

شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات زراعی در جمعیت حاصل از تلاقی ارقام بومی و موتانت برنج رقم طارم

مهناز کاتوزی^۱، سعید نواب‌پور^۲، حسین صبوری^{۳*} و علی اکبر عبادی^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح‌نیات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان و گروه

اپی‌ژنتیک، بیوتکنولوژی و اصلاح‌نیات موسسه تحقیقات آگروسکوپ، سوئیس

۲- دانشیار، گروه اصلاح‌نیات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۳- دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاوس، گنبد کاووس

۴- استادیار، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۰)

چکیده

به منظور شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات زراعی، ارقام وحشی و موتانت برنج رقم طارم تلاقی داده شدند. برای تهیه نقشه پیوستگی، نشانگرهای SSR، JSSR، iPBS و IRAP چند شکل در ۲۵۰ فرد از نسل دوم تلاقی تکثیر شدند. وزن ۱۰۰ دانه، تعداد پنجه، تعداد دانه پر، تعداد دانه‌های پوک، ارتفاع بوته، طول خوشه، تعداد خوشچه، قطر ساقه، طول، عرض و شکل دانه، وزن کاه، طول دوره رسیدگی، طول و عرض برگ پرچم روی کلیه افراد جمعیت اندازه‌گیری شد. نقشه پیوستگی ۹۷۰/۹ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد. فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر با ۱۲/۷۷ سانتی‌مورگان به دست آمد. در مجموع ۱۳ QTL برای صفات ارزیابی شده شناسایی شد. آلل‌های انتقال‌یافته از والدین در QTL‌های ردیابی شده برای کلیه صفات مورد بررسی در جهت افزایش عملکرد دانه عمل نمودند. بیشترین تعداد QTL برای روز تا گلدهی ردیابی شد. سه QTL روی کروموزوم‌های ۱۰ و ۴ (دو QTL) برای تعداد روز تا گلدهی مکان‌یابی شد. qLDF-4a و qLDF-4b دارای اثر افزایشی منفی بودند و آلل‌های والد طارم محلی موتانت باعث کاهش تعداد روز تا گلدهی شد. QTL‌های مذکور مجموعاً ۱۱/۶ درصد واریانس فنوتیپی را توجیه نمودند. نظر به این‌که جمعیت مورد بررسی از تلاقی ارقام بومی و موتانت طارم تهیه شدند و افراد جمعیت حاصل تنها در ژن‌های موتانت یافته تنوع نشان دادند؛ لذا QTL‌های ردیابی شده در این مطالعه می‌توانند دقت بیشتری در مکان و میزان بیان تغییرات داشته باشند و پس از تعیین اعتبار آنها، قابل توصیه برای برنامه‌های به‌نژادی انتخاب به کمک نشانگر می‌باشند.

واژگان کلیدی: برنج، موتانت، نشانگر مولکولی، نقشه پیوستگی، QTL

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: hossein.sabouri@gonbad.ac.ir

مقدمه

پس از گندم، برنج دومین غله است که در سطح وسیعی کشت می شود و یکی از عمده ترین ماده غذایی حدود نیمی از مردم دنیا را تشکیل می دهد. بیش از ۷۰ درصد برنج جهان در مناطق گرمسیری مرطوب آسیا کشت می شود و فقط نقاط نسبتاً کمی از مناطق خشک به کشت آن اختصاص دارند (Tajbakhsh and Pourmirza, 2007).

یکی از مهم ترین کاربردهای نشانگرهای مولکولی تهیه نقشه های ژنتیکی است که بر اساس آن می توان ژن های کنترل کننده صفات مطلوب را از نظر ترتیب و فاصله ژن ها و نشانگرها تعیین نمود. شناسایی نشانگرهای مولکولی کاملاً پیوسته با ژن مورد نظر و مکان یابی آن روی کروموزوم، یک هدف مهم در اصلاح نباتات برای کلون کردن ژن ها و گزینش به کمک نشانگر است. به کمک نشانگرهای پیوسته می توان صفت هدف را در مکان های غیر هدف شناسایی کرد (Liu, 1997).

در مجموع ۸۶۴۶ مورد QTL (تا سال ۲۰۱۸) برای کلیه صفات در این پایگاه به ثبت رسیده است که از این تعداد بیشترین سهم به کروموزوم شماره یک تعلق دارد (Kazerani, 2018). براساس اطلاعات موجود در پایگاه گرامینه (<http://www.gramene.org>) مطالعات زیادی در زمینه مکان یابی کلیه صفات صورت گرفته و مشخص شده که نواحی کنترل کننده آن ها تقریباً روی هر ۱۲ کروموزوم برنج به نسبت های متفاوت توزیع شده اند. برای مثال، مکان ژنی مرتبط با صفات زراعی در جمعیت های مختلف برنج در فاصله ی RG939-RG620 در کروموزوم چهار شناسایی شدند. یکی از ویژگی های منحصر به فرد این ناحیه این است که هر دو QTL مربوط به عملکرد و سایر صفات، هم مکان هستند (Babu et al., 2003). برای تاریخ گلدهی شش QTL توسط یو و همکاران (Yu et al., 2002) شناسایی شد که از این تعداد پنج QTL در دو سال ردیابی شدند و تحت اثر سال قرار نگرفتند. از بین QTL های ردیابی شده یک QTL روی کروموزوم ۱۱ تحت تأثیر عوامل محیطی قرار گرفت و فقط در یک سال شناسایی شد. صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2009)

نشان دادند که QTL های کنترل کننده وزن دانه، تعداد سنبلیچه و شاخص برداشت روی کروموزوم ۲، ۳، ۷ و ۱۲ هم پوشانی دارند. صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2010) در فاصله دو نشانگر RM7424 و RM1553، یک QTL برای صفت تعداد روز تا گلدهی و یک QTL برای صفت طول خروج خوشه از غلاف مکان یابی کردند. گاهی در پژوهش های متفاوت QTL های یکسانی ردیابی نمی شوند، که این امر می تواند ناشی از عوامل بسیاری هم چون متفاوت بودن جمعیت مکان یابی و والدین مورد استفاده باشد (Sabouri et al., 2010; Sabouri et al., 2011; Sabouri et al., 2014; Sabouri et al., 2016; Jafarzadeh Razmi et al., 2020). نکته قابل توجه در تمامی مطالعات مذکور اهمیت QTL های بزرگ اثر ردیابی شده در برنامه های اصلاحی است. برای نیل به این مقصود، پس از تعیین اعتبار QTL های بزرگ اثر می توان از آن ها برای انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود (Collard et al., 2005).

اگرچه مطالعات زیادی در زمینه مکان یابی QTL های کنترل کننده صفات در برنج در جمعیت های مختلف انجام شده است اما این مطالعه از نظر اینکه والدین آمیزش دو رقم بومی و موتانت آن می باشند، منحصر به فرد است و تاکنون گزارشی مشابه آن در بررسی منابع دیده نشده است.

مواد و روش ها

ارزیابی های فنوتیپی: تولید لاین های طارم محلی موتانت توسط عبادی و همکاران (Ebadi et al., 2014) در موسسه تحقیقات برنج با هدف دستیابی به ارقام متحمل به خشکی انجام شد. موتاسیون اولیه در سال ۱۳۷۹ انجام شد. در این راستا ابتدا جهت تعیین دز بهینه پرتوتابی، بذور را با دزهای مختلف اشعه گاما (۰، ۱۵۰، ۱۸۰، ۲۰۰، ۲۳۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ گری) در گاماسل در پژوهشگاه کشاورزی هسته ای کرج پرتوتابی شد. LD50 زنده مانگی گیاهچه ها در دزهای مختلف محاسبه و بعد از تعیین دز بهینه، بذور طارم محلی را با دز بهینه ۲۵۰ گری پرتوتابی شدند. سپس جمعیت گیاهی نسل M₁ ایجاد شد. از هر

گرم)، طول دوره رسیدگی (تعداد روز از نشاء تا رسیدگی کامل دانه)، طول برگ پرچم (برحسب سانتی‌متر)، عرض برگ پرچم (برحسب سانتی‌متر) روی ۲۵۰ بوته اندازه‌گیری شد.

ارزیابی‌های ژنوتیپی: آزمایش‌های ژنوتیپی تحقیق حاضر در آزمایشگاه‌های گیاه‌شناسی، اصلاح‌نباتات و ژنتیک دانشگاه گنبدکاووس انجام گرفت.

استخراج DNA ژنومی: نمونه‌گیری در مرحله حداکثر پنجه-زنی از برگ‌های سالم هر ژنوتیپ انجام گرفت. نمونه‌ها به وسیله نیتروژن مایع آسیاب گردید و تا زمان انجام مراحل استخراج در تیوپ‌های جداگانه در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی از برگ-های بوته‌های برنج به روش ¹CTAB (Saghaei Maroof et al., 1994) انجام گرفت. برای اندازه‌گیری کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز افقی مدل Bioneer (ساخت انگلیس) استفاده شد و از طریق نحوه تشکیل نوارها روی ژل توسط هر نمونه در جریان الکتروفورز کیفیت نمونه‌ها بررسی شد.

چگونگی تعیین نشانگرها و PCR: برای انتخاب نشانگرهای ریزماهواره مناسب از پایگاه اطلاعاتی ژنتیکی گرامینه^۲ استفاده شد. در این تحقیق برای تکثیر DNA از دستگاه ترموسایکلر مدل iCycler (BIORAD)، با بلوک ۹۶ تایی برای تیوپ‌های PCR به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر استفاده شد. برای تفکیک و نمایش آلل‌های جایگاه‌های نشانگرها از ژل پلی‌اکریل‌آمید با غلظت ۸٪ و از دستگاه الکتروفورز مدل Clevear VS20، از نوع عمودی دوطرفه که ابعاد ژل‌های آن ۱۸ × ۱۸ سانتی‌متر و ضخامت ژل‌ها برابر دو میلی‌متر بود استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR آغازگرهای ISSR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. برای تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار Map Manager QTX 17 (Manly and Olson, 1999) استفاده شد. فواصل نشانگری در این نقشه نیز براساس تابع کوزامبی (Kosambi, 1994) محاسبه گردید. جهت تهیه نقشه ژنتیکی

گیاه نسل M₁ یک خوشه جمع‌آوری شد. در جمعیت گیاهی نسل M₂ (۷۰۰۰ فرد) به بعد تنش آب حدود ۱۰ روز قبل از گلدهی تا ۴ روز بعد از گلدهی به‌مدت دو هفته در مزرعه اعمال شد. آنالیز فنوتیپی گیاهان برنج تحت تنش خشکی بر اساس سیستم‌های ارزیابی استاندارد IRRI انجام شد. صفاتی نظیر تعداد پنجه، تعداد پنجه‌های بارور، تعداد کل دانه، تعداد دانه پر، درصد باروری و وزن هزار دانه در جمعیت نسل M₂ مطالعه شدند. پس از یک ماه تنش خشکی در مزرعه آزمایشی، ۳۰ لاین متحمل بر اساس مقیاس لوله‌ای شدن برگ و ۵ لاین زودرس بر اساس تاریخ گلدهی از جمعیت نسل M₄ انتخاب شدند که از بین آنها، ۱۷ لاین براساس مقیاس باروری خوشه‌ها، متحمل شناخته شدند که میزان باروری خوشه بالایی در قیاس با شاهد نرمال داشتند. لاین‌های زودرس انتخابی (بین ۱۰ تا ۱۵ روز زودتر از والد) نیز میزان باروری خوشه بالایی در قیاس با شاهد داشتند.

در فروردین سال ۱۳۹۴ دو رقم برنج طارم محلی بومی و طارم محلی موتانت (M₇) به عنوان والدین تلاقی برای تولید یک جمعیت در حال تفرق F₂ انتخاب شدند و عملیات دورگ‌گیری در موسسه تحقیقات برنج انجام گرفت. در بهار سال ۱۳۹۶، ۴۰۰ عدد بذر F₂ حاصل از گیاهان F₁ بعد از جوانه‌دار شدن و تهیه نشاء در گلخانه، در بلوک‌های جداگانه در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه گنبدکاووس کشت شدند. در عملیات انتقال نشاء، گیاهچه‌ها در ردیف‌های جداگانه به فاصله ۲۵ × ۲۵ سانتی‌متر نشاء شدند. در طول دوره رشد کلیه عملیات داشت شامل وجین، کودپاشی و مبارزه با آفات و بیماری‌ها طبق عرف منطقه انجام شد. ارزیابی‌های فنوتیپی روی ۲۵۰ بوته تصادفی F₂ انجام شد. بذور هر یک از گیاهان F₂ به‌طور جداگانه برداشت و در داخل پاکت نگهداری شد. وزن ۱۰۰ دانه (وزن صد دانه تصادفی در هر بوته برحسب گرم)، تعداد پنجه، تعداد دانه پر، تعداد دانه‌های پوک، ارتفاع بوته (برحسب سانتی‌متر)، طول خوشه با احتساب ریشک، (برحسب سانتی‌متر)، تعداد خوشیچه، قطر ساقه (برحسب میلی‌متر)، طول دانه (برحسب میلی‌متر)، عرض دانه (برحسب میلی‌متر)، شکل دانه (برحسب میلی‌متر)، وزن کاه (برحسب

1- Cetyltrimethylammonium bromide
2- Gramine

از اسکورهای ۱ (برای وجود باند) و ۲ (برای عدم وجود باند) در نشانگرهای ریزماهواره استفاده شد.

در مورد نشانگرهای iPBS، ISSR و IRAP از اسکورهای ۱ (برای وجود باند) و ۳ (برای عدم وجود باند) در مواقعی که باند در والد اول تکثیر یافته بود، استفاده شد. همچنین در مورد نشانگرهای مذکور از اسکورهای ۲ (برای وجود باند) و ۴ (برای عدم وجود باند) در مواقعی که باند در والد دوم تکثیر یافته بود استفاده شد. خاطر نشان می شود که انکور کردن نشانگرهای تصادفی به نشانگرهای ریزماهواره برای کروموزوم ها جداگانه انجام شد. در نهایت برای پیدا کردن QTL ها از QGENE (Nelson, 1997) استفاده شد. برای تعیین QTL ها و برآورد اندازه اثرات آنها، از روش نقشه یابی فاصله ای مرکب (CIM) استفاده گردید و نقطه ای که واجد بالاترین مقدار LOD بود به عنوان ناحیه با بیشترین احتمال وجود QTL شناسایی شد. در کلیه موارد از پرمیویشن و Resampling، ۱۰۰۰ استفاده شد و برای هر پایش ۰/۵ سانتی مورگان در نظر گرفته شد و براساس آن $LOD = 2$ به عنوان حد بحرانی در نظر گرفته شد. خاطر نشان می شود که تعیین محل و برجسب زدن نشانگرهای تصادفی به نشانگرهای ریزماهواره برای کروموزوم ها جداگانه انجام شد.

برای رسم کروموزوم ها از نرم افزار MAPChart استفاده شد.

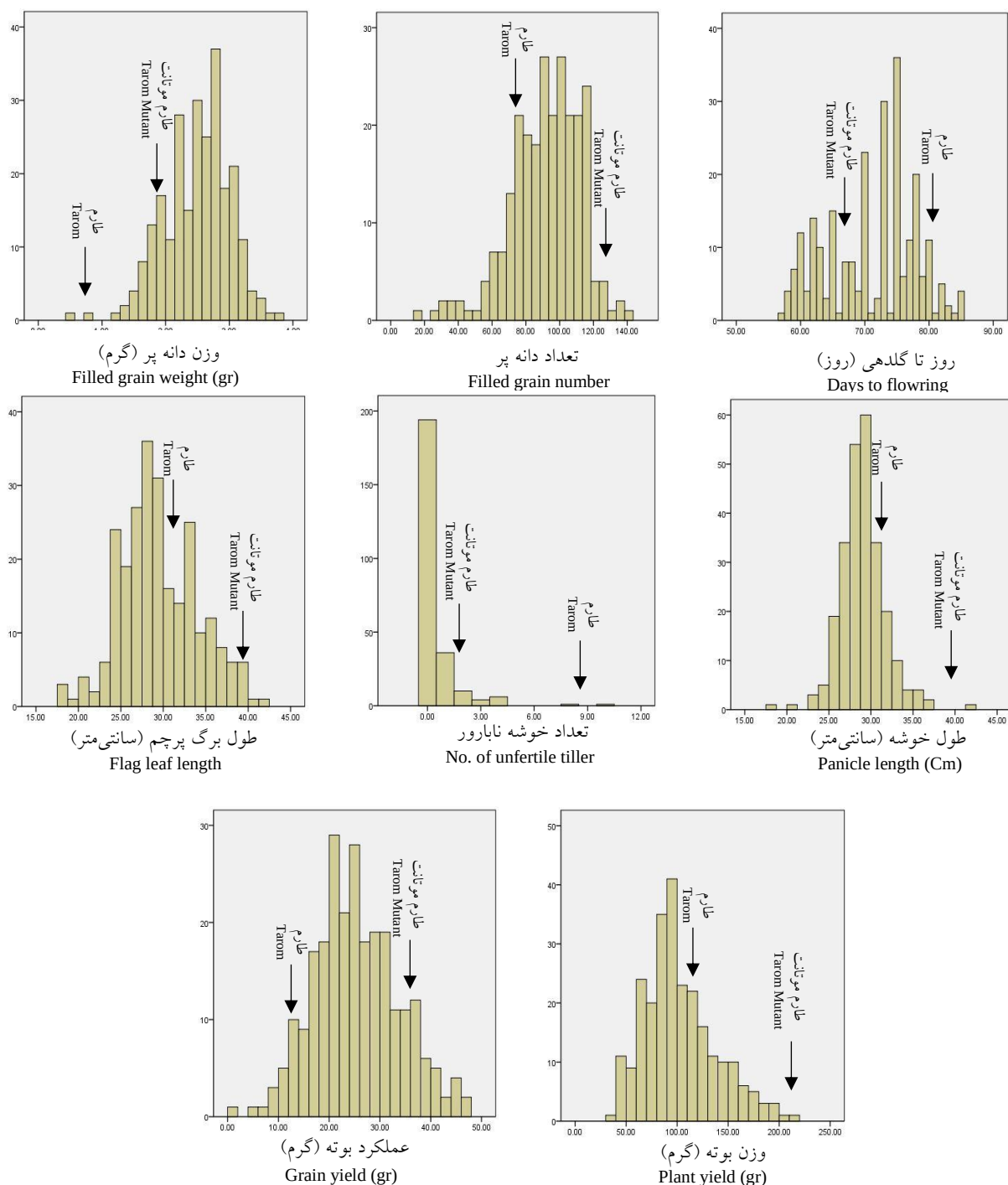
نتایج و بحث

توزیع فنوتیپی صفات: خصوصیات والدین در جدول ۱ آمده است. والدین در کلیه صفات به جز طول خروج خوشه و عرض برگ پرچم اختلاف معنی دار داشتند. توزیع فنوتیپی صفات مورد بررسی به جز تعداد خوشه نابارور نرمال بود. تفکیک متجاوز برای کلیه صفات مورد بررسی مشاهده شد. در بسیاری از مطالعات QTL وجود تفکیک متجاوز گزارش شده است (Tian et al., 2005; Zeng, 1994). تفکیک متجاوز به مواردی گفته می شود که ارزش هایی بیشتر از والد حداکثر مقدار صفت و کمتر از والد حداقل مقدار صفت دیده شود (Sabouri et al., 2012). تفکیک متجاوز می تواند به دلیل نوترکیبی QTL های کوچک اثر، اپیستازی، اثر متقابل ژنوتیپ با محیط و جهش به وجود آید (Tian et al., 2005).

نقشه پیوستگی: نقشه پیوستگی حاصل بر اساس نشانگرهای SSR، iPBS، IRAP و ISSR روی ۲۵۰ فرد نسل دوم رسم شد. نشانگرها به ۱۰ گروه پیوستگی با طول نقشه برابر با ۹۷۰/۹ سانتی مورگان بر اساس تابع کوزامبی (Kosambi, 1944) منتسب شدند. فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر با ۱۲/۷۷ سانتی مورگان برآورد شد (شکل ۲).

جدول ۱- خصوصیات والدین مورد بررسی
Table 1. Characteristic of evaluated parents

صفات	Traits	والدین Parent		اختلاف Differences
		طارم موتانت Tarom mutant	طارم Tarom	
گلدهی	Days to flowering	60.00	80.00	**
ارتفاع بوته	Plant height	131.00	145.00	**
وزن کل بوته	Plant weight	205.23	180.92	**
تعداد خوشه بارور	No. of fertile tiller	38.00	25.00	**
تعداد خوشه نابارور	No. of unfertile tiller	1.00	23.00	**
طول خوشه اصلی	Main panicle length	38.50	36.00	*
طول خروج خوشه از غلاف	Panicle exertion	17.30	17.60	ns
طول برگ پرچم	Flag leaf length	28.50	37.30	**
عرض برگ پرچم	Flag leaf width	1.10	1.00	ns
سطح برگ	Leaf area	23.51	27.98	**
تعداد خوشچه اولیه	No. of primary branches	10.00	7.00	*
تعداد دانه پر	No. of filled grain	107.00	93.00	*
تعداد دانه پوک	No. of unfilled grain	19.00	15.00	*
وزن دانه پر	Filled grain weight	2.70	0.54	**
باروری	Fertility	84.92	86.11	*
عملکرد بوته	Plant yield	38.68	14.10	**



شکل ۱- توزیع فنوتیپی صفات مورد بررسی در ۲۵۰ فرد جمعیت F_2 حاصل از تلاقی ارقام طارم محلی و طارم محلی مونتانت

Figure 1. Histogram of evaluated traits in 250 individuals of F_2 population caused Tarom $\times$ Tarom mutant crosses

عملکرد بوته (گرم)
Grain yield (gr)

وزن بوته (گرم)
Plant yield (gr)

عملکرد بوته (گرم)
Grain yield (gr)

وزن بوته (گرم)
Plant yield (gr)

عملکرد بوته (گرم)
Grain yield (gr)

وزن بوته (گرم)
Plant yield (gr)

عملکرد بوته (گرم)
Grain yield (gr)

وزن بوته (گرم)
Plant yield (gr)

عملکرد بوته (گرم)
Grain yield (gr)

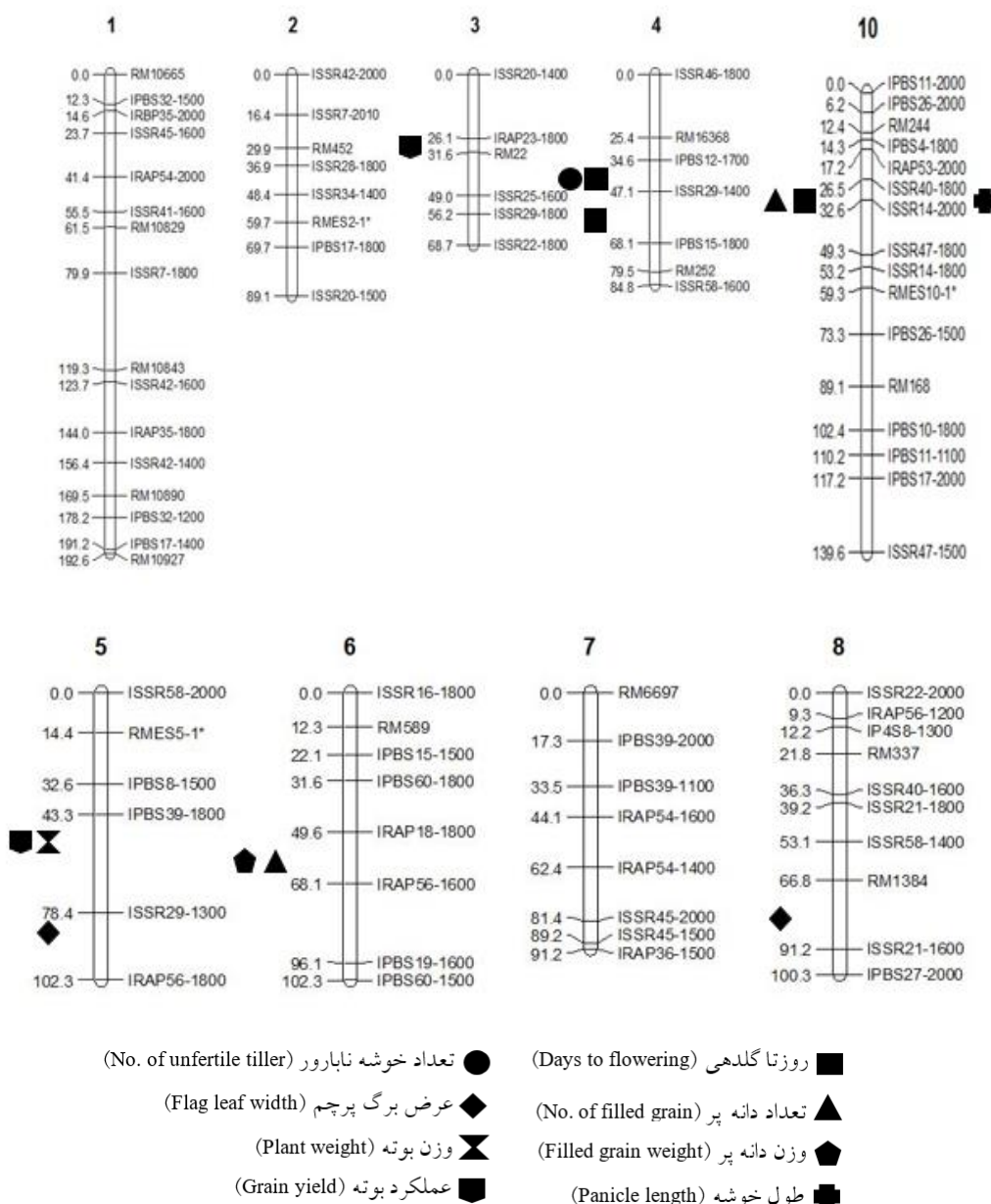
وزن بوته (گرم)
Plant yield (gr)

نسبت‌های مندلی با استفاده از آزمون کای اسکور بر روی کلیه نشانگرها آزمون شد و از آل‌های دارای نسبت مندلی برای تهیه نقشه استفاده شد. محققین در پژوهش‌های مختلف، نقشه‌های مختلفی را برای برنج به دست آوردند. نقشه حاصل از پژوهش کاتوزی و همکاران (Katouzi et al., 2018)، ۱۷۰۹/۲۹ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد و فاصله بین هر دو نشانگر مجاور بر روی نقشه به‌طور متوسط ۵/۲۰ سانتی‌مورگان برآورد شد. صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2010)، ۳۶۶ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش دادند و فاصله بین دو

نشانگر مجاور کمتر از ۲۰ سانتی مورگان برآورد شد. رحیمی و همکاران (Rahimi et al., 2012)، نقشه ژنتیکی را بر اساس ۱۳۱ نشانگر ریزماهواره و ۵۲ نشانگر AFLP تشکیل دادند که ۱۰۶۳/۱۴ سانتی مورگان از ژنوم برنج را پوشش دادند. فاصله متوسط ۵/۸۱ سانتی مورگان بین نشانگرها بود. فاصله بین نشانگرها در نقشه ژنتیکی به

نوع تلاقی و والدین آنها، نوع نشانگر و تعداد افراد مورد مطالعه بستگی دارد (Sabouri et al., 2014; Fotokian et al., 2010).

مکان یابی QTL های کنترل کننده صفات مورد بررسی: با توجه به نتایج حاصل از مکان یابی ژنی در مجموع ۱۳ QTL برای صفات شناسایی شد. QTL های کنترل کننده صفات مورد مطالعه جدول ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- نقشه پیوستگی نشانگرهای SSR، ISSR، iPBS و IRAP در ۲۵۰ فرد جمعیت F₂ برنج تلاقی طارم × طارم موتانت
Figure 2. Linkage map of SSR, ISSR, iPBS and IRAP in 250 individuals of F₂ population caused Taronm × Taronm mutant crosses

جدول ۲- QTL های صفات مورد مطالعه در جمعیت F₂ حاصل از تلاقی ارقام طارم محلی و طارم محلی موتانت

Table 2. QTL mapped for studied traits in F₂ population caused Tarom × Tarom mutant cross

صفات Traits	QTL	کروموزوم Chromosome	نشانه‌های حداصل Flanked markers	LOD	ضریب تبیین R ²	اثر افزایشی Additive effect	موقعیت (سانتی‌مورگان) Position (cM)	جهت آلل Allele direction
تعداد روز تا گلدهی Days to flowering	qLDF-10	10	ISSR40-1800- ISSR14-2000	3.268	5.8	9.21	30	TAM
	qLDF-4a	4	IPBS12-1700- ISSR29-1400	3.820	6	-0.064	46	TAMM
	qLDF-4b	4	ISSR29-1400- IPBS15-1800	3.130	5.6	-0.330	66	TAMM
تعداد دانه پر Filled grain number	qLFGN-10	10	ISSR40-1800- ISSR14-2000	2.520	4.5	21.94	28	TAMM
	qLFGN-6	6	IRAP18-1800- IRAP56-1600	2.570	4.6	-0.095	50	TAM
وزن دانه پر Filled grain weight	qGWP-6	6	IRAP18-1800- IRAP56-1600	2.580	4.6	-0.171	50	TAM
طول خوشه Panicle length	qLMPL-10	10	ISSR40-1800- ISSR14-2000	2.083	3.7	6.616	28	TAMM
تعداد خوشه نابارور No. of unfertile tillers	qNnFT-4	4	IPBS12-1700- ISSR29-1400	2.107	3.8	-0.681	42	TAMM
عرض برگ پرچم Flag leaf width	qWFL-5	5	ISSR29-1300- IRAP56-1800	2.160	3.9	1.011	80	TAMM
	qWFL-8	8	RM1384- ISSR21-1600	2.150	3.9	0.188	86	TAMM
وزن کل بوته Plant weight	qLWSFP-5	5	IPBS39-1800- ISSR29-1300	3.520	6.2	344.928	46	TAMM
عملکرد بوته Plant yield	qLYID-3	3	IRAP23-1800- RM22	2.03	3.6	-0.273	28	TAM
	qLYID-5	5	IPBS39-1800- ISSR29-1300	2.82	5	36.779	46	TAMM

*: TAM = طارم محلی؛ TAAM = طارم محلی موتانت

*: TAM = Tarom landrace; TAAM = Tarom landrace mutant

(Sabouri and Biabani, 2009) و صبوری و نحوی (Sabouri and Nahvi, 2009) مکان‌های کنترل‌کننده تعداد روز تا گلدهی را در جمعیت برنج ایرانی طارم محلی × خزر ردیابی کردند.

QTL های شناسایی شده برای تعداد دانه پر ۲ عدد بودند که qLFGN-10 با مقدار LOD برابر با ۲/۵۲ و اثر افزایشی برابر با ۲۱/۹۴ روی کروموزوم ۱۰ در فاصله نشانگری -ISSR40-1800-2000 و qLFGN-6 روی کروموزوم ۶ با مقدار LOD و اثر افزایشی برابر با ۲/۵۷ و ۰/۰۹۵- در فاصله نشانگری IRAP18-1800-IRAP56-1600 قرار داشتند. در qLFGN-10 آلل‌های والد طارم محلی موتانت باعث افزایش و در qLFGN-6 آلل‌های والد طارم محلی موجب کاهش تعداد دانه پر شدند و به ترتیب ۴/۵ و ۴/۶ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند (جدول ۲).

برای صفت وزن دانه پر تنها یک QTL روی کروموزوم ۶ شناسایی شد. QTL مکان‌یابی شده در صفات مذکور در فاصله نشانگری IRAP18-1800-IRAP56-1600

سه QTL روی کروموزوم‌های ۱۰ و دو QTL روی کروموزوم ۴ برای تعداد روز تا گلدهی مکان‌یابی شد. این QTL ها شامل qLDF-10، qLDF-4a و qLDF-4b بودند که به ترتیب در فواصل نشانگری -ISSR40-1800-2000-IPBS12-1700-ISSR29-1400 و -IPBS15-1800-2000 قرار داشتند. مقدار LOD این سه به ترتیب ۳/۲۶۸، ۳/۸۲۰ و ۳/۱۳۰ بود. اثر افزایشی برای qLDF-10 مثبت بود. آلل‌های والد طارم محلی باعث افزایش تعداد روز تا گلدهی برای QTL مذکور شد. qLDF-4a و qLDF-4b دارای اثر افزایشی منفی بودند و آلل‌های والد طارم محلی موتانت باعث کاهش تعداد روز تا گلدهی برای آن‌ها شد و مجموعاً ۱۱/۶ درصد واریانس فنوتیپی را توجیه نمود (جدول ۲). صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2012) به منظور تعیین ساختار ژنتیکی صفات زراعی از جمعیت برنج ایرانی حاصل از تلاقی غریب × خزر از نشانگرهای SSR استفاده نمودند. آن‌ها توانستند شش QTL در کروموزوم‌های ۱، ۲، ۵ و ۷ مکان‌یابی کنند. صبوری و بیابانی

مکان یابی گردید. اثر افزایشی صفت منفی بود که آل های والد طارم محلی باعث کاهش صفت مورد نظر شد (جدول ۲). صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2012) پنج QTL روی کروموزوم ۱، ۲ و ۱۱ برای وزن دانه در برنج گزارش نمودند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت نداشت.

برای طول خوشه اصلی یک QTL روی کروموزوم ۱۰ شناسایی شد. QTL مکان یابی شده (qLMPL-10) روی کروموزوم ۱۰ در فاصله نشانگری -ISSR14-40-1800-2000 مکان یابی شد و با LOD ۲/۰۸ مقدار ۳/۷ درصد واریانس فنوتیپی مثبت طول خوشه اصلی را توجیه نمود. آل های والد طارم محلی موتانت باعث افزایش این صفت شده است (جدول ۲). صبوری و همکاران در پژوهشی برای طول خوشه دو QTL روی کروموزوم های ۱ و ۱۲ گزارش کردند (Sabouri et al., 2012).

برای تعداد خوشه نابارور یک QTL شناسایی شد. شناسایی شده روی کروموزوم ۴ (qNNFT-4) واقع در فاصله IPBS12-1700-1400-29-1400 با LOD برابر با ۲/۱۰، میزان ۳/۸ درصد از تنوع فنوتیپی صفت تعداد خوشه نابارور را توصیف نمود (جدول ۲).

دو QTL شناسایی شده برای عرض برگ پرچم روی کروموزوم های ۵ و ۸ قرار داشتند. qWFL-5 با مقدار LOD و اثر افزایشی برابر با ۲/۱۶ و ۰/۱۱۸ روی کروموزوم ۵ در فاصله نشانگری -IRAP56-1800-29-1300-5 و qWFL-8 روی کروموزوم ۸ با مقدار LOD و اثر افزایشی برابر با ۳/۵۲ و ۳۴۴/۹۲۸ در فاصله نشانگری -IPBS39-1800-29-1300 قرار داشتند. اثر افزایشی در هر دو مکان ژنی مثبت بوده و والد طارم محلی موتانت باعث این افزایش شد. فتوکیان و همکاران (Fotokian et al., 2010) به منظور مکان-یابی QTL های مرتبط با صفات کمی در برنج از ۵۹ لاین تلاقی برگشتی حاصل از واریته های IR64 (والد دوره ای) و طارم مولایی (والد دهنده) استفاده نمودند. این محققین

توانستند تعداد ۱۰ QTL روی کروموزوم های ۱، ۲، ۴، ۶، ۷ و ۱۱ شناسایی کنند که با QTL های ردیابی شده در مطالعه حاضر مطابقت نداشت. برای صفت وزن کل بوته، یک QTL (qLWSFP-5) مکان یابی شد که بر روی کروموزوم ۵ در فاصله نشانگرهای ISSR29-1300 و IPBS39-1800 قرار داشت. در این QTL آل های والد طارم محلی موتانت باعث افزایش مقدار این صفت شد (جدول ۲). دو QTL شناسایی شده برای عملکرد بوته روی کروموزوم های ۳ و ۵ قرار داشتند. QTL های شناسایی شده به ترتیب عبارت بودند از qLYID-3 که روی کروموزوم ۳ در فاصله نشانگری IRAP23-1800-RM22 مکان یابی گردید و با LOD برابر با ۲/۰۳ مقدار، ۳/۶ درصد از واریانس فنوتیپی عملکرد بوته را توجیه نمود. اثر افزایشی این QTL برابر ۰/۲۷۳- بود که آل های والد طارم محلی باعث کاهش عملکرد بوته شد. qLYID-5 روی کروموزوم ۵ در فاصله نشانگرهای IPBS39-1800 و ISSR29-1300 شناسایی شد، اثر افزایشی و LOD آن برابر ۰/۰۰۱- و ۳۶۷۷۹ بود. اثر افزایشی در این مکان افزایشی بود و آل های والد طارم محلی موتانت باعث افزایش عملکرد بوته شد (جدول ۲).

از بین QTL های ردیابی شده در این مطالعه، هشت QTL (-qWFL، -qLMPL-10، -qLFGN-10، -qLDF-4b، -qLDF-4a) در جهت افزایش عملکرد دانه عمل نمودند. نظر به اینکه والدین تلاقی در برخی نقاط از ژنوم که تحت تأثیر جهش ها قرار گرفته بودند، به نظر می رسد مکان های کنترل کننده صفات را به شکل دقیقی تری نسبت به سایر مطالعات ردیابی نموده باشند. از QTL های تشخیص داده شده در این پژوهش، پس از تعیین اعتبار در جمعیت های نسل های بعدی و مکان ها و سال های ارزیابی بیشتر، می توان برای برنامه های اصلاحی انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

References

- Babu, R.C.B.D., Nguyen, V., Chamarek, P., Shanmugasundaram, P., Chezian, P., Jeyaprakash, S.K., Ganesh, A., Palchamy, S., Sadasivam, S., Sarkarung, L.J. and Nguyen, H.T. (2003). Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: Association between secondary traits and field performance. *Crop Science*, 43: 1457-1469.

- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, **142**: 169-196.
- Ebadi, A.A., Davatgar, N., Ghodsi, M., Beyranvand, N.P., Vedadi, S. and Khorasani, A. (2014). *Developing Tolerant Rice Plants to Drought Stress Using Mutation Breeding and Proteomics Techniques*. Ministry of Jahade Agriculture. Agricultural, Research, Education and Extension Organization. Rice Research Institute of Iran. Final Report of Project. Rasht, IR (In Persian).
- Fotokian, M.H., Naji, A.M., Ahmadi, J., Amiri oghan, H., Sadat Nouri, A., Mohammadi Nejad, G., Mohadesi, A. and Agahi, K. (2010). Determination of genetic loci for plant height, tiller number, flag leaf length and width in rice using SSR markers. *Journal of Biology*, **23(4)**: 488-497 (In Persian).
- Jafarzadeh Razmi, M.R., Navabpour, S., Sabouri, H. and Ramezanpour, S.S. (2020). qGW, a stable and major QTL for increasing of grain weight in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Genetic Researches*, **6(2)**: 173-182 (In Persian).
- Katouzi, M., Navvabpour, S., Yamchi, A., Ramzanpour, S.S. and Sabouri, H. (2018). Identification of genes controlling seedling stage traits in Iranian rice recombinant lines under drought stress conditions. *Journal of Crop Breeding*, **9(21)**: 1-9 (In Persian).
- Kazerani, B. (2018). QTL mapping analysis and assessment of some drought tolerance gene expression in recombinant inbred lines and mutant population of rice. Ph.D. Thesis, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran (In Persian).
- Kosambi, D.D. (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugene*, **12**: 172-175.
- Liu, B.H. (1997). *Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Manly, K.F. and Oslon, M. (1999). Overview of QTL mapping software and introduction to map manager QTX. *Mammalian Genome*, **10**: 327-334.
- Nelson, J.C. (1997). QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Molecular Breeding*, **3(3)**: 239-245.
- Rahimi, M., Dehghani, H., Rabiei, B. and Tarang, A.R. (2012). Multi-trait mapping of QTLs for drought tolerance indices in rice. *Cereal Research*, **2(2)**: 107-121 (In Persian).
- Sabouri, H. and Biabani, A. (2009). Toward the mapping of agronomic characters on a rice genetic map: Quantitative Trait Loci analysis under saline condition. *Biotechnology*, **8(1)**: 144-149.
- Sabouri, H. and Nahvi, M. (2009). Identification of major and minor genes associated with heading date in an *indica* × *indica* cross of rice (*Oryza Sativa* L.). *International Journal of Plant Production*, **3(1)**: 105-114.
- Sabouri, H., Sabouri, A. and Dadras, A.R. (2009). Genetic dissection of biomass production, harvest index and panicle characteristics in *indica-indica* crosses of Iranian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, **3(3)**: 155-166.
- Sabouri, A., Toorchi, M., Rabiei, B., Aharizad, S., Moumeni, A. and Singh, R.K. (2010). Identification and mapping of QTLs for agronomic traits in Indica-Indica cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Cereal Research Communications*, **38(3)**: 317-326.
- Sabouri, H., Mohammadi Nejad, G. and Ebadi, A.A. (2011). Evaluation of gene effects and providing of linkage map in Iranian rice population caused Gharib × Khazar cross. *Plant Production*, **35(2)**: 29-52 (In Persian).
- Sabouri, H., Dadras, A.R., Sabouri, A. and Katouzi, M. (2014). Detection of Quantitative gene protein content and gelatinization temperature of rice seed in population of recombinant inbred lines Anbarbou × Sepidroud. *Agricultural Biotechnology*, **13(2)**: 21-28 (In Persian).
- Sabouri, H., Sabouri, A. and Dadras, A.R. (2016). *Advanced Quantitative Genetics with Emphasis on QTL Mapping Software*. Nouroosi Press. Gorgan, IR (In Persian).
- Sabouri, H., Navvab pour, S. and Esmaili, M. (2010). Determination of genetic structure of agronomic rice trait using classical and molecular approach. *Journal of Plant Production*, **18(4)**: 45-72 (In Persian).
- Saghaei Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang Q. and Allard R.W. (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barely species diversity, chromosomal location and population dynamics. *Proceeding of National Academy Science*, **91**: 5466-5570.
- Tajbakhsh, M. and Pourmirza, E.A. (2007). *Cereals*. Jahad University Press, Tabriz, IR (In Persian).
- Tian, R., Jiang, G.H., Shen, L.H., Wang, L.Q. and He, Y.Q. (2005). Mapping quantitative trait loci underlying the cooking and eating quality of rice using a DH population. *Molecular Breeding*, **15**: 117-124.
- Yu, S.B., Li, J.X., Xu, C.G., Tan, Y.F., Li, X.H. and Zhang Q. (2002) Identification of quantitative trait loci and epistatic interactions for plant height and heading date in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**: 619-625.
- Zeng, Z.B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, **136**: 1457-1468.

Determination of QTLs Controlling Agronomical Traits in Rice Population Derived from Cross of Tarom Landrace and Tarom Mutant

Mahnaz Katouzi¹, Saeid Navabpour², Hossein Sabouri^{3,*} and Ali Akbar Ebadi⁴

- 1- Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran and Epigenetics, Biotechnology, and Plant Breeding Groups, Agroscope, Route de Duillier 50, Case Postale 1012, 1260 Nyon 1, Switzerland
- 2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
- 4- Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

(Received: June 5, 2019 – Accepted: October 12, 2019)

Abstract

In order to identify QTLs controlling agronomically traits, landrace Tarom and rice Tarom mutant were crossed. SSR, ISSR, iPBS and IRAP markers were amplified in 250 F₂ individuals to prepare the linkage map. Number of tillers, 100 grain weight, number of filled grains, number of unfilled grains, plant height, panicle length, number of branches, stem diameter, grain length, grain width, grain shape, straw weight, days to maturity, flag leaf length and flag leaf width were measured for 250 individuals. The linkage map covered 970.9 cM of rice genome. The distance between two adjacent markers was calculated to be 12.77 cM. Based on the results, a total of 13 QTLs were identified for the evaluated traits. For all studied traits, alleles transferred from the parents to the QTLs detected increased grain yield. Most QTLs were detected for days to flowering. Three QTLs were located on chromosomes 10 and 4 (two QTLs) for days to flowering. qLDF-4a and qLDF-4b had a negative additive effect and the parent alleles of the mutant landrace Tarom reduced the number of days to flowering. These QTLs explained 11.6% of the phenotypic variance. Since the population under study was derived from a cross between landrace and mutant Tarom cultivars and the resulting population varied only in the mutated genes; so, the QTLs detected in this study were more accurate in location and expression levels, and after validation of them, they could be recommended for marker assistant selection breeding programs.

Keywords: Rice, Mutant, Molecular marker, Linkage map, QTL

*Corresponding Author, E-mail: hossein.sabouri@gonbad.ac.ir