دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

رساله

برای دریافت درجه دکتری در رشته اصلاح نباتات

عنوان

مکان‌یابی QTLهای صفات مرتبط با کیفیت دانه در برنج

استادان راهنما

دکتر محمود تورچی و دکتر بابک ربیعی

استادان مشاور

دکتر سعید اهری‌زاد و دکتر علی مؤمنی

پژوهشگر

عاطفه صبوری

اردیبهشت ۸۹

تقدیم به

"پدر و مادرم که ایثار را به من آموختند".

تشکر و قدردانی

"همتم بدرقه راه کن ای طائر قدس که درازست ره مقصد و من نوسفرم"

خدای را سپاس می‌گویم که توفیق قدم نهادن در این راه پر فراز و نشیب را به من عطا فرمود و یاریم کرد تا تا آن را پشت سر گذارم و اکنون بر خود لازم می‌دانم از عزیزانی که مرا یاری نمودند قدردانی نمایم.

از پدر و مادر عزیزم که از ابتدای تحصیلم تا اجرای این کار همواره از کوچکترین کمکی در پیشرفت و تعالی‌ام دریغ ننمودند تشکر کنم. از خواهر عزیزم که در تمامی مراحل زندگی‌ام، همواره پشتیبانم بوده سپاسگذارم و از درگاه احدیت برایشان آرزوی توفیق و موفقیت‌های هر چه بیشتر را در زندگی‌شان مسئلت دارم.

از استاد راهنمای ارجمندم، آقای دکتر محمود تورچی که در نهایت صبر و شکیبایی، مرا در اجرای این تحقیق یاری نمودند و همواره مرا مورد تشویق قرار دادند تشکر می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر بابک ربیعی استاد راهنمای ارجمندم، که از راهنمایی‌های ایشان در طی این تحقیق استفاده نمودم تشکر می‌کنم و از حمایت‌های بی‌شائبه‌شان در تمامی زمینه‌ها در طی این چند سال سپاسگذارم.

از آقای دکتر سعید اهری‌زاد، استاد مشاور بزرگوارم که از راهنمایی‌های علمی و اخلاقی ارزنده‌شان در طول هر سه دوره تحصیل و اجرای پایاننامه بهره بردم تشکر می‌نمایم همچنین از آقای دکتر علی مؤمنی قدردانی می‌نمایم.

از آقای دکتر سید امیر موسوی که زحمت بازخوانی و داوری این پایاننامه را بر عهده داشتند تشکر می‌کنم و همچنین از آقایان دکتر سید ابوالقاسم محمدی و دکتر محمد مقدم که علاوه بر زحمت داوری پایاننامه در تمام طول تحصیل دانشگاهیم از وجودشان به عنوان معلمین علمی و اخلاقی بهره بردم متشکرم.

از آقای دکتر حسین صبوری برادر مهربانم که در تمام طول تحصیلم مانند معلمی دلسوز پشتیبانم بود و در اجرای این پایاننامه تا آخرین توان یاریم داد سپاسگذارم.

از همکار خوبم آقای مهندس احمدرضا دادرس که بی‌شک بدون ایشان اجرای این تحقیق برایم میسر نبود و از راهنمایی‌ها و همکاری صمیمانه‌اش در طول این تحقیق بهره بردم نهایت تشکر و قدردانی را دارم. از اساتید گروه زراعت و اصلاح نباتات که از محضرشان کسب علم نمودم و آن را از بزرگترین افتخارات زندگی علمی خود می‌دانم سپاسگذارم.

از آقایان دکتر راکش کومار سینگ و مایکل تامسون اساتید راهنمایم در مرکز تحقیقات بین المللی برنج فیلیپین و همچنین دوستان و همکاران دپارتمان PBGB این مرکز که از هیچ راهنمایی و کمکی برای اینجانب دریغ ننمودند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

از دوست بسیار عزیزم خانم مهندس مریم فضلعلی‌پور که در کلیه امور همیشه یار و پشتیبانم می‌باشند نهایت سپاسگذاری را دارم و از خداوند برایشان موفقیت‌های روزافزون را خواستارم.

از خانم‌ها دکتر فاطمه اعتدالی، مرجان عابدینی، فاطمه دانیالی و آقایان مهندس فردوس عادلی، مجید نحوی، علیرضا سمسار، همکاران مؤسسه تحقیقات برنج کشور و پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال کشور که در اجرای این تحقیق نهایت همکاری را با اینجانب داشتند تشکر می‌نمایم.

نام خانوادگی دانشجو: صبوری نام: عاطفه

عنوان پایان‌نامه: مکان‌یابیQTLهای صفات مرتبط با کیفیت دانه در برنج

استادان راهنما: دکتر محمود تورچی و دکتر بابک ربیعی

استادان مشاور: دکتر سعید اهری‌زاد و دکتر علی مؤمنی

مقطع تحصیلی: دکتری رشته: اصلاح نباتات گرایش: ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک دانشگاه: تبریز

دانشکده: کشاورزی تاریخ فارغ‌التحصیلی: ۸۹/۲/٤ تعداد صفحه: ۱۲٤

کلید واژه‌ها: برنج، صفات زراعی، کیفیت دانه، نشانگرهای ریزماهواره، نقشه پیوستگی، QTL.

چکیده:

برنج (*Oryza sativa* L.) از مهمترین گیاهان زراعی دنیا بویژه در کشورهای آسیایی است و تجزیه ژنتیکی عملکرد و صفات مرتبط با کیفیت آن به عنوان یکی از اهداف مهم اصلاحی می‌باشد. نظر به اینکه کیفیت دانه و صفات زراعی به صورت کمی توارث می‌یابند، بنابراین مکان-یابی ژن‌های کنترل کننده آنها با استفاده از نشانگرهای مولکولی در ایجاد ارقام برنج اصلاح شده بسیار مفید خواهد بود. به منظور مکان‌یابی QTLهای کنترل کننده ۱٦ صفت زراعی و مرتبط با کیفیت دانه، از جمعیت متشکل از ۲۳٦ خانواده $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی ارقام غریب و سپیدرود استفاده شد. نقشه پیوستگی حاصل از ۱۰۵ نشانگر ریزماهواره، ۱٤٤۰/۷ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را با فاصله متوسط ۱۳/۷۳ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور پوشش داد. با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، ۵۰ QTL مرتبط با صفات مطالعه شده شناسایی شد. QTLهای شناسایی شده برای صفات مرتبط با کیفیت پخت و خوراک، شامل سه QTL برای دمای ژلاتینی شدن، هشت QTL برای مقدار آمیلوز و یک QTL برای قوام ژل بود. برای دمای ژلاتینی شدن، QTLای که بیشترین درصد تغییرات فنوتیپی (۱۸/٤٪) را توجیه کرد (*qGT-6a*) در حد فاصل نشانگرهای RM217-RM276 روی کروموزوم ٦ در مکان ژنی مشابه با ژن آلکالی (*alk*) مکان‌یابی شد. برای مقدار آمیلوز، چهار QTL روی کروموزوم ٦ شناسایی شد که *qAC-6a*، واقع در حد فاصل نشانگرهای RM586-RM190 باید مطابق با ژن مومی (*wx*) در بازوی کوتاه کروموزوم ٦ باشد که ۱۹/۳٪ از تغییرات فنوتیپی کل را تبیین کرد. برای صفات ظاهری دانه به ترتیب سه، یک و دو QTL برای عرض، طول و شکل دانه شناسایی شد. برای نسبت عریض شدن، طویل شدن دانه پس از پخت و بازده تبدیل در این زمینه ژنتیکی، QTLای شناسایی نشد. در ارتباط با صفات زراعی برای تعداد خوشه‌های اولیه در خوشه اصلی، سه QTL روی کروموزوم‌های ۳، ۵ و ٦، برای تعداد دانه‌های پر، چهار QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ٦ و ۹ شناسایی شدند که *qNFG-1* واقع در کروموزوم ۱ به تنهایی ۳٤/٤٤ درصد تنوع فنوتیپی را تبیین کرد. برای صفت وزن هزار دانه، یک QTL روی کروموزوم ۱ در حد فاصل نشانگرهای RM8132 -RM283 با اثر افزایشی ۱/۷۲ گرم و تبیین فنوتیپی ۱۳/۸٤ درصد شناسایی شد که در این QTL الل مطلوب از والد سپیدرود بود. برای طول خوشه، چهار QTL روی کروموزوم‌های ۱، ٤، ۸ و ۱۲ شناسایی شد. برای طول خروج خوشه از غلاف، شش QTL شناسایی شد که دو QTL بزرگ اثر *qPE-6a* و *qPE-11* واقع در کروزوم‌های ٦ و ۱۱ به ترتیب ۲۷/۲٤ و ۲٦/٦۱ درصد از تغییرات فنوتیپی را تبیین کردند. برای صفت تعداد خوشه ۱۲ QTL شناسایی شد که دو QTL واقع در کروموزوم ۱۰، (*qNP-10b* و *qNP-10c*) به ترتیب با تبیین ۲۰/۳۳ و ۲۰/۳۵ درصد از تغییرات کل اثر نسبتاً بزرگی روی این صفت نشان دادند. برای صفت ارتفاع بوته دو QTL روی کروموزوم‌های ۷ و ۸ شناسایی شدند که مجموعاً ۱۰ درصد از تغییرات این صفت را تبیین کردند. برای چهار صفت دمای ژلاتینی شدن، وزن هزار دانه، طول خروج خوشه از غلاف و ارتفاع بوته اثرات متقابل اپیستازی بین QTLها وجود داشت. کل تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط اثرات متقابل بین QTLها در صفات مذکور از ٤۸٪ تا ٦۲/۲٪ متغیر بود. QTLهای شناسایی شده در نواحی ژنومی خاص با توجیه بخش قابل توجهی از تغییرات فنوتیپی می‌توانند در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر مورد توجه قرار گیرند.

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

مقدمه..... ۲

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- برنج و اهمیت آن..... ۵

۱-۲- اصلاح نباتات مولکولی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی..... ۵

۱-۳- تجزیه پیوستگی و مکان‌یابی QTL..... ٦

۱-٤- جمعیت‌های مورد استفاده در مکان‌یابی..... ۷

۱-۵- تهیه نقشه پیوستگی..... ۹

۱-٦- روش‌های آماری در مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات..... ۱۰

۱-۷- اصلاح کیفیت دانه برنج..... ۱۱

۱-۸- تجزیه QTL صفات مرتبط با کیفیت دانه..... ۱۲

۱-۹- اصلاح صفات زراعی ۲۹

۱-۱۰- تجزیه QTL صفات زراعی ۳۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه جمعیت F_2 و F_3..... ٤٤

۲-۱-۱- خصوصیات والدین مورد استفاده در تهیه جمعیت مکان‌یابی ٤٤

۲-۱-۲- مشخصات محل اجرای آزمایش و عملیات زراعی..... ٤٤

۲-۱-۳- تهیه جمعیت مکان‌یابی و خانواده‌های F_3..... ٤۵

۲-۲- صفات مورد ارزیابی..... ٤۷

۲-۲-۱- صفات زراعی..... ٤۷

۲-۲-۲- صفات مربوط به کیفیت دانه..... ٤٨
۲-۳- ارزیابی ژنوتیپی..... ٥٢
۲-۳-۱- استخراج DNA..... ٥٢
۲-۳-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA..... ٥٥
۲-۳-۳- آغازگرهای ریزماهواره یا SSR ٥٦
۲-۳-٤- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)..... ٥٧
۲-۳-٥- تشخیص آغازگرهای چندشکل و الکتروفورز فرآورده‌های PCR..... ٥٨
۲-٤- تجزیه و تحلیل داده‌ها ٦٢
۲-٤-۱- تهیه نقشه پیوستگی..... ٦٢
۲-٤-۲- تجزیه‌های آماری QTLهای کنترل کننده صفات مورد مطالعه..... ٦٣

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- ارزیابی‌های فنوتیپی صفات مرتبط با کیفیت و صفات زراعی..... ٦٥
۳-۲- تهیه نقشه پیوستگی..... ۷۰
۳-۳- شناسایی QTLهای کنترل کننده صفات مرتبط با کیفیت دانه و صفات زراعی مورد مطالعه..... ۷۳
۳-۳-۱- تجزیه تک نشانگری برای صفات مرتبط با کیفیت دانه..... ۷۳
۳-۳-۲- مکان‌یابی فاصله‌ای برای صفات مرتبط با کیفیت دانه..... ۷٥
۳-۳-۳- مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب برای صفات مرتبط با کیفیت دانه..... ۷۷
۳-۳-٤- بررسی اثر متقابل بین QTLهای کنترل کننده صفات مرتبط با کیفیت دانه برنج..... ۹۲
۳-۳-٥- مقایسه نتایج حاصل از سه روش آماری تجزیه مکان‌یابی QTLها..... ۹٤
۳-۳-٦- مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب برای صفات زراعی ۹٥
۳-۳-۷- بررسی اثر متقابل بین QTLهای کنترل کننده صفات زراعی..... ۱۰۸
نتیجه‌گیری و پیشنهادات..... ۱۱۰
منابع مورد استفاده..... ۱۱۳

فهرست شکل‌ها

عنوان | صفحه

شکل ۲-۱- خزانه خانواده‌های F_3 پس از بذرپاشی به صورت خوشه‌ای و خشک..... ٤٦

شکل ۲-۲- تعدادی از ردیف‌های مربوط به خانواده‌های F_3 در زمین اصلی ٤٦

شکل ۲-۳- تأثیرپذیری متفاوت دانه‌های برنج از هیدروکسیدپتاسیم ۱/۷ درصد ٥١

شکل ۲-٤- نمونه‌ای از DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ ٥٧

شکل ۳-۱- توزیع فنوتیپی صفات زراعی و کمی در خانواده‌های F_3..... ٦٥

شکل ۳-۲- توزیع فنوتیپی صفات مرتبط با کیفیت مورد مطالعه در خانواده‌های F_3 برنج..... ٦٧

شکل ۳-۳- الگوی نواربندی الکتروفورز محصول PCR نشانگر RM276 بر روی ژل اکریل‌آمید ٦٪ ٧١

شکل ۳-٤- الگوی نواربندی الکتروفورز محصول PCR نشانگر RM7434 بر روی ژل اکریل‌آمید ٦٪..... ٧١

شکل ۳-٥- نقشه پیوستگی حاصل از ۱۰٥ نشانگر ریزماهواره در ۲۳٦ فرد جمعیت F۲ در برنج..... ٧٢

شکل ۳-٦- مکان‌های کنترل کننده صفات مرتبط با کیفیت مورد مطالعه در جمعیت مکان‌یابی F۲:۳ برنج حاصل از تلاقی غریب در سپیدرود به همراه موقعیت دو مکان ژنی *wx* و *alk* روی کروموزوم ٦..... ٧٩

شکل ۳-۷- نمودارLOD مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب برای صفت تعداد دانه‌های پر و QTL بزرگ اثر *qNFG-1* در برنج..... ٩٧

شکل ۳-۸- مکان‌های کنترل کننده صفات زراعی مورد مطالعه در جمعیت مکان‌یابی F۲:۳ برنج حاصل از تلاقی غریب در سپیدرود..... ۱۰٧

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- مقادیر بهینه شده مواد در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)..... ۵۸

جدول ۲-۲- برنامه زمانی دمای بهینه شده چرخه‌های حرارتی PCR..... ۵۸

جدول ۳-۱- برخی از خصوصیات کیفی و زراعی بدست آمده در این مطالعه برای ارقام غریب و سپیدرود..... ٦۹

جدول ۳-۲- نتایج حاصل از تجزیه تک نشانگری به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مرتبط با کیفیت.. ۷٤

جدول ۳-۳- نتایج حاصل از تجزیه مکان‌یابی فاصله‌ای و شناسایی نشانگرهای پیوسته با QTLهای کنترل کننده صفات مرتبط با کیفیت برنج..... ۷٦

جدول ۳-٤- نتایج حاصل از تجزیه مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب و شناسایی نشانگرهای پیوسته با QTLهای کنترل کننده صفات مرتبط با کیفیت برنج..... ۷۸

جدول ۳-۵- ضرایب همبستگی بین صفات مربوط به کیفیت دانه در برنج..... ۸۷

جدول ۳-٦- اثرات متقابل معنی‌دار بین QTLها در صفات مرتبط با کیفیت دانه در برنج (سطح احتمال ۰/۰۱ درصد)..... ۹٤

جدول ۳-۷- نتایج حاصل از تجزیه مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب و شناسایی نشانگرهای پیوسته با QTLهای کنترل کننده صفات زراعی در برنج..... ۹٦

جدول ۳-۸- ضرایب همبستگی بین صفات زراعی مورد مطالعه در برنج..... ۱۰۸

جدول ۳-۹- اثرات متقابل معنی‌دار بین QTLها در صفات زراعی در برنج (سطح احتمال ۰/۰۱ درصد)..... ۱۱۰

فهرست اختصارات

AC: Amylose Content

GC: Gel consistency

GL: Grain length

GS: Grain shape

GT: Gelatinization temperature

GW: Grain width

HRR: Head rice recovery

LEC: Length elongation of cooked rice

MAS: Marker-assisted selection

NFG: Number of filled grains

NP: Number of panicles

NPB: Number of primary branches

PE: Panicle exsertion

PH: Plant height

PL: Panicle length

QTL: Quantitative trait loci

SSR: Simple sequence repeats

WEC: Width expansion of cooked rice

WTFG: Weight of thousand filled grains

مقدمه

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) غذای اصلی بیش از ۵۰ درصد مردم جهان می باشد و تقریباً زندگی سه چهارم فقیرترین مردم دنیا وابسته به آن است. برنج از گیاهان زراعی مهم قاره آسیاست، به‌طوری‌که بیش از ۹۰ درصد آن در آسیا تولید و مصرف می‌شود (مکلین و هتل، ۲۰۰۷). از طرفی با افزایش جمعیت، تقاضا برای تولید برنج رو به فزون بوده و امروزه تلاش بسیاری از اصلاح‌گران افزایش عملکرد این گیاه زراعی مهم است. هرچند که روش‌های کلاسیک اصلاحی در گیاهان، کمک شایانی به تولید ارقام جدید گیاهی با صفات مطلوب کرده است، اما مدت زمان طولانی لازم برای انجام چنین روش‌هایی و نیز گاهی گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب بدون اطلاع از ساختار ژنتیکی آنها، اصلاح‌گران نباتات را در تصمیم‌گیری دچار مشکل کرده است (محمدی، ۱۳۸۷). برای نیل به این هدف، بهتر است در اصلاح صفات پیچیده علاوه بر روش‌های سنتی، از روش‌های جدید مانند اصلاح نباتات مولکولی و مهندسی ژنتیک نیز استفاده کرد تا با تلفیق این روش‌ها بتوان علاوه بر صرفه جویی در زمان به نتایج دقیق‌تر و مطمئن‌تری دست یافت. همچنین باید در کنار صفاتی که مستقیماً روی عملکرد نقش دارند، از صفات مهم دیگر مانند صفات زراعی و موفولوژیک که به طور غیرمستقیم در بالا بردن محصول مؤثرند، و از طرف دیگر امتیازدهی آنها قابل مشاهده و آسان می‌باشد، استفاده نمود.

در اصلاح ارقام برنج، کیفیت دانه همیشه بعد از عملکرد مورد توجه محققان بوده است. کیفیت پخت و خوراک[1] برنج به وسیله صفاتی مثل مقدار آمیلوز[2]، دمای ژلاتینی‌شدن[3] و قوام ژل[4] مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در ایران کیفیت برنج عموماً اهمیت بیشتری نسبت به عملکرد داشته و ذائقه ایرانی برنج‌های معطر با طول دانه بلند و عرض دانه کم را ترجیح می‌دهد.

به منظور دستیابی به اطلاعات ژنتیکی مفید در ارتباط با صفات پیچیده مانند عملکرد و کیفیت، اصلاح نباتات مولکولی از نشانگرهای مولکولی به عنوان امکانات بالقوه جدیدی برای تکمیل روش‌های اصلاح نباتات کلاسیک استفاده می‌نماید تا باعث افزایش کارایی در مکان‌یابی و نشانمند کردن ژن‌ها و نیز انتقال ژن‌ها شده و

1. Cooking and eating quality
2. Amylose content
3. Gelatinization temperature
4. Gel consistency

امکان بررسی ارتباط ژنتیکی بین گونه‌ها را فراهم آورند. در مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی، شناسایی QTLها یا جایگاه‌های ژنومی کنترل کننده صفات کمی از جمله 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 کنترل کننده این صفات داشته و روش‌های صحیحی را در اصلاح این صفات به کار گیرد (دونگ و همکاران، ۲۰۰٤). اخیراً نشانگرهای مختلفی برای تشخیص مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی در برنج مورد استفاده قرار گرفته‌اند که کارایی اصلاح این صفات را با گزینش غیرمستقیم با استفاده از نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مطلوب را افزایش داده‌اند (مونکادا و همکاران، ۲۰۰۱).

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- برنج و اهمیت آن

برنج، یکی از مهمترین محصولات گیاهی در چرخه غذایی جهان است، به‌طوری‌که غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان و بویژه فقیرترین قشر مردم دنیا را تأمین می‌کند. برنج از گیاهان زراعی مهم در قاره آسیاست و بیش از ۹۰ درصد آن در آسیا تولید و مصرف می‌شود (مکلین و هتل، ۲۰۰۷). برنج ۲۳ درصد از ذخیره کالری و ١٦ درصد از پروتئین مورد نیاز مردم جهان را تأمین می‌کند. اگرچه برنج نسبت به سایر غلات پروتئین نسبتاً کمتری دارد، اما از کیفیت بالایی برخوردار است. پروتئین برنج عمدتاً از گلوتنین تشکیل شده و دارای ساختار آمینواسیدی متعادل‌تری نسبت به سایر غلات است که ذخیره پروتئینی غنی از پرولامین دارند (آلوکو، ۲۰۰۳). تولید برنج همیشه به عنوان یک غذای سالم مورد توجه قرار گرفته است. با افزایش جمعیت، تقاضا برای تولید برنج رو به افزایش است. اگرچه تولید آن در نتیجه معرفی ارقام با عملکرد بالا و به‌کارگیری روش‌های نوین زراعت و اصلاح نباتات، برای مثال در آسیا از ۲/۰۸۰ تن در هکتار در سال ١٩٦٦ به بیش از دو برابر یعنی حدود ٤/٣٨٦ تن در هکتار در سال ۲۰۰۸ رسیده است، اما این پیشرفت با افزایش جمعیت دنیا و به تبع آن افزایش تقاضا همراه بوده است. برای مقابله با این مشکل برآورد می‌شود که تولید برنج بایستی در طول ۲۵ سال آینده حداقل ٤٠ درصد افزایش یابد. بدیهی است که این امر نیازمند تولید ارقام با عملکرد بالاتر، مقاوم به تنش-های زیستی و غیرزیستی و با کیفیت بالاتر است (برار و کوش، ۲۰۰۲؛ آلوکو، ۲۰۰۳؛ فائو، ۲۰۱۰). باید خاطر نشان نمود مصرف کنندگان ایرانی همیشه از ارقامی استقبال می‌کنند که علاوه بر پرمحصول بودن دارای خصوصیات مطلوب از لحاظ کیفیت فیزیکی و شیمیایی دانه باشد. ارقام برنج با کیفیت بالا اهمیت تجاری بالاتری دارند. بدیهی است اصلاح نباتات می‌تواند نقش بسیار بزرگی را در دستیابی به این اهداف ایفا نماید.

۱-۲- اصلاح نباتات مولکولی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی

از آنجایی‌که فنوتیپ صفات کمی به دلیل کنترل آنها به وسیله چند ژن و اثر محیط، اطلاعات کافی از ژنوتیپ آنها به دست نمی‌دهد از این‌رو اصلاح این صفات مشکل است و بهبود آنها صرفاً با استفاده از روش-

های اصلاح نباتات کلاسیک زمان بر بوده و همچنین پتانسیل این روش‌ها جوابگوی نیاز کنونی نیست (فالکونر و مکی، ١٩٩٦). امروزه استفاده از روش‌های مولکولی افق تازه‌ای را برای رفع این مشکل باز کرده است. پیشرفت سریع در ژنتیک مولکولی به ویژه در زمینه نشانگرهای مولکولی به محققان در فهم اساس ژنتیکی صفات کمی مانند صفات مرتبط با عملکرد و اجزای آن، صفات زراعی و صفات مرتبط با کیفیت دانه و اصلاح ارقام برنج با عملکرد و کیفیت دانه برتر کمک شایانی کرده است (دونگ و همکاران، ٢٠٠٤). پیشرفت‌های چشم‌گیر در زمینه فناوری نشانگرهای مولکولی در طول دو دهه اخیر، ابزار قدرتمندی را برای تکمیل روش‌های اصلاح نباتات کلاسیک فراهم کرده‌اند. پیدایش روش‌های مولکولی و تلفیق آنها با روش‌های بیومتری، امکان تجزیه و تحلیل همزمان تعداد زیادی ژن در مقیاس ژنوم را تحت شاخه علمی ژنومیک آماری[1] فراهم نموده است. همچنین افزایش کارایی در مکان‌یابی و نشانمند کردن ژن‌ها، انتقال ژن‌ها و تعیین روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌ها را به‌دنبال داشته است (کرسی و پونی، ١٩٩٦؛ لینچ و والش، ١٩٩٨؛ مونکادا و همکاران، ٢٠٠١). شناسایی QTLها یا جایگاه‌های ژنومی کنترل کننده صفات کمی و تعیین پارامترهای ژنتیکی آنها در شناسایی عمل ژن، نحوه تنظیم و بیان ژن و افزایش اطلاعات در زمینه ژنوم کمک می‌کند و به به‌نژادگر این امکان را می‌دهد تا ارزیابی دقیقی از ژن‌های کنترل کننده این صفات داشته و روش‌های صحیحی را در اصلاح این صفات به کار گیرند (دونگ و همکاران، ٢٠٠٤). فالکونر و مکی (١٩٩٦) عنوان نمودند که انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن-های کنترل کننده صفات کمی می‌تواند کارایی اصلاحی این صفات را بهبود بخشد. چراکه این نشانگرها از محیط تأثیر نمی‌گیرند و می‌توانند برای تشخیص مکان‌های ژنی صفات کمی مورد استفاده قرار گیرند.

١-٣- تجزیه پیوستگی و مکان‌یابی QTL

در روش‌های مولکولی از "عدم تعادل پیوستگی[2]" بین مکان‌های ژنی برای شناسایی و مکان‌یابی QTLها استفاده می‌شود. در این روش، از جمعیت‌های مصنوعی حاصل از تلاقی دو والد هموزیگوت، مانند F_2،

1. Statistical genomics
2. Linkage disequilibrium

تلاقی‌های برگشتی، هاپلوئیدهای مضاعف شده، لاین‌های اینبرد نوترکیب[1] و لاین‌های تقریباً هم‌ژن[2] که در آنها عدم تعادل ناشی از پیوستگی ژنی در حداکثر مقدار خود است، برای تهیه نقشه پیوستگی استفاده می‌شود. البته در برخی گونه‌های گیاهی و جانوری که امکان تلاقی‌های کنترل شده وجود ندارد از جمعیت‌های طبیعی و یا برادر-خواهری ناتنی برای مکان‌یابی QTLها استفاده می‌شود (لیو، ۱۹۹۸). در تهیه جمعیت‌های مصنوعی، گزینش والدین مناسب اولین و مهمترین اصل است. والدین بایستی تا حد امکان از نظر صفات مورد بررسی حداکثر اختلاف را از همدیگر داشته باشند و بعبارت دیگر از نظر فنوتیپی در دو انتهای توزیع نرمال قرار گیرند. (محمدی، ۱۳۸۱؛ ربیعی و صبوری، ۱۳۸۷؛ لیو، ۱۹۹۸). در واقع هدف این است که یکی از والدین حداکثر آلل-های مطلوب و والد دیگر حداکثر الل‌های نامطلوب (کاهش دهنده صفت) را داشته باشد تا بدین صورت حداکثر هتروزیگوسی در F_1 و به تبع آن حداکثر تنوع در جمعیت F_2 حاصل گردد که باعث می‌شود در مکان‌های بیشتری تفرق به وجود آید و عدم تعادل پیوستگی افزایش یابد. بدیهی است تنها QTLهایی که برای بلوک ژنی آنها در جمعیت مورد نظر تفرق وجود داشته باشد مورد شناسایی قرار می‌گیرند. هر چه والدین از خلوص کمتر برخوردار بوده و ارزش فنوتیپی آنها به هم نزدیکتر باشد، تعداد QTLهای قابل مکان‌یابی کمتر خواهد شد که برای جبران این نقص می‌بایست تعداد افراد بیشتری از جمعیت بررسی گردند تا تنوع ژنتیکی بالاتر رفته و عدم تعادل پیوستگی افزایش و در نتیجه احتمال وجود انواع ژنوتیپ‌ها افزایش یابد. در این صورت با افزایش تعداد افراد مورد ارزیابی از لحاظ ژنوتیپی و فنوتیپی شانس حضور کلیه ژنوتیپ‌های ممکن افزایش یافته و یک جمعیت متنوع‌تر برای مکان‌یابی در دسترس خواهدبود (لیو، ۱۹۹۸).

۱-٤- جمعیت‌های مورد استفاده در مکان‌یابی

هر کدام از جمعیت‌های مکان‌یابی دارای مزایا و معایبی می‌باشند. بدیهی است که انتخاب جمعیت به هدف مطالعه و امکانات موجود بستگی دارد. به طور کلی می‌توان گفت که در جمعیت F_2 و تلاقی برگشتی اگرچه

1. Recombinant inbred line
2. Near isogenic lines

دسترسی به این جمعیت‌ها به زمان کمتری نیاز دارد اما از آنجائی‌که امکان شکستگی پیوستگی بین مکان‌های مورد بررسی در نسل‌های آینده با افزایش تعداد تقسیمات میوزی وجود دارد، این جمعیت‌ها ناپایدارند. در مقابل، جمعیت‌های لاین‌های اینبرد نوترکیب و لاین‌های تقریباً هم‌ژن چند تقسیم میوزی را طی کرده‌اند و در واقع جمعیت‌های پایدار و خالص محسوب می‌شوند (ربیعی و صبوری،۱۳۸۷؛ لیو، ۱۹۹۸). جمعیت F_2، دارای تمامی ترکیبات آللی والدین می‌باشد و بوته‌های این جمعیت برای تمامی کروموزوم‌های همولوگ نوترکیب هستند. از اینرو قابلیت تعیین و برآورد اثر غالبیت در این جمعیت حداکثر بوده و به تعداد افراد و نشانگر کمتری در مقایسه با جمعیت تلاقی برگشتی نیاز است. وجود تمامی ترکیبات گامتی در جمعیت F_2 باعث شده است که بطور گسترده از این جمعیت در تهیه نقشه‌های پیوستگی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی که اطلاعات بسیار کمی در ارتباط با نحوه کنترل ژنی آنها وجود دارد، مورد استفاده قرار گیرد. افراد جمعیت‌های هاپلوئید مضاعف شده و لاین‌های اینبرد نوترکیب از آنجائی‌که تا حد بالایی هموزیگوت هستند، می‌توان آنها را با خودباروری بدون محدودیت تکثیر نمود و از آنها برای بررسی اثر متقابل QTL و محیط استفاده کرد (لیو، ۱۹۹۸). در مورد جمعیت‌های تلاقی برگشتی، برای اینکه بتوان QTLهای با اثر غالبیت را تعیین کرد، بایستی تلاقی برگشتی را با هر دو والد انجام داد و در هر دو جمعیت ارزیابی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی انجام داد. از جمعیت‌های لاین‌های تقریباً هم‌ژن برای مکان‌یابی دقیق[1] ژن‌ها یا QTLها استفاده می‌شود. چون افراد این جمعیت فقط در یک ناحیه کوچک از ژنوم دارای تنوع هستند و زمینه ژنتیکی همه افراد از والد گیرنده است، در این جمعیت‌ها فقط آن ناحیه از ژنوم که موجب تنوع بین افراد می‌شود، مکان‌یابی می‌گردد (محمدی، ۱۳۸۱؛ ربیعی و صبوری،۱۳۸۷؛ هنری، ۱۹۹۷). در مطالعات مکان‌یابی ژنتیکی، تعداد افراد جمعیت به عوامل متعددی از جمله وراثت‌پذیری صفت مورد نظر، تعداد ژن‌های کنترل کننده صفت، نحوه انتخاب والدین و نوع جمعیت مکان‌یابی بستگی دارد. هرچه وراثت‌پذیری صفت کمتر باشد و یا تعداد ژن‌های کنترل کننده آن بیشتر باشد، لازم است تعداد افراد جمعیت بیشتر در نظر گرفته شود. در مقابل هرچه والدین از لحاظ صفت فنوتیپی، از دو انتهای توزیع نرمال انتخاب شده باشند، می‌توان تعداد افراد جمعیت را کمتر نمود. با افزایش تعداد افراد جمعیت

1. Fine mapping

حساسیت آزمایش بیشتر می‌شود و می‌توان QTLهای با اثر کوچکتر را شناسایی نمود (فالکونر و مکی، ۱۹۹٦؛ هنری، ۱۹۹۷؛ لیو، ۱۹۹۸).

۱-۵- تهیه نقشه پیوستگی

پس از تشکیل جمعیت مکان‌یابی، گام بعدی در تهیه نقشه پیوستگی است، در این راستا ابتدا نشانگرهای مولکولی چند شکل بین والدین[1] شناسایی می‌شود. سپس این نشانگرها روی تمامی افراد جمعیت آزمون می‌شوند و بدین ترتیب نقشه پیوستگی برای جمعیت مکان‌یابی مورد بررسی قابل ترسیم است (فالکونر و مکی، ۱۹۹٦؛ هنری، ۱۹۹۷؛ لیو، ۱۹۹۸).

برنج بعد از گوجه‌فرنگی و ذرت، جزء اولین گیاهانی است که نقشه ژنتیکی آن تهیه شد. اولین نقشه ژنتیکی برنج با استفاده از یک جمعیت F_2 برنج و نشانگرهای RFLP، بود که توسط سایتو و همکاران (۱۹۹۱) تهیه شد. نقشه دیگر به وسیله کاس و همکاران (۱۹۹٤) در دانشگاه کرنل آمریکا تهیه گردید که در آن ۷۰۰ نشانگر RFLP در یک جمعیت تلاقی برگشتی برنج مکان‌یابی شد. بعلاوه مک کوش و دوئرگ (۱۹۹۵) با استفاده از تجزیه و تحلیل ۵۳ گیاه F_2، نقشه ژنتیکی شامل ۱۳۵ نشانگر RFLP تهیه کردند که ۱۳۹۸ سانتی‌مورگان را پوشش داد. پس از اینکه مطالعات مک کوش و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که نشانگرهای ریزماهواره[2] تقریباً بطور یکنواخت در سرتاسر ژنوم برنج توزیع شده‌اند و سطوح بالایی از تنوع اللی را در بین ارقام زراعی برنج نشان می‌دهند، اولین نقشه SSR برنج توسط چن و همکاران (۱۹۹۷) تهیه شد که در آن ۱۲۱ نشانگر ریزماهواره بر روی ۱۲ کروموزوم برنج مکان‌یابی شدند. تمنیخ و همکاران (۲۰۰۰) این نقشه را برای ۳۱۲ نشانگر ریزماهواره توسعه دادند. پس از آن نقشه ژنتیکی اشباع شده برنج با استفاده از نشانگرهای SSR تهیه شده است که در آن ۲۲٤۳ نشانگر ریزماهواره با فاصله متوسط کمتر از یک سانتی‌مورگان روی کروموزوم‌های برنج شناسایی شده‌اند (مک کوش و همکاران، ۲۰۰۲). تاکنون کامل‌ترین نقشه ژنتیکی به نقشه ارائه شده توسط International Rice

1. Parental survey
2. Microsatellite markers

Genome Sequencing Project مربوط می‌شود که تعداد ۱۸۸۲۸ نشانگر SSR (دو، سه و چهار نوکلئوتیدی) را شامل می‌شود (IRGSP، ۲۰۰۵).

۱-٦- روش‌های آماری در مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات

شناسایی QTLها، پس از جمع آوری داده‌های فنوتیپی صفت، از طریق ایجاد ارتباط بین داده‌های فنوتیپی و داده‌های ژنوتیپی موجود در نقشه پیوستگی با استفاده از روش‌های آماری امکان‌پذیر می‌شود. تجزیه تک نشانگری[1]، مکان‌یابی فاصله‌ای[2] و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب[3] از جمله روش‌های آماری معمول در تجزیه QTLها می‌باشد (لیو، ۱۹۹۸). در روش تجزیه تک نشانگری از مدل‌های خطی برای آزمون رابطه یک نشانگر و تغییرات فنوتیپی صفت جهت مکان‌یابی QTLها استفاده می‌شود و بر این اصل استوار است که اگر بین ژنوتیپ‌های نشانگر از نظر ارزش‌های فنوتیپی صفت مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود داشته باشد، می‌توان احتمال داد که حداقل یک QTL کنترل کننده صفت در نزدیکی نشانگر مورد نظر وجود دارد. اما عیب عمده این روش تداخل اثر QTL با فاصله آن از نشانگر است. همچنین، قدرت آزمون در این روش پایین است و نمی‌توان تعداد دقیق QTL را تعیین کرد اما روش مکان‌یابی فاصله‌ای بر اساس فراوانی و تفرق همزمان یک جفت نشانگر نزدیک و مجاور هم و یک QTL احاطه شده توسط این دو نشانگر استوار است. از معایب عمده آن اختصاص QTL به فاصله بین دو نشانگر است که در نتیجه نمی‌توان تعداد دقیق QTL و موقعیت آنها را تخمین زد و از طرفی اثر متقابل بین QTLها قابل ارزیابی نیست. اما روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، ترکیبی از مکان‌یابی فاصله‌ای و رگرسیون خطی چند متغیره است. در این روش چند نشانگر اضافی به عنوان عامل همراه وارد مدل رگرسیون می‌شوند و ضرایب رگرسیونی فنوتیپ بر ژنوتیپ نشانگرها تنها به آن دسته از QTLهایی که در ناحیه بین دو نشانگر قرار دارند، بستگی دارد و مستقل از QTLهای دیگر است. به منظور کنترل اثر زمینه ژنتیکی و خنثی نمودن اثر سایر QTLها در گروه پیوستگی مورد مطالعه در این روش، تعدادی از نشانگرها به

1. Single marker analysis
2. Interval mapping
3. Composite interval mapping