تشخیص ژن‌های کمی محتوای پروتئین و دمای ژلاتینی شدن دانه برنج در جمعیت رگه‌های نوترکیب عنبربو × سپیدرود

Identification of Quantitative Genes of Protein Content and Gelatinization Temperature in Recombinant Inbreed Lines of Cross of Anbarbu×Sepidroud

حسین صبوری[۱*]، احمدرضا دادرس[۲]، عاطفه صبوری[۳] و مهناز کاتوزی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۴/۲۴

چکیده

شناسایی مکان‌های ژنومی کنترل‌کننده صفات پیچیده، با در اختیار قرار دادن اطلاعات ژنتیکی مفید، امروزه به‌عنوان مقدمه برنامه-های اصلاحی انتخاب به کمک نشانگر یک راهکار کاربردی در اصلاح صفات پیچیده محسوب می‌گردد. در پژوهش حاضر از ۹۶ لاین اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی ارقام عنبربو در سپیدرود به‌عنوان یک جمعیت مکان‌یابی برای شناسایی QTLهای کنترل‌کننده دو صفت مهم مرتبط با کیفیت دانه شامل دمای ژلاتینی‌شدن و میزان پروتئین استفاده شد. نقشه پیوستگی با ۳۸۷ نشانگر تشکیل شد که شامل ۲۶۳ نشانگر AFLP و ۱۲۴ نشانگر SSR بود. نتایج حاصل از تجزیه مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب در کل پنج QTL برای دو صفت شناسایی نمود. در بین دو QTL شناسایی شده برای دمای ژلاتینی‌شدن، *qGT-6* در مجاورت ژن *wx* در کروموزوم ۶ ردیابی شد. با توجه به نقش آلل‌های والد عنبربو در هر دو QTL در بالابردن دمای ژلاتینی‌شدن، این QTLها می‌توانند در بهبود این صفت بسیار کارآ باشند. برای پروتئین دانه نیز سه QTL شناسایی شد که با در نظر گرفتن اثر افزایشی مثبت *qPR-1b* و بیش از ۱۳ درصد توجیه تغییرات فنوتیپی آن می‌تواند پس از اشباع نقشه در آن ناحیه ژنومی و در صورت تأیید نتایج، در برنامه انتخاب به کمک نشانگر در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: برنج، دمای ژلاتینی‌شدن، میزان پروتئین، مکان‌یابی

۱. دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس، گلستان
۲. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت
۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت
۴. کارشناس‌ارشد زراعت و دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات داشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
*: نویسنده مسوول Email: hossein.sabouri@ghec.ac.ir

مقدمه

کیفیت پخت و خوراک برنج به وسیله صفاتی مثل مقدار آمیلوز، دمای ژلاتینی‌شدن و قوام ژل مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در ایران کیفیت برنج عموماً نسبت به عملکرد اهمیت بیشتری دارد به‌طوری‌که ذائقه ایرانی برنج‌های معطر با طول دانه بلند و عرض دانه کم را ترجیح می‌دهد.

امروزه از نشانگرهای مولکولی به‌ویژه نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات مولکولی برای دستیابی به اطلاعات ژنتیکی مفید در ارتباط با صفات پیچیده مانند عملکرد و کیفیت، به‌عنوان راهکارهای تکمیلی برای روش‌های اصلاح‌نباتات کلاسیک استفاده می‌نماید تا باعث افزایش کارآیی در مکان‌یابی QTLها (Quantitative trait loci) یا ژن‌های کنترل‌کننده این صفات پیچیده شده و امکان انتخاب به کمک نشانگر را برای آنها فراهم آورد. شناسایی QTLهای صفات کمی ازجمله صفات زراعی و مرتبط با کیفیت دانه و برآورد پارامترهای ژنتیکی آنها به به‌نژادگر این امکان را می‌دهد تا ارزیابی دقیقی از تک تک ژن‌های کنترل‌کننده این صفات داشته و روش‌های صحیحی را در اصلاح این صفات به‌کار گیرد *دونگ* و همکاران (Dong *et al.*, 2004). در چندین پژوهش توسط محققان داخلی ژنتیک صفات مرتبط با کیفیت دانه مانند طول، عرض و شکل دانه، قد کشیدن دانه پس از پخت، درصد آمیلوز، دمای ژلاتینی‌شدن و درصد قوام ژل برای اصلاح ارقام ایرانی با کیفیت بالا، مورد مطالعه قرار گرفته است *فوتوکیان* و همکاران (Fotokian *et al.*, 2004)؛ *صبوری* (Sabouri, 2009)؛ *صبوری* و همکاران (Sabouri *et al.*, 2012) و *ربیعی* و همکاران (Rabiei *et al.*, 2004).

در مطالعه‌ای توسط *هی* و همکاران (He *et al.*, 1999) صفات مرتبط با کیفیت دانه برنج با استفاده از جمعیت هاپلوئید مضاعف شده حاصل از کشت بساک یک هیبرید *indica/japonica*، مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. در این بررسی از ۲۴۳ نشانگر چند شکل که به‌طور یکنواخت روی ۱۲ کروموزوم توزیع شده بودند، برای شناسایی QTLهای کیفیت دانه برنج استفاده کردند. برای دمای ژلاتینی‌شدن، دو QTL و هر دو روی کروموزوم ۶ با میزان توجیه تغییرات فنوتیپی ۸۲/۴ و ۲۴/۶ درصد ردیابی شدند. با توجه به شواهد موجود آنها اظهار داشتند که QTL بزرگ اثر کنترل‌کننده انتشار قلیا بایستی مرتبط با مکان ژنی *آلکالی* (*alk*) باشد. *هی* و همکاران (1999).

در پژوهش دیگری برای تهیه نقشه پیوستگی و تجزیه QTL از ۱۹۱ نشانگر SSR، RFLP و AFLP استفاده شد *لنسراس* و همکاران (Lanceras *et al.*, 2000). در این مطالعه، برای دمای ژلاتینی شدن نیز دو QTL روی کروموزوم ۶ در حد فاصل نشانگرهای RZ667-C1478 و RM3-RM238 و یک QTL روی کروموزوم ۲ در حد فاصل نشانگرهای RG73-RM6 مجموعاً با میزان توجیه تغییرات فنوتیپی ۶۷ درصد شناسایی شدند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر برای شناسایی‌QTLهای مرتبط با کیفیت برنج، از ۳۱۲ لاین هاپلوئید مضاعف شده مشتق شده از BC_3F_1 حاصل از تلاقی بین‌گونه‌ای *O. Glaberrima* و *O. sativa* و ۱۰۰ نشانگر SSR چندشکل برای تهیه نقشه پیوستگی استفاده شد *آلوکو* (Aluko, 2003) و در مجموع ۲۷ QTL برای صفات مطالعه شده شناسایی نمودند. محل‌های کروموزومی برای QTLهای مرتبط با مقدار آمیلوز، انتشار قلیایی و درصد پروتئین قبلاً توسط محققین دیگر گزارش شده بود. در پژوهش *فن* و همکاران (Fan *et al.*, 2005) به‌منظور ارزیابی اثر متقابل QTL و محیط تجزیه QTL سه صفت مهم تأثیرگذار در کیفیت پخت و خوراک برنج یعنی مقدار آمیلوز، قوام ژل و دمای ژلاتینی‌شدن با استفاده از جمعیت هاپلوئید مضاعف شده حاصل از تلاقی دو رقم هندی Zhenshan97 و H94 در دو محیط ارزیابی شد و ۲۱۸ نشانگر SSR توانستند اثر اصلی و اپیستاتیک QTLها و همچنین اثر متقابل QTLها با محیط را برآورد نمایند. آنها از دو تیمار محیطی کاملاً متفاوت از لحاظ زمان گلدهی استفاده کردند. براساس این تجزیه، برای دمای ژلاتینی شدن نیز پنج QTL شناسایی شد که مجموعاً ۷۸/۵ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه کردند و QTL با بالاترین اثر مکان‌یابی شده روی کروموزوم ۶، ۳۸/۱ درصد از تغییرات را توجیه نمود. این QTL با مکان ژنی *alk* ارتباط داشت و افزون بر اینکه دو QTL بزرگ اثر دیگر یکی در مجاورت مکان ژنی *wx* و دیگری در بین دو مکان ژنی *wx* و *alk* شناسایی شد. دو QTL باقیمانده با اثرات کوچک روی کروموزوم ۱ و ۱۱ مکان‌یابی شد که در مطالعات قبلی گزارش نشده بود. اثرات اپیستازی توانستند ۵/۴ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه نمایند *فن* و همکاران (2005). در پژوهشی دیگر با استفاده از جمعیت BC_1F_9 حاصل از تلاقی بین ارقام Koshihikari (*japonica*) و Kasalath (*indica*) به‌ترتیب با کیفیت پخت و خوراک بالا و پایین، صفات مرتبط با کیفیت پخت و خوراک دانه‌های برنج مورد بررسی قرار گرفت. *شی-یانگ* و همکاران (Shi-Yong *et al.*, 2006). در مطالعه آنها سه QTL برای دمای ژلاتینی‌شدن (*qGT3-1*، *qGT3-2* و *qGT-6*) به‌ترتیب در حدفاصل نشانگرهای R663-S14055، R2856-R3226 و G200-R2171 مرتبط است. در

مطالعه‌ای در ایران توسط *صبوری* و همکاران (2012) به‌منظور مکان‌یابی QTLهای کنترل‌کننده صفات مرتبط با کیفیت دانه، از جمعیت متشکل از ۲۳۶ خانواده $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی ارقام غریب و سپیدرود استفاده شد *(صبوری* و همکاران، 2012). نقشه پیوستگی حاصل از ۱۰۵ نشانگر ریزماهواره، ۱۴۴۰/۷ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را با فاصله متوسط ۱۳/۷۳ سانتی-مورگان بین دو نشانگر مجاور پوشش داد. در این پژوهش سه QTL برای دمای ژلاتینی شدن شناسایی شد.

برنج به‌عنوان یک منبع مهم پروتئین محسوب می‌شود. پروتئین دانه برنج نه تنها به ارزش غذایی دانه می‌افزاید بلکه بر روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی دانه تأثیر می‌گذارد *جولیانو* (Juliano, 1993). لذا اصلاح و بهبود محتوای پروتئین دانه به‌منظور بالابردن ارزش و کیفیت تغذیه‌ای دانه برنج برای به-نژادگران از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. *تان* و همکاران (Tan *et al*., 2001) برای پروتئین دانه توانستند دو QTL بر روی کروموزوم‌های ۶ و ۷ شناسایی نمایند. *ژنگ* و همکاران (Zhang *et al*., 2008) برای شناسایی مکان‌های ژنومی کنترل‌کننده پروتئین دانه برنج از هفتاد و یک لاین اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی بین رقم (*japonica*) Asominori و (*indica*) IR24 و ۳۷۵ نشانگر RFLP استفاده کردند. آنها در کل ۱۶ QTL روی ۸ کروموزوم برای پروتئین شناسایی کردند. به‌علاوه توانستند وجود QTLای که قسمت اعظم تغییرات فنوتیپ را کنترل می‌کرد در دو زمینه ژنتیکی لاین‌های جایگزین با قطعات کروموزومی به تأیید برسانند. از سوی دیگر دو QTL شناسایی شده برای پروتئین در پژوهش آنها در مجاورت QTL شناسایی شده در پژوهش‌های قبل *آلوکو* (2003) بود.

مواد و روش‌ها

تهیه جمعیت مکان‌یابی

مواد گیاهی مورد استفاده در پژوهش حاضر ۹۶ لاین حاصل از جمعیت لاین‌های نوترکیب نسل هشتم ارقام عنبربو × سپیدرود بود. توسعه نسل‌های در حال تفکیک این جمعیت، در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه گنبد کاووس تا نسل F8 به روش بالک تک‌بذری انجام شد.

استخراج DNA و تهیه نقشه ژنتیکی

به‌منظور استخراج DNA از بوته‌های نسل هشتم نمونه‌های برگی تهیه شد و استخراج DNA ژنومی به روش CTAB *سقای معروف* و همکاران (Saghai Maroof *et al*., 1994) در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه گنبد کاووس انجام شد. برای تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. تعیین غلظت نمونه‌های DNA به کمک DNA فاژ لاندا با غلظت مشخص صورت گرفت و کیفیت نمونه‌های DNA از نحوه تشکیل نوارها مشخص گردید. نشانگرهای مورد استفاده در پژوهش SSR و AFLP بود و برای تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار Map Manager *مانلی و السون* (Manly and Olson, 1999) استفاده شد.

نشانگرهای ریزماهواره

آغازگرهای مورد استفاده از نقشه‌های ژنتیکی ارائه شده توسط چن و همکاران (Chen *et al*., 1997)، *تمنیخ* و همکاران (Temnykh *et al*., 2000) و *مک‌کوش* و همکاران (McCouch *et al*., 2002) انتخاب شدند. به‌منظور تشخیص نشانگرهای چندشکل، ابتدا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تنها برای DNAی والدینی (عنبربو و سپیدرود) برای ۳۶۵ جفت آغازگر انجام شد. از این تعداد ۱۳۶ آغازگر چندشکل تشخیص داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌های DNA لاین‌های نوترکیب با استفاده از ۱۲۴ آغازگر چندشکل که نواربندی واضح‌تری داشتند، تکثیر شدند و فرآورده‌های حاصل به‌منظور تعیین ژنوتیپ افراد الکتروفورز شدند. توالی این آغازگرها در پایگاه اطلاعاتی گرامینه (http://www.gramene.org) قابل دسترس است.

نشانگرهای AFLP

روشAFLP مطابق روش *وس* و همکاران (Vos *et al*., 1995) با استفاده از ترکیبات آغازگری *Eco*RI و *Mse*I انجام شد. پس از هضم DNA ژنومی با استفاده از آنزیم‌های محدودگر *Eco*RI و *Mse*I و اتصال سازگارسازها، در مرحله پیش‌تکثیر از آغازگرهای *Eco*RI و *Mse*I واجد یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' باتوالی‌های زیر

*Mse*I آغازگر: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAA-3'

*EcoR*I آغازگر: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'

استفاده شد. محصولات حاصل ازتکثیر پیش‌انتخابی به نسبت ۱۰:۱ رقیق شده و با ۲۱ ترکیب (از ۳۵ ترکیب آغازگری) دارای ۲ نوکلئوتید انتخابی دیگر در انتهای ۳' (علاوه‌بر یک نوکلئوتید در پیش تکثیر) تحت چرخه حرارتی Touch down شامل سه مرحله دمایی مختلف تکثیر شدند. جدول ۱ ترکیبات آغازگری استفاده شده در تجزیهAFLP را نشان می‌دهد. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز شش درصد تفکیک و با روش نیترات‌نقره رنگ‌آمیزی شدند. در پژوهش‌های مربوط به

مکان‌یابی صفات از نشانگر ریزماهواره به‌دلیل اینکه دارای جایگاه مشخصی در ژنوم می‌باشد به‌عنوان یکی از مهم‌ترین نشانگرها استفاده می‌شود و نشانگر AFLP نیز با توجه به اینکه اطلاعات زیادی از ژنوم را با تولید تعداد زیادی نوار در اختیار قرار می‌دهد برای اشباع‌تر کردن نقشه استفاده مورد استفاده قرار می‌گیرد.

جدول ۱: ترکیبات آغازگری استفاده شده در تجزیه AFLP

Table 1: Primer combinations used for AFLP analysis

آغازگرهای *Mse*I *Mse*I Primers		آغازگرهای *Eco*RI *Eco*RI Primers	
نام Name	توالی DNA DNA Sequence	نام Name	توالی DNA DNA Sequence
M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC	E060	GACTGCGTACCAATTCAAG
M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA	E070	GACTGCGTACCAATTCAAT
M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT	E080	GACTGCGTACCAATTCACG
		E090	GACTGCGTACCAATTCACT
		E100	GACTGCGTACCAATTCAGT
		E110	GACTGCGTACCAATTCATC
		E120	GACTGCGTACCAATTCATT

ارزیابی صفات کیفی دانه

برای اندازه‌گیری دمای ژلاتینی شدن بر اساس روش *لیتل* و همکاران (Little *et al*., 1985) عمل شد. از هر بوته به‌طور تصادفی تعداد ۱۲ دانه برنج سفید سالم در سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این دانه‌های برنج بر حسب میزان تأثیرپذیری از هیدروکسید پتاسیم ۱/۷ درصد به هفت درجه امتیازدهی می‌شوند. به‌طوری‌که امتیاز ۱ مربوط به دانه‌هایی است که تحت تأثیر محلول واقع نمی‌شوند و امتیاز ۷ به دانه‌هایی اختصاص دارد که حل شده و اختلاف دانه‌ها و لایه خارجی مشهود نباشند و در داخل محلول به رنگ محلول یا بی‌رنگ درآیند. *لیتل* و همکاران (1985) امتیازات فوق را به سه گروه کلی طبقه‌بندی کردند. گروه اول مربوط به دمای ژلاتینی‌شدن بالا با بیشتر از ۷۴°C تعلق دارد که مربوط به امتیازات ۱ تا ۳ بود. قابل ذکر است که دمای ژلاتینی‌شدن بالا موجب نرمی و چسبنده‌شدن برنج پس از پخت می‌شود. گروه دوم و سوم مختص دمای ژلاتینی‌شدن متوسط با دمای بین ۷۰ تا ۷۴°C و دمای ژلاتینی‌شدن پایین با دمای کمتر از ۷۰°C است که به‌ترتیب به امتیازات ۴-۵ و ۶-۷ منتسب می‌گردد. اگر دمای ژلاتینی‌شدن برای رقمی پائین باشد، برنج پخته‌شده آن سفت و خشک می‌شود.

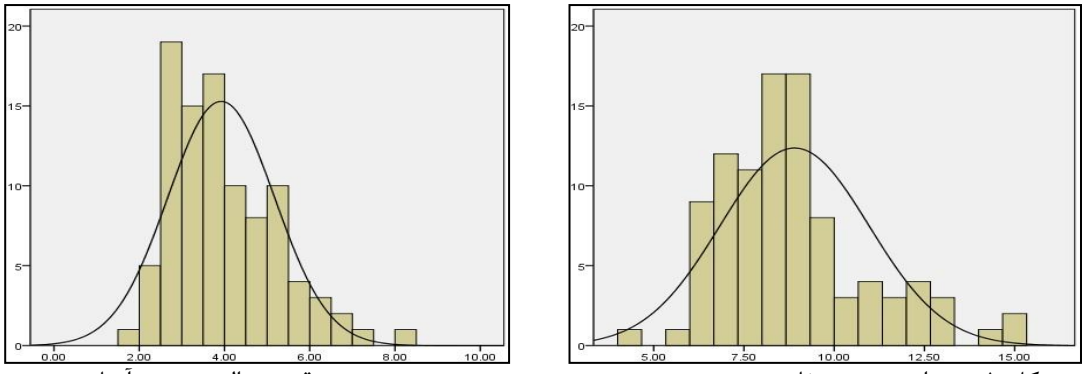
به‌منظور ارزیابی محتوای پروتئین دانه ابتدا درصد نیتروژن دانه برنج به روش کجلدال و با استفاده از دستگاه کجل دانشگاه گنبد کاووس انجام شد. سپس با استفاده از رابطه ۵/۷ × درصد نیتروژن دانه، محتوای پروتئین دانه برآورد شد *فولر* و همکاران (Fowler *et al*., 1989).

تجزیه داده‌ها

بعد از ارزیابی صفات زراعی و صفات کیفی مورد مطالعه، ابتدا آزمون نرمال بودن داده‌ها (آزمون چولگی و کشیدگی) انجام شد. پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع تمامی داده‌ها، QTLهای کنترل‌کننده صفات با استفاده از نرم‌افزار *بستن* و همکاران QTL Cartographer (Basten *et al*., 1997) شناسایی شدند. همچنین نشانگرهای پیوسته با QTLهای کنترل‌کننده صفات به‌همراه اثر ژنتیکی افزایشی و میزان تبیین تغییرات فنوتیپی صفات توسط هر یک از QTLهای کنترل‌کننده صفات برآورد شدند. روش‌های آماری تجزیه QTL مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب بود. نقطه‌ای‌که واجد بالاترین مقدار LOD بود به‌عنوان ناحیه با بیشترین احتمال وجود QTL شناسایی شد و از آستانه LOD=۲/۵ برای شناسایی QTLها استفاده شد. سپس جایگاه دقیق QTL نسبت به نشانگرهای طرفین برحسب سانتی‌مورگان تعیین شد.

نتایج و بحث

شکل ۱ توزیع فراوانی ارزش‌های فنوتیپی صفات مورد مطالعه در لاین‌های نوترکیب را به‌صورت نمودار ستونی (هیستوگرام) همراه با منحنی نرمال و ارزش‌های والدینی نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، توزیع فنوتیپی صفات به‌صورت پیوسته است. لازم به ذکر است که آزمون چولگی و کشیدگی برای صفات توزیع نرمال را نشان داد. جدول ۲ نیز میانگین ارزش‌های فنوتیپی والدین به‌همراه جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب را نشان می‌دهد.



شکل ۱: نمودار ستونی صفات مورد بررسی در جمعیت عنبربو × سپیدرود و موقعیت والدین روی آنها

Fig. 1: Histogram of Gelatinization and protein content in recombinant inbreed lines of Anbarbu×Spidroud crosses

جدول ۲: میانگین صفات مورد بررسی در والدین و لاین‌های نوترکیب جمعیت عنبربو × سپیدرود

Table 2: Mean of parent measured trait and recombinant inbreed lines of Anbarbu×Sepidroud population

اینبرد لاین‌های نوترکیب RILs	والدین Parent	
	سپیدرود Sepidroud	عنبربو Anbarbu
3.92	7	3
دمای ژلاتینی شدن (رتبه) Gelatinization temperature		
8.89	7.3	10.2
محتوای پروتئین Protein content		

ابتدا به‌منظور بررسی و مطابقت فراوانی‌های ژنوتیپی هر مکان نشانگر با فراوانی‌های مورد انتظار (۱:۱) در ۹۶ لاین، از آزمون χ^2 استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که نسبت‌های ژنوتیپی نشانگرها، در سطح پنج درصد اختلاف غیرمعنی‌داری با نسبت‌های مندلی دارند. لذا از اطلاعات تمامی نشانگرها در رسم نقشه پیوستگی استفاده شد.

به‌منظور تهیه نقشه پیوستگی، از ۲۶۳ نشانگر AFLP و ۱۲۴ نشانگر SSR چندشکل که نواربندی کاملاً واضح داشته و از لحاظ آماری با تفرق مندلی مطابقت داشتند، استفاده شد. نشانگرها به دوازده گروه پیوستگی معادل با دوازده کروموزوم برنج منتسب شدند. در کل نقشه پیوستگی حاصل، ۱۹۵۰/۴ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد و فاصله بین نشانگرها به‌طور متوسط ۵/۰۴ سانتی‌مورگان به‌دست آمد (شکل ۲). از آنجایی‌که میانگین فاصله بین دو نشانگر کمتر از ۲۰ سانتی‌مورگان یعنی حد آستانه‌ای که *لندر و بوتستین* (Lander and Botestein, 1989) پیشنهاد نمودند، بود از این نقشه برای مکان‌یابی QTL استفاده شد. برای تهیه نقشه ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Map Manager *مانلی و السون* (1999)، ترتیب نشانگرهای SSR با نقشه‌های موجود در برنج *چن* و همکاران (1997)، *تمنیخ* و همکاران (2000) و *مک‌کوش* و همکاران (2002) مطابقت داشت.

مطابق نتایج مندرج در جدول ۳، تجزیه آماری مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، برای دمای ژلاتینی‌شدن دو QTL روی کروموزوم‌های ۲ و ۶ (*qGT-2* و *qGT-6*) شناسایی نمود که در مجموع ۲۲/۸۸ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه کردند. درصد توجیه QTLها به‌ترتیب ۱۲/۵۸ و ۱۰/۳۳ بود. به‌طوری‌که *qGT-2* در حد فاصله RM221 تا RM258 **و** *qGT-6* در حدفاصل بین RM5088 تا E090M15011 قرار داشت. اثرات افزایشی این QTLها به‌ترتیب ۰/۵۵۳- و ۰/۵۲۵- بود. همان‌گونه که اشاره شد پائین بودن امتیاز مربوط به دمای ژلاتینی‌شدن بالاست که منجر به نرمی و چسبنده‌شدن برنج پس از پخت می‌شود. در مقابل بالابودن امتیاز یا پایین بودن دمای ژلاتینی‌شدن باعث خشک شدن و سفتی برنج پس از پخت می‌گردد. والد عنبربو با داشتن آلل‌های مطلوب از لحاظ این صفت از کیفیت پخت بسیار بهتری نسبت به والد سپیدرود برخوردارند و در هر دو QTL شناسایی شده برای دمای ژلاتینی‌شدن، آلل‌های والد عنبربو باعث کاهش امتیاز این صفت شدند.

جدول ۳: مجموع QTLهای شناسایی شده برای کیفیت دانه در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی عنبربو × سپیدرود. a:QTLها با مخفف نام صفت و شماره کروموزوم نامگذاری شدند. b: اثر افزایشی، c: درصدی از کل تغییرات فنوتیپی صفت که توسط QTL توجیه می‌گردد. d: جهت اثرات فنوتیپی ANB و SPD به‌ترتیب نشان‌دهنده عنبربو و سپیدرود می‌باشند

Table 3: Total identified QTL for grain quality in recombinant inbred lines derived from cross between Anbarbu and Spidroud. a: QTLs are named by abbreviations plus chromosomal number. b: additive effect, c: percentage of total phenotypic variance explained by the QTL,d: direction of phenotypic effect, ANB and SPD indicate Anbarbu and Spidroud, respectively

صفات Traits	کیوتی‌ال QTL[a]	کروموزوم Chr.	نشانگرهای مجاور Flanking markers	مکان Position	نقطه اوج Peak LOD	اثر افزایشی a[b]	بیان درصد PEV[c]	جهت آلل Dpe[d]
دمای ژلاتینی شدن (امتیاز) Gelatinization temperature	*qGT-2*	2	RM221-RM258	251.82	2.82	-0.553	12.58	ANB
	qGT-6	6	RM5088-E090M15011	3.70	2.82	-0.525	10.33	ANB
محتوای پروتئین (درصد) Protein (%)	*qPR-1a*	1	RM1337-E090M1407	44.91	3.14	-35.920	20.21	SPD
	qPR-1b	1	E100M1601-RM5310	211.53	4.83	28.324	13.11	ANB
	qPR-4	4	E060M1603-RM1359	15.76	5.12	-39.286	22.18	SPD

در پژوهش‌های مختلف بر روی مکان‌یابی صفات مرتبط با کیفیت دانه در برنج، کروموزوم ۶ به‌عنوان مهم‌ترین کروموزوم ژنوم برنج شناسایی شده است برای مثال برای دمای ژلاتینی شدن دو QTL روی کروموزوم ۶ توسط *لنسراس* و همکاران (Lanceras *et al*., 2000) با استفاده از جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی KDML105 وCT9993، شناسایی شدند که مجموعاً حدود ۵۷ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت مذکور را تبیین نمود. این QTLها در حد فاصل نشانگرهای C1478-RZ667 و RM3-RM238 قرار داشتند. برای همین صفت یک QTL توسط *بائو* و همکاران (Bao *et al*., 2002) در بازوی بزرگ کروموزوم ۶ و در حدفاصل نشانگرهای Amy2A و RG433 شناسایی شد که ۱۰ درصد از تنوع صفت را کنترل کرد. همچنین یک QTL بزرگ اثر توسط *تیان* و همکاران (Tian *et al*., 2005) با استفاده از جمعیت هاپلوئید مضاعف شده حاصل از تلاقی بین ارقام (*japonica*) WYJ2 و (indica) Zhenshan97B روی کروموزوم ۶ در حد فاصل نشانگرهای RM276-RM121 شناسایی شد که ۸۰/۳ درصد از تغییرات فنوتیپی دمای ژلاتینی‌شدن را در جمعیت مورد مطالعه‌شان توجیه کرد که جایگاه آن با جایگاه *qGT-6* که ۱۰/۳۳ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را در جمعیت مورد مطالعه ما توجیه نمود، از نظر مکان کروموزومی مطابقت چندانی نداشت. از دیگر پژوهش‌ها می‌توان پژوهش *فن* و همکارن (2005) را نام برد که تجزیه ژنتیکی دمای ژلاتینی‌شدن را با استفاده از جمعیت هاپلوئید مضاعف شده حاصل از تلاقی دو رقم هندی Zhenshan97 وH94 در دو محیط و به کمک ۲۱۸ نشانگر SSR انجام دادند و پنج QTL در مجموع با ۷۸/۵ درصد توجیه برای این صفت گزارش نمودند که QTL با بالاترین اثر، حدود ۴۰ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را توجیه نمود و روی کروموزوم ۶ قرار داشت. این QTL با مکان ژنی *alk*، که در مطالعات متعدد به‌عنوان ناحیه مؤثر در کنترل دمای ژلاتینی شدن گزارش شده است هی و همکاران (1999) *تیان* و همکاران (2005) *لنسراس* و همکاران (2000) *فن* و همکاران (2005) ارتباط داشت. در مطالعه حاضر QTL شناسایی شده بر روی کروموزوم ۶ در مجاورت مکان ژنی *alk* قرار نداشت. چون با نشانگرهای پیوسته با مکان ژنی *alk* فاصله داشت.

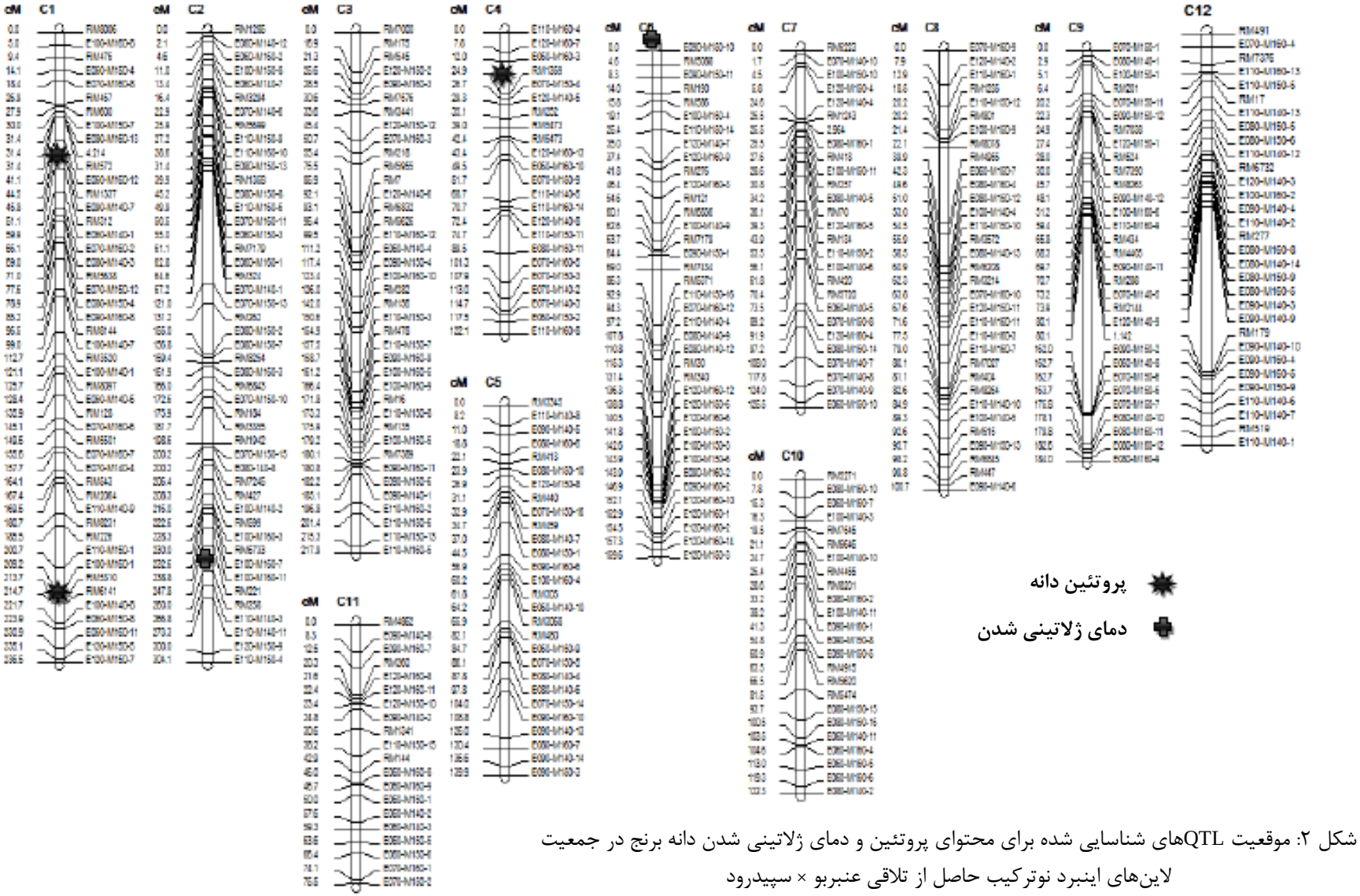
علاوه‌بر مکان‌ژنی *alk*، *wx* موسوم به ژن *مومی* پیوسته به نشانگر RM190 در مطالعات متعددی به‌عنوان یک ناحیه مهم کنترل‌کننده دمای ژلاتینی‌شدن گزارش گردید *تیان* و همکاران (2005) *لنسراس* و همکاران (2000) *فن* و همکاران (2005) در این پژوهش نیز نتایج حاصل، با توجه به قرابت نشانگرهای احاطه کننده *qGT-6* و نشانگر RM190، ارتباط نزدیکی بین این مکان و دمای ژلاتینی‌شدن نشان داد. در پژوهش *شی-یونگ* و همکاران (2006) با استفاده از یک جمعیت لاین‌های اینبرد تلاقی برگشتی (BC_1F_9) حاصل از تلاقی بین ارقام (*japonica*) Koshihikari و Kasalath (*indica*) به‌ترتیب ارقام با کیفیت پخت و خوراک بالا و پایین، سه QTL برای دمای ژلاتینی‌شدن (*qGT3-1*، *qGT3-2* و *qGT-6*) به‌ترتیب در حدفاصل نشانگرهای R663-S14055، R2856-R3226 و G200-R2171 شناسایی کردند که دو QTL واقع بر کروموزوم ۳ در مجموع ۱۱/۴۵ و یک QTL روی کروموزوم ۶ که در نزدیکی ژن *alk* قرار داشت، ۶۴/۴۲ درصد تغییرات این صفت را توجیه کردند. در پژوهشی که توسط *صبوری* (2009) با استفاده از یک جمعیت $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی دو والد ایرانی طارم‌محلی و خزر، انجام شد QTLهای کنترل‌کننده دمای ژلاتینی‌شدن بر روی کروموزوم‌های ۴، ۸ و ۱۱ شناسایی شدند. در پژوهش مذکور همانند بررسی *بائو* و همکاران (2002)، هیچ مکان کنترل‌کننده دمای ژلاتینی شدن

در نزدیکی مکان‌ژنی *wx* و *alk* شناسایی نشد. جمعیت مکان-یابی در مطالعه *بائو* و همکاران (2002) هاپلوئید مضاعف شده حاصل از تلاقی دو والد IR64 و Azucena با مقدار آمیلوز تقریباً مشابه بود. آنها QTLهای دیگری به‌غیر از *wx* و *alk* را در کنترل دمای‌ژلاتینی‌شدن و مقدار آمیلوز مؤثر دانستند و اظهار داشتند که در گزارشات دیگر بالابودن اثر الل‌های ژن *مومی* اثر پوشانندگی روی این QTLها داشته و به این دلیل این QTLها شناسایی نشده‌اند. در مطالعه دیگری بر روی جمعیت‌های ایرانی که توسط *صبوری* و همکاران (2012) با استفاده از یک جمعیت $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی ارقام غریب و سپیدرود انجام شد، از سه QTL شناسایی شده برای دمای ژلاتینی‌شدن، QTLای که بیشترین درصد تغییرات فنوتیپی (۱۸/۴٪) را توجیه کرد (*qGT-6a*) در حد فاصل نشانگرهای RM217-RM276 روی کروموزوم ۶ در مکان ژنی مشابه با ژن آلکالی (*alk*) مکان‌یابی شد.

برای پروتئین دانه نیز سه QTL بر روی کروموزوم‌های ۱ (دو QTL) و ۴ شناسایی شد. این QTLها به‌ترتیب در حدفاصل نشانگرهای RM1337-E090M1407، E100M1601-RM5310 و E060M1603-RM1359 قرار داشتند و به‌ترتیب ۲۰/۲۱، ۱۳/۱۱ و ۲۲/۱۸ درصد از تغییرات فنوتیپی را تبیین نمودند. به‌جز یکی از QTLهای مکان‌یابی شده بر روی کروموزوم یک که اثر افزایشی مثبت داشت دو QTL دیگر اثر افزایشی منفی داشتند. براساس اطلاعات منتشر شده در پایگاه داده گرامینه تاکنون تعداد ۶۶ QTL برای این صفت روی کروموزوم‌های مختلف به ثبت رسیده است (http://www.gramene.org). *گو* و همکاران (Guo *et al.*, 2007) با استفاده از یک جمعیت دابل هاپلوئید حاصل از تلاقی بین رقم Yuefu و IRAT109 به‌ترتیب به‌عنوان یک رقم *Japonica* lowland و *Japonica* upland برای شناسایی QTLهای مرتبط با کیفیت دانه ازجمله پروتئین دانه و همچنین بررسی اثر متقابل QTL در محیط استفاده کردند. نتایج بررسی آنها سه QTL برای پروتئین روی کروموزوم‌های ۲، ۷ و ۱۲ در مجاورت نشانگرهای G1327-RM263، RM214-OSR22 و RM270-C751 شناسایی نمود. بر طبق بررسی‌های انجام شده QTLهای شناسایی شده در پژوهش حاضر در زمینه ژنتیکی دیگری گزارش نشده است. در بین سه QTL ردیابی شده در مطالعه حاضر، *qPR-1b* که بیش از ۱۳ درصد از تغییرات درصد پروتئین دانه را توجیه نمود با توجه به اینکه الل‌های والد عنبربو باعث افزایش اثر این QTL شدند و اثر افزایشی آن بیش از ۲۸ درصد می‌باشد بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک مکان ژنومی کمی با ارزش در اصلاح و بهبود درصد پروتئین دانه در برنج باشد. جمعیت به‌کار رفته در این تحقیق، یک جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب بود که با توجه به پایداربودن این نوع جمعیت‌ها، QTLهای شناسایی شده با استفاده از آنها می‌تواند از قابلیت اعتماد بالایی برخوردار باشد. لذا انتظار می‌رود بتوان از QTLهای شناسایی شده در این پژوهش در جهت بهبود صفات مهم کیفی دانه برنج شامل دمای ژلاتینی‌شدن و محتوای پروتئین دانه با استفاده از انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۶-۷ متن انگلیسی مراجعه شود.



شکل ۲: موقعیت QTLهای شناسایی شده برای محتوای پروتئین و دمای ژلاتینی شدن دانه برنج در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی عنبربو × سپیدرود

Fig. 2: Position of identified QTL for grain quality in recombinant inbred lines derived from cross between Anbarbu and Spidroud