Spring (2023) 12(41): 61-69.
DOI: 10.30473/cb.2023.67638.1907
Received: 19 Feb. 2023 Accepted: 17 Jun. 2023

Crop Biotechnology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Detection of rice grain length genes in the second-generation population using morphological and molecular markers

Nadali Bagheri*, Zeinab Masoudi Jozchal

Department of Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

Correspondence
Nadali Bagheri
Email: n.bagheri@sanru.ac.ir

How to cite
Bagheri, N., & Masoudi Jozchal, Z. (2023). Tracking of rice grain length genes in the second generation population using morphological and molecular markers. *Crop Biotechnology*, *12*(41), 61-69.

ABSTRACT
Grain length is one of the most important characteristics in rice breeding, which affects the yield and quality of the grain. In this study, the genetic diversity of grain length and width and 1000 seed weight were evaluated in the F_2 population resulting from the crossing of L44 line (maternal parent) and IR-229R genotype (paternal parent). Also, molecular markers correlated with grain length were used to identify genotypes with longer grain length in the F_2 population. The results of the evaluation of morphological traits showed that the average length of rice grain in the second generation L44 × IR-229R population is 11.16 mm, which is close to the average grain length in the mother genotype L44 (11 mm). Also, 10 genotypes showed longer seed length than the paternal parent, and among these genotypes, 6 genotypes (numbers 8, 10, 76, 82, 91 and 96) had greater seed width and 1000 seed weight than the population average. In the molecular evaluation, it was found that primers RM488 and RM234 (correlated with rice grain length on chromosome 1 and 7, respectively) showed polymorphism between parent's genotypes. In examining the grain length trait with markers RM488 and RM234, genotypes 76, 82, 91 and 101 with grain length of 12.96, 12.66, 12.79 and 12.53 mm respectively were identified as long seed genotypes.

KEYWORDS
Aggressive separation, F2 population, Grain shape, Polymorphism, Rice.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال دوازدهم، شماره سوم، پیاپی چهل و یکم، بهار ۱۴۰۲ (۶۹-۶۱)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۷

DOI: 10.30473/cb.2023.67638.1907

نشریه علمی

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

ردیابی ژن(های) طول دانه برنج در جمعیت نسل دوم با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی

نادعلی باقری*، زینب مسعودی جوزچال

گروه اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

نویسنده مسئول:
نادعلی باقری
رایانامه: n.bagheri@sanru.ac.ir

چکیده

طول دانه یکی از خصوصیات بسیار مهم در اصلاح برنج است که بر عملکرد و ویژگی‌های کیفی دانه تأثیر می‌گذارد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی صفات طول و عرض و وزن هزار دانه در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی لاین L44 (والد مادری) و ژنوتیپ IR-229R (والد پدری) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین از نشانگرهای مولکولی هم‌بسته با طول دانه برای شناسایی ژنوتیپ‌هایی با طول دانه بلندتر در جمعیت F_2 استفاده شد. نتایج ارزیابی صفات مورفولوژی نشان داد که میانگین طول دانه برنج در جمعیت نسل دوم L44 × IR-229R برابر با ۱۱/۱۶ میلی‌متر می‌باشد که به میانگین طول دانه در ژنوتیپ مادری L44 (۱۱ میلی‌متر) نزدیک است. همچنین تعداد ۱۰ ژنوتیپ طول دانه بلندتر از والد پدری نشان دادند که از بین این ژنوتیپ‌ها، تعداد ۶ ژنوتیپ (شماره‌های ۸، ۱۰، ۷۶، ۸۲، ۹۱ و ۹۶) عرض دانه و وزن هزار دانه بیشتری از میانگین جمعیت داشتند. در ارزیابی مولکولی مشخص شد که آغازگرهای RM488 و RM234 (به ترتیب هم‌بسته با طول دانه برنج روی کروموزم ۱ و ۷) بین ژنوتیپ‌های والدینی چندشکلی نشان دادند. در بررسی صفت طول دانه با نشانگرهای RM488 و RM234، ژنوتیپ‌های ۷۶، ۸۲، ۹۱ و ۱۰۱ با طول دانه به ترتیب ۱۲/۹۶، ۱۲/۶۶، ۱۲/۷۹ و ۱۲/۵۳ میلی‌متر بعنوان ژنوتیپ‌های دانه بلند شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی

برنج، تفکیک متجاوز، جمعیت F_2، شکل دانه.

استناد به این مقاله:

باقری، نادعلی و مسعودی جوزچال، زینب (۱۴۰۲). ردیابی ژن (های) طول دانه برنج در جمعیت نسل دوم با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی, ۱۲(۴۱), ۶۹-۶۱.

مقدمه

در برنج صفات مربوط به طول و شکل دانه تاثیر زیادی بر بازارپسندی دارد و نقش مهمی در معرفی ارقام جدید خواهند داشت (جولیانو، ۲۰۰۷). در اصلاح گیاه برنج، کیفیت دانه بعد از عملکرد مورد توجه بوده و شکل دانه با صفات کیفی متفاوت از جمله طول و عرض دانه و ضخامت دانه ارتباط دارد (خراسانی و همکاران، ۱۳۹۹). در ایران کیفیت فیزیکی و شیمیایی دانه برنج عموماً اهمیت بالایی داشته و ذائقه ایرانی، برنج‌های معطر با طول دانه بلند را ترجیح می‌دهد. بنابراین از دیدگاه اصلاح نبات، درک اساس ژنتیکی طول و شکل دانه برنج مهم است (حیدری و همکاران، ۱۳۹۸).

با ارزیابی صفات مختلف زراعی مخصوصاً صفات مهمی که در عملکرد برنج موثر می‌باشند (از جمله طول دانه)، می‌توان توسعه و اصلاح گیاه برنج را دقیق‌تر برنامه‌ریزی نمود. طول دانه در برنج توسط چندین ژن کنترل می‌شود و شناسایی این ژن‌ها در برنامه‌های اصلاحی، گزینش لاین‌هایی با عملکرد و کیفیت دانه برتر را تسریع می‌کند، بنابراین استفاده از نشانگرهای کارآمد ضروری است (ژانگ و همکاران، ۲۰۲۰).

لاین برنج L44 بسیار معطر و با متوسط عملکرد بیشتر از طارم محلی می‌باشد، اما از لحاظ طول دانه جزو ارقامی با طول دانه متوسط می‌باشد. از آنجایی که ذائقه مردم ایران ارقام برنجی با طول دانه بلند می‌باشد، لذا این امر از بازار پسندی این لاین می‌کاهد. بنابراین برنامه‌ی اصلاحی برای افزایش طول دانه در این لاین ضروری می‌باشد. در این پژوهش، با تلاقی یک لاین برنج دانه بلند (IR-229R) با برنج معطر و اصلاحی دانه متوسط لاین L44، بوته‌هایی در نسل F_2، به طور تصادفی گزینش و با استفاده از انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی و ارزیابی مورفولوژی، شناسایی ژنوتیپ‌های گزینش یافته انجام شد. بوته‌های انتخابی را می‌توان در برنامه‌های اصلاحی آتی بخصوص انتقال ژن(های) مذکور به ارقام زراعی برنج بکار برد.

پیشینهٔ پژوهش

پیشینهٔ نظری

طرح‌های تلاقی در برنج یکی از مهم‌ترین تکنولوژی‌های قابل دسترس و کاربردی برای افزایش عملکرد است. در برنامه‌های به‌نژادی بر پایه دورگ‌گیری، بایستی والدین از نظر ژنتیکی در صفات مورد مطالعه از هم فاصله داشته باشند. بدلیل اینکه وجود آلل‌های متفاوت در دو والد و ترکیب آلل‌های آن‌ها در نتاج، منجر به بروز ارزشی بالاتر یا پایین‌تر از ارزش والدین و ظهور پدیده تفکیک متجاوز می‌شود (بهمنکار و همکاران، ۲۰۱۳). پس از دورگ گیری و ایجاد تنوع در نسل دوم، انتخاب بر اساس صفات مورفولوژی و مولکولی، راه سریعی برای غربال جوامع گیاهی و بهبود عملکرد می‌باشد (لفیتی و همکاران، ۲۰۰۴). گزینش به کمک نشانگرها روشی است که در آن از ژنوتیپ نشانگرها برای انتخاب افراد دارای فنوتیپ مورد نظر استفاده می‌شود. انتخاب گیاهان در بین نتاج در حال تفکیک که واجد ترکیب مناسبی از ژن‌های مطلوب باشند، یکی از ارکان اساسی اصلاح نباتات می‌باشد. پس از شناسایی نشانگرهای دارای پیوستگی زیاد با ژن‌ها یا QTLهای مورد نظر، به‌نژادگر می‌تواند از آلل‌های نشانگر اختصاصی DNA به عنوان یک ابزار تشخیصی جهت شناسایی گیاهان حامل آن ژن‌ها یا QTLها استفاده نماید (سینق تاکور و همکاران، ۲۰۲۱). در برنامه‌های اصلاح نباتات، انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی، روشی موثر و کارآمد در تعیین تنوع ژنتیکی می‌باشد (هو و همکاران، ۲۰۲۰). تعیین تنوع ژنتیکی طول دانه، از طریق انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی در بهبود عملکرد و کیفیت دانه ارقام مختلف برنج می‌تواند موفقیت آمیز باشد (نان و همکاران، ۲۰۱۸؛ ژائو و همکاران، ۲۰۱۸).

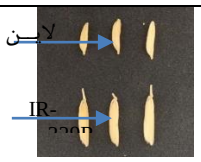
پیشینهٔ تجربی

برای افزایش بهره‌وری برنامه اصلاحی، به منظور غربال ژنوتیپ‌های مطلوب در نسل‌های اولیه، بایستی از نشانگرهایی استفاده نمود که نزدیک به ژن و یا مکانهای ژنی صفات کمی مورد نظر باشند. در بررسی تنوع صفات کیفی دانه و ارتباط بین صفت-نشانگر در ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره، مشخص شد که نشانگرهای RM246، RM11، RM241، RM16427، RM421، RM3، RM234 و RM257 با صفت طول دانه همبسته‌اند، لذا می‌توان آنها را در برنامه‌های اصلاحی برنج استفاده نمود (سومان و همکاران، ۲۰۲۰). تجزیه و تحلیل یک جمعیت تصادفی از نسل BC_3F_2، حاصل از تلاقی و یک کراس Minghui63 (طول دانه بلند) و Chuan7 (طول دانه کوتاه) مشخص شد که GS_3 یک QTL بزرگ اثر برای طول و وزن دانه و یک QTL کوچک اثر برای عرض و ضخامت دانه در برنج می‌باشد (فان و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین GL7-2 یکی دیگر از QTLهای بزرگ اثر برای طول

دانه برنج می‌باشد، که روی کروموزوم ۷ بین نشانگرهای Indel1 و RM21945 در مکان ۱۳/۲ سانتی‌مورگان از qGL7 نقشه‌یابی شد (شائو و همکاران، ۲۰۱۰).

بذور برنج مورد آزمایش (ژنوتیپ‌های مادری و جمعیت F_2) از بانک بذر آزمایشگاه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه گردید. مشخصات ژنوتیپ‌های والدینی مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. ژنوتیپ‌های والدینی برنج مورد استفاده و خصوصیات آنها در این مطالعه

ژنوتیپ	نام	مشخصات دانه	شکل دانه
مادری	لاین L44	متوسط طول و عرض دانه شلتوک به ترتیب ۱۱/۰ و ۲ میلی متر	
پدری	IR-229R	متوسط طول و عرض دانه شلتوک به ترتیب ۱۲/۵ و ۳/۲ میلی متر	

ارزیابی مورفولوژیکی

در زمان رسیدگی فیزیولوژیک (یک هفته قبل از برداشت محصول)، طبق دستورالعمل ثبت مشخصات موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (ایری، ۲۰۰۲) اندازه‌گیری صفات طول و عرض دانه و وزن هزار دانه روی ژنوتیپ‌های والدینی و جمعیت F_2 برنج انجام گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل توصیفی صفات مورد مطالعه و بررسی سطح تنوع فنوتیپی موجود در مواد گیاهی مطالعه شده، پارامترهای توصیفی شامل میانگین، مقادیر حداقل و حداکثر، دامنه تغییرات، ضریب تغییرات و انحراف معیار برای ژنوتیپ‌های والدینی و جمعیت F_2ی L44 × IR-229R محاسبه شد. تفکیک متجاوز برای صفات در جهت مثبت و منفی، با استفاده از رابطه‌های ۱ و ۲ محاسبه شد.

$$TSp = \frac{BINL-BP}{BP}$$ رابطه (۱)

$$TSn = \frac{WINL-WP}{WP}$$ رابطه (۲)

در این روابط، TSp و TSn: به‌ترتیب تفکیک متجاوز مثبت و منفی، BINL و WINL: به‌ترتیب نتاج دارای بیشترین و کمترین ارزش و BP و WP: به‌ترتیب والدین برخوردار از بالاترین و کمترین ارزش هستند (هوشمند، ۲۰۰۳).

ارزیابی مولکولی

از والدین (لاین L44 و رقم IR-229R) و جمعیت نسل دوم حاصل از تلاقی والدین (تعداد ۱۲۰ بوته)، در مرحله حداکثر پنجه‌زنی، از هر بوته ۵-۴ نمونه برگی سالم و عاری از آفت و بیماری در ساعات ۸-۶ صبح تهیه و درون پاکت فریزر اتیکت دار قرار داده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریز نگهداری شدند. در این مطالعه DNA ژنومی والدین و نتاج F_2 آنها با استفاده از روش CTAB (دویل و دویل، ۱۹۹۰)، استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA ژنومی با روش الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad انجام گرفت. حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. نشانگرهای مولکولی جهت بررسی ژن(های) طول دانه برنج در والدین و جمعیت F_2 حاصل از تلاقی بین والدین به شرح جدول شماره ۲ می‌باشد.

جدول ۲. نشانگرهای مولکولی مورد استفاده در این مطالعه

ژن	نشانگر	کروموزوم	آغازگر رو به جلو آغازگر رو به عقب	منبع
GL1	RM488	۱	3′CAGCTAGGGTTTTGAGGCTG5′ 5′TAGCAACAACCAGCGTATGC3′	وانگ و همکاران (۲۰۱۲)
qGRL-1.1	RM431	۱	3′TCCTGCGAACTGAAGAGTTG5′ 5′AGAGCAAAACCCTGGTTCAC3′	آماراواتی و همکاران (۲۰۰۸)
qGL3.2	RM282	۳	3′CTGTGTCGAAAGGCTGCAC5′ 5′CAGTCCTGTGTTGCAGCAAG3′	وانگ و همکاران (۲۰۱۲)
GS3	GS09	۳	3′GCAACCAAGTCCACGCTAAT5′ 5′TAGCCGAAGATCAGCCTCCT3′	فان و همکاران (۲۰۰۶)
GS3	GS06	۳	3′AGCAAAGCTGGAACGAAGAG5′ 5′TAAATTACGCCGTGTCAACG3′	فان و همکاران (۲۰۰۶)
GS3	SF28	۳	3′TGCCCATCTCCCTCGTTTAC5′ 5′GAAACAGCAGGCTGGCTTAC3′	فان و همکاران (۲۰۰۹)
grl7-1	RM505	۷	3′AGAGTTATGAGCCGGGTGTG5′ 5′GATTTGGCGATCTTAGCAGC3′	آماراواتی و همکاران (۲۰۰۸)
qGL7-2	RM234	۷	3′ACAGTATCCAAGGCCCTGG5′ 5′CACGTGAGACAAAGACGGAG3′	ربیعی و همکاران (۲۰۰۴)

الکتروفورز محصولات تکثیر PCR، روی ژل آگارز ۲ درصد ران و رنگ‌آمیزی به وسیله اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) انجام گردید. بعد از رنگ‌آمیزی، با استفاده دستگاه ژل داک (مدل IP-115-S (Vilber Lourmat) عکس برداری از ژل انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها و روابط بین داده‌های مورفولوژیکی شکل دانه و همچنین گروه‌بندی داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. باندهای DNA چند شکل ایجاد شده توسط هر یک از ژنوتیپ ها در هر سطح نشانگر، امتیاز داده شد، حضور و عدم حضور هر باند به ترتیب بصورت ۱ و صفر کد داده شد. رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ ها از طریق گروه بندی به روش UPGMA و با استفاده از نرم افزار PAST (PAleontological Statistics, Version 2.17) بر آورد گردید.

یافته های پژوهش

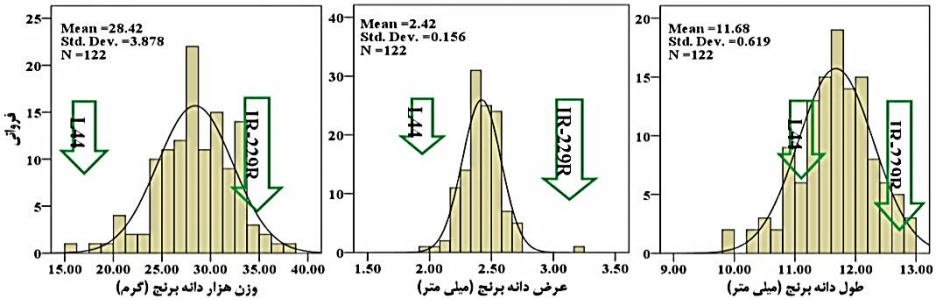
ارزیابی صفات مرتبط با شکل دانه نشان داد که میانگین طول دانه برنج در جمعیت نسل دوم L44 × IR-229R برابر با ۱۱/۱۶ میلی متر می‌باشد که به میانگین طول دانه در ژنوتیپ مادری L44 ($\bar{X}$ = ۱۱ میلی متر) نزدیک می‌باشد، در حالیکه تعداد ۱۰ ژنوتیپ طول دانه بیشتر از والد پدری IR-229R ($\bar{X}$ = ۱۲/۵ میلی متر) داشتند (جدول ۴ و شکل ۱).

میانگین عرض دانه برنج در جمعیت نسل دوم L44×IR-229R برابر با ۲/۴۲ میلی متر می‌باشد که تقریبا متوسط میانگین عرض دانه در ژنوتیپ‌های مادری L44 ($\bar{X}$ = ۲ میلی متر) و پدری IR-229R ($\bar{X}$ = ۳/۲ میلی متر) می‌باشد، در حالیکه اکثر ژنوتیپ‌های نسل دوم از والد مادری عرض دانه بیشتری داشتند، اما هیچ ژنوتیپی به اندازه والد پدری، عرض دانه نشان نداد (جدول ۴ و شکل ۱).

در جمعیت نسل دوم برنج L44 × IR-229R، میانگین وزن هزار دانه برابر با ۲۸/۴۱ گرم می باشد که متوسط میانگین وزن هزار دانه در ژنوتیپ‌های مادری L44 ($\bar{X}$ = ۲۰/۹ گرم) و پدری IR-229R ($\bar{X}$ = ۳۷/۹ گرم) می‌باشد. اکثر ژنوتیپ‌های نسل دوم برنج از والد مادری وزن هزار دانه بیشتری داشتند، اما هیچ ژنوتیپی بیش از والد پدری، وزن هزار دانه نشان نداد (جدول ۴ و شکل ۱).

بیشترین ضریب تغییرات در بین صفات مورد مطالعه در جمعیت نسل دوم برنج L44 × IR-229R را وزن هزار دانه (٪ ۱۳/۶۲) در مقایسه با صفات طول (٪ ۵/۳۱ = CV) و عرض دانه (٪ ۶/۴۵ = CV) نشان داد (جدول ۳). بعبارتی در این جمعیت برنج مورد مطالعه وزن هزار دانه بیشترین تنوع را داشت، لذا چنانچه در برنامه اصلاحی هدف انتخاب ژنوتیپ‌هایی با وزن هزار دانه بیشتر باشد، انتخاب ژنوتیپ‌های مورد نظر راحت‌تر خواهد بود.

تفکیک متجاوزر برای صفات شکل دانه نشان داد که برای طول دانه تفکیک متجاوز مثبت وجود دارد اما برای صفات عرض دانه و وزن هزار دانه در تلاقی L44 × IR-229R تفکیک متجاوز مثبت وجود نداشت. لذا می‌توان در جمعیت در حال تفکیک ژنوتیپ‌هایی با طول دانه بلندتر را گزینش نمود، اما بایستی دقت داشت تا ژنوتیپ‌های انتخابی از عرض دانه و وزن هزار دانه مطلوب نیز برخوردار باشند.



شکل ۱. نمودار فراوانی صفات مرتبط با شکل دانه در جمعیت F_2 برنج

جدول ۳. جدول آمار توصیفی جمعیت F_2

صفات	شاخص‌های جمعیت F_2									ژنوتیپ والدینی	
	کمترین	بیشترین	دامنه	میانگین	انحراف استاندارد	ضریب تغییرات (٪)	تفکیک متجاوزر			مادری (L44)	پدری (IR-229R)
							مثبت	منفی			
ول دانه برنج (میلی‌متر)	۹/۸۵	۱۲/۹۶	۳/۱۱	۱۱/۶۸	۰/۶۲	۵/۳۱	۳/۶۸	−۱۰/۴۵		۱۱/۰	۱۲/۵۰
رض دانه برنج (میلی‌متر)	۱/۹۸	۲/۷۰	۰/۷۲	۲/۴۲	۰/۱۵۶	۶/۴۵	−۱۵/۶۲	−۱/۰		۲/۰	۳/۲
زن هزار دانه (گرم)	۱۵/۵	۳۶/۲۷	۲۰/۷۷	۲۸/۴۱	۳/۸۷	۱۳/۶۲	−۴/۳	−۲۵/۸۴		۲۰/۹	۳۷/۹

از آنجایی هدف اصلی این پژوهش شناسایی ژنوتیپ‌هایی با طول دانه بیشتر می‌باشد. تعداد ۱۰ ژنوتیپ (جدول ۴) طول دانه بلندتر از والد پدری نشان دادند، که از بین این ژنوتیپ‌ها، تعداد ۶ ژنوتیپ (شماره‌های ۸، ۱۰، ۷۶، ۸۲، ۹۱ و ۹۶) عرض دانه و وزن هزار دانه بیشتر از میانگین جمعیت داشتند (جدول ۴).

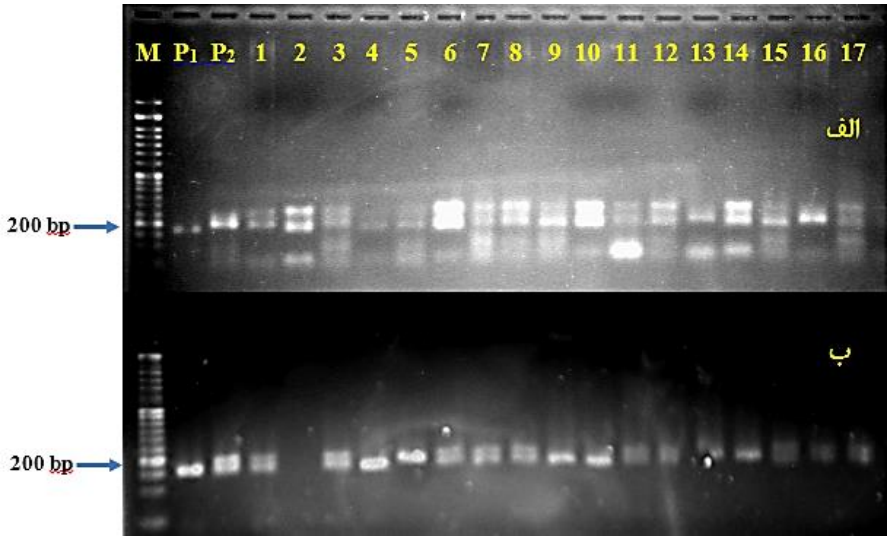
جدول ٤. ژنوتیپ‌های برنج انتخابی دارای صفات ظاهری دانه مطلوب

شماره ژنوتیپ	طول دانه (میلی متر)	عرض دانه (میلی متر)	وزن هزار دانه (گرم)
۸	۱۲/۷۹	۲/۴۷	۳۰/۶
۱۰	۱۲/۶۶	۲/۴۷	۳۱/۴
۳۹	۱۲/۸۵	۲/۳۲	۲۸/۴
۷۳	۱۲/۶۳	۲/۲۶	۲۷/۹
۷۶	۱۲/۹۶	۲/۵۵	۲۸/۹۷
۸۲	۱۲/۶۶	۲/۵۱	۳۵/۱۷
۹۱	۱۲/۷۹	۲/۳۷	۳۳/۰۳
۹۶	۱۲/۸۸	۲/۵۴	۳۴/۲۷
۱۰۱	۱۲/۵۳	۲/۶۷	۱۵/۵
۱۱۴	۱۲/۵۹	۲/۳۵	۲۷/۷
میانگین جمعیت F_2	۱۱/۱۶	۲/۴۲	۲۸/۴۱

از بین ۸ نشانگر مولکولی مورد استفاده در این مطالعه (شامل ۵ نشانگر SSR، ۲ نشانگر SNP و یک نشانگر CAPS)، فقط ۲ نشانگر SSR یعنی RM488 و RM234 توانستند بین ارقام والدینی چند شکلی نشان دهند. لذا در این مطالعه از نشانگرهای RM488 و RM234 (به ترتیب همبسته با طول دانه برنج روی کروموزم ۱ و ۷) جهت ردیابی ژن (های) طول دانه در جمعیت F_2 استفاده شد.

قطعات DNA حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نشانگر RM488 همبسته با ژن GL1 واقع بر روی کروموزوم شماره ۱ برنج، برای رقم دانه متوسط L44 قطعه باندی به طول ۱۷۷ جفت باز و برای رقم دانه بلند IR229R قطعات باندی ۱۹۰ و ۲۵۰ جفت باز را نشان دادند (شکل ۲ – الف). الگوی باندی نشانگر RM488 در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه نشان داد که ۲۱ ژنوتیپ مشابه رقم L44 و ۳۴ ژنوتیپ مشابه رقم IR229R و بقیه ژنوتیپ‌ها هتروزیگوت می‌باشند. (وانگ و همکاران، ۲۰۱۲)، در بررسی QTLهای کنترل کننده طول و عرض دانه حاصل از تلاقی رقم دانه بلند باسماتی ۳۸۵ و رقم دانه کوتاه HJX74، نشان دادند که آلل qGL1 کنترل کننده طول دانه روی کروموزوم ۱ بین نشانگرهای جانبی RM488 و RM294b واقع شده است.

الگوی باندی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نشانگر RM234 همبسته با ژن GL7-2 واقع بر کروموزوم شماره ۷ برنج، برای رقم دانه متوسط L44، قطعه باندی به طول ۱۵۶ جفت باز و برای رقم دانه بلند IR229R، قطعه باندی به طول ۱۷۵ جفت باز را نشان دادند. الگوی باندی نشانگر RM234 در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه، نشان داد که ۱۳ ژنوتیپ مشابه لاین L44 و ۷۱ ژنوتیپ مشابه رقم IR229R و بقیه ژنوتیپ‌ها هتروزیگوت می‌باشند (شکل ۲– ب). شائو و همکاران (۲۰۱۰) در نقشه‌یابی qGL7-2، یک QTL طول دانه برنج، گزارش کردند که این آلل در فاصلهٔ ۴/۸ سانتی‌مورگان بین نشانگرهای جانبی RM234 و RM351 قرار دارد.



شکل ۲. الگوی باندی محصول PCR با نشانگر RM488 (الف) و با نشانگر RM234 (ب) برای ارقام والدینی و تعدادی از ژنوتیپ‌های جمعیت F_2 حاصل از تلاقی آنها روی ژل آگارز ۲ درصد، M؛ نشانگر وزنی 50bp، P_1؛ لاین L44 (طول دانه متوسط) و P_2؛ IR229R (طول دانه بلند).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در بررسی صفات طول دانه و وزن هزار دانه مشخص شد که ژنوتیپ‌های با طول دانه بلندتر از والد دانه بلند، وزن هزار دانه بیشتری نسبت به میانگین جمعیت F_2 دارند (جدول ۴). عیدی کهنکی و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی همبستگی صفات مورفولوژیکی در نسل F_3 برنج، نشان دادند که صفت طول دانه با وزن هزار دانه همبستگی مثبت و معنی‌دار دارد. بنابراین صفت طول دانه با تأثیر بر وزن هزار دانه می‌تواند یکی از صفات مؤثر بر عملکرد دانه باشد.

نشانگری مطلوب است که بتواند ژن مورد مطالعه را در ژنوتیپ‌های مختلف از هم متمایز کند؛ مثلا رقم دانه کوتاه را از دانه بلند بتواند تمایز دهد و در باندها تفاوت دیده شود. در بین نشانگرهای مولکولی مورد مطالعه نشانگرهای RM488 و RM234 از قابلیت خوبی در تشخیص صفت طول دانه برنج برخوردار بودند. این نشانگرها از نشانگرهای همبارز می‌باشند و می‌توانند هتروزیگوت‌ها را از هموزیگوت‌ها تشخیص دهند. اختصاصی بودن، چند آللی و دارا بودن چندشکلی بالا از ویژگی‌های بارز این نشانگرهاست. لاین L44 اندازه باندی متفاوتی نسبت به IR229R داشت که بیانگر وجود آل‌های مختلف در واریته‌ها و ایجاد فنوتیپ‌های متفاوت می‌باشد. اسلام و عاریف (۲۰۱۴)، در بررسی روابط ژنتیکی QTLهای کنترل کننده طول دانه برخی ارقام برنج، از ۵۱ نشانگر SSR واقع بر کروموزوم‌های ۳ و ۷ استفاده نمودند و تعداد زیادی ژن /QTL با گروه های مختلف بر روی کروموزوم ۳ و ۷ کنترل کننده طول دانه شناسایی شد.

بررسی‌های مولکولی حاصل از دو نشانگر کاربردی در ارقام والدینی و ژنوتیپ‌های گزینش شده، الگوی باندی مناسبی ارائه داد به طوری که با این دو نشانگر به طور مشترک تعداد ۳ ژنوتیپ الگوی باندی مشابه لاین L44 و تعداد ۲۶ ژنوتیپ الگوی باندی مشابه والد IR-229R و همچنین تعداد ۲۰ ژنوتیپ الگوی باندی مشترک دو والد یعنی هتروزیگوت نشان دادند (جدول ۵). در این بررسی، با هدف انتقال ژن کنترل کننده طول دانه به روش تلاقی برگشتی از رقم دانه بلند IR-229R به لاین L44، ژنوتیپ‌های هتروزیگوت دارای اهمیت هستند. بنابراین ژنوتیپ‌هایی که با هر دو نشانگر هتروزیگوت نشان دادند با اطمینان بیشتری مورد انتخاب خواهند بود. ژو، وانگ و لی (۲۰۰۶)، اساس ژنتیکی صفات مرتبط با کیفیت دانه برنج از جمله اندازه و شکل دانه برنج را با استفاده از نشانگرهای SSR و CAPS در جمعیت F_2 و BC_2F_2 مورد مطالعه قرار دادند و توانستند یک ژن بزرگ اثر کنترل کننده طول دانه به نام LK-4(t) را مکان‌یابی کنند. آنها این مکان ژنی را با استفاده از نشانگرهای P2-SacI، P1-EcoRV و P3-MboI روی کروموزوم ۳ و نزدیک به سانترومر نشانمند کردند. همچنین در بررسی شناسایی QTLهای کنترل کننده ابعاد دانه در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی دو رقم برنج ایرانی (دم سفید و گرده) توسط ربیعی و همکاران (۲۰۰۴)، ۶ تا QTL روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۵، ۷ و ۸ مکان یابی شدند.

جدول ۵. شماره ژنوتیپ‌هایی که با هر دو نشانگر RM488 و RM234 الگوی باندی مشابه داشتند

ژنوتیپ‌های مشابه با لاین L44	۹۳-۱۱۰- ۱۱۳
ژنوتیپ‌های مشابه با IR-229R	۱-۳-۷-۱۱-۱۲-۱۸-۲۳-۲۸-۳۱-۳۵-۳۶-۳۷-۳۹-۴۲-۴۳-۴۸-۵۵-۶۱-۶۹-۷۱-۷۶-۷۸-۸۶-۱۰۸-۱۱۱-۱۱۲
ژنوتیپ‌های هتروزیگوت	۶-۱۷-۲۴-۳۲-۳۳-۳۴-۴۱-۴۴-۴۶-۵۱-۶۴-۷۷-۸۲-۸۳-۹۴-۱۰۰-۱۰۱-۱۰۳-۱۰۶-۱۰۷

در بررسی صفت طول دانه با دو نشانگر RM488 و RM234، ژنوتیپ‌های ۷۶، ۸۲، ۹۱ و ۱۰۱ هتروزیگوت‌های دانه بلند با طول دانه شلتوک به ترتیب (۱۲/۹۶، ۱۲/۶۶، ۱۲/۷۹ و ۱۲/۵۳ میلی متر) شناسایی شدند و برای خالص سازی در نسل‌های بعدی معرفی می‌شوند. با بررسی نتایج مولکولی با دو نشانگر مذکور، تعداد ۲۰ ژنوتیپ هتروزیگوت شناخته شدند. تجزیه و تحلیل فنوتیپی و ژنوتیپی یکدیگر را کاملا تصدیق نمی‌کنند؛ چرا که صفت طول دانه یک صفت کمی است و فقط تحت تأثیر دو ژن واقع بر روی کروموزوم ۱ و ۳ پوشش نمی‌یابد. به عبارتی نتایج مکان‌یابی QTLهای کنترل کننده طول دانه در کروموزوم‌های مختلف برنج نشان می‌دهد صفت طول دانه برنج چند ژنی است.

بنابراین فن‌آوری نشانگرهای مولکولی بخصوص SSR می‌تواند برای ردیابی نواحی ژنومی از جمله طول دانه مفید باشد و تا حد زیادی دقت و کارایی برنامه‌های اصلاحی را بهبود بخشد. با توجه به تنوع فنوتیپی ایجاد شده در جمعیت F_2 برای صفت طول دانه و استفاده از تفکیک یافته‌های مطلوب در برنامه‌های به‌نژادی، می‌توان در نسل‌های بعد به ژنوتیپ‌هایی با خصوصیات مورد نظر و افزایش طول دانه دست یافت.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به جهت حمایتهای مالی و از همکاری گروه آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی که امکانات لازم برای اجرای این پروژه را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله از طرح تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به شماره ۱۰-۱۴۰۰-۰۱ استخراج شده است.

References

Amaravathi, Y., Singh, R., Singh, A.K., Singh, V.P., Mahopatra, T., Sharma, T.R. & Singh, N.K. (2008). Mapping of quantitative trait loci for Basmati quality traits in rice (*Oryza Sativa* L.). *Molecular Breeding*, *21* (1), 49-65.

Aslam, K. & Arif, M. (2014). SSR analysis of chromosomes 3 and 7 of rice (*Oryza sativa* L.) Associated with grain length. *Pakistan Journal of Botany*, *46*(4), 1363-1372.

Bahmankar, M., Sadat Noori, S.A. & Mortazavian, S.M.M. (2013). Transgressive segregation phenomena in breeding of crop plants. *Journal of Applied Crop Breeding*, *1*(2), 175-185. (in persian)

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Vol. *12* (1): 13-15.

Eidi-kohnaki, M., Kiani, Gh. & Nematzadeh, Gh. (2013). Relationship between Morphological Traits in Rice Restorer Lines at F_3 Generation using Multivariate Analysis. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, *1* (6), 572-577.

Fan, C.H., Xing, Y., Mao, H., Lu, T., Han, B., Xu, C., Li, X. & Zhang, Q. (2006). GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 1164-1171.

Fan, C., Yu, S., WAng, H. & Xing, Y. (2009). A causal C–A mutation in the second exon of GS3 highly associated with rice grain length and validated as a functional marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 465-472.

Heydari, R., Bagheri, N., Babaeian Jelodar, N. & Najafi Zarrini, H. (2019). Evaluation of qualitative traits of grain in rice promising lines (*Oryza Sativa* L.). *Isfahan University of Technology-Journal of Crop Production and Processing*, *9* (2): 53-66. (in persian)

Houshmand, S. (2003). The genetically analysis of quantitative traits. *Shahre Kord University*, Iran, P. 462.

Hu, W., Zhou, T., Wang, P., Wang, B., Song. J., Han, Z., Chen, L., Liu, K. & Xing, Y. (2020). Development of whole-genome agarose-resolvable LInDel markers in rice. *Rice*, 13, 1.

IRRI. (2002). Standard Evaluation System for rice (SES). *International Rice Research Institute*. 54p.

Juliano, B.O. (2007). Rice chemistry and quality. *Philippine Rice Research Institute*, 402 pages.

Khorasany, E., Fahmideh, L., Babaeian, N.A., Ranjbar, G. & Najafi, M.A. (2020). Investigation of the yield and quality traits of some rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Journal of Crop Breeding*, *12* (36), 9-20. (in persian)

Lafitte, H.R., Price, A.H. & Courtois, B. (2004). Yield response to water deficit in an upland rice mapping population: Associations among traits and genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1237-1246.

Nan, J.Z., Feng, X.M., Wang, C., Zhang, X.H., Wang, R.S., Liu, J.X., Yuan, Q.B., Jiang, G.Q. & Lin, S.Y. (2018). Improving rice grain length through updating the GS3 locus of an elite variety Kongyu 131. *Rice*, 11, 21.

Rabiei, B., Valizadeh, M., Ghareyazie, B., Moghaddam, M. & Ali, A.J. (2004). Identification of QTLs for rice grain size and shape of Iranian cultivars using SSR markers. *Euphytica*, 137, 325-332.

Shao, G., Tang, S., Luo, J., Jiao, G., Wei, X., Tang, A., Wu, J., Zhuang, J. & Hu, P. (2010). Mapping of qGL7-2, a grain length QTL on chromosome 7 of rice. *Journal of Genetics and Genomics*, *37*(8), 523-531.

Singh Thakur, V.J., Ponnuswamy, R., Singh, A.K., Shankar, V.G. & Chary, D.S. (2021). Molecular tagging of Rf genes for the fertility restoration of WA-CMS system by bulk segregant analysis in rice. *Indian J. Genet*., *81*(1), 43-49.

Suman, K., Madhubabu, P., Rathod, R., Sanjeeva Rao, D., Rojarani, A., Prashant, S., Subbarao, L.V., Ravindrababu, V. & Neeraja, C.N. (2020). Variation of grain quality characters and marker-trait association in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics*, 99, 5.

Wang, Sh., Wu, K., Yuan, Q., Liu, X., Liu, Zh., Lin, X., Zeng, R., Zhu, H., Dong, G., Qian, Q., Zhang, G. & Fu, X. (2012). Control of grain size, shape and quality by OsSPL16 in rice. *Nature America Nat. Genet*. 44, 950–954.

Zhang, L., Bin, M., Zhong, B., Xiaoyuan, L., Changquan, Z., Jiyun, L., Qun, L., Qiaoquan, L. &Zuhua, H. (2020). Grain size selection using novel functional markers targeting 14 genes in rice. *Rice*, 13, 63.

Zhao, D.S., Li, Q.F., Zhang, C.Q., Zhang, C., Yang, Q.Q., Pan, L.X., Ren, X.Y., Lu, J., Gu, M.H. & Liu, Q.Q. (2018). GS9 acts as a transcriptional activator to regulate rice grain shape and appearance quality. Nature Communications, 9, 1240.

Zhou, L.Q., Wang, Y.P. & Li, S.G. (2006). Genetic analysis and physical mapping of LK-4(t), a major gene controlling length in rice, with a BC_2F_2 population. *Yi Chuan Xue Bao*, 33, 72-79.