

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

تهیه نقشه لینکازی نشانگرهای SSR و مکان یابی QTL های کنترل کننده زمان رسیدگی در یک جمعیت F_۲ برنج

برنج

بابک ربیعی^{۱*} و بهزاد قره باضی^۲

۱- عضو هیئت علمی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، صندوق پستی ۱۳۱۴-۴۱۶۳۵، تلفن ۰۱۳۱-۶۶۹۰۲۸۲

پست الکترونیک babakrabiei1348@yahoo.com

۲- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی

چکیده

تهیه نقشه های مولکولی و شناسایی نواحی ژنومی کنترل کننده صفات کمی اهمیت زیادی برای به نژادگران برنج دارد، به طوری که با علم به موضوع با دقت بیشتر و در مدت زمان کمتری می توان از طریق اجرای برنامه های انتخاب به کمک نشانگر به اصلاح اینگونه صفات پرداخت. با توجه به بارندگی های زمان برداشت در نواحی شمالی ایران و خسارت بسیار زیادی که در این مرحله به محصول وارد می شود و باعث کاهش کیفیت و قیمت آن می گردد، اهمیت مطالعه زمان رسیدگی به منظور کاهش آن بر کسی پوشیده نیست. در این مطالعه، نقشه ژنتیکی نشانگرهای ریز ماهواره (SSR) و نواحی ژنومی کنترل کننده زمان رسیدگی در برنج در یک جمعیت F_۲ حاصل از تلاقی گرده/دم سفید مکان یابی شدند. ۱۹۲ گیاه F_۲ حاصل از تلاقی فوق به همراه هر دو والد در موسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) کشت و برای زمان رسیدگی مورد اندازه گیری قرار گرفتند. استفاده ژنومی از برگهای تازه و جوان والدین و گیاهان F_۲ استخراج و از نظر ۸۸ نشانگر SSR تعیین ژنوتیپ شدند. نقشه لینکازی حاصل (با حداکثر نوترکیبی ۰/۳ و $LOD \leq 5$)، ۱۳۶۷/۹ سانتی مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد و فاصله متوسط نشانگرها از یکدیگر ۱۸ سانتی مورگان بود. برای شناسایی نواحی ژنومی کنترل کننده زمان رسیدگی از روش تجزیه QTL استفاده گردید. ابتدا مکان یابی فاصله ای ($LOD \leq 3$) مورد استفاده قرار گرفت و سپس از مکان یابی فاصله ای مرکب (CIM) برای تأیید QTL های شناسایی شده استفاده گردید. در مجموع پنج QTL شناسایی گردید که بر روی کروموزوم های ۲، ۳، ۵، ۶ و ۸ قرار داشتند. از پنج QTL فوق دو QTL (*md6* و *md8*)، که بر روی کروموزوم های ۶ (در فاصله *RM121-RM527*) و ۸ (در فاصله *RM38-RM25*) مکان یابی شدند، بزرگ اثر بودند و با $LOD=5.82$ و $LOD=6.57$ به ترتیب باعث افزایش زمان رسیدگی در QTL های *md2*، *md3* و *md8* (با میانگین ۳ روز در هر QTL) شدند، در حالیکه در دو QTL دیگر (*md5* و *md6*)

الل های دم سفید با متوسط ۲/۷۴ روز در هر QTL زمان رسیدگی را کاهش دادند. نوع عمل ژن در QTL های شناسایی شده از افزایشی تا فوق غالبیت متغیر بوده و به استثنای *md3* و *md8* که در آنها غالبیت به سمت افزایش زمان رسیدگی بود، در سایر QTL ها اثر غالبیت ژن ها برای کاهش زمان رسیدگی مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: برنج، زمان رسیدگی، نشانگرهای SSR، نقشه لینکازی، تجزیه QTL، مکان یابی فاصله ای، مکان یابی فاصله ای مرکب (CIM)

مقدمه

اکثر صفات اقتصادی در گیاهان و جانوران، کمی بوده و به وسیله چندین ژن با اثرات کوچک کنترل می شوند. علاوه بر تعداد زیاد مکان های ژنی، تأثیر عوامل پیوسته محیطی در تظاهر اینگونه صفات موجب شده است که تنوع فنوتیپی کاملاً پیوسته ای در نتایج یک جمعیت نشان دهند. مجموعه این عوامل باعث شده است که مطالعه صفات کمی و به ویژه تعیین تعداد و جایگاه مکان های ژنی کنترل کننده آنها و سهم هر یک از مکان ها در کنترل تنوع فنوتیپی و ژنتیکی اینگونه صفات بسیار مشکل گردد. شناسایی QTL های کنترل کننده صفات کمی به اوایل دهه ۱۹۲۰ میلادی بر می گردد. در آن زمان، ساکس (Sax, ۱۹۲۳) مکان های ژنی کنترل کننده رنگ دانه در لوبیا را با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی تعیین نمود. از آن زمان، صفات کمی زیادی مورد مطالعه قرار گرفته اند و تعداد و جایگاه ژن های کنترل کننده آنها نیز شناسایی شده اند. در ابتدا بیشتر از نشانگرهای مورفولوژیکی و سیتوژنتیک برای این منظور استفاده شد. اما، پس از معرفی و توسعه نشانگرهای مولکولی نظیر نشانگرهای آیزوزایم و به ویژه نشانگرهای DNA، شناسایی QTL ها سرعت چشمگیری پیدا کرد، به طوری که هم اکنون اطلاعات زیادی در مورد جایگاه ژنی QTL ها برای بسیاری از صفات زراعی در گیاهان متعددی در اختیار است. برنج، یکی از اولین گیاهانی بود که هدف تحقیقات مولکولی قرار گرفت. کوچک بودن اندازه ژنوم و سرعت تکثیر تقریباً مناسب آن موجب شده است که یکی از بهترین موجودات عالی برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی باشد. در برنج، QTL ها برای بسیاری از صفات نظیر عملکرد و اجزای عملکرد (Xiao et al., 1996; Septiningsih et al., 2003)، کیفیت دانه (He et al., 1999; Rabiei et al., 2004)، مقاومت به آفات و بیماری ها (Wang et al., 1994)، مقاومت به تنش های محیطی (Champoux et al., 1994) و غیره شناسایی شده اند. با این حال، به جز مطالعات ربیعی و همکاران (Rabiei et al., 2004)، که QTL های کنترل کننده کیفیت ظاهری دانه (اندازه و شکل دانه) را شناسایی نمودند، گزارش دیگری از تجزیه QTL در ارقام برنج ایرانی در اختیار نیست.

در این مطالعه، QTL های کنترل کننده زمان رسیدگی در برنج در یک جمعیت F_۲ حاصل از تلاقی دو رقم برنج ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره (SSR) مکان یابی شد. هدف از تجزیه ژنتیکی، شناسایی تعداد QTL ها، جایگاه ژنومی آنها، نوع عمل ژن و سهم هر یک از QTL ها در تعیین تنوع فنوتیپی زمان رسیدگی می باشد.

مواد و روش ها

یک جمعیت F_2 شامل ۱۹۲ فرد از تلاقی بین دو رقم برنج ایرانی (دم سفید و گرده) به دست آمد. دم سفید یک رقم محلی یا بلند (سازگار به استان های گیلان و مازندران)، با کیفیت خوب، عملکرد کم و زمان رسیدگی طولانی است، در حالی که گرده یک رقم محلی نسبتاً پا کوتاه (سازگار به استان های زنجان و آذربایجان)، با کیفیت پایین و زمان رسیدگی کوتاه می باشد. ۱۹۲ بوته F_2 حاصل از تلاقی فوق در مزرعه آزمایشی موسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) کشت شدند و زمان رسیدگی (تعداد روز از کاشت تا ظهور اولین خوشه در هر بوته) در آنها اندازه گیری شد. استخراج DNA به روش دلاپورتا (Dellaporta et al., 1983) انجام شد. به منظور تهیه نقشه لینکاژی جمعیت مورد مطالعه، ۸۸ نشانگر چند شکل SSR که توزیع خوبی بر روی ۱۲ کروموزوم برنج داشتند، بر اساس نقشه های موجود (Chen et al., 1997; Temnykh et al., 2000; McCouch et al., 2002) انتخاب شدند و برای تعیین ژنوتیپ افراد F_2 مورد استفاده قرار گرفتند. نقشه لینکاژی به روش آنالیز سه نقطه ای با حداکثر میزان نوترکیبی $0/3$ و $LOD \geq 5$ و به کمک نرم افزار Mapmaker/EXP (Lincoln et al., 1993a) تهیه شد و برای تبدیل فراوانی نوترکیبی به فاصله نقشه ای از تابع نقشه کوسامبی (Kosambi., 1944) استفاده گردید. تجزیه QTL ها به دو روش مکان یابی فاصله ای (Lander & Botstein., 1989) و مکان یابی فاصله ای مرکب (Zeng, 1993 & 1994) و با استفاده از نرم افزار های Mapmaker/QTL (Lincoln et al., 1993b) و QTL Cartographer (Basten et al., 2001) انجام شد و نهایتاً QTL های شناسایی شده با هر دو روش گزارش گردیدند.

نتایج و بحث

در روش مکان یابی فاصله ای شش QTL شناسایی گردید که بر روی کروموزوم های ۲، ۳، ۵، ۶ (دو QTL) و ۸ قرار داشتند. نمودار LOD در این روش، وجود دو نقطه پیک را در دو فاصله نشانگری مجاور هم در روی کروموزوم ۶ (RM121-RM527 و RM527-RM3) نشان داد که می توانست دلیلی بر وجود دو QTL در این ناحیه باشد. اما، چون در روش مکان یابی فاصله ای، ناحیه مورد آزمون می تواند تحت تأثیر نشانگرهای دیگری باشد که در خارج از فاصله مذکور، بر روی کروموزوم مربوطه قرار دارند (Zeng, 1993 & 1994)، به این ترتیب تجزیه QTL به روش مکان یابی فاصله ای مرکب (Zeng, 1993 & 1994) نیز انجام شد. نتایج حاصل تنها وجود یک QTL را در این ناحیه تأیید نمود ($md6$) که در فاصله نشانگری RM121-RM527 قرار داشت (جدول ۱، شکل ۱). سایر QTL های شناسایی شده در روش مکان یابی فاصله ای، در مکان یابی فاصله ای مرکب نیز مورد تأیید قرار گرفتند. به این ترتیب پنج QTL ($md2$, $md3$, $md5$, $md6$, $md8$)، زمان رسیدگی را در جمعیت مورد مطالعه کنترل کردند. دو QTL بزرگ اثر با $LOD=6/57$ و $LOD=5/82$ در فاصله های RM121-RM527 و RM121-RM527 به ترتیب بر روی کروموزوم های ۶ ($md6$) و ۸ ($md8$) شناسایی شد که به تنهایی ۲۷/۹٪ و ۳۲/۶٪ از کل تنوع فنوتیپی موجود در زمان رسیدگی را کنترل کردند. اثر افزایشی QTL ها از ۱/۴۱ تا ۴/۵۴ روز متغیر بود. الل های گرده باعث افزایش زمان رسیدگی در QTL های $md3$ ، $md2$ و $md8$ (با میانگین ۳ روز در هر QTL) شدند، در حالیکه در دو QTL دیگر ($md5$ و $md6$) الل های دم سفید با متوسط ۲/۷۴ روز در هر QTL زمان رسیدگی را کاهش دادند. نوع عمل ژن در QTL های شناسایی شده از افزایشی تا فوق غالبیت متغیر بوده و به استثنای $md3$ و $md8$ که در آنها غالبیت به سمت افزایش زمان رسیدگی بود، در سایر QTL ها اثر غالبیت ژن ها برای کاهش زمان رسیدگی مشاهده گردید. جالب این که تنها QTL هایی که عمل فوق غالبیت ژن ها را نشان دادند باعث افزایش زمان رسیدگی شدند، در حالی که QTL های با اثرات افزایشی یا غالبیت ناقص ژن ها، زمان رسیدگی را کاهش دادند.

اگر چه عواملی نظیر نوع و اندازه جمعیت مورد مطالعه، نوع نشانگرها و تراکم نقشه لینکاژی در شناسایی QTL ها موثرند، اما به اعتقاد بسیاری از محققین، اختلاف زیاد بین والدین از نظر صفات مورد مطالعه موجب خواهد شد که تقریباً تمامی QTL های کوچک اثر و بزرگ اثر کنترل کننده صفات کمی شناسایی شوند. والدین دم سفید و گرده به ترتیب با زمان رسیدگی $127/05 \pm 1/47$ روز و $107/50 \pm 1/26$ روز اختلاف بسیار معنی داری در سطح احتمال $\alpha=1\%$ نشان دادند ($t=45/16$, $df=49$). تجزیه QTL زمان رسیدگی در برنج نشان داد که این صفت به وسیله ی دو QTL بزرگ اثر و با اثرات فنوتیپی زیاد (که بر روی کروموزوم های ۶ و ۸ قرار دارند) و چندین QTL کوچک اثر (هر یک با اثرات فنوتیپی کم) کنترل می شوند. نتایج مشابهی به وسیله محققین دیگر گزارش شده است. زیانو و همکاران (Xiao et al., 1996) یک QTL بزرگ اثر بر روی کروموزوم ۸ شناسایی کردند که به تنهایی ۷۳/۷٪ از تنوع فنوتیپی زمان رسیدگی را کنترل می کرد. علاوه بر آن یک QTL کوچک اثر بر روی کروموزوم ۱۱ مکان یابی نمودند که کمتر از ۱۰٪ تنوع فنوتیپی را دتوجیه می کرد. در مقابل، سپتینینگ سی و همکاران (Septiningsih et al., 2003) چهار QTL برای زمان رسیدگی شناسایی نمودند که همگی کوچک اثر بودند و بر روی کروموزوم های ۴ (دو QTL)، ۷ و ۸ قرار داشتند. مقایسه QTL های شناسایی شده در این مطالعه با مطالعات محققین قبلی نشان داد که QTL

بزرگ اثر مکان یابی شده بر روی کروموزوم ۸ در این مطالعه ($md8$)، جایگاه تقریباً مشابهی با مطالعات محققین قبلی داشت (Xiao et al., 1996; Septiningsih et al., 2003). چهار QTL دیگر، از جمله QTL بزرگ اثر $md6$ ، تا کنون برای زمان رسیدگی گزارش نشده بود. اما زمان رسیدگی و زمان گلدهی دو صفت کاملاً همبسته می باشند، به طوری که همبستگی بسیار معنی داری در این مطالعه نشان دادند ($r=0.975$, $df=190$). به استثنای $md5$ ، سه QTL دیگر یعنی $md2$ ، $md3$ و $md6$ تقریباً جایگاه مشابهی با QTL های شناسایی شده برای زمان گلدهی به وسیله محققین قبلی داشتند (Lin et al., 1998; Yamamoto et al., 2001). در مقابل، $md5$ یک QTL کوچک اثر کنترل کننده زمان رسیدگی بود که تنها در این مطالعه مکان یابی شد و ممکن است یک مکان اختصاصی برای ارقام برنج مورد مطالعه باشد.

تقدیر و تشکر

تمامی عملیات زراعی و آزمایشگاهی این تحقیق در موسسه تحقیقات برنج کشور (RRII) و با حمایت مالی این موسسه و موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII) انجام شده است که بدین وسیله مراتب تشکر و سپاس فراوان خود را تقدیم کلیه همکاران این دو موسسه می نمایم.

References

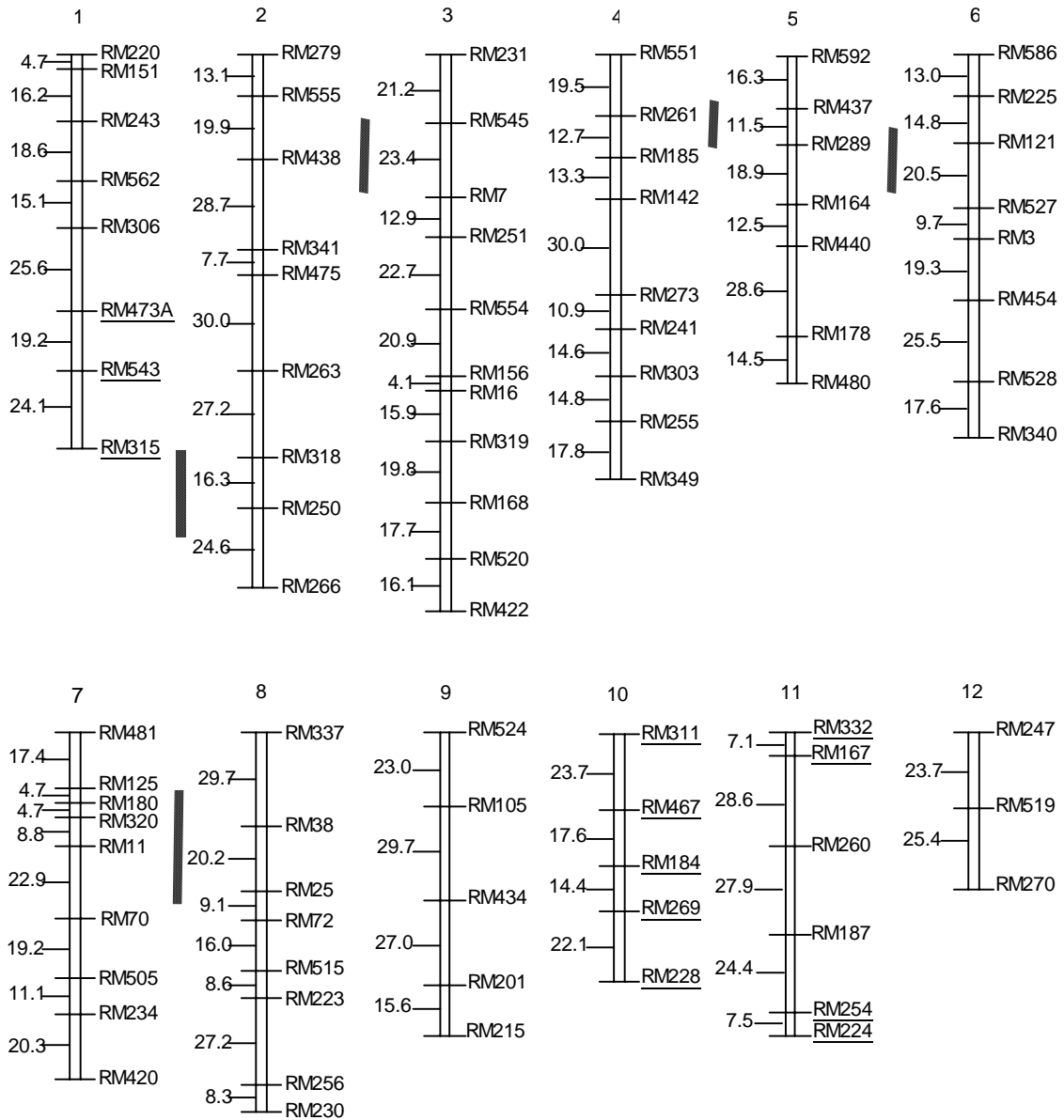
- Basten, C.J. B.S. Weir and Z.B. Zeng. 2001. QTL Cartographer: a reference manual and tutorial for QTL mapping. North Carolina State University. USA. pp. 163.
- Champoux, M.C., G. Wang, S. Sarkarung, D.J. Mackill, J.C. O'Toole, N. Huang and S.R. McCouch. 1994. Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. Theor. Appl. Genet. 90: 969-981.
- Chen, X., S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho and S.R. McCouch. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa L.*). Theor. Appl. Genet. 95: 553-567.
- Dellaporta, S.C., F. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprepation: version II. Plant Mol. Biol. Reporter 1(4): 19-21.
- He, P., S.G. Li, Q. Qian, Y.Q. Ma, J.Z. Li, W.M. Wang, Y. Chen and L.H. Zhu. 1999. Genetic analysis of rice grain quality. Theor. Appl. Genet. 98: 502-508.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Ann. Eugen. 12: 172-175.
- Lander, E.S. and D. Botstein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185-199.
- Lin, S.Y., T. Sasaki, and M. Yano. 1998. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa L.*, using backcross inbred lines. Theor. Appl. Genet. 96: 997-1003.
- Lincoln, S., M. Daly and E.S. Lander. 1993a. Constructing genetic linkage maps with Mapmaker/EXP version 3.0: a tutorial and reference manual. 3rd ed. A Whitehead Institute for Biometrical Research Technical Report.
- Lincoln, S., M. Daly and E.S. Lander. 1993b. Mapping genes controlling quantitative traits using Mapmaker/QTL version 1.1: a tutorial and reference manual. 2nd ed. A Whitehead Institute for Biometrical Report.
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K. Lobos, K. Clare and M. Walton. 2002. Development of 2243 new SSR markers for rice by the international rice microsatellite initiative. Proceeding of the First International Rice Congress. China.
- Rabiei, B., M. Valizadeh, B. Ghareyazie, M. Moghaddam, and A.J. Ali. 2004. Identification of QTLs for rice grain size and shape of Iranian cultivars using SSR markers. Euphytica 137: 325-332.
- Sax, K. 1923. The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. Genetics 8: 552-560.
- Septiningsih, E.M., J. Prasetyono, E. Lubis, T.H. Tai, T. Tjubyaryat, S. Moeljopaviro and S.R. McCouch. 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*. Theor Appl Genet 107:1419-1432.
- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y.G. Cho, T. Ishii and S.R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa L.*). Theor. Appl. Genet. 100: 697-712.
- Wang, G.L., D.J. Mackill, J.M. Bonman, S.R. McCouch, M.C. Champoux and R.J. Nelson. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136: 1421-1434.
- Xiao, J., J. Li, L. Yuan and S.D. Tanksley. 1996. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. Theor. Appl. Genet. 92: 230-244.

- Yamamoto, T., F. Taguchi-Shiobara, Y. Ukai, T. Sasaki, and M. Yano. 2001. Mapping quantitative trait loci for days to heading, and culm, panicle and internode lengths in a BC₁F₃ population using an elite rice variety, Koshihikari, as the recurrent parent. *Breeding Sci.* 51: 63-71.
- Zeng, Z.B. 1993. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10972-10976.
- Zeng, Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.

جدول ۱- QTL های مکان یابی شده برای زمان رسیدگی در ارقام برنج مورد مطالعه

درجه	اثر	اثر	درصد	LOD	موقعیت	نشانه‌گرهای مجاور	QTL	صفت
غالبیت ^۱	غالبیت	افزایشی	واریانس ^۲		(CM)			
(d/ a)	(d)	(a)						
-۰/۲۹	-۰/۸۷	-۳/۰۱	۷/۳	۳/۱۶	۱۰	RM318- RM250	<i>md2</i>	زمان رسیدگی
۱/۵۰	۲/۱۱	-۱/۴۱	۱۳/۱	۳/۷۴	۸	RM545- RM7	<i>md3</i>	
-۰/۵۰	-۱/۱۷	۲/۳۴	۸/۴	۳/۲۲	۲	RM437- RM289	<i>md5</i>	
-۰/۰۴	-۰/۱۴	۳/۱۴	۲۷/۹	۵/۸۲	۹	RM121- RM527	<i>md6</i>	
۱/۱۳	۵/۱۲	-۴/۵۴	۳۲/۶	۶/۵۷	۱۰	RM38- RM25	<i>md8</i>	

- ۱- درجه غالبیت به صورت نسبت اثر غالبیت به قدر مطلق اثر افزایشی محاسبه شده است (d/|a|).
- ۲- سهمی از واریانس فنوتیپی صفت مربوطه که به وسیله هر QTL توصیف شده است.
- ۳- فاصله QTL از نشانه‌گر سمت چپ و بر حسب سانتی مورگان محاسبه شده است.
- ۴- QTL ها بر اساس روش مک کوچ و همکاران (۱۹۹۷) نامگذاری شده‌اند. در این روش ابتدا علامت اختصاری صفت کمی نوشته شده و به دنبال آن شماره کروموزوم مربوطه نوشته می‌شود. gl، gb و gs به ترتیب طول دانه (grain length)، عرض دانه (grain breadth) و شکل دانه (grain shape) را نشان می‌دهند.



شکل ۱- نقشه لینکازی نشانگرهای SSR در جمعیت F_2 مورد مطالعه. خطوط عمودی مشبک در سمت چپ کروموزوم ها، جایگاه QTL های کنترل کننده زمان رسیدگی را نشان می دهند.

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله