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[٤]

۱- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان و گروه اپی‌ژنتیک، بیوتکنولوژی و اصلاح‌نباتات موسسه تحقیقات اگروسکوپ، سوئیس

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

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

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

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

چکیده

به‌منظور شناسایی QTLهای کنترل‌کننده صفات زراعی، ارقام وحشی و موتانت برنج رقم طارم تلاقی داده شدند. برای تهیه نقشه پیوستگی، نشانگرهای SSR، ISSR، 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 به‌دست 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 ٤ (دو QTL) برای تعداد روز تا گلدهی مکان‌یابی شد. qLDF-4a و qLDF-4b دارای اثر افرایشی منفی بودند و آلل‌های والد طارم محلی موتانت باعث کاهش تعداد روز تا گلدهی شد. QTLهای مذکور مجموعا ۱۱/٦ 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 می‌شود و یکی از عمده‌ترین ماده غذایی حدود نیمی از مردم دنیا را تشکیل می‌دهد. بیش از ۷۰ درصد برنج جهان در مناطق گرمسیری مرطوب آسیا کشت می‌شود و فقط نقاط نسبتاً کمی از مناطق خشک به کشت آن اختصاص دارند (Tajbakhsh and Pourmirza, 2007).

یکی از مهم‌ترین کاربردهای نشانگرهای مولکولی تهیه نقشه‌های ژنتیکی است که بر اساس آن می‌توان ژن‌های کنترل‌کننده صفات مطلوب را از نظر ترتیب و فاصله ژن‌ها و نشانگرها تعیین نمود. شناسایی نشانگرهای مولکولی کاملاً پیوسته با ژن مورد نظر و مکان‌یابی آن روی کروموزوم، یک هدف مهم در اصلاح‌نباتات برای کلون کردن ژن‌ها و گزینش به کمک نشانگر است. به کمک نشانگرهای پیوسته می‌توان صفت هدف را در مکان‌های غیر هدف شناسایی کرد (Liu, 1997).

در مجموع ۸٦٤٦ 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 مکان‌یابی کلیه صفات صورت گرفته و مشخص شده که نواحی کنترل‌کننده آن‌ها تقریباً روی هر ۱۲ کروموزوم برنج به نسبت‌های متفاوت توزیع شده‌اند. برای مثال، مکان‌ژنی مرتبط با صفات زراعی در جمعیت‌های مختلف برنج در فاصله‌ی RG939-RG620 در کروموزوم چهار شناسایی شدند. یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد این ناحیه این است که هر دو QTL مربوط به عملکرد و سایر صفات، هم‌مکان 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 QTLهای 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 QTLهای کنترل‌کننده وزن دانه، تعداد سنبلچه و شاخص برداشت روی کروموزوم ۲، ۳، ۷ و ۱۲ هم‌پوشانی 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 مکان‌یابی کردند. گاهی در پژوهش‌های متفاوت QTLهای یکسانی ردیابی نمی‌شوند، که این امر می‌تواند ناشی از عوامل بسیاری هم‌چون متفاوت بودن جمعیت مکان‌یابی 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 QTLهای بزرگ اثر ردیابی شده در برنامه‌های اصلاحی است. برای نیل به این مقصود، پس از تعیین اعتبار QTLهای بزرگ اثر می‌توان از آن‌ها برای انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود (Collard *et al*., 2005).

اگرچه مطالعات زیادی در زمینه مکان‌یابی QTLهای کنترل‌کننده صفات در برنج در جمعیت‌های مختلف انجام شده است اما این مطالعه از نظر اینکه والدین آمیزش دو رقم بومی و موتانت آن می‌باشند، منحصر به فرد است و تاکنون گزارشی مشابه آن در بررسی منابع دیده نشده است.

مواد و روش‌ها

ارزیابی‌های فنوتیپی: تولید لاین‌های 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 پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج پرتوتابی شد. LD50 زنده‌مانی گیاهچه‌ها 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 M_1 ایجاد شد. از هر

گیاه نسل M_1 یک خوشه جمع‌آوری شد. در جمعیت گیاهی نسل M_2 (۷۰۰۰ فرد) به بعد تنش آب حدود ۱۰ روز قبل از گلدهی تا ٤ 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 M_2 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 M_4 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 ۱۳۹٤ دو رقم برنج طارم محلی بومی و طارم محلی موتانت (M_7) به عنوان والدین تلاقی برای تولید یک جمعیت در حال تفرق F_2 انتخاب شدند و عملیات دورگ گیری در موسسه تحقیقات برنج انجام گرفت. در بهار سال ۱۳۹٦، ٤۰۰ عدد بذر F_2 حاصل از گیاهان F_1 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 F_2 انجام شد. بذور هر یک از گیاهان F_2 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 خوشچه، قطر ساقه (برحسب میلی‌متر)، طول دانه (برحسب میلی‌متر)، عرض دانه (برحسب میلی‌متر)، شکل دانه (برحسب میلی‌متر)، وزن کاه (برحسب 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 پنجه‌زنی 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 برگ‌های بوته‌های برنج به روش CTAB[1] (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[2] استفاده شد. در این تحقیق برای تکثیر DNA از دستگاه ترموسایکلر مدل iCycler (BIORAD)، با بلوک ۹٦ 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

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 ٤ (برای عدم وجود باند) در مواقعی که باند در والد دوم تکثیر یافته بود استفاده شد. خاطر نشان می‌شود که انکور کردن نشانگرهای تصادفی به نشانگرهای ریزماهواره برای کروموزوم‌ها جداگانه انجام شد. درنهایت برای پیدا کردن QTLها از QGENE (Nelson, 1997) استفاده شد. برای تعیین QTLها و برآورد اندازه اثرات آن‌ها، از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) استفاده گردید و نقطه‌ای که واجد بالاترین مقدار LOD بود به‌عنوان ناحیه با بیشترین احتمال وجود QTL شناسایی شد. در کلیه موارد از پرمیوتیشن و Resampling، ۱۰۰۰ استفاده شد و برای هر پایش ۰/۵ سانتی‌مورگان در نظر گرفته شد و براساس آن LOD = 2 به‌عنوان حد بحرانی در نظر گرفته شد. خاطر نشان می‌شود که تعیین محل و برچسب زدن نشانگرهای تصادفی به نشانگرهای ریزماهواره برای کروموزوم‌ها جداگانه انجام شد. برای رسم کروموزوم‌ها از نرم‌افزار MAPChart استفاده شد.

نتایج و بحث

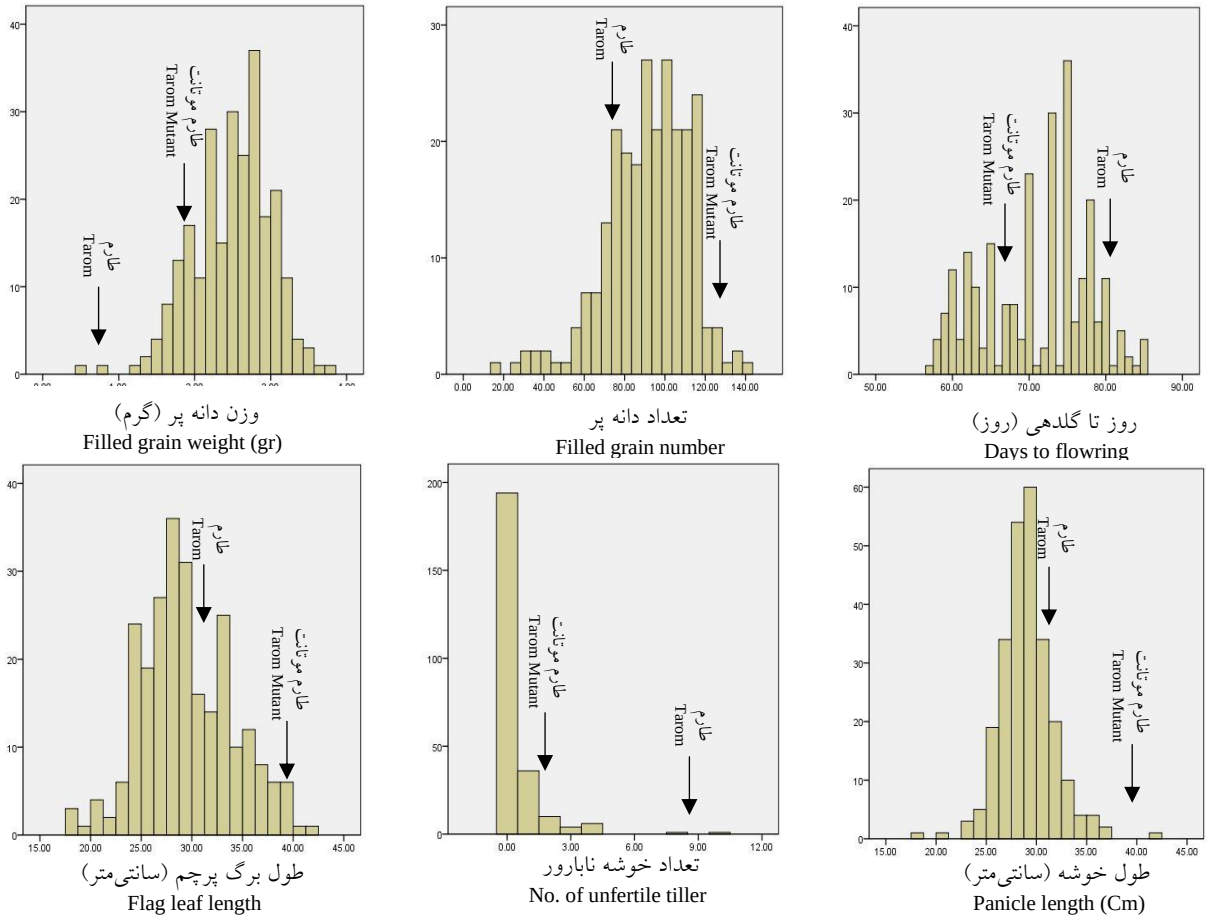
توزیع فنوتیپی صفات: خصوصیات والدین در جدول ۱ آمده است. والدین در کلیه صفات به جز طول خروج خوشه و عرض برگ پرچم اختلاف معنی دار داشتند. توزیع فنوتیپی صفات مورد بررسی به‌جز تعداد خوشه نابارور نرمال بود. تفکیک متجاوز برای کلیه صفات مورد بررسی مشاهده شد. در بسیاری از مطالعات QTL وجود تفکیک متجاوز گزارش شده است (Tian *et al*., 2005; Zeng, 1994). تفکیک متجاوز به مواردی گفته می‌شود که ارزش‌هایی بیشتر از والد حداکثر مقدار صفت و کمتر از والد حداقل مقدار صفت دیده شود (Sabouri *et al*., 2012). تفکیک متجاوز می‌تواند به‌دلیل نوترکیبی QTLهای کوچک اثر، اپیستازی، اثر متقابل ژنوتیپ با محیط و جهش به‌وجود 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 سانتی‌مورگان بر اساس تابع کوزامبی (Kosambi, 1944) منتسب شدند. فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر با ۱۲/۷۷ سانتی‌مورگان 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	**



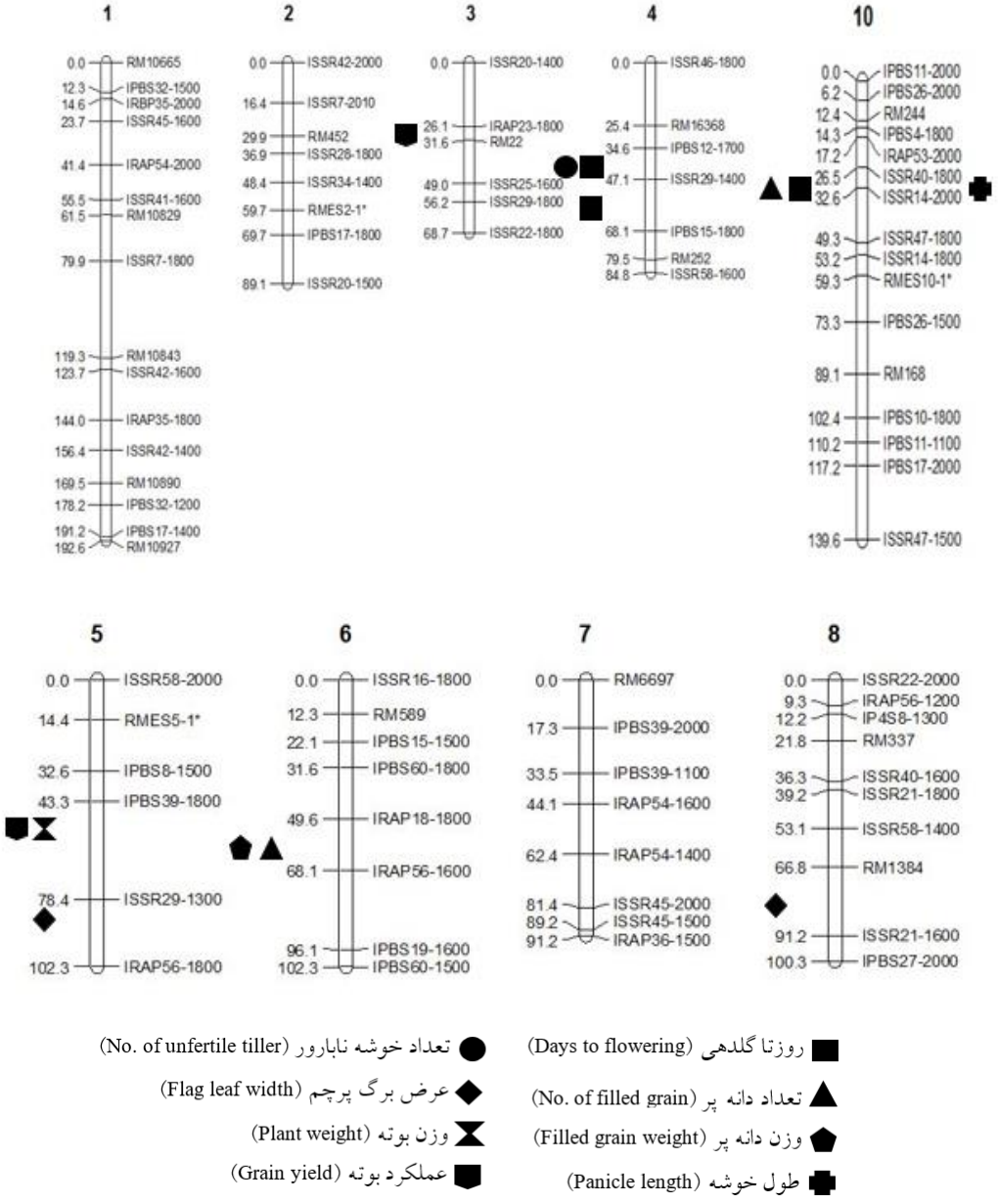
شکل ۱- توزیع فنوتیپی صفات مورد بررسی در ۲۵۰ فرد جمعیت F_2 حاصل از تلاقی ارقام طارم محلی و طارم محلی موتانت

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

نسبت‌های مندلی با استفاده از آزمون کای‌اسکور بر روی کلیه نشانگرها آزمون شد و از آلل‌های 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)، ۳٦٦ سانتی مورگان 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 ۱۰۶۳/۱٤ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش دادند. فاصله متوسط ۵/۸۱ سانتی‌مورگان 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).

مکان‌یابی QTLهای کنترل‌کننده صفات مورد بررسی: با توجه به نتایج حاصل از مکان‌یابی ژنی درمجموع ۱۳ QTL برای صفات شناسایی شد. QTLهای کنترل‌کننده صفات مورد مطالعه جدول ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- نقشه پیوستگی نشانگرهای SSR، ISSR، iPBS و IRAP در ۲۵۰ فرد جمعیت F_2 برنج تلاقی طارم × طارم موتانت

Figure 2. Linkage map of SSR, ISSR, iPBS and IRAP in 250 individuals of F_2 population caused Tarom × Tarom mutant crosses

جدول ۲- QTL های صفات مورد مطالعه در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی ارقام طارم محلی و طارم محلی موتانت

Table 2. QTL mapped for studied traits in F_2 population caused Tarom × Tarom mutant cross

صفات Traits	QTL	کروموزوم Chromosome	نشانگرهای حدفاصل 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

سه QTL روی کروموزوم‌های ۱۰ و دو QTL روی کروموزوم ٤ برای تعداد روز تا گلدهی مکان‌یابی شد. این QTLها شامل qLDF-10، qLDF-4a و qLDF-4b بودند که به‌ترتیب در فواصل نشانگری ISSR40-1800-ISSR14-2000، IPBS12-1700-ISSR29-1400 و ISSR29-1400-IPBS15-1800 قرار داشتند. مقدار LOD این سه به‌ترتیب ۳/۲٦۸، 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 ۱۱/٦ درصد واریانس فنوتیپی را توجیه نمود (جدول ۲). صبوری و همکاران (Sabouri *et al.*, 2012) به‌منظور 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 (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.

QTLهای شناسایی شده برای تعداد دانه پر ۲ عدد بودند که qLFGN-10 با مقدار LOD برابر با ۲/۵۲ و اثر افزایشی برابر با ۲۱/۹٤ روی کروموزوم ۱۰ در فاصله نشانگری ISSR40-1800-ISSR14-2000 و qLFGN-6 روی کروموزم ٦ 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 به‌ترتیب ٤/۵ و ٤/٦ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند (جدول ۲).

برای صفت وزن دانه پر تنها یک QTL روی کروموزوم ٦ شناسایی شد. QTL مکان‌یابی شده در صفات مذکور در فاصله‌ی نشانگری IRAP18-1800-IRAP56-1600

مکان‌یابی گردید. اثر افزایشی صفت منفی بود که آلل‌های 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 مکان‌یابی شده (qLMPL-10) روی کروموزوم ۱۰ در فاصله نشانگری ISSR40-1800-ISSR14-2000 مکان‌یابی شد و با LOD، ۲/۰۸ مقدار ۳/۷ درصد واریانس فنوتیپی مثبت طول خوشه اصلی را توجیه نمود. آلل‌های والد طارم محلی موتانت باعث افزایش این صفت شده است (جدول ۲). صبوری و همکاران در پژوهشی برای طول خوشه دو QTL روی کروموزوم‌های ۱ و ۱۲ گزارش کردند (Sabouri *et al*., 2012).

برای تعداد خوشه نابارور یک QTL شناسایی شد. QTL شناسایی‌شده روی کروموزوم ٤ (qNNFT-4 واقع در فاصله IPBS12-1700-ISSR29-1400) با LOD برابر با ۲/۱۰، میزان ۳/۸ درصد از تنوع فنوتیپی صفت تعداد خوشه نابارور را توصیف نمود (جدول ۲).

دو QTL شناسایی‌شده برای عرض برگ پرچم روی کروموزم‌های ۵ و ۸ قرار داشتند. qWFL-5 با مقدار LOD و اثر افزایشی برابر با ۲/۱٦ و ۰/۱۱۸ روی کروموزوم ۵ در فاصله نشانگری ISSR29-1300-IRAP56-1800 و qWFL-8 روی کروموزم ۸ با مقدار LOD و اثر افزایشی برابر با ۳/۵۲ و ۳٤٤/۹۲۸ در فاصله نشانگری IPBS39-1800-ISSR29-1300 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) به‌منظور مکان‌یابی QTLهای مرتبط با صفات کمی در برنج از ۵۹ لاین تلاقی برگشتی حاصل از واریته‌های IR64 (والد دوره‌ای) و طارم مولایی (والد دهنده) استفاده نمودند. این محققین توانستند تعداد ۱۰ QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ٤، ٦، ۷ و ۱۱ شناسایی کنند که با QTLهای ردیابی شده در مطالعه حاضر مطابقت نداشت. برای صفت وزن کل بوته، یک QTL (qLWSFP-5) مکان‌یابی شد که بر روی کروموزوم ۵ در فاصله نشانگرهای ISSR29-1300 و IPBS39-1800 قرار داشت. در این QTL آلل‌های والد طارم محلی موتانت باعث افزایش مقدار این صفت شد (جدول ۲). دو QTL شناسایی‌شده برای عملکرد بوته روی کروموزم‌های ۳ و ۵ قرار داشتند. QTLهای شناسایی‌شده به‌ترتیب عبارت بودند از qLYID-3 که روی کروموزوم ۳ در فاصله نشانگری IRAP23-1800-RM22 مکان‌یابی گردید و با LOD برابر با ۲/۰۳ مقدار، ۳/٦ درصد از واریانس فنوتیپی عملکرد بوته را توجیه نمود. اثر افزایشی این QTL برابر ۰/۲۷۳- بود که آلل‌های 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 ۳٦/۷۷۹ بود. اثر افزایشی در این مکان افزایشی بود و آلل‌های والد طارم محلی موتانت باعث افزایش عملکرد بوته شد (جدول ۲).

از بین QTLهای ردیابی شده در این مطالعه، هشت QTL (qLDF-4a, qLDF-4b, qLFGN-10, qLMPL-10, qWFL-5, qWFL-8, qLYID-5 qLWSFP-5) در جهت افزایش عملکرد دانه عمل نمودند. نظر به اینکه والدین تلاقی در برخی نقاط از ژنوم که تحت تأثیر جهش‌ها قرار گرفته بودند، به‌نظر می‌رسد مکان‌های کنترل‌کننده صفات را به شکل دقیقی‌تری نسبت به سایر مطالعات ردیابی نموده باشند. از QTLهای تشخیص داده شده در این پژوهش، پس از تعیین اعتبار در جمعیت‌های نسل‌های بعدی و مکان‌ها و سال‌های ارزیابی بیشتر، می‌توان برای برنامه‌های اصلاحی انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

References

Babu, R.C.B.D., Nguyen, V., Chamarerk, P., Shanmugasundaram, P., Chezhian, 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 inbreed 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. *Annuals 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. *Mammulian 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 Nejhad, 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 inbreed 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*. Nourosi 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 Katouzi[1], Saeid Navabpour[2], Hossein Sabouri[3,*] and Ali Akbar Ebadi[4]

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 F_2 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**