



شناسایی QTL های عملکرد و صفات مرتبط با عملکرد برنج با استفاده از نقشه لینکاژی با تراکم بالای نشانگرهای SNP

مصطفی احمدی زاده^۱، نادعلی بابائیان جلودار^۲، قاسم محمدی نژاد^{۳*}، نادعلی باقری^۴، راکش کومار سینگ^۵

^۱ دانشجوی دکتری رشته اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

^۲ استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

^۳ دانشیار بخش زراعت و اصلاح نباتات و پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.

^۴ استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

^۵ استاد پژوهش بخش تحقیقات اصلاح نباتات، مؤسسه بین المللی تحقیقات برنج.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۲

چکیده

برنج یکی از غلات مهم با تنوع بسیار خوب است که به عنوان غذای اصلی نیمی از جمعیت جهان استفاده می‌شود. مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمی یکی از روش‌های کاربردی و مهم برای مطالعه صفات مرتبط با عملکرد است. در این مطالعه تعداد ۱۸۸ لاین (F4) برنج حاصل از تلاقی CSR28 و صدری به همراه والدین خود جهت بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مورد ارزیابی قرار گرفت. هدف از این مطالعه تهیه نقشه پیوستگی با درجه اشباع بالا با استفاده از نشانگرهای SNP (Infinium Illumina 6K) و شناسایی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات مرتبط با عملکرد در ۱۸۸ لاین جمعیت F4 است. مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمی منجر به شناسایی ۲۱ QTL برای صفات مورد مطالعه بر روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۸ و ۱۰ شد. برای تعداد دانه‌های پر شده در بوته یک QTL (*qFG_N-3-1*) روی کروموزوم ۳ شناسایی شد. سه QTL (*qSpkF_N-2-1*، *qSpkF_N-3-1* و *qSpkF_N-5-1*) برای درصد باروری روی کروموزوم‌های ۲، ۳ و ۵ مکان‌یابی شد که ۲۹/۲۸ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کردند. یک QTL (*qGY_N-8-1*) برای عملکرد دانه در فاصله نشانگری 9037125 و 9049928 روی کروموزوم ۸ مکان‌یابی شد. در نهایت، علاوه بر شناخت QTL‌های جدید می‌توان دیگر QTL‌هایی که در نواحی مشابه با مطالعات قبلی شناسایی شده را به عنوان QTL-های دارای اعتبار معرفی کرد که مناسب برای برنامه‌های اصلاحی به کمک نشانگر است.

واژه های کلیدی: برنج، صفات کمی، نقشه یابی، نشانگر SNP.

روش‌های مطالعه صفات کمی فراهم می‌شود (Ahmadikhah, 2008). بدیهی است که ارزش اقتصادی یک رقم به ویژگی‌های مختلف آن بستگی دارد و انتخاب برای چندین صفت به منظور حصول حداکثر ارزش، همواره مورد توجه اصلاحگران بوده است. صفاتی از قبیل طول ساقه اصلی، مساحت برگ پرچم، تعداد خوشه، وزن خوشه، تعداد دانه پر و پوک در خوشه و عملکرد دانه به منظور تعیین اثر بخشی آن‌ها در عملکرد مورد مطالعه قرار گرفته است (Ahamadi et al., 2008; Amiri-Fahliani et al., 2014).

یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش روی اصلاحگران برنج برای افزایش پتانسیل عملکرد و بهبود صفات زراعی که در عملکرد نهایی مشارکت دارند، است. بواسطه اثرات متقابل ایستازی در ژن‌های دخیل در عملکرد رسیدن به این هدف با تکیه بر روش‌های سنتی اصلاحی مشکل است (Jena & Mackill, 2008) از دیگر عواملی که اصلاح نباتات را محدود می‌کند، نبود اطلاعات کافی در مورد ژن‌های کنترل کننده صفات کمی 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 روش‌های صفات تک ژنی به اصلاح این صفت پرداخت. مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمی یکی از روش‌های کاربردی و مهم برای مطالعه صفات کمی است

برنج یکی از غلات مهم است که دارای تنوع بسیار خوبی است و در دامنه اکولوژی وسیعی، شامل زمین‌هایی هم سطح دریا تا ارتفاع ۲۷۰۰ متر مانند بخش‌هایی از هیمالیا رشد می‌یابد. برنج وحشی به احتمال زیاد در شرق چین و حوضه رودخانه یانگ (Yangtze) تا شمال شاندونگ (Shandong) رشد کرده است. مطالعات مولکولی و همچنین برخی گزارش‌های معتبر باستان‌شناسی بیان کننده این بوده است که اهلی شدن برنج از ۸۲۰۰ تا ۱۳۵۰۰ سال قبل آغاز شده است (Awan et al., 2017). برنج به عنوان یک غذای اصلی برای نیمی از جمعیت جهان است. پیش بینی می‌شود که در آینده نزدیک بخصوص در آسیا و آفریقا جمعیت به سرعت افزایش یابد، بنابراین افزایش بیشتر عملکرد برنج بایستی یک از اهداف مهم اصلاحی باشد (Gichuhi et al., 2016). همچنین برنج به عنوان یک گیاه مدل در تحقیقات گیاهی در نظر گرفته شده است (Xing & Zhang, 2010).

یکی از اهداف مهم برنامه‌های به نژادی افزایش عملکرد است. به دلیل کمی بودن این صفت مهم و کنترل آن، بوسیله چندین ژن و تأثیر شدید عوامل محیطی روی آن مطالعه ژنتیکی آن بسیار مشکل است (Amiri-Fahliani et al., 2014). اصلاح ارقام پرمحصول نیازمند شناخت ساختار ژنتیکی والدین مورد تلاقی و همچنین آگاهی از ترکیب پذیری صفات مطلوب آن‌ها است که این شناخت با استفاده از

(Thomson, 2014). نشانگرهای DNA که پیوستگی شدیدی با ژنهای کنترل کننده صفات مطلوب زراعی دارند ممکن است به عنوان ابزار ملکولی برای انتخاب به کمک نشانگر در برنامه-های اصلاحی گیاهان زراعی مختلف مورد استفاده قرار گیرد. روش انتخاب به کمک نشانگر، عمل گزینش را به طور معنی داری موثرتر و کم هزینه تر از روشهای کلاسیک به نژادی گیاهی می کند (Collard & Mackill, 2008; Collard *et al.*, 2005). گزارش های متعددی از شناسایی QTL های کنترل کننده عملکرد و اجزا عملکرد توسط محققین ارائه شده است (Hittalmani *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010).

هدف از انجام این تحقیق تهیه نقشه پیوستگی با تراکم بالای نشانگری با استفاده از نشانگرهای SNP (Infinium 6K SNP chip) و شناسایی مکان های ژنی کنترل کننده صفات مرتبط با عملکرد و اجزا آن، تعیین سهم و نحوه اثر QTL های شناسایی شده در تغییرات فنوتیپی صفات مورد بررسی در جمعیت F₄ حاصل از تلاقی رقم های صدری و CSR28 برنج است.

مواد و روش ها

در این مطالعه تعداد ۱۸۸ لاین (F₄) برنج حاصل از تلاقی ارقام (IR51485- CSR28 (AC6534-4 و صدری (رقم بومی معطر ایرانی) به همراه والدین خود جهت بررسی فنوتیپی و

که به طور گسترده در گیاهان زراعی مهم از جمله برنج به کار گرفته می شود (Gong *et al.*, 2001; Movafegh *et al.*, 2009).

امروزه اطلاعات فراوانی در زمینه توالی-یابی ژنوم برنج در اختیار محققین قرار داده شده است که در مطالعات ژنومیکس با استفاده از نشانگرهای DNA بسیار کمک کننده است. ایجاد نقشه های پیوستگی برای گونه های متفاوت گیاهان زراعی، یکی از اساسی ترین کاربردهای نشانگرهای DNA در تحقیقات کشاورزی است. با استفاده از نقشه های پیوستگی می توان نواحی کروموزومی در برگیرنده ژن های کنترل کننده صفات ساده و صفات کمی را با استفاده از تجزیه QTL ردیابی نمود (Amiri-Fahlani *et al.*, 2014). از جمله نشانگرهایی که به فراوانی در سطح ژنوم یافت می شوند، نشانگرهای SNP هستند. مزیت های اصلی نشانگرهای SNP مربوط به مدیریت ساده داده ها به همراه انعطاف پذیری، سرعت بالا و هزینه کم است. دوآلی بودن نشانگرهای SNP، کار را برای ادغام داده ها آسان کرده و پایگاه داده بزرگی از اطلاعات نشانگری به وجود می آورد. به تازگی، تراشه مخصوص ارزیابی ژنوتیپی برنج با تراکم بالای نشانگری توسط دانشگاه کرنل طراحی شده است که هر دوازده کروموزوم برنج را به خوبی پوشش می دهد. به طور کلی به واسطه فراوانی SNP ها در مقایسه با دیگر نشانگرها، می توان نقشه با وضوح بسیار بالا توسط نشانگرهای SNP تشکیل داد

کرده و سپس ۱۰ میلی گرم از هر نمونه برای استخراج وزن شد. نمونه برگ وزن شده در داخل ۱۰ میلی لیتر الکل ۹۵ درصد قرار داده شد. زمانی که نمونه‌ها رنگ سبز خود را از دست دادند، نمونه‌ها آماده قرائت توسط دستگاه اسپکتوفتومتر شد. جذب در طول موج‌های ۶۶۴/۱، ۶۴۸/۶ و ۴۷۰ نانومتر برای ارزیابی کلروفیل (Ca) a، کلروفیل (Cb) b، مجموع کلرفیل (a + b) و کاروتنوئید با استفاده از اسپکتوفتومتر مدل (SPECTROstar Nano, Ultra-fast, full) (UV/Vis spectrum absorbance) صورت پذیرفت. محاسبه محتوای هر پارامتر با استفاده از فرمول‌های زیر انجام شد (Lichtenthaler & Buschmann, 2001):

$$Ca = ((13.56 A_{664.1} - 5.19 A_{648.6}) * extraction\ volume) / dwt$$

$$Cb = ((27.43 A_{648.6} - 8.12 A_{664.1}) * extraction\ volume) / dwt$$

$$Carotenoid = (((1000 A_{470} - 2.13 Ca - 97.64 Cb) / 209) * extraction\ volume) / dwt$$

$$Total\ Chlorophyll\ (a + b) = Ca + Cb$$

در این رابطه‌ها A_{664.1}، A_{648.6} و A₄₇₀ میزان جذب در طول موج‌های ۶۶۴/۱، ۶۴۸/۶ و ۴۷۰ نانومتر است. و dwt: وزن خشک نمونه بر حسب گرم است.

باروری دانه گرده: قبل از اینکه خوشه به طور کامل بیرون آید یا به عبارت دیگر زمان ظهور خوشه و قبل از شروع گلدهی نمونه‌برداری صورت گرفت. برای پرهیز از انتخاب خوشه‌چه‌های دارای بلوغ کامل و خوشه‌چه‌های نابالغ از وسط خوشه، ۱۰ خوشه‌چه جمع‌آوری شد و به طور جداگانه به لوله آزمایش حاوی اتانول ۷۰ درصد انتقال داده شد. سپس تعداد ۴ بساک از ۵

ژنوتیپی در مؤسسه بین المللی تحقیقات برنج (IRRI) واقع در کشور فیلیپین مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش به صورت گلدانی در شرایط گلخانه‌ای بر پایه طرح کاملاً تصادفی در دو تکرار در سال ۲۰۱۵ اجرا شد. دانه‌های گیاهان مورد مطالعه جهت شکستن خواب بذر به مدت ۵ روز در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بذرهای ضد عفونی شده جهت جوانه‌زنی داخل پتری دیش و کاغذ صافی قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. در مرحله بعد چهار بذر جوانه زده در هر گلدان کشت شد. بعد از ۱۴ روز یک بوته در هر گلدان باقی گذاشته شد و سایر گیاهچه‌ها حذف شد.

عملیات برداشت برای تعیین عملکرد نهایی انجام شد. برداشت هنگامی صورت گرفت که رشد و نمو گیاه خاتمه یافته، رنگ بوته‌ها به زردی متمایل شده و دانه‌ها نیز سفت شده بودند. جهت ارزیابی فنوتیپی صفات: ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، طول خوشه (سانتی‌متر)، عملکرد دانه در بوته (گرم)، تعداد دانه پر شده در بوته، تعداد دانه پرنشده در بوته، درصد باروری خوشه، وزن دانه پرنشده در بوته (گرم)، درصد دانه‌های پرنشده، دانه‌های پرنشده در خوشه (گرم)، دانه‌های پرنشده در خوشه (گرم) درصد دانه‌های پرنشده در خوشه، تعداد دانه‌های پرنشده در خوشه، تعداد دانه‌های پرنشده در خوشه اندازه‌گیری شد.

سنجش محتوای کلروفیل: پس از جمع-

آوری و آب کشی نمونه برگ‌ها، برای یکنواخت سازی نمونه مورد آزمایش آنرا خرد و مخلوط

SNP طراحی شده در تراشه مورد استفاده، به خوبی کل ژنوم یا به عبارت دیگر هر ۱۲ کروموزوم برنج پوشش داده شد. تعیین ژنوتیپ ۱۸۸ فرد جمعیت F₄ به همراه والدین شان در آزمایشگاه خدمات ژنوتیپی (GSL) موسسه بین المللی تحقیقات برنج (IRRI)، فیلیپین انجام گرفت. ارزیابی ژنوتیپی بر اساس روش استاندارد Infinium صورت پذیرفت (Infinium HD Assay, 2009).

برای تهیه نقشه پیوستگی، پالایش نشانگرها در جمعیت مورد مطالعه صورت گرفت. نشانگرهایی که بین دو والد چندشکلی نشان دادند، انتخاب شد. نشانگرهایی که در هر والد بصورت داده گم شده یا هتروزیگوت بودند، از ادامه آنالیز کنار گذاشته شد. بررسی برازش و انحراف نشانگرها از نسبت ۱:۱ صورت پذیرفت و نشانگرهایی که در سطح ژنوم انحراف از تفکیک داشتند، حذف شد. مقیاس ۳ برای LOD جهت ترسیم نقشه ژنتیکی انتخاب گردید. بر طبق دستورالعمل نرم افزار IciMapping و با توجه به ساختار جمعیت اصلاحی، تنها امکان وجود سه ژنوتیپ در مکان‌های چندشکل با فراخوان دو آللی نشانگرهای SNP وجود دارد. کدهای A، B، X برای کد کردن آلل‌های متفاوت در داده‌های ژنوتیپی مورد استفاده قرار گرفت. نشانگرهای SNP که در جمعیت بیش از ۱۰ درصد گم شده یا خوانده نشده باشند از ادامه آنالیز حذف شد. فراخوانی SNPها و گروه‌های پیوستگی و ترتیب

گلچه هر نمونه جدا شد و بر روی اسلاید شیشه‌ای قرار داده شد. پس از جداسازی پوسته خارجی با دقت دانه‌های گرده را با فشار دادن سوزن جدا کرده و یک قطره از محلول یک درصد I₂KI (Potassium Iodide) بر روی آن چکانده شد. پس از قرار دادن سرپوش، اسلاید شیشه‌ای جهت مشاهده و شمارش در زیر میکروسکوپ (Olympus DP7) قرار داده شد. سپس به صورت تصادفی از چهار قسمت اسلاید عکس گرفته شد، دانه‌های تیره با حاشیه کامل به عنوان بارور کامل، دانه‌های گرده با حاشیه نامنظم و تیره به عنوان بارور جزئی و دانه‌های گرده به رنگ روشن به عنوان نابارور شمارش شد. در نهایت با استفاده از فرمول زیر درصد باروری دانه گرده هر نمونه مشخص شد (Calapit-Palao et al., 2013).

$$100 \times (\text{بارور کامل} + \text{بارور ناقص} + \text{نابارور}) / \text{گرده‌های بارور کامل} = \text{درصد باروری دانه گرده}$$

تهیه نقشه پیوستگی و نقشه‌یابی جایگاه‌های کنترل کننده صفات مورد مطالعه: استخراج DNA ۱۸۸ فرد جمعیت F₄ به همراه والدین شان (CSR28 و صدری) با استفاده از کیت Sbeadex® Mini Plant Kit صورت پذیرفت. به منظور کاهش زمان و هزینه نقشه‌یابی و همچنین تهیه نقشه پیوستگی با تراکم بالای نشانگری از Infinium Illumina 6K SNP chip شامل ۶۰۰۰ bead type استفاده شد. با استفاده از نشانگرهای

شده در ۱۸۸ لاین F4 حاصل از تلاقی صدری و CSR28 در شکل ۱ نشان داده شده است. توزیع فنوتیپی در نتاج F4 برای تمامی صفات بجز طول خوشه، وزن دانه‌های پرنشده و وزن دانه‌های پرنشده در خوشه تقریباً پیوسته و نرمال بود که این می‌تواند دلیلی بر چند ژنی بودن و وراثت کمی صفات باشد و همچنین نشان دهنده مشارکت ژن‌هایی از هر دو والد در صفات مورد مطالعه بود (Mohammadi *et al.*, 2013). برای صفات طول خوشه، وزن دانه‌های پرنشده و وزن دانه‌های پرنشده در خوشه تبدیل لگاریتمی صورت گرفت و در آنالیزها از داده‌های نرمال شده استفاده شد. در تمامی صفات تعدادی از نتاج F4 وجود داشت که مقادیری خارج از محدوده والدینی را نشان دادند که این بیانگر پدیده تفکیک متجاوز است. ارزش میانگین در برخی صفات از قبیل باروری دانه گرده، طول خوشه، ارتفاع گیاه، پارامترهای کلروفیل و تعداد دانه‌های پرنشده بیشتر از دو والد بود در حالی که در سایر صفات به سمت مقادیر کمتر از دو والد کشیدگی داشت (شکل ۱ و جدول ۱). دلیل آن احتمالاً وجود آلل‌های متفاوت در دو والد در مکان‌های ژنی کنترل کننده این صفات و دخیل بودن دو والد در بروز آنها است، به نظر می‌رسد که ترکیب آلل‌های دو والد در نتاج، منجر به بروز مقادیر بالاتر یا پایین‌تر از والدین و ظهور پدیده تفکیک متجاوز شده است.

نشانگرها بر طبق نقشه فیزیکی ژنوم رفرنس Nipponbare بود، که توسط دانشگاه ایالت میشیگان نسخه ۷ (MSU7) آن ارائه شده است (Kawahara *et al.*, 2013). برای تبدیل نسبت-های نو ترکیبی بین نشانگرها به واحد نقشه (سانتی مورگان) از تابع نقشه کوزامبی (Kosambi, 1943) استفاده شد. در نهایت نقشه پیوستگی توسط نرم افزار QTL IciMapping version 4.0.6.0 ترسیم شد. نقشه‌یابی مکان‌های کنترل کننده صفات کمی مورد مطالعه بوسیله روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب جامع (ICIM) که با استفاده از داده‌های فنوتیپی و نقشه پیوستگی مربوطه توسط نرم افزار QTL IciMapping انجام شد. آزمون جایگشت با ۱۰۰۰، و سطح احتمال ۰/۰۵ برای شناسایی QTL‌های معنی دار استفاده شد. در این بررسی سرعت گام بر داشتن بر روی کروموزوم ۱ سانتی مورگان در نظر گرفته شد. درصد توجیه واریانس فنوتیپی و اثرات افزایشی هر QTL در ارتباط با صفت مورد نظر نیز محاسبه شد (Meng *et al.*, 2015). نامگذاری QTL‌ها بر اساس سیستم استاندارد نامگذاری برنج توسط McCouch & CGSNL (2008) صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین نتاج حاصل از تلاقی صدری × CSR28 از لحاظ صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). توزیع فنوتیپی صفات مطالعه

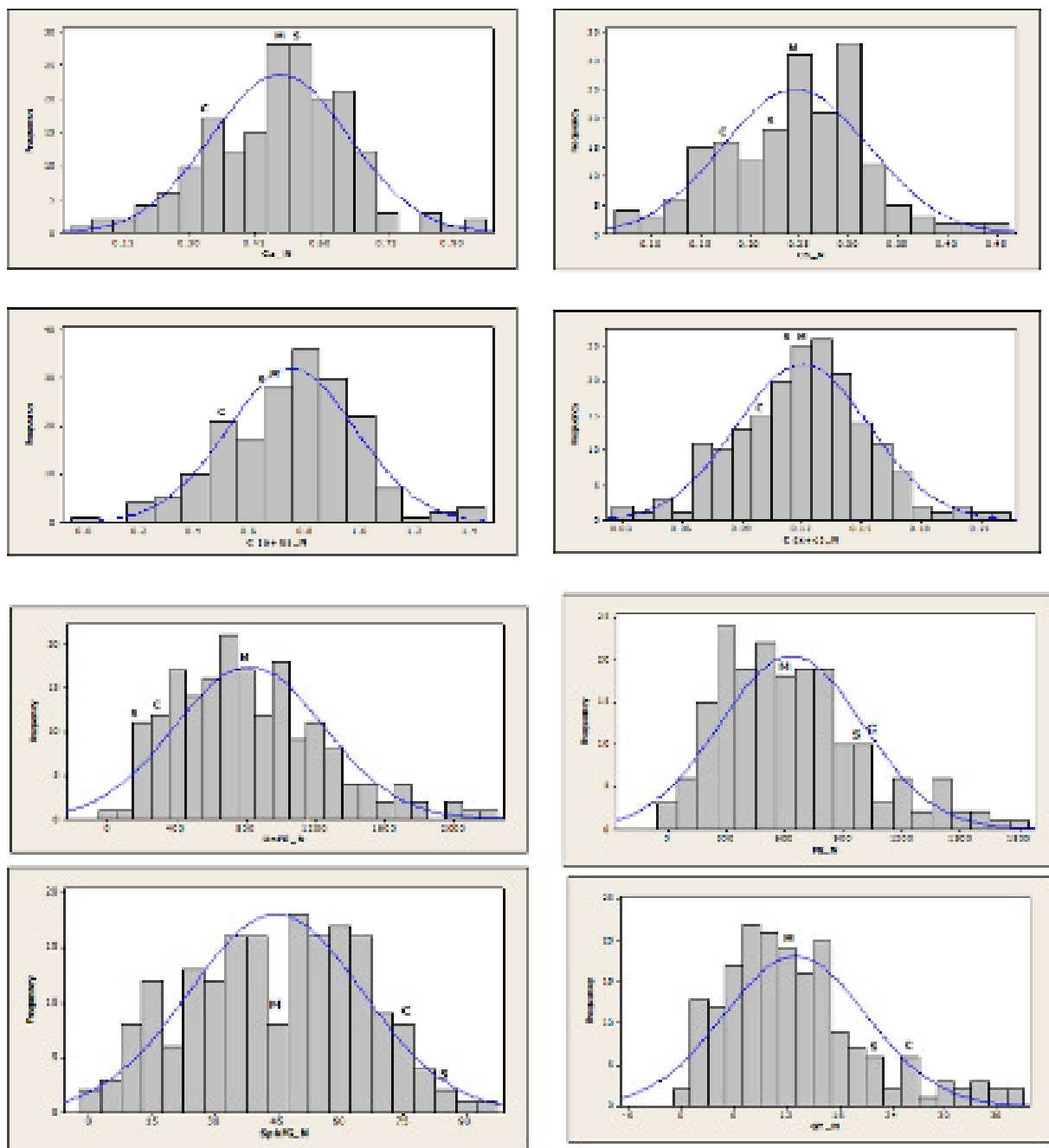
جدول ۱- آمار توصیفی مربوط به صفات مورد مطالعه در جمعیت F₄ حاصل از تلاقی CSR28 × صدری

Table 1- Descriptive statistics of studied traits in F₄ population derived from CSR28 × Sadri cross

معنی داری Sig.	کشیدگی Skewness	چولگی Kurtosis	بیشترین Max	کمترین Min	اشتباه میانگین Error Mean	میانگین Mean	صفات Traits
***	0.36	-0.15	0.948	0.030	0.0116	0.505	کلروفیل a (Chlorophyll a)
***	0.11	0.01	0.454	0.064	0.0054	0.2460	کلروفیل b (Chlorophyll b)
***	0.45	-0.01	0.221	0.028	0.002	0.120	کاروتنوئید (Carotenoid)
***	0.38	-0.15	1.384	0.037	0.017	0.749	مجموع کلروفیل (a+b) Total Chlorophyll
***	0.5	0.84	1822	17	26.7	633.3	تعداد دانه پر شده No. Filled Grain
***	0.37	0.74	2204	41	31.5	817.1	تعداد دانه پر نشده No. Unfilled Grain
***	-0.75	-0.06	93.98	1.30	1.52	44.59	باروری خوشه (%) Spikelet Fertility (%)
***	2.36	1.12	44.00	19.58	0.309	27.68	طول خوشه (Panicle Length)
***	0.1	0.47	205	111.5	1.34	147.6	ارتفاع بوته (Plant Height)
**	0.83	1.01	38.35	0.18	0.6	12.94	عملکرد دانه (Grain Yield)
*	2.02	1.2	11.96	0.49	0.144	3.5	وزن دانه‌های پر نشده Unfilled Grain Weight
**	2.59	-1.46	97.61	0	1.37	73.13	درصد دانه‌های پر شده Filled Grain (%)
***	-0.47	-0.3	90.46	7.95	1.33	52.71	باروری دانه گرده (%) Pollen Fertility
***	2.1	1.04	3.397	0.012	0.039	0.897	دانه‌های پر شده در خوشه (g) Filled Grain/Panicle
***	1.11	0.99	0.675	0.034	0.008	0.234	دانه‌های پر نشده در خوشه (g) Unfilled Grain/Panicle
***	3.08	-1.53	96.96	0	1.34	73.72	درصد دانه‌های پر شده Filled Grain/Panicle (%)
***	1.27	0.76	139.4	0.44	1.67	40.28	تعداد دانه پر شده در خوشه No. Filled Grain/Panicle
***	0	0.61	133.2	4.56	2.01	56.56	تعداد دانه پر نشده در خوشه No. Unfilled Grain/Panicle

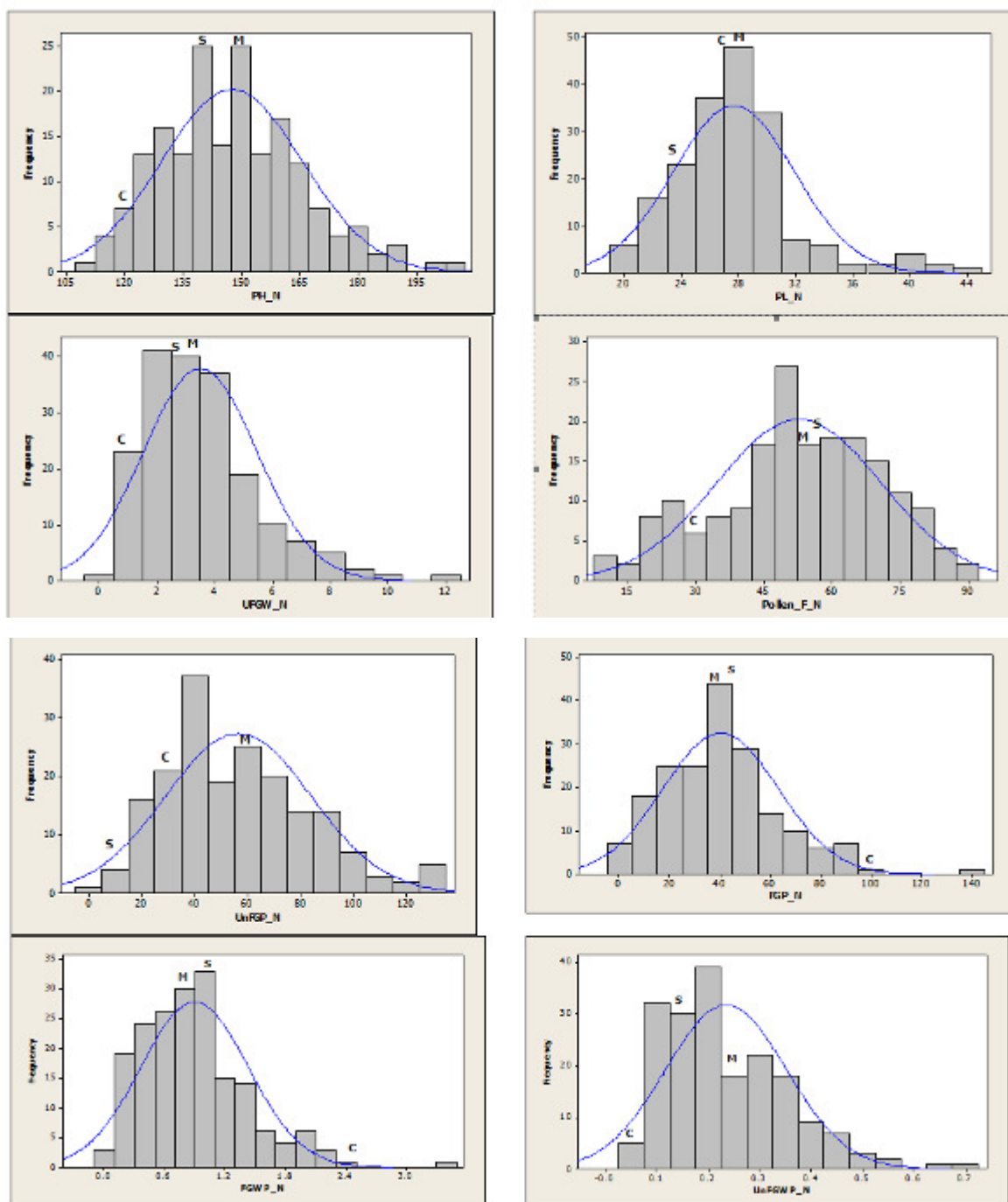
*** و ** و *: به ترتیب سطح معنی داری در 0.05، 0.01 و 0.001

***, ** and *: significant at level of 0.05, 0.01 and 0.001



شکل ۱- توزیع فراوانی ارزش‌های فنوتیپی صفات مورد مطالعه در ۱۸۸ لاین F4 حاصل از تلاقی (C) CSR28 × صدری (S)
 Ca_N: کلروفیل a، Cb_N: کلروفیل b، C (a+b)_N: مجموع کلروفیل (a+b)، C (x+c)_N: کاروتنوئید، UnFG_N: تعداد
 دانه‌های پر نشده، FG_N: تعداد دانه‌های پر شده، SpkFG_N: درصد باروری، GY: عملکرد دانه

Figure 1- Phenotypic distribution of studied traits in 188 F4 lines derived from CSR28 × Sadri cross. Ca_N: Chlorophyll a, Cb_N: Chlorophyll b, C (a+b)_N: Total Chlorophyll, C (x+c)_N: Carotenoid, UnFG_N: No. Unfilled Grain, FG_N: No. Filled Grain, SpkFG_N (%): Spikelet Fertility percent, GY: Grain Yield



شکل ۱ (ادامه) - توزیع فراوانی ارزش‌های فنوتیپی صفات مورد مطالعه در ۱۸۸ لاین F₄ حاصل از تلاقی CSR28 (C) × Sadri (S). PH_N: ارتفاع بوته، PL_N: طول خوشه، UnFGW_N: وزن دانه‌های پر نشده، باروری دانه: Pollen_F_N، گرده، UnFGP_N: تعداد دانه‌های پر نشده در خوشه، FGP_N: تعداد دانه‌های پر شده در خوشه، FGWP_N: وزن دانه-های پر شده در خوشه، UnFGWP_N: وزن دانه‌های پر نشده در خوشه.

Figure 1(Cont.)- Phenotypic distribution of studied traits in 188 F₄ lines derived from CSR28 × Sadri cross. PH_N: Plant Height, PL_N: Panicle Length, UnFGW_N: Unfilled Grain Weight, Pollen_F_N: Pollen Fertility, UnFGP_N: No. Unfilled Grain per Panicle, FGP_N: No. Filled Grain per Panicle, FGWP_N: Filled Grain Weight per Panicle, UnFGWP_N: Unfilled Grain Weight per Panicle

تهیه نقشه لینکاژی و توزیع آلی در کروموزومها

از ۴۶۰۶ نشانگر SNP، تعداد ۱۹۹۳ نشانگر بین دو والد چندشکلی نشان دادند. بعد از حذف داده‌های گم شده و هتروزیگوت در هر والد تعداد ۱۸۰۱ نشانگر SNP به دست آمد. بررسی انحراف از تفکیک توسط آزمون کای دو صورت پذیرفت و تعداد ۸۳۴ نشانگر از نسبت مورد انتظار انحراف داشت که از ادامه تجزیه حذف شدند. در مرحله بعد نشانگرهایی که تفکیک یکسانی در جمعیت مورد مطالعه داشتند و در بر دارنده اطلاعات ژنتیکی نبودند با رویه بین (Bining function) حذف شد، در این مرحله تعداد ۵۰۶ نشانگر حذف شد. در نهایت نقشه ژنتیکی با استفاده از نرم افزار IciMapping تهیه شد. نقشه لینکاژی با استفاده از ۴۶۱ نشانگر SNP تهیه شد که این تعداد نشانگر ۱۱۵۴/۴۸ سانتی مورگان از طول ژنوم برنج (۱۲ کروموزوم) را پوشش داد و فاصله بین دو نشانگر مجاور به طور متوسط ۲/۵ سانتی مورگان بود (شکل ۲). همچنین دامنه هر گروه لینکاژی از ۲۸/۵۵ سانتی مورگان در گروه لینکاژی ۱۰ تا ۱۴۰/۹۳ در گروه لینکاژی ۱۱ بود. مکان‌های هموزیگوس در طول ۱۲ کروموزوم ۶۷/۸۵ درصد بود. به همین ترتیب ۲۶/۹ درصد مکان هتروزیگوس وجود داشت و همچنین ۵/۲۳ درصد آلل‌های گم شده بود.

شناسایی QTL های مرتبط با صفات مورد

مطالعه

جهت شناسایی مکان‌های کنترل کننده صفات زراعی و فیزیولوژی در جمعیت F₄ حاصل از تلاقی صدی × CSR28 تمام ژنوم با استفاده از نرم افزار IciMapping بر پایه ۱۰۰۰ آزمون جایگشت بررسی شد. تجزیه جمعیت F₄ منجر به شناسایی ۲۱ QTL برای صفات مورد بررسی بر روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۸ و ۱۰ شد (جدول ۲، شکل ۲). برای کلروفیل a و کلروفیل b QTL های *qCa_N-7-1* و *qCb_N-7-* روی کروموزوم ۷ در فاصله نشانگری 7108578-7165460 و به ترتیب با LOD ۳/۰۶ و ۳/۳۹ شناسایی شد که این QTL ها ۶/۸۹ و ۷/۳۶ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کردند. همچنین QTL های *qCa_N-10-1* و *qCb_N-10-* برای صفات کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل (a+b) با دامنه LOD از ۵/۳۹ تا ۶/۷۳ در فاصله نشانگرهای 10659848 و id10006161 بر روی کروموزوم ۱۰ ردیابی شد. QTL های *qCa_N-10-1*، *qCb_N-10-1* و *qCab_N-10-1* به ترتیب ۱۴/۳۳، ۱۳/۵۵ و ۱۲/۷۹ درصد از واریانس فنوتیپی را به خود اختصاص دادند و آلل‌های والد CSR28 موجب افزایش این صفات شد. همچنین یک QTL (*qCxc_N-10-1*) مرتبط با صفت کارتنوئید در فاصله نشانگری 10618874-10659848 با LOD برابر با ۵ و توجیه ۱۲/۰۶

توجیه کننده ۷/۵۸ درصد از واریانس فنوتیپی بود در فاصله نشانگری 2443604 و 2443604 قرار داشت. *qSpkF_N-3-1* دارای ۱۱/۲۷ درصد واریانس فنوتیپی و با ارزش LOD برابر با ۳/۷۲ بین نشانگرهای 3297629 و 3528886 روی کروموزوم ۳ ردیابی شد. روی کروموزوم ۵ در فاصله نشانگری 5730084-5706503، با ارزش LOD برابر با ۵/۰۱، *qSpkF_N-5-1* QTL شناسایی شد که این QTL توجیه کننده ۱۰/۴۳ درصد از واریانس فنوتیپی بود. درصد باروری توسط آلل‌های CSR28 افزایش یافت (جدول ۲، شکل ۲). در پژوهشی *Marri et al.* (2005) دو QTL (*sf3.1* و *sf1.1*) برای باروری خوشه روی کروموزوم‌های ۱ و ۳ مکان‌یابی کردند که این QTL ها به ترتیب با LOD برابر با ۳/۲۶ و ۴/۳۵ توجیه کننده ۵/۲ و ۶/۷ درصد از واریانس فنوتیپی بودند. در تحقیق دیگری هفت QTL، *qSF1*، *qSF2*، *qSF3*، *qSF5.1*، *qSF8*، *qSF10* و *qSF12* برای باروری خوشه روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۸، ۱۰ و ۱۲ در جمعیت RIL برنج شناسایی شد (Zhu et al., 2016). در مطالعات پیشین برای درصد باروری QTL‌هایی روی کروموزوم‌های ۱ [*sf1.1*] (Marri et al., 2005)، *pss1.1* (Thomson et al., 2003)، *SF* (Redona & Mackill, 1998) و ۳ [*sf3.1*] (Marri et al., 2005)، *S3b* (He et al., 1999)، *SF* (Redona & Mackill, 1998) گزارش شده است. جایگاه‌های شناسایی شده در مطالعه حاضر

درصد از واریانس فنوتیپی در مجاورت سایر QTL‌های مرتبط با کلروفیل روی کروموزوم ۱۰ شناسایی شد که افزایش این صفت نیز تحت تاثیر آلل‌های والد CSR28 بود (جدول ۲، شکل ۲). تعداد دانه در بوته یک صفت اصلی در عملکرد دانه برنج است. شناسایی مکان ژن‌های کنترل کننده این صفت به دلیل تاثیرات زیاد محیطی بر این صفت، بسیار مشکل است. در مطالعه حاضر یک QTL (*qFG_N-3-1*) برای تعداد دانه‌های پر شده در بوته با LOD برابر ۴/۵۷ شناسایی شد که بیش از ۱۰/۰۲ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کرد. QTL شناسایی شده در ناحیه ۷۷۴۰۲۰۸-۷۸۴۹۱۹۹ bp روی کروموزوم ۳ شناسایی شد. آلل‌های والد CSR28 موجب افزایش تعداد دانه‌های پر شده شد (جدول ۲، شکل ۲ و ۳). در پژوهشی ۵ QTL مرتبط با تعداد دانه در بوته روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۸ و ۱۲ مکان‌یابی شد (Swamy et al., 2014). همچنین در مطالعات پیشین برای تعداد دانه پر شده در بوته QTL‌های (*gn2.1*) (Marri et al., 2005) و (*gpp2.1*) (Septiningsih et al., 2003) بر روی کروموزوم ۲ و (*gn5.1*) (Marri et al., 2005) روی کروموزوم ۵ گزارش شد. نتایج گزارش شده توسط این محققین با *qFG_N-3-1* شناسایی شده در مطالعه حاضر مشابه نبود. سه QTL برای درصد باروری روی کروموزوم‌های ۲، ۳ و ۵ مکان‌یابی شد. یک QTL (*qSpkF_N-2-1*) با LOD برابر ۳/۷۳ که

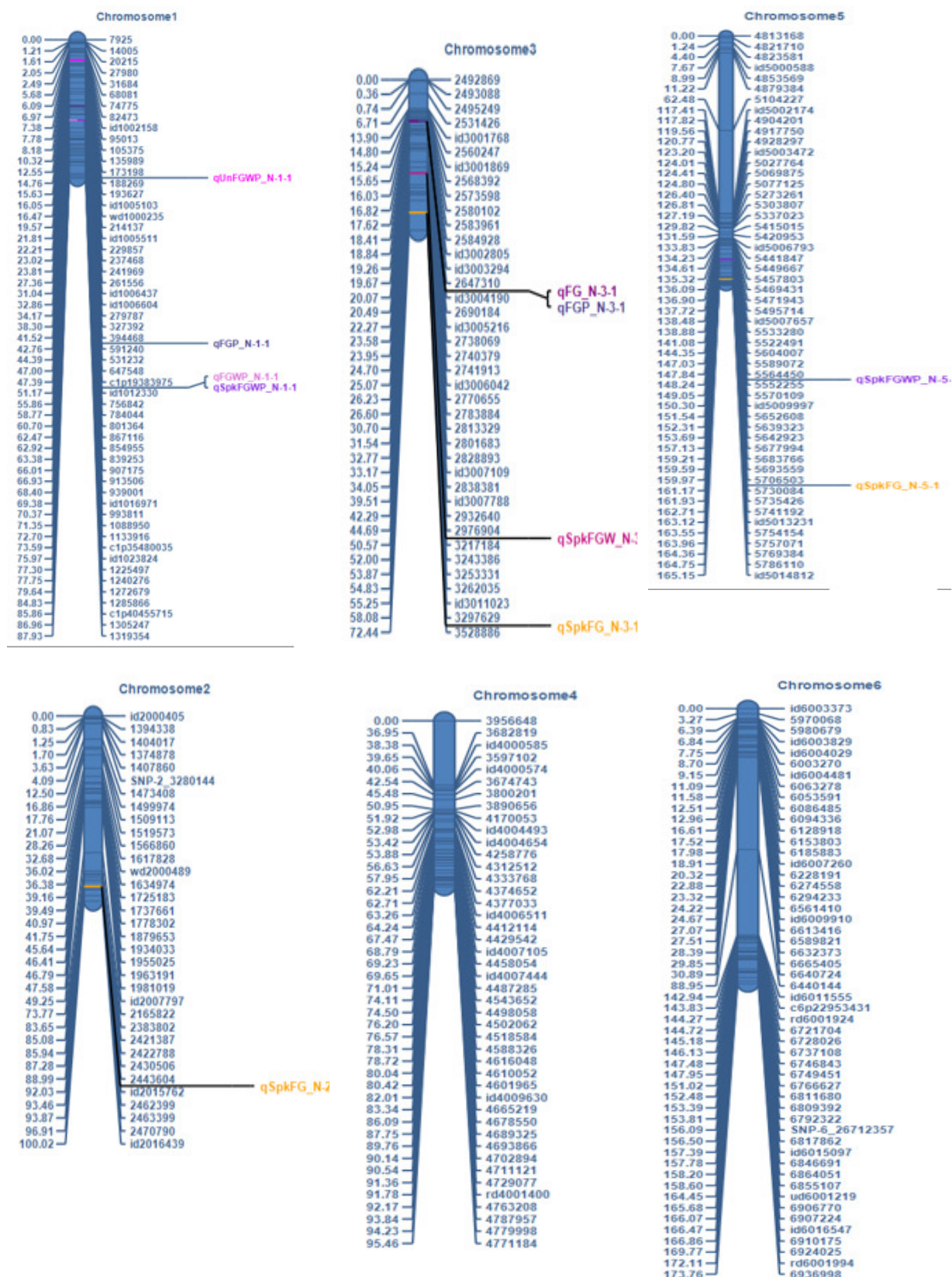
(Marri *et al.*, gw2.3 و gw2.2, gw2.1] (Gao *et al.*, 2004) kw2-2 (2005) و ۹ gw9.1 و (Marri *et al.*, 2005) gw9.1] (Thomson *et al.*, 2003) شناسایی شده است. یک QTL برای عملکرد دانه در فاصله نشانگری 9037125 و 9049928 با LOD برابر ۳/۳۰ مکان‌یابی شد که این QTL *qGY_N-8-1*، ۷/۵۶ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کرد (جدول ۲، شکل ۲). این QTL، *qGY_N-8-1* در ناحیه ۲۸۰۵۸۸۳۰-۲۷۴۹۲۵۳۷ bp روی کروموزوم ۸ شناسایی شد. همچنین دو QTL برای درصد وزن دانه‌های پر شده با مقادیر LOD ۳/۶۲ و ۳ به ترتیب در فاصله نشانگری 3217184-2976904 و 7947435-7962882 (۲۳۸۱۷۹۳۳-۱۷۸۴۰۹۸۸) و ۲۸۹۴۲۴۵۸-۲۸۳۰۳۰۳۹ bp روی کروموزوم-۳ و ۷ شناسایی شدند. آلل‌های CSR28 افزایش دهنده صفات عملکرد دانه و درصد باروری در *qGY_N-8-1*، *qSpkFGW_N-3-1* و *qSpkFGW_N-7-1* بود (جدول ۲، شکل ۲). در پژوهشی (Marri *et al.*, 2005) سه QTL روی کروموزوم ۳ و یک QTL روی کروموزوم ۹ برای صفت وزن دانه ردیابی کردند. سه QTL، *yldp2.1*، *yldp2.2* و *yldp9.1* با دامنه LOD برابر با ۴/۳۵-۳/۵۹ برای صفت عملکرد روی کروموزوم‌های ۲ و ۹ شناسایی کردند.

qSpkF_N-2-1، *qSpkF_N-3-1* و *qSpkF_N-5-1* به ترتیب در نواحی ۳۴۴۰۹۵۰۹-۳۴۸۶۵۷۵۴، ۲۶۳۳۴۳۰۵-۳۴۹۱۹۹۹۷ و ۲۶۹۳۴۰۱۶-۲۵۹۶۸۸۴۰ bp روی کروموزوم ۲، ۳ و ۵ شناسایی شدند. همچنین سه QTL برای صفات وزن دانه‌های پر شده در خوشه و درصد وزن دانه‌های پر شده در خوشه مکان‌یابی شد. دو QTL (*qFGW_N-1-1* و *qSpkFGW_N-1-1*) در فاصله نشانگرهای c1p19383975 و id1012330 با ارزش LOD برابر با ۳/۵۱ و ۳/۸۱ به ترتیب برای صفات میانگین وزن دانه‌های پر شده در خوشه و درصد وزن دانه‌های پر شده در خوشه ردیابی شدند. این QTL‌ها (*qSpkFGW_N-1-1* و *qFGW_N-1-1*) هر کدام ۸ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه نمودند و در ناحیه ۲۱۷۹۵۱۹۸-۱۹۳۸۳۹۷۶ bp روی کروموزوم ۱ قرار داشتند (جدول ۲، شکل ۲). یک QTL دیگر بین نشانگرهای 5564450 و 5552255 (۲۱۰۱۱۶۰-۲۰۶۱۲۳۷۴ bp) روی کروموزوم ۵ مکان‌یابی شد که این QTL، *qSpkFGW_N-5-1* با ارزش LOD برابر با ۳/۶۳ توجیه کننده ۷/۴۶ درصد از واریانس فنوتیپی بود (جدول ۲، شکل ۲). افزایش صفات وزن دانه‌های پر شده در خوشه و درصد وزن دانه‌های پر شده در خوشه در *qFGW_N-1-1*، *qSpkFGW_N-5-1* و *qSpkFGW_N-1-1* توسط آلل‌های والد CSR28 بود. بررسی نتایج تحقیقات برخی محققین برای صفت وزن دانه نشان داد که QTL‌هایی روی کروموزوم‌های ۲

جدول ۲- اطلاعات مربوط به QTLهای شناسایی شده برای صفات مورد مطالعه با استفاده از روش ICIM در جمعیت F4 حاصل از تلاقی صدری × CSR28.

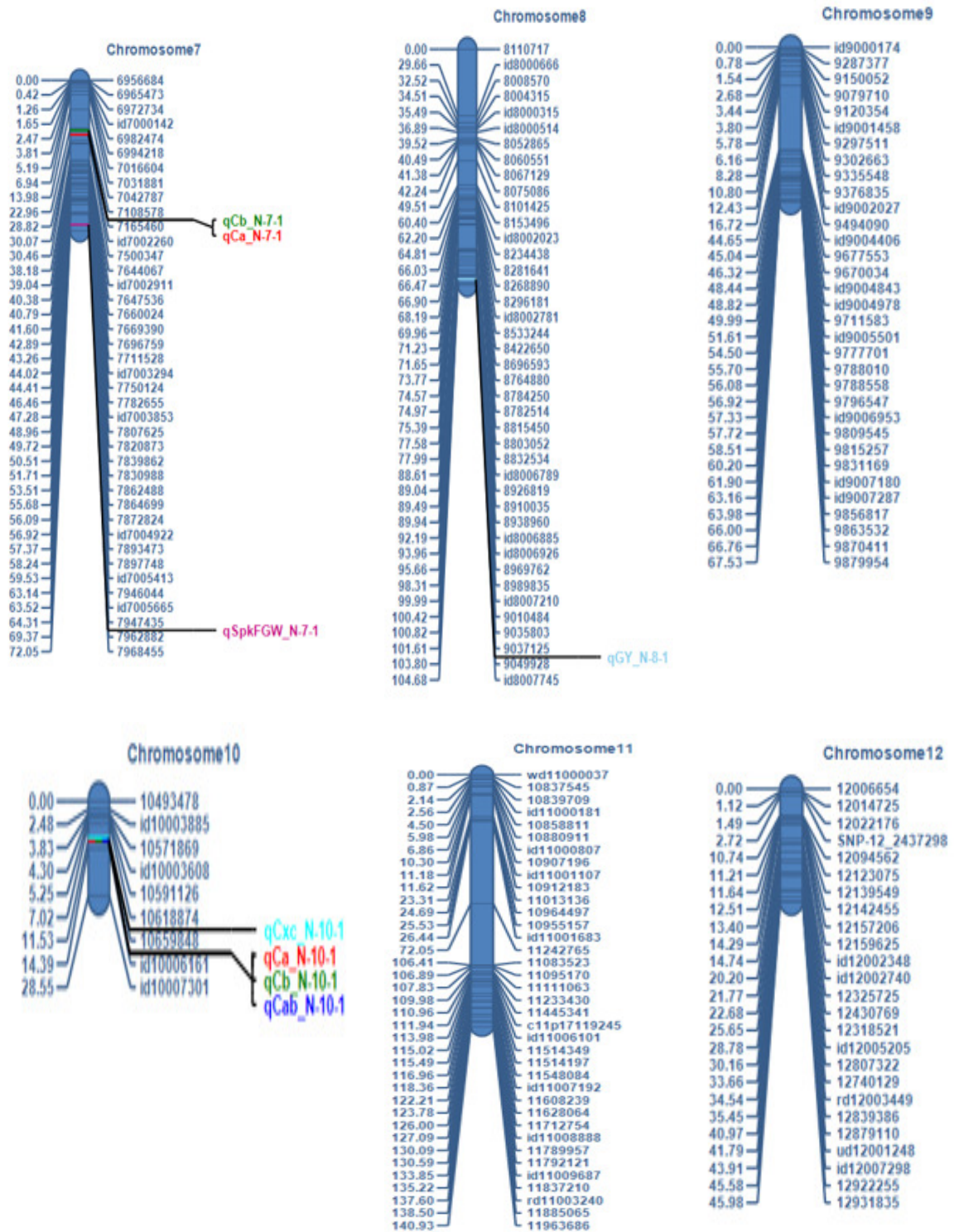
Table 2- Information of identified QTLs for studied traits in F4 population derived from CSR28 × Sadri cross using ICIM method.

اثر افزایشی Add	واریانس فنوتیپی PVE (%)	LOD	نشانهگر راست Right Marker	نشانهگر چپ Left Marker	مکان Position	QTL	کروموزوم Chromosome	نام صفت Trait Name
-0.041	6.89	3.06				<i>qCa_N-7-1</i>	7	کلروفیل a Chlorophyll a
-0.020	7.36	3.39	7165460	7108578	26	<i>qCb_N-7-1</i>		کلروفیل b Chlorophyll b
0.059	14.33	6.73				<i>qCa_N-10-1</i>		کلروفیل a Chlorophyll a
0.027	13.55	6.30	id10006161	10659848	12	<i>qCb_N-10-1</i>	10	کلروفیل b Chlorophyll b
0.083	12.79	5.39				<i>qCab_N-10-1</i>		کلروفیل (a+b) Total Chlorophyll
0.011	12.06	5.00	10659848	10618874	11	<i>qCxc_N-10-1</i>		کاراتنوئید Carotenoid
115	10.02	4.57	id3004190	2647310	20	<i>qFG_N-3-1</i>	3	دانه پر شده No. Filled Grain
5.72	7.58	3.73	id2015762	2443604	92	<i>qSpkF_N-2-1</i>	2	
7.007	11.27	3.72	3528886	3297629	64	<i>qSpkF_N-3-1</i>	3	درصد باروری Spikelet Fertility
6.71	10.43	5.01	5730084	5706503	161	<i>qSpkF_N-5-1</i>	5	
2.24	7.56	3.30	9049928	9037125	102	<i>qGY_N-8-1</i>	8	عمکرد دانه Grain Yield
5.35	8.19	3.62	3217184	2976904	45	<i>qSpkFGW_N-3-1</i>	3	وزن دانه‌های پر شده (%) Filled Grain Weight (%)
4.85	6.77	3.00	7962882	7947435	69	<i>qSpkFGW_N-7-1</i>	7	وزن دانه پر شده. خوشه Filled Grain Weight/ Panicle
0.15	8.54	3.51	id1012330	c1p19383975	51	<i>qFGWP_N-1-1</i>	1	وزن دانه پر نشده. خوشه Unfilled Grain Weight/ Panicle
0.01	8.41	3.81	188269	173198	13	<i>qUFGWP_N-1-1</i>	1	وزن دانه‌های پر شده (%). خوشه Filled Grain Weight/ Panicle (%)
5.21	8.00	3.67	id1012330	c1p19383975	51	<i>qSpkFGWP_N-1-1</i>	1	وزن دانه‌های پر شده (%). خوشه Filled Grain Weight/ Panicle (%)
4.99	7.46	3.63	5552255	5564450	148	<i>qSpkFGWP_N-5-1</i>	5	تعداد دانه پر شده. خوشه No. Filled Grain per Panicle
6.65	8.44	3.83	591240	394468	42	<i>qFGP_N-1-1</i>	1	
6.74	8.70	4.09	id3004190	2647310	20	<i>qFGP_N-3-1</i>	3	



شکل ۲- نقشه ژنتیکی و QTLهای مرتبط با صفات مورد مطالعه در جمعیت F_4 حاصل از تلاقی صدی $CSR28 \times$

Figure 2- Molecular genetic map and QTLs related to studied traits in the F_4 population from the CSR28/Sadri cross.



شکل ۲ (ادامه) - نقشه ژنتیکی و QTLهای مرتبط با صفات مورد مطالعه در جمعیت F4 حاصل از تلاقی صدری × CSR28.

Figure 2 (Cont.)- Molecular genetic map and QTLs related to studied traits in the F4 population from the CSR28/Sadri cross.

جدول ۳- ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه در جمعیت F₄ حاصل از تلاقی CSR28 × صدری

Table 3- Correlation coefficients of evaluated traits in F₄ population derived from CSR28 × Sadri cross.

13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	کلروفیل a Chlorophyll a	صفات
													0.97**	کلروفیل b (1) Chlorophyll b
												0.90**	0.96**	کارتنوئید (2) Carotenoid
											0.94**	0.98**	0.99**	کلروفیل (a+b) (3) Total Chlorophyll
										0.07	0.10	0.10	0.08	دانه پر شده (4) No. Filled Grain
														دانه پر نشده (5) No. Unfilled Grain
														درصد باروری (6) Spikelet Fertility Percent
														عمکرد دانه (7) Grain Yield
														وزن دانه پر نشده (8) Unfilled Grain Weight
														وزن دانه‌های پر شده (%) (9) Filled Grain Weight (%)
														وزن دانه پر شده. خوشه (10) Filled Grain Weight / Panicle
														وزن دانه پر نشده. خوشه (11) Unfilled Grain Weight / Panicle
														وزن دانه‌های پر شده (%). خوشه (12) Filled Grain Weight / Panicle (%)
														دانه پر شده. خوشه (13) Filled Grain per Panicle
														دانه پر نشده. خوشه Unfilled Grain per Panicle

عملکرد دانه توسط این محققین هیچکدام با QTL (*qGY_N-8-1*) ردیابی شده در این تحقیق هم مکان نبوده است. تفاوت در نتایج ممکن است به دلیل تفاوت در نوع جمعیت‌ها و نشانگرهای مورد استفاده در نقشه یابی باشد. برای صفت وزن دانه-های پرنشده در خوشه یک QTL (*qUFGP_N-1-1*) با ارزش LOD ۳/۸۱ در فاصله نشانگری 173198 و 188269 (۵۵۱۰۳۵۰-۵۹۸۲۷۷۲ bp) روی کروموزوم ۱ مکان‌یابی شد که این QTL توجیه کننده ۸/۴۱ درصد از واریانس فنوتیپی بود (جدول ۲، شکل ۲). در پژوهشی توسط *Ahamadi et al.* (2008) برای صفت تعداد دانه پرنشده در خوشه ۹ QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۵، ۶، ۹، ۱۰ و ۱۱ مکان‌یابی کردند که QTL ردیابی شده بر روی کروموزوم ۵ بیشترین اثر افزایشی را دارا بود. نه QTL شناسایی شده توسط این محققین ۸۱ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کردند. در نهایت دو QTL، *QS2a* و *QS2b* با R^2 برابر با ۳۱/۹ و ۲۳/۹ را به عنوان QTL‌های اصلی گزارش شدند. برای تعداد خوشه‌چه پوک در خوشه، یک QTL در فاصله نشانگری RM307-M58-P70-2 روی کروموزوم ۴ توسط *Rabiei, et al.* (2013) مکان‌یابی گردید که با LOD برابر با ۵/۱۳ مقدار ۱۶ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کرد.

سه QTL، *yldp2.1*، *yldp2.2* و *yldp9.1* به ترتیب در بین نشانگرهای RM262 - RM183 - RM263 و RM242 - RM205 قرار داشتند که ۱۴/۲، ۷/۰۵ و ۲۳/۲ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کردند. در مطالعه‌ای دیگر *Rangel et al.* (2013) با تهیه نقشه لینکاژی با استفاده از ۱۴۱ نشانگر SSR در جمعیت BC₂F₂ حاصل از تلاقی *Oryza sativa* x *O. glumaepatula* یک QTL روی کروموزوم ۴ بین نشانگرهای 4879-EST20 برای عملکرد ($R^2=21.29$) گزارش کردند. در پژوهش دیگری تعداد ۸ QTL برای عملکرد با دامنه LOD برابر با ۳/۸-۱۵/۴ بر روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۸، ۹، ۱۱ و ۱۲ شناسایی شد که این QTL‌ها در مجموع توجیه کننده ۹۸ درصد از واریانس فنوتیپی بودند (*Swamy et al.*, 2014). در پژوهشی *Yue et al.* (2015) دو QTL *qGYP-1* و *qGYP-9* برای صفت عملکرد دانه به ترتیب در فاصله نشانگری RM576-RM35 و RM1553-RM2144 روی کروموزوم‌های ۱ و ۹ ردیابی نمودند که این QTL‌ها ۶/۲۵-۶/۸۰ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کردند. در مطالعه دیگری *Rabiei, et al.* (2015) یک QTL (*qGY-3*) برای عملکرد دانه بر روی کروموزوم ۳ شناسایی کردند که این QTL، ۱۰/۲۶ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کرد و توسط آلل والد غریب افزایش یافت. با توجه به QTL‌های گزارش شده برای

مکان‌یابی شد (Ahamadi *et al.*, 2008). در مطالعه دیگری توسط Zhou, *et al.* (2013) با تهیه نقشه لینکاژی با استفاده از ۱۱۹ نشانگر SSR در ۳۰۷ لاین اینبرد نوترکیب برنج حاصل از تلاقی Guanghai 116 به عنوان والد دهنده و LaGrue والد گیرنده مکان‌یابی برای صفات عملکرد و اجزای عملکرد انجام شد. با استفاده از روش نقشه‌یابی فاصله ای ۳ QTL روی کروموزوم‌های ۵ و ۸ با اثر افزایشی مثبت شناسایی کردند که این QTL ها ۲۳/۶۴ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کردند. همچنین برای صفت تعداد دانه دانه در خوشه ۳ QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۴ و ۶ که توجیه کننده ۱۰/۶۶ درصد از واریانس فنوتیپی بودند را گزارش کردند. در پژوهشی Rabiei, *et al.* (2015) با مطالعه ۱۹۶ لاین برنج حاصل از تلاقی سپیدرود و غریب، سه QTL برای تعداد دانه پر شده در خوشه روی کروموزوم‌های ۱، ۶ و ۱۱ شناسایی کردند که از بین این QTL ها *qNGP-1* در فاصله نشانگرهای RM246-RM1268 توجیه کننده ۲۱/۰۳ درصد از واریانس فنوتیپی بود که به عنوان یک QTL اصلی و بزرگ اثر معرفی شد. همچنین این محققین ۳ QTL برای تعداد خوشه چه نابارور بر روی کروموزوم‌های ۲، ۳ و ۱۲ ردیابی کردند که *NES-2* روی کروموزوم ۲ بین نشانگرهای E33-M61-11-E35-M42-1 با ارزش LOD برابر با ۹/۰۷ توجیه کننده ۱۵/۲۳ درصد از واریانس فنوتیپی بود و به عنوان یک QTL بزرگ اثر گزارش شد. برای تعداد دانه در

دو QTL برای صفت تعداد دانه‌های پر شده در خوشه با LOD برابر با ۳/۸۳ و ۴/۰۹ به ترتیب با فاصله نشانگری 394468-591240 و 2647310-id3004190 در نواحی ۱۷۵۴۵۵۹۵-۱۲۶۷۹۸۱۶ و ۷۲۴۰۲۰۸-۷۸۴۹۱۹۹ bp روی کروموزوم‌های ۱ و ۳ مکان‌یابی شدند. این QTL-ها *qFGP_N-1-1* و *qFGP_N-3-1* به ترتیب ۸/۴۴ و ۸/۷۰ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کردند (جدول ۲، شکل ۲). آل‌های CSR28 موجب افزایش صفت تعداد دانه‌های پر شده در خوشه شد. در مطالعه جمعیت F₁₄ برنج توسط Yue *et al.* (2015) با تهیه نقشه لینکاژی با استفاده از ۱۹۸ نشانگر SSR سه QTL (*qFGP-1b*، *qFGP-3b* و *qFGP-8b*) روی کروموزوم‌های ۱، ۳ و ۸ برای تعداد دانه پر شده در خوشه شناسایی کردند. این QTL ها دارای ارزش LOD ۲/۶-۹۵/۵۴ بودند که ۸/۴۸-۱۳/۰۶ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه می‌کردند. شش QTL *qNGP4*، *qNGP3*، *qNGP2*، *qNGP5* و *qNGP6.2* برای تعداد دانه در خوشه بر روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ و ۷ توسط Zhu *et al.* (2016) در مطالعه جمعیت RIL گزارش شد. برای تعداد دانه در خوشه سه QTL بر روی کروموزوم‌های ۱ و ۱۲ ردیابی شد که ارزش LOD برای QTL‌هایی که در فاصله نشانگری RM431-RM14 و RM237-M473A روی کروموزوم ۱ قرار داشتند، ۳/۳۳ و ۳/۴۳ بود و QTL دیگر با ۲۷/۸ درصد توجیه تنوع فنوتیپی و ارزش LOD برابر با ۴/۰۶ روی کروموزوم ۱۲

منفی تعداد دانه پر نشده در خوشه با صفات عملکرد دانه و پارامترهای کلروفیل ملاحظه شد (جدول ۳).

به طور کلی، بیشتر مطالعات نقشه‌یابی پیشین با استفاده از جمعیت‌هایی با سایز کوچک و همچنین تعداد کم نشانگر صورت گرفته است که بیشتر منجر به شناسایی نواحی بزرگ اثر شده و QTL کوچک اثر کمتر ردیابی شده است. اما در این مطالعه نقشه‌یابی با اشباع ملکولی بالا با استفاده از نشانگرهای SNP صورت پذیرفت و همچنین جمعیت مورد بررسی با اندازه ۱۸۸ لاین با زمینه والد ایرانی (صدری) بود. مطالعات فراوانی در زمینه مکان‌یابی QTL‌های دخیل در عملکرد بوته صورت گرفته است. اما میانگین فاصله نشانگری در برخی مطالعات پیشین توسط نشانگرهای SSR، ۸/۹۵ (Rabiei et al., 2015) و ۱۵ (Mohammadi et al., 2013) (نشانگر/سانتی مورگان) است که در بررسی حاضر این فاصله به ۲/۵ (نشانگر/سانتی مورگان) کاهش یافته است. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که QTL‌های که برای اولین بار گزارش شدند، نیازمند بررسی در زمینه‌های ژنتیکی متفاوت و مناسب برای نقشه‌یابی دقیق می‌باشند. از سوی دیگر بررسی QTL‌ها در مکان‌های متفاوت جهت شناسایی QTL‌های پایدار پیشنهاد می‌گردد. همچنین QTL‌هایی که در نواحی مشابه با مطالعات قبلی شناسایی شده، می‌توان به عنوان QTL‌های دارای اعتبار معرفی کرد، چراکه در بین

خوشه چندین QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۱ و ۱۲ شناسایی شده است (Marri et al., 2005; Moncada et al., 2001; Septiningsih et al., 2003; Thomson et al., 2003; Xiao et al., 1998; Yoon et al., 2006). همبستگی صفات عملکرد دانه با تعداد دانه‌های پر شده و درصد باروری خوشه ارتباط مثبت و معنی داری داشت (جدول ۲). که با نتایج Moncada et al. (2001) همخوانی داشت. با توجه به QTL‌های ردیابی شده (جدول ۳ و شکل ۲) و مقایسه نتایج آن‌ها با ضرایب همبستگی صفات (جدول ۳) تأیید کننده این مطلب بود که برخی صفات که دارای همبستگی معنی دار هستند، توسط جایگاه‌های ژنومی مشابهی کنترل می‌گردند. به طوری که می‌توان دلیل وجود ارتباط معنی دار بین صفات را با احتمال زیاد به کنترل آن صفات توسط مکان‌های ژنومی یکسان و پیوستگی شدید بین QTL‌ها مرتبط دانست (Rabiei et al., 2013). بین صفات کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئید و کلروفیل (a+b) همبستگی مثبت و بسیار معنی‌داری وجود داشت و همچنین همبستگی مثبت و معنی داری بین این صفات با درصد وزن دانه‌های پر شده در بوته و درصد میانگین وزن دانه‌های پر شده در خوشه ملاحظه شد (جدول ۳). به همین ترتیب صفاتی که بر اساس تک خوشه ارزیابی شده بود از جمله تعداد دانه پر در خوشه با صفات عملکرد دانه و پارامترهای کلروفیل همبستگی مثبت و معنی داری داشت و ارتباط

یابی ارتباطی در جهت شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات مهم و همچنین درک بهتری از مکانیسم‌های فیزیولوژی در برنج گام برداشت. چراکه شناخت دقیق از کنترل ژنتیکی صفات مرتبط با عملکرد برنج برای افزایش تولید برنج و برنامه انتخاب به کمک نشانگر بسیار حائز اهمیت است.

جمعیت‌های متفاوت تکرارپذیر بودند و مناسب برای برنامه انتخاب به کمک نشانگر می‌باشند. علاوه بر این، با توجه به کاهش فاصله نشانگری و افزایش دقت نقشه‌یابی و در دسترس بودن توالی ژنوم برنج و ابزارهای بیوانفورماتیکی می‌تواند بسیار کمک کننده و مفید برای شناسایی بهتر و دقیق نواحی مطلوب ژنومی باشد. می‌توان با استفاده از پسا آنالیزهای مربوطه و نیز با نقشه-

منابع

- Amiri-Fahliani R, Khodambashi M, Hoshmand S, Masoumi-Asl A (2014). Heritability of some morphological and qualitative traits of rice and identification of their related quantitative trait loci (QTLs) using microsatellite marker. *Seed and Plant Improvement Journal* 30: 419–440.
- Ahamadi J, Fotokian MH, Fabriki-Orang S (2008). Detection of QTLs influencing panicle length, panicle grain number and panicle grain sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology* 11: 163–170.
- Ahmadikhah A (2008). Estimation of heritability and heterosis of some agronomic traits and combining ability of rice lines using line \times tester method. *Electronic Journal of Crop Production* 1: 15–33.
- Awan TH, Ahmadzadeh M, Jabran K, Hashim S, Chauhan BS (2017). Domestication and development of rice cultivars. In Chauhan BS, Jabran K, Mahajan G (Eds.), *Rice Production Worldwide* (pp. 207–216). Springer International Publishing.
- Calapit-Palao CD, Viña CB, Gregorio GB, Singh RK (2013). A new phenotyping technique for salinity tolerance at the reproductive stage in rice. *ORYZA- An International Journal on Rice* 50: 199–207.
- Collard BC, Mackill DJ (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 557–572.
- Collard BC, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.
- Gao Y, Zhu J, Song Y, He C, Shi C, Xing Y (2004). Analysis of digenic epistatic effects and QE interaction effects QTL controlling grain weight in rice. *Journal of Zhejiang University. Science* 5: 371–7.
- Gichuhi E, Himi E, Takahashi H, Zhu S, Doi K, Tsugane K, Maekawa M (2016). Identification of QTLs for yield-related traits in RILs derived from the cross between pLIA-1 carrying *Oryza longistaminata* chromosome segments and Norin 18 in rice. *Breeding Science* 66: 720–733.
- Gong J, Zheng X, Du B, Qian Q, Chen S, Zhu L, He P (2001). Comparative study of QTLs for agronomic traits of rice (*Oryza sativa* L.) between salt stress and non stress environment. *Science in China Series C: Life Sciences* 44: 73–82.
- He YQ, Yang J, Xu CG, Zhang ZG, Zhang Q (1999). Genetic bases of instability of male

- sterility and fertility reversibility in photoperiod-sensitive genic male-sterile rice. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 683–693.
- Hittalmani S, Huang N, Courtois B, Venuprasad R, Shashidhar HE, Zhuang JY, Zheng KL, Liu GF, Wang GC, Sidhu JS, Srivantaneeyakul S, Singh VP, Bagali PG, Prasanna HC, McLaren G, Khush GS (2003). Identification of QTL for growth- and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 679–690.
- Infinium HD Assay ultra, manual (2009). <http://www.illumina.com>.
- Jena, KK, Mackill DJ (2008). Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. *Crop Science* 48: 1266.
- Kawahara Y, de la Bastide M, Hamilton JP, Kanamori H, McCombie WR, Ouyang S, Schwartz DC, Tanaka T, Wu J, Zhou S, Childs KL, Davidson RM, Lin H, Quesada-Ocampo L, Vaillancourt B, Sakai H, Lee SS, Kim J, Numa H, Itoh T, Buell CR, Matsumoto T (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6: 4.
- Kosambi DD (1943). The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* 12: 172–175.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Liu T, Mao D, Zhang S, Xu C, Xing Y (2009). Fine mapping SPP1, a QTL controlling the number of spikelets per panicle, to a BAC clone in rice (*Oryza sativa*). *Theoretical and Applied Genetics* 118: 1509–1517.
- Liu T, Shao D, Kovi MR, Xing Y (2010). Mapping and validation of quantitative trait loci for spikelets per panicle and 1,000-grain weight in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 120: 933–942.
- Marri PN, Sarla N, Reddy LV, Siddiq E (2005). Identification and mapping of yield and yield related QTLs from an Indian accession of *Oryza rufipogon*. *BMC Genetics* 6: 33.
- McCouch SR, CGSNL (Committee on Gene Symbolization, N. and L. R. G. C. (2008). Gene nomenclature system for rice. *Rice* 1: 72–84.
- Meng L, Li H, Zhang L, Wang J (2015). QTL iciMapping: integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *The Crop Journal* 3: 269–283.
- Mohammadi R, Mendioro MS, Diaz GQ, Gregorio GB, Singh RK (2013). Mapping quantitative trait loci associated with yield and yield components under reproductive stage salinity stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics* 92: 433–443.
- Moncada P, Martínez CP, Borrero J, Chatel M, Gauch JH, Guimaraes E, Tohme J, McCouch SR (2001). Quantitative trait loci for yield and yield components in an *Oryza sativa* × *Oryza rufipogon* BC₂F₂ population evaluated in an upland environment. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 41–52.
- Movafegh S, Rabiee B, Zare Feizabadi A, Taheri G (2009). Mapping QTLs controlling yield in two Iranian rice cultivars-F₂ populations. *Iranian Agricultural Research Journal* 7: 673–683.
- Rabiei B, Kordrostami M, Sabouri A, Sabouri H (2015). Identification of QTLs for yield related traits in indica type rice using SSR and AFLP markers. *Agriculturae Conspectus Scientifici* 80: 91–99.
- Rabiei B, Masaeli, M, Tarang A (2013). Identification of gene loci (QTLs) controlling grain yield and yield components in rice (*Oryza sativa* L.). *Iranian Journal of Field Crop*

- Science 44: 293–304.
- Rahman ML, Chu SH, Choi MS, Qiao YL, Jiang W, Piao R, Khanam S, Cho YI, Jeung JU, Jena K, Koh, HJ (2007). Identification of QTLs for some agronomic traits in rice using an introgression line from *Oryza minuta*. *Molecules and Cells* 24: 16–26.
- Rangel PN, Vianello RP, Melo ATO, Rangel PHN, Mendonça JA, Brondani C (2013). Yield QTL analysis of *Oryza sativa* x *O. glumaepatula* introgression lines. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 48: 280–286.
- Redona ED, Mackill DJ (1998). Quantitative trait locus analysis for rice panicle and grain characteristics. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 957–963.
- Septiningsih EM, Prasetyono J, Lubis E, Tai TH, Tjubaryat T, Moeljopawiro S, McCouch SR (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*. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1419–1432.
- Swamy MBP, Kaladhar K, Reddy GA, Viraktamath BC, Sarla N (2014). Mapping and introgression of QTL for yield and related traits in two backcross populations derived from *Oryza sativa* cv. Swarna and two accessions of *O. nivara*. *Journal of Genetics* 93: 643–654.
- Thomson MJ (2014). High-Throughput SNP genotyping to accelerate crop improvement. *Plant Breeding and Biotechnology* 2: 195–212.
- Thomson MJ, Tai TH, McClung AM, Lai XH, Hinga ME, Lobos KB, Xu Y, Martinez CP, 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: 479–93.
- Xiao J, Li J, Grandillo S, Ahn SN, Yuan L, Tanksley SD, McCouch SR (1998). Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics* 150: 899–909.
- Xiao Y, Pan Y, Luo L, Zhang G, Deng H, Dai L, Liu X, Tang W, Chen L, Wang GL (2010). Quantitative trait loci associated with seed set under high temperature stress at the flowering stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 178: 331–338.
- Xing YZ, Tang WJ, Xue WY, Xu CG, Zhang Q (2008). Fine mapping of a major quantitative trait loci, *qSSP7*, controlling the number of spikelets per panicle as a single Mendelian factor in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 789–796.
- Xing Y, Zhang Q (2010). Genetic and molecular bases of rice yield. *Annual Review of Plant Biology* 61: 421–442.
- 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 *O. sativa japonica* cultivar Hwaseongbyeon. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1052–1062.
- Yue F, Rong-rong Z, Ze-chuan L, Li-yong C, Xing-hua W, Shi-hua C (2015). Quantitative trait locus analysis for rice yield traits under two nitrogen levels. *Rice Science* 22: 108–115.
- Zhou S, Zhu M, Wang F, Huang J, Wang G (2013). Mapping of QTLs for yield and its components in a rice recombinant inbred line population. *Pakistan Journal of Botany* 45: 183–189.
- Zhu Y, Huang D, Fan Y, Zhang Z (2016). Detection of QTLs for yield heterosis in rice using a RIL population and its testcross population. *International Journal of Genomics* 1–9.

Identification of QTLs for rice yield and yield-related traits using high density SNPs linkage map

Ahmadizadeh M.¹, Babaeian-Jelodar N.², Mohammadi-Nejad Gh.^{*3}, Bagheri N.⁴, Singh R. K.⁵

¹ Ph.D. Student of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

² Professor of Plant Breeding, Plant Breeding and Biotechnology Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

³ Associate professor of Plant Breeding, Dep. of Agronomy and Plant Breeding and Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP) Shahid-Bahonar University, Kerman, Iran.

⁴ Assistance professor of Plant Breeding, Plant Breeding and Biotechnology Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

⁵ Senior Scientist-II of Plant Breeding, International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Laguna, Philippines.

Abstract

Rice is one of the most important cereal with great variation, which is a major food for more than half of the world's population. Mapping quantitative traits loci is one of the applied and momentous approaches to study yield-related traits. In present study 188 F₄ rice lines derived from CSR28 and Sadri cross along with the parents were used for genotyping and phenotyping. The objective of this study was to construct high saturation linkage map using SNPs markers (Infinium Illumina 6K SNP chip) and QTL identification of yield-related traits in 188 F₄ population. Mapping of quantitative traits loci led to identify 21 QTLs for studied traits on chromosomes 1, 2, 3, 5, 7, 8 and 10. One QTL (*qFG_N-3-1*) was identified for filled grain number per plant on chromosome 3. For spikelet fertility, three QTLs (*qSpkF_N-2-1*, *qSpkF_N-3-1* and *qSpkF_N-5-1*) were mapped on chromosomes 2, 3 and 5, which explained 29.28 percentage of phenotypic variation. One QTL (*qGY_N-8-1*) was detected for grain yield on chromosome 8, which was flanked by 9037125 and 9049928 markers. In conclusion, besides the QTLs which is reported for first time, the QTLs were consistent as reported previously, could be introduced as reliable QTLs that is suitable for marker assisted breeding programs.

Keywords: *Mapping, SNP Marker, Quantitative traits, Rice.*

* Corresponding Author: Mohammadi-Nejad Gh.

Tel: 09133415937

Email Mohammadinejad@uk.ac.ir

