصد از تنوع فنوتیپی عملکرد در گیاه را توجیه می‌نمودند. در مقابل، زی‌او و همکاران (۱۷ و ۱۸) برای صفت عملکرد تنها دو QTL روی کروموزوم‌های ۱ و ۲ شناسایی کردند که هر یک در حدود ۱۸ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه می‌کردند.

نتیجه حاصل از آنالیز داده‌های تحقیق حاضر و پژوهش افراد دیگر حاکی از این مطلب است که عوامل ژنتیکی کنترل کننده عملکرد تأثیر کمی بر این صفت دارند و در مقابل عوامل محیطی اثر عمده‌ای بر آن می‌گذارند و از آنجایی که QTL بدست آمده در این مطالعه و نیز QTL یا QTL‌های گزارش شده توسط افراد دیگر درصد پایینی از تنوع فنوتیپی را در کنترل صفت عملکرد بر عهده دارند، بر اساس گفته لین و همکاران (۱۰)، نمی‌توان آنها را به عنوان

منابع

- ۱- ربیعی، ب. ۱۳۸۲. تجزیه QTL کنترل کننده صفات دانه در ارقام برنج ایرانی. رساله دکتری. دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.
- 2-Basten, C.J., B.S. Weir and Z.B. Zeng. 2001. QTL Cartographer: a reference manual and tutorial for QTL mapping. North Carolina State University. USA. Pp. 163.
- 3-Benmoussa, M., A. Achouch and J. Zhu. 2005. QTL analysis for yield components in rice (*Oryza sativa* L.) under different environments. Journal Central European Agriculture. 6 (3): 317-322.
- 4-Benmoussa, M., A. Achouch, S.A. Snoussi and J. Zhu. 2006. Conditional QTL analysis of genetic main effects and genotype × environment interaction effects for yield in rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Food, Agriculture & Environment. 4 (1): 157-162.

- 5-Brondani, C., PHN. Rangel, RPV. Brondani and ME. Ferreira: 2002. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite makers. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1192-1203.
- 7-Lander, E.S. and D. Botstein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- 8-Li, S.B., Z.H. Zhang, Y. Hu, C.Y. Li, X. Jiang, T. Mao, Y.S. Li and Y.G. Zhu. 2006. Genetic dissection of developmental behavior of crop growth rate and its relationships with yield and yield related traits in rice. *Plant Science.* 170: 911-917.
- 9-Li, Z., S.R. Pinson, W.D. Park, A.H. Paterson and J.W. Stansel. 1997. Epistasis for three grain yield components in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics* 145: 453-465.
- 10-Lin, H. X., H. R. Qian, J.Y. Zhuang, J. Lu, S.K. Min, Z.M. Xiong, N. Huang, and K.L. Zheng. 1996. RFLP mapping of QTLs for yield and related characters in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 92: 920-927.
- 11-Manly, K.F. and J.M. Olson. 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to map manager QT. *Mammalian genom* 10: 327-334.
- 12-Marri, P.R., N. Sarla, V. Laxminarayana, R and EA Siddiq. 2005. Identification and mapping of yield and yield related QTLs from an Indian accession of *Oryza rufipogon*. *BMC Genetics* 6: 33-46.
- 13-Rabiei, B., M. Valizadeh, B. Ghareyazie, M. Moghaddam & A.J. Ali, 2004. Identification of QTLs for rice grain size and shape of Iranian cultivars using SSR markers. *Euphytica* 137: 325-332.
- 14-Septiningsih, EM., J. Prasetyono, E. Lubis, T.H. Tai, T. Tjubaryat, S. Moeljopawiro and S.R. McCouch: 2003. Identification of quantitative trait loci for yield and yield components in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *O. rufipogon*. *Theor. Appl. Genet.* 107:1419-1432.
- 15-Vos, P., R. Hoger, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
- 16-Xiao, J., J. Li, L.P. Yuan, and S.D. Tanksley. 1995. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in recombinant inbred population derived from a sub specific rice cross. *Theor. Appl. Genet.* 92: 230-244.
- 17-Xiao, J.H., J.M. Li, L.P. Yuan and S.D. Tanksley. 1996. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. *Theor. Appl. Genet.* 92: 230-244.
- 18-Xiao, J., J. Li., S. Grandillo., S.N. Ahn., L. Yuan., S.D. Tanksley and S.R. McCouch: 1998. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics* 150:899-909.
- 19-Yoon, D.-B., K.-H. Kang., H.-J. Kim., H.-G. Ju., S.-J. Kwon., J.-P. Suh and O.-Y. Jeong. 2006. Mapping quantitative trait loci for yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza grandiglumis* and the *O. sativa japonica* cultivar Hwaseongbyeo. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1052-1062.
- 20-Yu, S.B., J.X. Li, C.G. Xu, Y.F. Tan, Y.J. Gao, X.H. Li, Q. Zhang and M.A. Sagai Maroof. 1997. Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. *Proc Natl Acad Sci.* 94: 9226-9231.
- 21-Zeng, Z.B. 1993. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10972-10976.
- 22-Zeng, Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.
- 23-Zhuang, J.Y., H.X. Lin, J. Lu, H.R. Qian, S. Hittalmani, N. Huang and K.L. Zheng. 1997. Analysis of QTL × environment interaction for yield components and plant height in rice. *Theor. Appl. Genet.* 95: 799-808.

Mapping QTLs controlling yield in two Iranian rice cultivars-F₂ populations

S. Movafegh,¹ B. Rabiee², A. Zare Feizabadi³, G. Taheri⁴

Abstract

In this study, a linkage map of 117 AFLP markers was constructed in an F₂ population derived from a cross between two Iranian rice varieties, Domsephid and Gerdeh. This map used for identification of the QTLs controlling yield in F₂. Average grain yield in parents Gerdeh and Domsephid were 43.25 and 31.55 g/plant respectively, and t-test showed significant difference (P<0.01) between two parents. Genotypes were determined for F₂ individuals using 117 AFLP markers. The linkage map of the population was generated with Map Manager V2.6.5. Map length was 1212 cM with an average interval size of 11.88 cM. QTLs analysis were carried out to determine the relationship between marker genotypes and trait values in F₂ individuals using simple interval mapping (SIM) and composite interval mapping (CIM). In F₂ population, one QTL associated with yield was determined on linkage group 2. Phenotypic variation associated with this QTL and its additive effect was 8.3% and 4.74 gr, respectively. In this QTL, alleles from Gerdeh increased grain yield.

Key words: Rice, Linkage map, AFLP markers, QTL analysis

1, 3- Research Center of Agriculture and Natural Resources of Khorasan Razavi, 2- Guilan University and 4- Islamic Azad University, Neishabour.