

## تجزیه مولکولی صفات مرتبط با رشد رویشی برنج

حسین صبوری<sup>۱\*</sup>، قاسم محمدی نژاد<sup>۲</sup>، عاطفه صبوری<sup>۳</sup>، سعید نواب پور<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

<sup>۲</sup> استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

<sup>۳</sup> استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

<sup>۴</sup> استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۱۹

### چکیده

خصوصیات مرتبط با رشد و توسعه برگ‌ها و خوشه از عوامل تعیین کننده عملکرد نهایی برنج می‌باشند. به منظور تجزیه ژنتیکی صفات مرتبط با توسعه برگ‌ها و خوشه، از نقشه ژنتیکی حاصل از جمعیت F<sub>2</sub> تلاقی یافته از ارقام برنج غریب × خزر و ۱۱۱ جفت نشانگر ریزوماهواره چند شکل استفاده شد. در این بررسی صفات تعداد کل برگ‌ها، تعداد روز تا ظهور برگ پرچم، سرعت ظهور برگ، وزن دانه، تعداد دانه، طول و عرض برگ پرچم و تعداد خوشچه مکان‌یابی شدند. از بین بیست QTL مکان‌یابی شده برای صفات مذکور QTL‌های qGW-1b برای وزن دانه و qFG-1b برای تعداد دانه روی کروموزوم ۱ و qWFL-7 برای عرض برگ پرچم روی کروموزوم ۷ توانستند به ترتیب با ۱۴/۳۰، ۱۳/۷۰ و ۲۰/۳۲ درصد میزان نسبتاً بزرگی از تغییرات را توجیه نمایند. دو QTL مرتبط با تعداد کل برگ‌ها مجموعاً با اثر افزایشی بیش از ۲۰ درصد توانستند میزان قابل توجهی از تغییرات فنوتیپی آنرا کنترل نمایند. با استفاده از اطلاعات فوق می‌توان لاین‌هایی از برنج را تولید نمود که دوره رشدی کوتاهتر، تعداد کل برگ‌های بیشتر و وزن دانه بیشتر داشته باشند.

**واژه‌های کلیدی:** برنج، برگ، خوشه، QTL، مکان‌یابی.

مورد ژن‌های کنترل کننده صفات کمی تاثیر گذار روی صفات برگ در اختیار داشتیم اما پیشرفت- های شگفت انگیزی که امروزه در توسعه نشانگرهای مولکولی حاصل شده است، منجر به تولید نقشه‌های ژنتیکی با ارزشی شده است که با استفاده از آن‌ها می‌توان تک ژن‌های مرتبط با صفات کمی را مکان‌یابی نمود. با استفاده از نقشه ژنتیکی حاصل از نشانگرهای مولکولی، QTL‌های کنترل کننده مرفولوژی برگ مانند طول و عرض برگ (Yan et al. 1998) و زاویه برگ (Li et al., 1999; Yan et al., 1999) مکان‌یابی شده‌اند. به‌رحال، اطلاعات ما در مورد تجزیه QTL‌های کنترل کننده رفتارهای رشدی برگ بسیار محدود است. در مورد خصوصیات خوشه نیز مطالعات چندی صورت گرفت است. Xiao et al., 1999 با استفاده از ۱۴۱ نشانگر RFLP و ۱۹۴ رگه خویش آمیخته نوترکیب (F<sub>۸</sub>)، صفات تعداد دانه در خوشه وزن هزار دانه را ردیابی نمودند. Zhu et al., 1996 از یک جمعیت ۱۳۳ رگه ای هاپلوئیدهای دوگانه (DH) برای مکان‌یابی QTL‌های کنترل کننده شش صفت کمی در برنج با استفاده از ۱۶۷ نشانگر RFLP استفاده نمودند. آنها با استفاده از تجزیه فاصله‌ای QTL برای صفات وزن هزار دانه، تعداد کل دانه‌ها (پر و پوک) در خوشه، تعداد دانه‌های پر در خوشه و درصد تشکیل دانه در خوشه شناسایی نمودند. اساس ژنتیکی سه جزء عملکرد یعنی وزن هزار دانه، تعداد دانه در خوشه و وزن

روند رشد و توسعه برگ‌ها در برنج نه تنها چگونگی رشد رویشی گیاه را تعیین می‌کند بلکه تعیین کننده عملکرد دانه در این گیاه نیز می‌باشد چون برگ‌ها مهمترین منبع تعیین کننده برای وزن نهایی دانه‌ها می‌باشند. عموماً در کنار طول، عرض و سطح برگ، تعداد کل برگ‌های گیاه، تعداد روز تا ظهور برگ پرچم و سرعت ظهور برگ سه صفت مهم تعیین کننده رشد و توسعه برگ‌ها هستند. علاوه بر خصوصیات تعیین کننده رشد و توسعه برگ، صفات مرتبط با خوشه نیز از مهمترین عوامل تعیین کننده عملکرد نهایی در برنج می‌باشند. در سال‌های اخیر تجزیه ژنتیکی صفات مختلفی از برگ در برنج انجام شده است. امروزه مشخص شده است که صفاتی مانند افتادگی برگ، لوله شدن برگ، کرکدار بودن یا نبودن برگ، وجود و عدم وجود گوشوارک صفاتی هستند که بوسیله ژن‌های مغلوب یا ژن‌های مضاعف شده کنترل می‌گردند (Yamagata, 1997). صفات مذکور ارزش چندانی در اصلاح واریته‌های برنج ندارند و استفاده از آنها تنها در صورتیکه از نشانگرهای مولکولی استفاده شود، مقرون به صرفه خواهد بود. اما علاوه بر این محققان متعددی وجود دارند که روی صفات کمی کار می‌کنند و گزارش نمودند که طول، عرض و پهنک برگ از جمله صفات کمی هستند (Yamagata, 1997). تا قبل از اینکه نشانگرهای مولکولی توسعه یابند، اطلاعات محدودی را در

روش‌هایی مانند انتخاب به کمک نشانگر برای اصلاح لاین‌های برتر که تولید رویشی بالایی را در دوره زمانی کوتاهی قبل از گلدهی داشته باشند، فراهم خواهد نمود. اگرچه مطالعات متعددی در جهان برای مکان‌یابی صفات خوشه وجود دارد اما برای جمعیت‌های ایرانی گزارش‌ها بسیار محدود است.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه جمعیت

برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با رشد برگ و خوشه در جمعیت برنج ایرانی، ارقام غریب با خزر تلاقی داده شده و جمعیت‌های در حال تفرق آنها در موسسه تحقیقات برنج کشور و مطابق استانداردهای موسسه بین‌المللی برنج در سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۶ تهیه شد. نمونه‌های برگ‌گی از ۱۹۲ بوته به تصادف انتخاب و DNA ژنومی آنها استخراج گردید و در نهایت کیفیت و کمیت DNA استخراج شده تعیین شد. اندازه‌گیری‌های فنوتیپی بر روی فامیل‌های  $F_4$  انجام گرفت، بدین ترتیب که در بهار ۱۳۸۷ پس از اینکه نمونه‌های بذر به منظور شکسته شدن خواب، به مدت ۳ روز در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند از هر ۱۹۲ فامیل  $F_4$  (حاصل از ۱۹۲ بوته  $F_2$  اولیه)، ۲۰ بذر انتخاب گردید و در ردیف‌های مجزا در مزرعه تحقیقاتی مجتمع آموزش عالی گنبد کاووس کشت گردید.

دانه در خوشه، به وسیله Li et al., 1996 مورد مطالعه قرار گرفتند. با استفاده از یک جمعیت  $F_4$  و ۱۱۴ نشانگر RFLP در مجموع شانزده QTL برای سه صفت فوق‌شناسایی نمودند که بر روی هفت کروموزوم از دوازده کروموزوم برنج قرار داشتند. از شانزده QTL ردیابی شده، هشت QTL وزن هزار دانه، شش QTL تعداد دانه در خوشه و دو QTL وزن دانه در خوشه را کنترل می‌کردند. Wu et al., 1996 نیز از یک جمعیت ۲۳۱ فردی  $F_6$  برای ردیابی QTL‌های کنترل‌کننده شش صفت کمی در برنج با استفاده از ۱۰۴ نشانگر RFLP سود جستند. برای تعداد خوشه‌های فرعی اولیه در هر خوشه اصلی و وزن هزار دانه، QTL‌ها به ترتیب بر روی کروموزوم‌های ۴ و ۱ مکان‌یابی شدند. در پژوهشی Zhuang et al., 1997 برای ردیابی QTL‌های کنترل‌کننده عملکرد و صفات مرتبط با آن از یک جمعیت  $F_6$  و دو جمعیت  $F_3$  استفاده نمودند. از بین QTL‌های ردیابی شده، هفت QTL وزن هزار دانه، شش QTL تعداد کل دانه‌های پر و پوک در خوشه، پنج QTL صفات تعداد دانه‌های پر در خوشه و وزن دانه در بوته را کنترل می‌کردند.

از اهداف این مطالعه تشخیص QTL‌ها، تعیین ساختار ژنتیکی و برآورد نوع عمل ژن در صفات مرتبط با رفتارهای رشدی برگ برنج و خوشه با استفاده از جمعیت  $F_{2:4}$  جمعیت برنج ایرانی بود. ردیابی QTL‌های مرتبط با رفتارهای رشدی برگ برنج اطلاعات پایه‌ای برای استفاده از

## تهیه نقشه ژنتیکی

آغازگرهای SSR مورد استفاده (۳۶۵ جفت) در این تحقیق با استفاده از نقشه های SSR ارایه شده به وسیله *Chen et al., 1997*، *Temnykh et al., 2000* و *McCouch et al., 2002* طوری انتخاب شدند که توزیع یکنواختی بر روی ۱۲ کروموزوم برنج داشته و فاصله بین هر دو نشانگر مجاور بیشتر از ۱۰ سانتی مورگان نباشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در ابتدا تنها برای نمونه‌های DNA والدینی (غریب و خزر) با استفاده از کلیه ۳۶۵ جفت آغازگر SSR انجام شد. هدف از انجام این آزمایش تشخیص چندشکلی آغازگرهای موجود برای دو والد بود. فرآورده‌های PCR کلیه آغازگرها برای دو نمونه DNA والدینی (غریب و خزر) بر روی ژل پلی‌اکریلامید واسرشته‌ساز<sup>۱</sup> ۶ درصد الکتروفورز شدند. از بین ۳۶۵ آغازگر ۱۱۱ نشانگر چندشکلی نشان دادند. در مرحله بعد، نمونه‌های DNA افراد  $F_2$  با استفاده از ۱۱۱ جفت آغازگر فوق تکثیر شدند و فرآورده‌های حاصل به منظور تعیین ژنوتیپ افراد الکتروفورز شدند. روش تعیین ژنوتیپ برای نشانگرهای همباز SSR در افراد جمعیت  $F_2$  به این صورت بود که افرادی که تنها یک نوار را نشان دادند، با حروف A یا B مشخص شدند. اما افرادی که دارای هر دو نوار مشابه با هر دو والد بودند، هتروزیگوت بوده و با حرف H مشخص شدند. بر این اساس، ژنوتیپ

تمامی افراد با حروف A، B یا H تعیین شد. این روش برای تمامی نشانگرهای مورد مطالعه انجام شد و نهایتاً ماتریس داده های ژنوتیپی به ابعاد ۱۹۲×۱۱۱ بدست آمد که از آن برای تهیه نقشه پیوستگی جمعیت استفاده شد.

گروههای پیوستگی اولیه با استفاده از نرم افزارهای Map Manager (Manly and Olson, 1999) تشکیل شدند. برای تخصیص هر یک از نشانگرها به کروموزوم‌های مربوط، گروه‌های پیوستگی بدست آمده با نقشه‌های ژنتیکی ارایه شده توسط *Chen et al., 1997*، *Temnykh et al., 2000* و *McCouch et al., 2002* مقایسه شدند. برای تبدیل نسبت های نوترکیبی بین نشانگرها به واحد نقشه (سانتی مورگان) از تابع تهیه نقشه *Kosambi 1944* استفاده گردید.

## صفات مورد بررسی

تعداد کل برگ‌ها (TNL) در مرحله حداکثر پنجه زنی شمارش گردید. تعداد روز تا ظهور برگ پرچم (DEF) که برای ثبت آن خوشه اصلی هر بوته ملاک قرار گرفت. سرعت ظهور برگ‌ها در ده روز (LER) با حاصل ضرب ۱۰ در نسبت تعداد کل برگ به تعداد روز تا ظهور برگ پرچم محاسبه شد. طول و عرض برگ پرچم (LFL و WFL): برای اندازه‌گیری طول برگ در پایان دوره رشد رویشی گیاه، به کمک خط کش میلی‌متری، از گوشوارک تا نوک برگ بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد.

<sup>1</sup>-Denaturing polyacrylamide gels

متفاوت برنج قرار داشتند. و سایر آغازگرها هیچگونه تفاوتی بین والدین نشان ندادند (شکل ۱). تفاوت بین والدین مورد بررسی برای کلیه صفات معنی‌دار بود. توزیع فنوتیپی کلیه صفات مرتبط با رشد برگ و خوشه به صورت پیوسته و نرمال بود (جدول ۱) که دلیلی بر وجود وراثت کمی برای صفات مورد بررسی است. برای این صفات، تعدادی از نتایج  $F_2$ ، ارزش‌های فنوتیپی خارج از محدوده والدینی را نشان دادند. به عبارت دیگر ارزش مشاهده شده صفت در آنها بیشتر از والد دارای حداکثر مقدار صفت و کمتر از والد دارای حداقل مقدار صفت بود که مبین وقوع پدیده تفکیک متجاوز در نتایج باشد (شکل ۲).

برای تجزیه داده‌ها، از روش ICIM (Inclusive Composite Interval Mapping) و با استفاده از نرم افزار Qgene (Nelson, 1997) استفاده انجام شد. اخیراً در بسیاری از مطالعات مربوط به مکان‌یابی ژن‌های کمی از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) استفاده شده است، الگوریتم اجرا شده در نرم‌افزار QTL Cartographer (Basten et al., 2001) تمام جزئیات مفید مکان‌یابی را تأمین نمی‌کند. علاوه بر این روش‌های مختلف انتخاب نشانگر در زمینه ژنومی، نتایج مختلفی را ارائه می‌دهد و اینکه کدام روش برای گزینش نشانگرهای کوفاکتور مناسب است، دقیقاً مشخص نیست.

اندازه عریض‌ترین بخش برگ نیز به عنوان عرض برگ ثبت شد. برای اندازه‌گیری وزن دانه (GW)، در زمان رسیدگی، وزن دانه خوشه اصلی تصادفی به کمک ترازویی با دقت یک صدم گرم وزن شد و سپس میانگین آنها بر حسب گرم محاسبه شد. تعداد خوشچه‌های اولیه (BRA) ۱۰ خوشه تصادفی از هر واحد آزمایشی شمارش گردید و سپس میانگین آنها محاسبه شد. برای ثبت تعداد دانه (FG) در خوشه اصلی، در زمان رسیدگی، تعداد دانه‌های خوشه اصلی از هر بوته شمارش گردید و سپس میانگین آنها محاسبه شد.

#### نتایج و بحث

برای تهیه نقشه پیوستگی نشانگرهای ریزماهواره در جمعیت  $F_2$ ، از بین ۳۶۵ جفت آغازگر مطالعه شده، ۱۱۱ جفت آغازگر برای جمعیت غریب و خزر توانستند الگوی نواربندی متفاوتی برای دو والد در جریان الکتروفورز نشان دهند که از این تعداد، ۱۱۱ جفت آغازگر (۳۰/۴۱ درصد) الگوی نواربندی متفاوتی برای والدین غریب و خزر به نمایش گذاشتند. نتایج نشان داد که از ۱۱۱ نشانگر موجود در نقشه ژنتیکی، ۱۰ نشانگر (۲/۲۷ درصد) دارای فراوانی‌های اللی و ژنوتیپی متفاوت و معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) با فراوانی‌های مورد انتظار ۱:۲:۱ بودند. همه این نشانگرها در سه ناحیه ژنومی پیوسته بر روی دو کروموزوم

جدول ۱- میانگین صفات مورد بررسی برای والدین و جمعیت F<sub>4</sub> و چولگی صفات.

**Table 1-Mean traits of characters for parentd and F<sub>4</sub> population and Skewness**

چولگی Skewness	میانگین F <sub>4</sub> F <sub>4</sub> Mean	خزر Khazar	غریب Gharib	صفات Traits
0.237 <sup>ns</sup>	62.32	68.35	58.71	تعداد کل برگ‌ها Total leaf number
0.222 <sup>ns</sup>	122.12	125.14	117.23	روز تا ظهور برگ پرچم Days to flag leaf emergence
0.210 <sup>ns</sup>	3.71	3.21	4.32	سرعت ظهور برگ Leaf emergence rate
0.121 <sup>ns</sup>	11.85	9.61	15.32	وزن دانه Grain weight
0.292 <sup>ns</sup>	132.28	167.51	64.63	تعداد دانه Grain number
0.134 <sup>ns</sup>	1.34	1.22	1.61	عرض برگ پرچم Flag leaf width
0.284 <sup>ns</sup>	11.45	13.81	10.22	تعداد خوشه‌چه Branches number

ns : غیر معنی‌دار Nonsignificant

مکان‌یابی فاصله‌ای و فاصله‌ای مرکب را دارد، علاوه بر اینکه از افزایش خطای نمونه‌برداری اجتناب می‌کند. همچنین پیچیدگی انتخاب نشانگر در زمینه ژنتیکی در مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب را نیز ندارد. Li *et al.*, 2007 با مقایسه دو روش CIM و ICIM با زمینه‌های ژنتیکی مختلف نشان دادند که این روش قدرت بسیاری در ردیابی QTLها دارد ضمن اینکه از نرخ ردیابی‌های غلط می‌کاهد و تخمین‌های اریب را برای اثرات QTL بسیار کاهش می‌دهد. بیست فاصله واجد QTL شناسایی شد که

ICIM الگوریتمی را ارائه می‌کند که در آن انتخاب نشانگر بر اساس انجام یکبار رگرسیون گام به گام است که در آن از اطلاعات کلیه نشانگرها بطور همزمان استفاده می‌شود و ارزش فنوتیپی نیز برای کلیه نشانگرهای باقیمانده در معادله رگرسیون بجز دو نشانگری که در فاصله مکان‌یابی مد نظر می‌باشند، تصحیح خواهد شد و برای مکان‌یابی فاصله‌ای (IM) استفاده می‌شود. این روش ساده تر از CIM بوده و بسیار سریعتر همگرا می‌شود. این روش تمامی مزایا دو روش

غالبیت برای وزن دانه در خوشه بودند، در حالیکه عمل سایر QTLها به صورت غالبیت جزئی بود. QTLهای شناسایی شده برای تعداد دانه پر بر روی کروموزومهای ۱ (چهار QTL) و ۴ قرار داشتند. اثر افزایشی هر QTL منفرد از ۱۴/۲۲ تا ۲۴/۶۳ متغیر بود. در همه QTLهای شناسایی شده آلل-های خزر باعث افزایش تعداد دانه پر شدند. qFG-1b با لود ۲۴/۶۳، ۱۳/۷۰ درصد از تنوع فنوتیپی موجود در صفت را توجیه نمود. به جز در مورد qFG-1a که غالبیت آن به صورت فوق غالبیت بود، در سایر QTLهای شناسایی شده نوع عمل ژن‌ها به صورت غالبیت جزئی بود (جدول ۲).

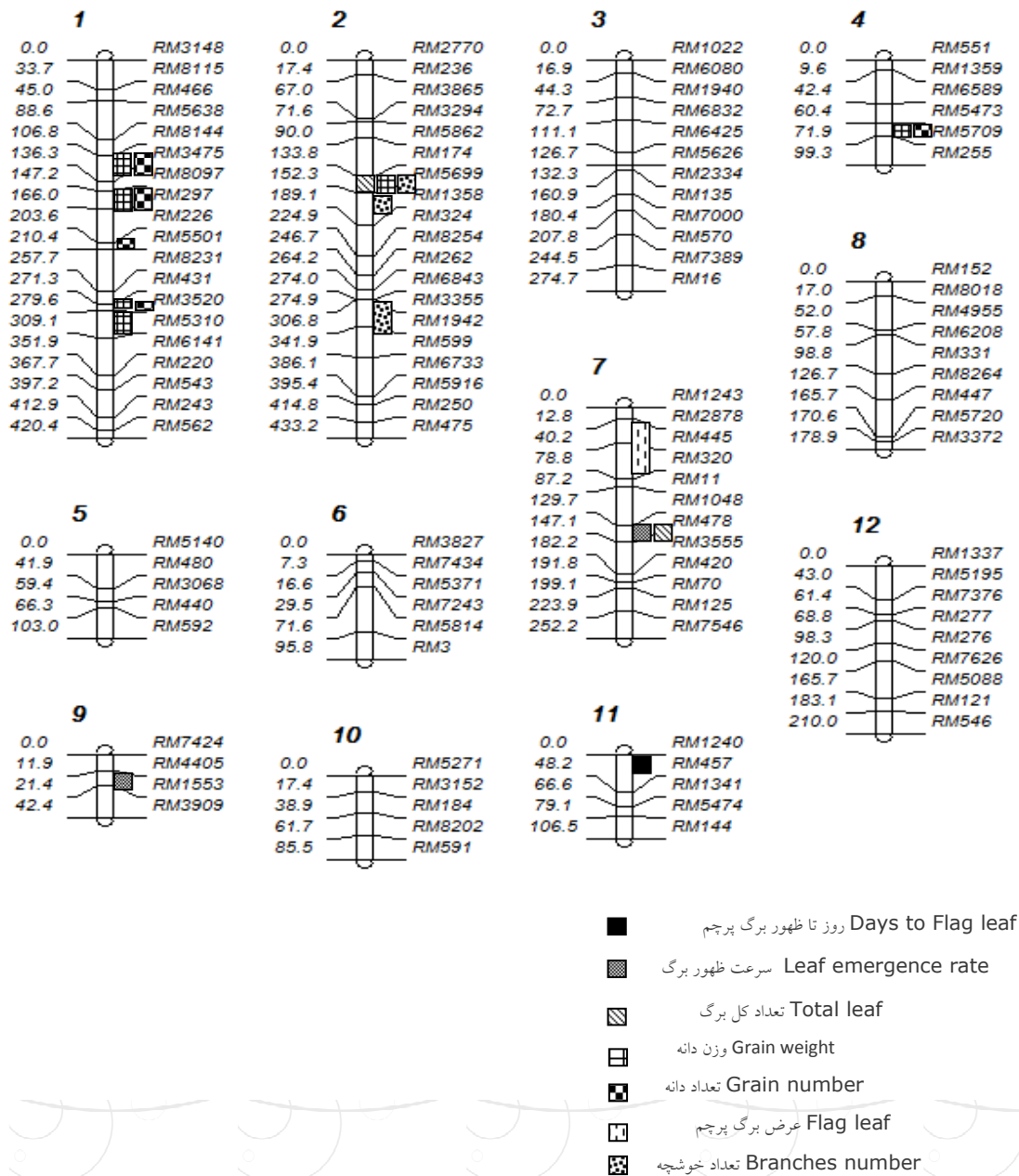
تنها یک QTL برای عرض برگ پرچم روی کروموزوم ۷ و در جهت کاهش آن به اندازه ۰/۱۴ سانتی متر ردیابی شد. این QTL بزرگ اثر توانست به تنهایی ۲۰/۳۲ درصد از تغییرات عرض برگ پرچم را توجیه نماید. نوع عملکرد ژن در qWLF7 به صورت غالبیت جزئی بود (جدول ۲).

کنترل ۷ صفت را بر عهده داشتند. از این تعداد ۲ QTL تعداد کل برگ، یک QTL روز تا ظهور برگ پرچم، دو QTL سرعت ظهور برگ، شش QTL وزن دانه در خوشه، پنج QTL تعداد دانه در خوشه، یک QTL عرض برگ پرچم و سه QTL تعداد خوشچه را کنترل کردند (جدول ۲).

شش QTL کنترل کننده وزن دانه در خوشه بر روی کروموزومهای ۱ (چهار QTL)، ۲ و ۳ قرار داشتند. QTLهای qGW-1a، qGW-1b و qGW-1c به ترتیب با LOD برابر با ۴/۷۳، ۶/۴۵ و ۴/۹۱ بیشترین اثر را بر وزن دانه در خوشه داشتند و به ترتیب ۱۰/۷۰، ۱۴/۳۰، ۱۱/۱۰ درصد از تنوع فنوتیپی موجود را توجیه نمودند. اثر افزایشی هر QTL منفرد از ۰/۱۳ تا ۰/۶۷ متغیر بود و در کلیه QTLهای شناسایی شده آلل‌های غریب به طور متوسط ۰/۴۶ گرم وزن دانه را افزایش دادند. اثر غالبیت در همه QTLها به جز qGW-4 افزایشی برآورد گردید (جدول ۲).

نتایج نشان داد که کلیه QTLهای شناسایی شده جز qGW-1a، qGW-1b و qGW-1c دارای عمل فوق

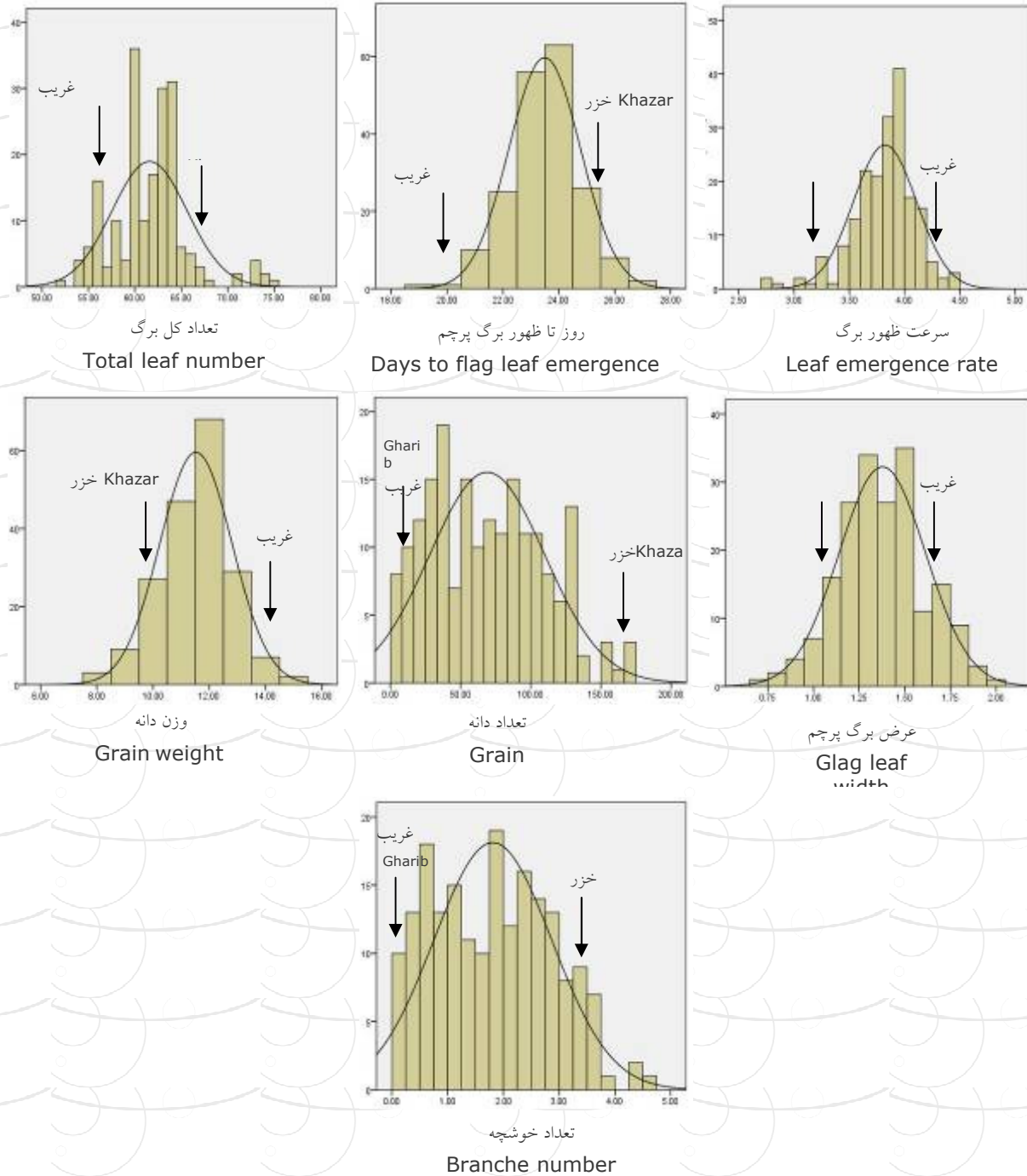




شکل ۱- نقشه پیوستگی ۱۱۱ نشانگر ریزماهواره در جمعیت  $F_2$  برنج ایرانی حاصل از تلاقی غریب × خزر.

Figure 1- Linkage map of 111 SSR markers in rice  $F_2$  population caused Gharib × Khazar cross





شکل ۲- توزیع فنوتیپی صفات مرتبط با رشد و توسعه برگ و خوشه در جمعیت  $F_{2:4}$  غریب × خزر.

Figure 2- Phenotypic distribution of traits related to leaf and panicle development in  $F_{2:4}$  Gharib × Khazar population

داشتند. اثر افزایشی QTL های مذکور منفرد در جهت کاهش سرعت ظهور برگ‌ها بود. عمل ژن در هر دو QTL ردیابی شده به صورت فوق غالبیت بود (جدول ۲).

برای روز تا ظهور برگ پرچم تنها یک QTL بر روی کروموزوم ۱۱ با اثر افزایشی از آلل غریب شناسایی شد. عمل این ژن به صورت فوق غالبیت بود. این QTL حدود ۸/۴۰ درصد از تغییرات فنوتیپی روز تا ظهور برگ پرچم را توجیه نمود (جدول ۲).

اگر یک QTL بتواند تنوع بیشتری را نسبت به سایر QTL های مکان‌یابی شده برای یک صفت نشان دهد و مقیاس لود بیشتری از سایر QTL ها داشته باشد، به عنوان یک مکان ژنی اصلی یا یک ژن بزرگ اثر کنترل کننده صفت تلقی می‌شود. QTL های qGW-1b ، qFG-1b و qWFL-7 به ترتیب با تبیین ۱۴/۳۰، ۱۳/۷۰ و ۲۰/۳۲ درصد از تنوع فنوتیپی چنین مشخصه‌ای داشتند.

سه QTL کنترل کننده تعداد خوشچه بر روی کروموزوم‌های ۲ قرار داشتند. اثر افزایشی از ۱/۱۹- تا ۰/۶۰ متغیر بود. در مورد qBRA-2c الل خزر باعث افزایش تعداد خوشچه شد در سایر QTL های ردیابی شده الل‌های غریب باعث کاهش تعداد خوشچه شد. عمل ژن در همه QTL شناسایی شده به صورت فوق غالبیت به سمت افزایش تعداد خوشچه بود. QTL شناسایی شده، مجموعاً بیش از ۲۲ درصد از تغییرات فنوتیپی مربوط به تعداد خوشچه را کنترل کنند (جدول ۲).

برای تعداد برگ، دو QTL بر روی کروموزوم‌های ۲ و ۷ شناسایی شد. اثر افزایشی QTL های مربوط به تعداد برگ از ۰/۹۰ تا ۱۳/۰۶ متغیر بود و در هر دو مورد آلل‌های خزر باعث افزایش تعداد برگ شدند. QTL های ردیابی شده برای تعداد برگ مجموعاً ۲۲/۲۰ درصد از تغییرات تعداد برگ را کنترل نمودند (جدول ۲).

QTL های شناسایی شده برای سرعت ظهور برگ بر روی کروموزوم‌های ۷ و ۹ قرار

جدول ۲- QTLهای ردیابی شده برای صفات مرتبط با رشد و توسعه برگ و خوشه در جمعیت F<sub>2:4</sub> مشتق از تلاقی ارقام غریب × خزر با استفاده از روش **Inclusive Composite Interval Mapping**

**Table 1- QTLs detected for traits related to leaf and panicle development in F<sub>2:4</sub> Gharib × Khazr population using Inclusive Composite Interval Mapping**

صفات Traits	QTL	کروموزوم Chromosome	مارکرهای مجاور Flanking marker	LOD	اثر افزایشی Additive effect	اثر غالبیت Dominance effect	درصد توجیه Expansion effect	جهت آلل Allele direction
روز تا ظهور برگ پرچم Days to flag leaf emergence	qDFL-11	11	RM1240- RM457	3.655	5.711	-6.330	8.40	خزر Khazar
سرعت ظهور برگ Leaf emergence rate	qLER-7	7	RM478- RM3555	4.131	-0.04	0.169	9.40	غریب Gharib
	qLER-9	9	RM4405- RM1553	3.636	-0.041	0.154	8.40	غریب Gharib
تعداد کل برگ Total leaf number	qTNL-2	2	RM5699- RM1358	5.146	13.063	-13.950	11.60	خزر Khazar
	qTNL-7	7	RM478- RM3555	4.684	0.901	-2.640	10.60	خزر Khazar
وزن دانه Grain weight	qGW-1a	1	RM3475- RM8097	4.729	0.630	0.091	10.70	غریب Gharib
	qGW-1b	1	RM297- RM226	6.446	0.667	0.448	14.30	غریب Gharib
	qGW-1c	1	RM3520- RM5310	4.907	0.597	0.487	11.10	غریب Gharib
	qGW-1d	1	RM5310- RM6141	4.044	0.489	0.510	9.20	غریب Gharib
	qGW-2a	2	RM5699- RM1358	3.343	0.127	0.531	7.70	غریب Gharib
	qGW-4	4	RM5709- RM255	3.696	0.249	-1.189	8.50	غریب Gharib
	تعداد دانه Grain number	qFG-1a	1	RM3475- RM8097	22.686	3.608	4.026	9.20
	qFG-1b	1	RM297- RM226	24.633	12.462	6.142	13.70	خزر Khazar

صبوری و همکاران، ۱۳۹۲

	qFG-1c	1	RM3520- RM5310	21.051	20.975	4.062	9.30	خزر Khazar
	qFG-1d	1	RM5501- RM8231	14.224	-16.533	3.009	7.00	خزر Khazar
	qFG-4	4	RM5709- RM255	17.574	-47.726	3.226	7.40	غریب Gharib
عرض برگ								
پرچم Flag leaf width	qWFL-7	7	RM2878- RM320	11.530	0.140	-2.020	20.32	خزر Khazar
	q BRA-2a	2	RM5699- RM1358	-0.472	-1.193	3.182	7.30	غریب Gharib
تعداد خوشچه Branches number	q BRA-2b	2	RM1358- RM324	-0.766	-0.942	3.380	7.80	غریب Gharib
	q BRA-2c	2	RM1942- RM599	-0.351	0.597	3.184	7.40	خزر Khazar

خوشچه روی کروموزوم ۲ (qBRA-2a)، تعداد برگ، وزن دانه و تعداد دانه را نیز کنترل نمود. ناحیه ای روی کروموزوم ۷ ردیابی شد که تعداد برگ و سرعت ظهور برگ را نیز کنترل نمود. مقایسه نتایج این بررسی با سایر محققین (جدول ۴) نشان داد که QTLهای ردیابی شده برای صفات رشد و توسعه برگ در این مطالعه با مطالعات قبلی مطابقت ندارد. این ممکن است به دلایل مختلفی از جمله زمینه ژنتیکی متفاوت در بررسی‌های مختلف باشد. از طرف دیگر مطالعات برای بررسی QTLهای صفات مربوط به رشد و توسعه برگ‌ها نیز بسیار محدود می‌باشد. اما برای صفات خوشه نتایج نشان داد که QTLهای ردیابی شده برای وزن دانه در خوشه در این مطالعه روی کروموزوم‌های ۱، ۲ و ۴ با نتایج Li et Hittalmani et al., 2002، Xiao et al., Marri et al., 2005، Thomson et al., 1996، 2003، 1996 روی کروموزوم ۱، یون و همکاران (۲۰۰۶)، Li، Marri et al., 2005، Zhuang et al., 1997، et al., 1996 کروموزوم ۲، Yoon et al., 2006 روی کروموزوم ۴ مطابقت داشت. برای تعداد دانه در خوشه نیز Brondani et al., 2002، Marri et al., 2005، Thomson et al., 2003 مانند این مطالعه روی کروموزوم ۱، Brondani et al., 2002 و Thomson et al., 2003 روی کروموزوم ۴ ردیابی نمودند.

علاوه بر این QTLهای qDFL-2، qDFL-1c و qGW-1a و 2، qGW-1c و qGW-1a مربوط به ظهور برگ و وزن دانه به ترتیب با لود برابر ۵/۱۵، ۴/۶۴، ۴/۷۳ و ۴/۹۱ اثر نسبتاً بزرگی داشتند و به ترتیب ۱۱/۶۰، ۱۰/۶۰، ۱۰/۷۰ و ۱۱/۱۰ درصد از تنوع فنوتیپی موجود را توجیه نمودند. سایر QTLهای شناسایی شده کوچک اثر بوده و اثرات فنوتیپی کمتری را توجیه نمودند. وجود همبستگی‌های بین صفات به وسیله اثرات پلیوتروپی یا پیوستگی شدید بین ژنهای کنترل کننده آنها توصیف می‌شود. صفات همبسته اغلب به وسیله QTLهایی کنترل می‌شوند که در نواحی مشابهی بر روی کروموزوم‌ها قرار دارند (Xiao et al., 1996 و Paterson et al., 1988). چنین نتایجی برای وزن دانه، تعداد دانه، تعداد خوشچه، تعداد و سرعت ظهور برگ در این مطالعه نیز مشاهده شد. ضرایب همبستگی بین صفات مورد بررسی در جدول ۳ آمده است. در اکثر موارد مورد بررسی جهت همبستگی‌ها با جهت اثر QTLهای ردیابی شده مطابقت داشت. نتایج بدست آمده در این بررسی اثرات پلیوتروپی یا پیوستگی بین ژنهای کنترل کننده صفات مورد بررسی را مورد تأیید قرار داد. تعداد دانه پر و وزن دانه همبستگی بسیار بالا و معنی‌داری دارند. از بین QTLهای شناسایی شده برای وزن دانه، تمام آنها جز یک QTL (qGW-2a) تعداد دانه را نیز کنترل نمودند. همچنین QTL ردیابی شده برای تعداد

جدول ۳- ضرایب همبستگی بین صفات مرتبط با رشد و توسعه برگ‌ها و خوشه.

Table 3- correlation coefficient between traits related to leaf and panicle development

عرض برگ	تعداد خوشچه	تعداد دانه	وزن دانه	سرعت ظهور برگ	روز تا ظهور برگ	تعداد کل برگ
Flag leaf width	Branches number	Grain number	Grain weight	Leaf emergence rate	Days to flag leaf emergence	Total leaf number
۱						۱
	۱					0.214**
		۱				-0.727**
			۱			-0.041
				۱		-0.045
					۱	-0.018
	۱					0.037
		۱				0.125
			۱			0.0428**
				۱		0.111
					۱	-0.067
	۱					0.127
		۱				0.062
			۱			-0.045
				۱		-0.038
					۱	-0.065
						-0.039
						-0.063
						-0.004
						0.503**
						-0.067

\*\* معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

گیاهان را تولید نمایند که در یک دوره رشد کوتاه-تر، منبع تامین کننده فتوسنتزی بیشتری (تعداد برگ بیشتر) داشته باشند. در مطالعه حاضر، آل‌های با اثر افزایشی و کاهش‌ی موثر بر صفات توسعه‌ای برگ از هر دو والد شناسایی شد که توزیع کمی و انتقال ژن برای صفات فوق را در جمعیت مورد مطالعه ما را نشان می‌دهد.

رفتارهای رشد و توسعه برگ، نه تنها تعیین کننده رشد رویشی گیاه برنج می‌باشد بلکه از عوامل تعیین کننده عملکرد دانه نیز می‌باشد. چون برگ‌ها منبع اصلی تعیین کننده ظرفیت عملکرد برنج می‌باشد. تجزیه QTL این صفات، مکانیسم ژنتیکی آن‌ها را آشکار خواهد نمود و اطلاعاتی را برای اصلاح‌گران برنج را فراهم خواهد نمود تا بتوانند

جدول ۴- مقایسه QTL های شناسایی شده در این مطالعه با مطالعات پیشین.

**Table 4- Comparison of detected QTL in this study with previous studies**

سرعت ظهور برگ Leaf emergence rate		
کروموزوم Chromosome	QTL شناسایی شده در این مطالعه Detected QTL in this study	QTL شناسایی شده در مطالعات پیشین QTL detected in previous studies
3	-	qDEF-3 ( Dong <i>et al.</i> , 2004)
6	-	qDEF-6( Dong <i>et al.</i> , 2004)
7	qDFL-7	-
8	-	qDEF-8 ( Dong <i>et al.</i> , 2004)
9	qDFL-9	-
تعداد کل برگ Total leaf number		
2	qTNL-2	-
3	-	qTNL-3 ( Dong <i>et al.</i> , 2004)
5	-	qTNL-5 ( Dong <i>et al.</i> , 2004)
6	-	qTNL-6 ( Dong <i>et al.</i> , 2004)
7	qTNL-7	-
8	-	qTNL-8 ( Dong <i>et al.</i> , 2004)
9	-	qTNL-9 ( Dong <i>et al.</i> , 2004)
12	-	qTNL-12 ( Dong <i>et al.</i> , 2004)
روز تا ظهور برگ پرچم Days to flag leaf emergence		
11	qLER-11	
وزن دانه Grain weight		
1	qGW-1a, qGW-1b, qGW-1c and qGW- 1d	qTGW1-1, qTGW1-2 and aTGW1-3(Hittalmani <i>et al.</i> 2003); GRYLD ( Li <i>et al.</i> 1997); <i>yld1.1</i> (Marri <i>et al.</i> 2005 and Xiao <i>et al.</i> 1998); <i>gw1.1</i> (Thomson <i>et al.</i> 2003)



صیوری و همکاران، ۱۳۹۲

2	qGW-2	<i>tgw2</i> (Yoon <i>et al.</i> 2006); <i>gw2.1</i> , <i>gw2.2</i> and <i>gw2.3</i> (Marri <i>et al.</i> 2005); <i>GW</i> (Li <i>et al.</i> 1998); <i>tgwt</i> (Zhuang <i>et al.</i> 1997); <i>GW</i> (Yoshida <i>et al.</i> 2002); <i>kw2-2</i> (Gao <i>et al.</i> 2002); <i>gw2.1 yldp2.2</i> (Marri <i>et al.</i> 2005); <i>GRYLDPPL</i> (Zauang <i>et al.</i> 1997; Li <i>et al.</i> 1997 and Xiao <i>et al.</i> 1996); <i>yd2</i> ( Yoon <i>et al.</i> 2006)
3	-	<i>qTGW3-1</i> , <i>qTGW3-2</i> and <i>qTGW3-3</i> (Hittalmani <i>et al.</i> 2003); <i>gw3.1</i> and <i>gw3.2</i> (Thomson <i>et al.</i> 2003); <i>yld2.1</i> ( Thomson <i>et al.</i> 2003); <i>yld3.1</i> and <i>yld3.2</i> (Thomson <i>et al.</i> 2003)
4	qGW-4	<i>qYLD4-1</i> ( Yoon <i>et al.</i> 2006)
5	-	<i>Gw5.1</i> ( Thomson <i>et al.</i> 2003 )
6	-	<i>qTGW6-1</i> (Hittalmani <i>et al.</i> 2003); <i>yld6.1</i> ( Thomson <i>et al.</i> 2003)
8	-	<i>yld8.1</i> , <i>yld8.3</i> and <i>yld8.4</i> (Marri <i>et al.</i> 2005); <i>GRYLD</i> ( Li <i>et al.</i> 1997 and Xiao <i>et al.</i> 1996); <i>yld9.1</i> ( Thomson <i>et al.</i> 2003)
9	-	<i>gw9.1</i> (Marri <i>et al.</i> 2005 and Thomson <i>et al.</i> 2003); <i>qYLD9-1</i> (Yoon <i>et al.</i> 2006); <i>gw9.1</i> ( Thomson <i>et al.</i> 2003)
10	-	<i>qTGW10-1</i> , <i>qTGW10-2</i> and <i>qTGW10-3</i> (Hittalmani <i>et al.</i> 2003); <i>qYLD10-1</i> ( Yoon <i>et al.</i> 2006); <i>gw10.1</i> ( Thomson <i>et al.</i> 2003)
11	-	<i>tgw11</i> (Yoon <i>et al.</i> 2006)
12	-	<i>gw12.1</i> ( Thomson <i>et al.</i> 2003 )

تعداد دانه

Grain number

1	qFG-1a, qFG-1b, qFG-1c and qFG-1d	<i>gn2.1</i> (Marri <i>et al.</i> 2005); <i>FGP1-1</i> and <i>FGP1-2</i> (Brondani <i>et al.</i> 2002); <i>gpp1.1</i> and <i>gpp1.2</i> (Thomson <i>et al.</i> 2003)
2	-	<i>FGP1-2</i> (Brondani <i>et al.</i> 2002); <i>gpp2.1</i> (Thomson <i>et al.</i> 2003)
3	-	<i>FGP3</i> (Brondani <i>et al.</i> 2002); <i>gpp3.1</i> (Thomson <i>et al.</i> 2003)
4	qFG-4	<i>FGP4-1</i> and <i>FGP4-2</i> (Brondani <i>et al.</i> 2002); <i>gpp4.1</i> (Thomson <i>et al.</i> 2003)
5	-	<i>gn5.1</i> ( Marri <i>et al.</i> 2005)
7	-	<i>FGP7-1</i> and <i>FGP7-2</i> (Brondani <i>et al.</i> 2002)
8	-	<i>gpp4.1</i> (Thomson <i>et al.</i> 2003)
9	-	<i>gpp9.1</i> (Thomson <i>et al.</i> 2003)
11	-	<i>gpp11.1</i>
12	-	<i>gpp12.1</i> and <i>gpp12.2</i>

- Basten CJ, Weir BS, Zeng ZB (2001). QTL Cartographer: A reference manual and tutorial for QTL mapping. North Carolina State University. USA.
- Brondani C, Rangel PHN, Brondani RPV, Ferreira ME (2002). QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1192–1203.
- Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, McCouch SR (1997). Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 95: 553–567.
- Dong Y, Kamiunten H, Ogawa T, Tsuzuki E, Terao H, Lin D, Matsuo M (2004). Mapping of QTLs for leaf development behavior in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 138:169-175.
- Hittalmani S, Shashidhar HE, Bagali PG, Huang N, Sidhu JS, Singh VP, Khush GS (2002). Molecular mapping of quantitative trait loci for plant growth, yield and yield related traits across three diverse locations in a doubled haploid rice population. *Euphytica* 125: 207–214.
- Li H, Ye G, Wang J (2007). A modified algorithm for the improvement of composite interval mapping. *Genetics* 175:361-374.
- Li ZK, Paterson AH, Pinson SRM (1999). RFLP facilitated analysis of tiller and leaf angles in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 109:79-84.
- Li Z, Pinson SRM, Park WD, Paterson AH, Stansel JW (1996). Mapping of quantitative trait loci and quantitative-trait-modifying factors affecting three grain yield components in rice (*Oryza sativa* L.). In: Khush, G.S. (Ed.). *Rice Genetic III*. IRRI, Manila, Philippines.
- Kosambi DD (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Annul Eugen* 12: 172–175.
- Marri PR, Sarla N, Reddy LV, Siddiq EA (2005). Identification and mapping of yield and yield related QTLs from an Indian accession of *Oryza rufipogon*. *BMC Genetic* 6:33-47.
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos K, Clare K, Walton M (2002). Development of 2243 new SSR markers for rice by the international rice microsatellite initiative. *Proc. First International Rice Congress*. China. PP.150 - 152.
- Manly KF, Olson JM (1999) Overview of QTL mapping software and introduction to map manager QTX. *Mammalian Genome* 10: 327–334.
- Nelson JN (1997). QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Molecular Breeding* 3: 239–245.
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Paterson S, Lincoln SE, Tanksley SD (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete RFLP linkage map. *Nature* 335: 721–726.
- Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho YG, Ishii T, McCouch SR (2000). Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 697–712.
- Thomson MJ, Tai TH, McClung AM, Lai XH, Hinga ME, Lobo KB, Xu Y, Martínez R, McCouch SR (2003). Mapping quantitative trait loci for yield, yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. *Theoretical and Applied Genetics* 107:479-493.
- Wu P, Zhang G, Huang N (1996). Identification of QTLs controlling quantitative characters in rice using RFLP markers. *Euphytica* 89: 349–354.

- Xiao J, Li J, Yuan L, Tanksley SD (1996). Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 230–244.
- Yamagata H (1997). Differentiation and inheritance of characters. Chapter 2. Inheritance of morphological characters. In Science of the rice plant, Genetics (Vol. 3) Matsuo T, Futsuhara Y, Kikuchi F, Yamaguchi (eds), Food and Agriculture Policy Research Center, Tokyo, Japan, 277-285.
- Yan JQ, Zhu C, He C, Benmoussa M, Wu P (1998). Quantitative trait loci analysis for the development behavior of number tiller in rice (*Oryza sativa* L.) *Crop Science* 39:538-544.
- Yan JQ, Zhu J, He C, Benmoussa M, Wu P (1999). Molecular Marker-assisted dissection of genotype × environment interaction for plant type traits in rice (*Oryza sativa* L.) *Crop Science* 39: 538-544.
- Yoon DB, Kang KH, Kim HJ, Ju HG, Kwon SJ, Suh JP, Jeong OY, Ahn SN (2006). Mapping quantitative trait loci for yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza grandiglumis* and the *Oryza sativa* japonica cultivar Hwaseongbyeon. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1052–1062
- Zhuang JY, Lin HX, Lu J, Qian HR, Hittalmani S, Huang N, Zheng KL (1997). Analysis of QTL×environment interaction for yield components and plant height in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 799–808.
- Zhu L, Lu C, Li P, Shen L, Xu Y, He P, Chen Y (1996). Using doubled haploid populations of rice for quantitative trait locus mapping. In: Khush GS (ed.). *Rice Genetic III*. IRRI, Manila, Philippines.

## Molecular analysis of rice vegetative growth traits

Sabouri H.<sup>\*1</sup>, Mohammadinejad Gh.<sup>2</sup>, Sabouri A.<sup>3</sup>, Navvabpouri S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor of Department of Plant Production, College of Agriculture Science and Natural Resource, Gonbad Kavous University, Iran.

<sup>2</sup> Assistant Professor of Department of Plant Breeding, College of Agriculture Science, Kerman University of Shahid Bahonar, Kerman, Iran.

<sup>3</sup> Assistant Professor of Department of Plant Breeding, College of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

<sup>4</sup> Assistant Professor of Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture Science, Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resource, Gorgan, Iran.

### Abstract

Leaf growth and development characteristics are important factor for grain yield. In order to genetic analysis of Leaf growth and development characteristics of rice, a linkage map provided from F2 rice mapping population caused Gharib × Khazar and 111 microsatellite markers. Total number leaf, Days to flag leaf, leaf emergence rate, grain weight, grain number, length and width of flag leaf and branches number were mapped. qGW-1b, qFG-1b and qWFL-7 were identified as major effect on chromosome 1 and 7 and explained 14.30, 13.70 and 20.32% of total variation of grain weight, filled grain and width of flag leaf, respectively. The most of variation of total leaf number explained by 2 QTLs (over than 20%). According to these result, we can produced rice lines that have low vegetative growth periods and high total leaf number.

**Key words:** rice, leaf, panicle, QTL, mapping.

---

\* Corresponding Author: Sabouri H.

Tel: 09111438917

Email: hos.sabouri@gmail.com

