

«مقاله پژوهشی»

اعتبارسنجی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی دانه در لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب برنج ایرانی (*Oryza sativa* L.)امیر فرقانی سراوانی^۱، بابک ربیعی^{۲*}، علی اکبر عبادی^۳

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲. استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳. استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گیلان، رشت، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۵)

Validation of molecular markers linked to grain physical and chemical characteristics in recombinant inbred lines of Iranian rice (*Oryza sativa* L.)Amir Forghani Saravani¹, Babak Rabiei^{2*}, Aliakbar Ebadi³

1. M.Sc. Graduated, Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Professor, Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Research Assist. Prof, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

(Received: Apr. 16, 2021 - Accepted: Sep. 16, 2021)

Abstract

Rice grain quality is a complex characteristic that can be divided into milling quality, appearance quality, cooking quality, and nutritional quality. Most studies on rice grain quality show the importance of chromosomes number one and six in the genetic control of various traits in rice. In the present study, the validation of 35 microsatellite markers linked to grain quality characteristics which all located on two chromosomes one and six, was performed in 144 recombinant inbred lines of F₁₀ population resulted from the cross between Sepidrood (an Iranian improved cultivar with inferior quality) and Gharib (an Iranian local cultivar with good quality). The results of regression analysis showed that 25 markers were linked to different quantitative and qualitative traits, and explained from 16 to 39% of the variance of different traits, but the markers RM253, RM246, RM190, RM104, RM314, RM3827 and RM7434 had stronger linkage. Construction of the linkage map of 35 microsatellite markers in the studied population showed that the map length was 236.5 cM and the average distance between adjacent markers was 6.95 cM. QTL analysis by the composite interval mapping method showed that 40 QTLs controlled the measured traits in the studied population and the phenotypic variance controlled by the identified QTLs ranged from 7.57 to 37.41% for milling quality and head rice percentage, respectively. Based on this analysis, 23 markers were closer to the QTLs controlling the studied traits in this research. Of these, some markers were linked to several different traits. In total, the results of regression analysis and QTL analysis showed that the markers RM253, RM246, RM340, RM243, RM4128, RM314, RM3827, RM7434, RM104 and RM190 were the informative markers linked to grain quality characteristics, which can be used in marker-assisted selection programs in the future.

Keywords: Cluster Analysis, Regression Analysis, Markers associated, Linkage Map.

چکیده

کیفیت دانه برنج یک ویژگی پیچیده است که می‌توان آن را به کیفیت تبدیل، کیفیت ظاهری، کیفیت پخت و خوراک و کیفیت تغذیه‌ای تقسیم کرد. بیشتر مطالعات انجام شده در زمینه کیفیت دانه برنج، اهمیت کروموزوم‌های شماره یک و شش برنج را در کنترل ژنتیکی صفات مختلف مرتبط با آن نشان می‌دهند. در مطالعه حاضر، اعتبارسنجی ۳۵ نشانگر ریزماهوره پیوسته با ویژگی‌های کیفیت دانه برنج که همگی روی دو کروموزوم شماره یک و شش قرار داشتند، در ۱۴۴ لاین خویش‌آمیخته نوترکیب نسل F₁₀ حاصل از تلاقی ارقام سپیدرود (یک رقم اصلاح شده ایرانی با کیفیت ضعیف) و غریب (یک رقم محلی ایرانی با کیفیت خوب) انجام شد. نتایج تجزیه رگرسیونی نشان داد که تعداد ۲۵ نشانگر مورد مطالعه با صفات مختلف کمی و کیفی پیوسته بودند و بین ۱۶ تا ۳۹ درصد از تنوع صفات مختلف را توجیه کردند، اما نشانگرهای RM253، RM246، RM190، RM104، RM314، RM3827 و RM7434 دارای پیوستگی قوی‌تری بودند. تهیه نقشه پیوستگی ۳۵ نشانگر ریزماهوره در جمعیت مورد مطالعه نشان داد که طول نقشه حاصل ۲۳۶/۵ سانتی‌مورگان و متوسط فاصله بین نشانگرهای مجاور ۶/۹۵ سانتی‌مورگان بود. تجزیه QTL با روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب نشان داد که تعداد چهل QTL کنترل صفات اندازه‌گیری شده در جمعیت مورد مطالعه را برعهده داشتند و تنوع فنوتیپی کنترل شده توسط QTL‌های شناسایی شده از ۷/۵۷ تا ۳۷/۴۱ درصد به ترتیب برای صفات بازده تبدیل دانه و درصد برنج سالم متغیر بود. بر اساس این تجزیه تعداد ۲۳ نشانگر در فاصله نزدیک‌تری به QTL‌های کنترل‌کننده صفات مورد مطالعه در این پژوهش بودند. از این تعداد برخی نشانگرها با چند صفت مختلف پیوسته بودند. در مجموع نتایج حاصل از تجزیه رگرسیونی و تجزیه QTL نشان داد که نشانگرهای آگاهی‌بخش پیوسته با ویژگی‌های کیفیت دانه شامل نشانگرهای RM253، RM246، RM340، RM243، RM4128، RM314، RM3827، RM7434، RM104 و RM190 بودند که با تحقیقات کامل‌تر می‌توان از آن‌ها در برنامه‌های انتخاب به‌کمک نشانگر در آینده استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تجزیه رگرسیونی، نشانگرهای آگاهی‌بخش، نقشه پیوستگی.

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات غذایی جهان بوده که منبع اصلی غذا برای بیش از نیمی از جمعیت جهان به حساب می‌آید (Zhang *et al.*, 2021). بر اساس آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (فائو) تولید برنج در سال ۲۰۱۸ برابر با ۵۱۰ میلیون تن گزارش شده است (FAO, 2019). در حال حاضر، با رشد سریع اقتصادی و بهبود سطح زندگی در بسیاری از کشورهای جهان از جمله آسیا، تقاضای مداوم برای کیفیت بالای برنج وجود دارد. بنابراین به‌نژادگران برنج باید ارقامی با کیفیت مطلوب دانه به‌صورت خاص برای رفع نیازهای بازار در مناطق هدف تولید کنند (Pang *et al.*, 2015). کیفیت دانه برنج یک ویژگی پیچیده است که نظرات تولیدکنندگان، فرآوری کنندگان، فروشندگان و مصرف‌کنندگان را در مورد تولید، فرآوری، بازاریابی و مصرف دانه منعکس می‌کند و به‌طور کلی این کیفیت را می‌توان به کیفیت تبدیل، کیفیت ظاهری، کیفیت پخت و خوراک و کیفیت تغذیه‌ای تقسیم کرد (Rabiei *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2020). معیارهای کیفیت برنج از کشوری به کشور دیگر، حتی از شهری به شهر دیگر متفاوت است (Sravani *et al.*, 2020) و بسیاری از کشورها پروتکل‌های خاص خودشان را برای ارزیابی کیفیت مربوطه تنظیم کرده‌اند (Bao, 2014). برای مثال مصرف‌کنندگان در ژاپن به دنبال برنج با ویژگی‌های ظاهری صیقلی و سفید همراه با عطر، طعم خوب، قوام نرم و چسبنده هستند (Yamamoto *et al.*, 2010). در حالیکه مصرف‌کنندگان ایرانی برنج‌های دانه‌بلند معطر که پس از پخت دانه‌ها قد کشیده و جدا از هم باقی می‌مانند را ترجیح می‌دهند (Rabiei *et al.*, 2004). در مورد مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با کیفیت دانه برنج و اعتبارسنجی نشانگرهای پیوسته با این صفات در جمعیت‌های مختلف،

مطالعات مختلفی انجام گرفته است. Rabiei و همکاران (۲۰۰۴) اولین مطالعه را در زمینه شناسایی نشانگرهای پیوسته با QTL‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با کیفیت ظاهری دانه‌ها شامل طول، عرض و شکل دانه در ارقام برنج ایرانی انجام دادند. آنها از تلاقی ارقام برنج ایرانی دم‌سفید و گرده، جمعیت F₂ با ۱۹۲ فرد تهیه و نقشه پیوستگی جمعیت را با ۸۸ نشانگر ریزماهواره ایجاد کردند و سپس با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، توانستند ۱۸ ناحیه کروموزومی دربردارنده QTL‌های کنترل‌کننده این صفات را شناسایی کنند. این محققین گزارش کردند که هر یک از صفات طول، عرض و شکل دانه برنج توسط یک تا دو QTL بزرگ‌اثر به همراه چند QTL کوچک‌اثر کنترل می‌شوند و تعدادی از آنها نیز دارای اثر پلی‌تروپیک هستند. Ebadi و همکاران (۲۰۱۳) به منظور شناسایی QTL‌های صفات مرتبط با کیفیت پخت و خوراک برنج شامل میزان آمیلوز، دمای ژلاتینه شدن و هشت پارامتر مربوط به چسبندگی نشاسته، از جمعیت لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی دو رقم برنج هاشمی × نعمت استفاده کردند. در این پژوهش با استفاده از ۱۷۱ نشانگر ریزماهواره در مجموع تعداد ۱۸ ناحیه QTL به همراه مهم‌ترین نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با ۱۰ خصوصیت کیفی برنج مکان‌یابی و معرفی شد که اکثر آنها از کروموزوم ۶ برنج بودند. در مطالعه دیگری توسط Kordrostami و همکاران (۲۰۱۵) به منظور شناسایی QTL‌های مرتبط با صفات کیفیت پخت و تبدیل برنج شامل ابعاد دانه و وزن برنج سفید، بازده تبدیل، ابعاد دانه بعد از پخت، میزان آمیلوز، دمای ژلاتینه شده و قوام ژل، از تعداد ۱۹۶ خانواده F_{2:4} حاصل از تلاقی ارقام غریب × سپیدرود استفاده شد. در این پژوهش با استفاده از اطلاعات ۲۱۶ نشانگر چندشکل تعداد ۲۸ QTL کنترل‌کننده صفات کیفیت برنج مکان‌یابی شدند. Kim و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای ارتباط بسیار

میزان آمیلوز و در نتیجه در کیفیت پخت و خوراک برنج ایفا می‌کنند. Bazrkar و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه خود از ۱۵۷ لاین نوترکیب خویش‌آمیخته حاصل از تلاقی ارقام علی‌کاظمی × کادوس و ۶۵ نشانگر چندشکل استفاده کردند. مجموعاً تعداد هفت QTL بزرگ‌اثر در چهار کروموزوم ۱، ۶، ۹ و ۱۲ برای چهار صفت کیفی برنج مکان‌یابی کردند که ۲۷/۴۴ درصد از تنوع فنوتیپی را نشان می‌داد. Borale و Kumbhar (۲۰۲۱) به منظور شناسایی نشانگرهای SSR مرتبط با صفت اندازه دانه از ۲۴ نشانگر ریزماهوره SSR در یک جمعیت F_2 حاصل از تلاقی ارقام VDN 1137-1-1 و Badshabhog استفاده کردند. تجزیه و تحلیل ژنتیکی در این مطالعه نشان داد که نشانگر RM147 در ارزیابی پارامتر کیفیت دانه برنج یکی از موثرترین نشانگرهای ریزماهوره می‌باشد.

همان‌طور که ملاحظه می‌شود، نتایج حاصل از مطالعات مختلف در زمینه تجزیه ژنتیکی و شناسایی ژن‌ها و QTL‌های کنترل‌کننده صفات مختلف مرتبط با کیفیت دانه متفاوت است که مهم‌ترین دلیل آن استفاده از جمعیت‌ها و نسل‌های مختلف حاصل از ارقام و والدین مختلف و در نتیجه زمینه‌های ژنتیکی مختلف و نیز تعداد نسل‌هایی است که این جمعیت‌ها متحمل کراسینگ‌اور شده‌اند. از اینرو، شناسایی و اعتبارسنجی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد نظر در جمعیت اصلاحی مورد مطالعه ضروری است. تحقیق حاضر نیز در این راستا اجرا شد که هدف آن، اعتبارسنجی نشانگرهای پیوسته با صفات کیفیت دانه برنج در جمعیت لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب ارقام برنج ایرانی بود. همچنین گروه‌بندی لاین‌ها جهت شناسایی لاین‌های با ویژگی‌های برتر برای استفاده در برنامه‌های بعدی از اهداف دیگر این تحقیق بود.

معنی‌داری را بین نشانگر RM586 با صفت شکل دانه شلتوک گزارش کردند. Deborah و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از تجزیه ارتباطی در ارقام باسماتی نشان دادند که سه نشانگر، RM6024 با ضخامت دانه و RM1237 و RM18582 با صفت شکل دانه رابطه بسیار معنی‌داری دارند و نشانگرهای مناسبی برای برنامه‌های به‌نژادی به کمک نشانگر می‌باشند. همچنین با بررسی بیان ۲۴ ژن در منطقه QTL مورد مطالعه اظهار داشتند که ژن *Os05g0374200* در تجمع سایتوکاینین‌ها دخالت داشته و بر اندازه دانه تاثیر می‌گذارد. Mei و همکاران (۲۰۱۸)، ضمن بررسی و اعتبارسنجی QTL‌های مرتبط با صفات شکل دانه و گچی شدن آندوسپرم، از دو جمعیت $BC_2F_2:3$ و BC_2F_2 حاصل از تلاقی ارقام هندی با والد تکرار شونده IR24 استفاده کردند. آن‌ها یک قطعه کروموزومی به طول 93.4-kb در حد فاصل نشانگرهای RM25828 و RM3123 پیدا کردند که اثر معنی‌داری بر عرض دانه، طول دانه، وزن هزار دانه و درجه گچی شدن آندوسپرم داشت. به عقیده آن‌ها در این ناحیه کروموزومی احتمالاً ژنی با اثر پلیوتروپی وجود دارد که می‌تواند شکل دانه و گچی شدن آندوسپرم را کنترل کند.

Ponce و همکاران (۲۰۱۸) برای شناسایی QTL‌های مرتبط با ۱۰ خصوصیت فیزیکی‌وشیمیایی مرتبط با کیفیت پخت و خوراک برنج شامل میزان آمیلوز، دمای ژلاتینه شدن و پارامترهای چسبندگی نشاسته، از ۵۰۸ لاین F_6 (حاصل از تلاقی نسل پیشرفته چند والدی MAGIC) استفاده و تعداد هفده QTL برای تمامی صفات شناسایی کردند. همچنین در این مطالعه جایگاه ژنی *GBSSI* و *SSIIa* مکان‌یابی شد که نقش کلیدی در ساختار نشاسته و

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از تعداد ۱۴۴ لاین خویش‌آمیخته نو ترکیب نسل F₁₀ حاصل از تلاقی ارقام سپیدرود و غریب استفاده شد. رقم سپیدرود از ارقام اصلاح شده در موسسه تحقیقات برنج کشور است که از تلاقی بین ارقام IR28 و رقم IR8 از ارقام ارسالی ایری انجام و خالص‌سازی نتاج به روش شجره‌ای بر اساس ویژگی‌هایی مانند مقاومت به ورس و بیماری و عملکرد بالا صورت گرفت، سپس به منظور افزایش کیفیت پخت لاین انتخابی از جمعیت مذکور مجدداً با رقم گرم‌صدری تلاقی داده شد و در نهایت لاین ۱۰۳۳ که از نظر عملکرد، کیفیت پخت، زودرسی و تحمل به بیماری‌ها بهتر از والدین خود بود، انتخاب و به‌عنوان رقم سپیدرود معرفی شد، اما در نهایت به علت کیفیت نامطلوب در مقایسه با ارقام محلی و به‌ویژه بازده تبدیل و درصد برنج سالم پایین، مورد استقبال کشاورزان ایرانی قرار نگرفت (Allahgholipour et al., 2012). در مقابل، رقم غریب از ارقام محلی ایران است که طی سال‌های متمادی در مناطق شمالی کشور کشت شده است. از ویژگی‌های بارز این رقم می‌توان به دوره رشد کم تا متوسط، عملکرد پایین و کیفیت دانه خوب اشاره کرد (Rabiei et al., 2015). عملیات کاشت بذرها در تاریخ ۲۸ فروردین ۱۳۹۶ در خزانه موسسه تحقیقات برنج کشور واقع در رشت با طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۳۴ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی و با ارتفاع ۷ متر پایین‌تر از سطح دریای آزاد انجام شد. هر لاین در دو خط و هر خط با ۱۵ نشا با فاصله ۲۵×۲۵ سانتی‌متر به‌صورت تک‌نشا کشت و فاصله بین لاین‌ها نیز ۵۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. کلیه عملیات زراعی شامل آبیاری، کوددهی، وجین و مبارزه با آفات و بیماری‌ها طبق توصیه موسسه تحقیقات برنج کشور انجام شد. برای اندازه‌گیری صفات مربوط به کیفیت دانه، تعداد ۱۰ بوته به‌طور تصادفی بعد از حذف اثر حاشیه‌ای از دو

خط کاشت مربوط به هر لاین انتخاب شد. ابتدا تمامی دانه‌های هر بوته جداگانه برداشت و پس از جدا کردن شلتوک از ساقه و خوشه، اندازه‌گیری صفات شلتوک انجام شد، سپس بذرها را هر لاین مخلوط شدند و پوست‌کنی شلتوک طی دو مرحله برای تهیه برنج قهوه‌ای و برنج سفید در مرکز تحقیقات برنج کشور با استفاده از دستگاه ساتاکه و دستگاه سفیدکن آزمایشگاهی انجام شد. سپس با استفاده از الک، دانه‌های سالم از دانه‌های خرد جدا شدند. صفات اندازه‌گیری شده شامل: طول شلتوک (PL)، عرض شلتوک (PW)، شکل یا نسبت طول به عرض شلتوک (PS)، بازده تبدیل دانه (MY)، طول دانه (GL)، عرض دانه (GW)، نسبت طول به عرض دانه (GS)، میزان برنج قهوه‌ای (TPBR)، درصد برنج سالم (HRP)، درصد برنج خرد (BRP)، طول شدن دانه پس از پخت (LAC)، میزان الانگیته (EL)، میزان آمیلوز (AC) و درجه حرارت ژلاتینی شدن (GT) بود که اندازه‌گیری آن‌ها طبق دستورالعمل موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (SES, 2005) انجام شد.

ارزیابی ژنوتیپی

ارزیابی ژنوتیپی لاین‌های مورد مطالعه در این تحقیق توسط ۳۵ نشانگر ریزماهواره که در مطالعات قبلی پیوستگی آنها با صفات مرتبط با کیفیت دانه برنج گزارش شده بود، انجام شد. مشخصات این نشانگرها به‌همراه صفات پیوسته با آنها و منابع مربوطه در جدول ۱ ارائه شده است. استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگی جوان والدین و ۱۴۴ لاین خویش‌آمیخته نو ترکیب نسل F₁₀ با استفاده از تعداد ۱۰ گیاهچه از هر لاین به روش CTAB (Saghai Maroof et al., 1994) انجام و سپس کیفیت و کمیت DNA استخراجی به‌ترتیب با الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه نانودراپ تعیین شد. سپس تمامی نمونه‌ها تا غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق شدند.

جدول ۱. نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با نواحی ژنومی کنترل‌کننده ویژگی‌های کیفی دانه برنج استفاده شده در این پژوهش

Linked trait	Marker	CH	Reference
میزان آمیلوز، دمای ژلاتینی شدن	RM276	6	Yun <i>et al.</i> , 2016; Wang, 2007; Rabiei <i>et al.</i> , 2012
میزان آمیلوز و شکل دانه	RM586	6	Kim <i>et al.</i> , 2016
میزان آمیلوز و دمای ژلاتینی شدن	RM584	6	Yun <i>et al.</i> , 2016
میزان آمیلوز، دمای ژلاتینی شدن و قوام ژل	RM190	6	Eizenga <i>et al.</i> , 2016; Yao <i>et al.</i> , 2017
میزان آمیلوز و دمای ژلاتینی شدن	RM402	6	Yacouba <i>et al.</i> , 2013
میزان آمیلوز و دمای ژلاتینی شدن	RM314	6	Swamy <i>et al.</i> , 2012; Wang, 2007; fan <i>et al.</i> , 2005
میزان آمیلوز، دمای ژلاتینی شدن و بازده تبدیل دانه	RM217	6	Young <i>et al.</i> , 2014
عرض دانه، بازده تبدیل دانه و میزان آمیلوز	RM204	6	Zhao <i>et al.</i> , 2015; Cheng <i>et al.</i> , 2014; Cheng <i>et al.</i> , 2007
عرض دانه، بازده تبدیل دانه، میزان برنج قهوه‌ای و میزان برنج خرد	RM225	6	Zheng <i>et al.</i> , 2007; Zheng <i>et al.</i> , 2007
بازده تبدیل دانه، شکل دانه، درصد برنج سالم و میزان آمیلوز	RM253	6	Aluko <i>et al.</i> , 2004; Fan <i>et al.</i> , 2005; Cheng <i>et al.</i> , 2007; Zheng <i>et al.</i> , 2007
بازده تبدیل دانه	RM508	6	Gaikwad <i>et al.</i> , 2018; Hsu <i>et al.</i> , 2014
دمای ژلاتینی شدن	RM141	6	Musyoki <i>et al.</i> , 2015
طول دانه	RM3827	6	Guleria <i>et al.</i> , 2012
دمای ژلاتینی شدن	RM2615	6	Yan <i>et al.</i> , 2014; Eizenga <i>et al.</i> , 2016
میزان آمیلوز	RM3	6	Amarawathi <i>et al.</i> , 2008
شکل دانه و میزان آمیلوز	RM549	6	Lou, 2009; leng <i>et al.</i> , 2014; Yan <i>et al.</i> , 2014
عرض دانه	RM6836	6	Dai <i>et al.</i> , 2016
میزان آمیلوز و دمای ژلاتینی شدن	RM587	6	Fan <i>et al.</i> , 2005; Leng <i>et al.</i> , 2014
عرض شلتوک و شکل دانه	RM527	6	Xing <i>et al.</i> , 2016
بازده تبدیل	RM4608	6	2014 Bernier <i>et al.</i> , 2007; Malkarjona <i>et al.</i> ,
میزان آمیلوز	RM3330	6	Linh <i>et al.</i> , 2016
میزان آمیلوز	RM340	6	Yan <i>et al.</i> , 2014; Rabiei <i>et al.</i> , 2012
دمای ژلاتینی شدن	RM7434	6	Wang <i>et al.</i> , 2014; Rabiei <i>et al.</i> , 2012
شکل دانه	RM30	6	Zheng <i>et al.</i> , 2007
	RM4128	6	
	RM220	1	Yan <i>et al.</i> , 2014
دمای ژلاتینی شدن	RM243	1	
طول دانه	RM104	1	He <i>et al.</i> , 2005; Amarawathi <i>et al.</i> , 2008; Singh <i>et al.</i> , 2012
	RM246	1	
عرض دانه	RM265	1	He <i>et al.</i> , 2005
دمای ژلاتینی شدن	RM580	1	Xing <i>et al.</i> , 2004
دمای ژلاتینی شدن	RM9	1	He <i>et al.</i> , 2005
دمای ژلاتینی شدن	RM237	1	Rabiei <i>et al.</i> , 2012
عرض دانه	RM5423	1	Bian <i>et al.</i> , 2013
طول دانه و میزان آمیلوز	RM431	1	Amarawathi <i>et al.</i> , 2008

روی ژل‌های آگارز ۳٪ تفکیک و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت برای تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی، لاین‌های مورد مطالعه بر اساس نوارهای دو والد غریب و سپیدرود تعیین ژنوتیپ شدند، به این ترتیب که لاین‌های دارای نوار مشابه والد غریب با ژنوتیپ A و لاین‌های دارای نوار مشابه با والد سپیدرود با ژنوتیپ B مشخص شدند.

تجزیه آماری داده‌ها

برای تجزیه آماری داده‌ها ابتدا نمودار توزیع فراوانی هر یک از صفات مورد مطالعه تهیه و وجود توزیع نرمال در داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.25 بررسی شد. سپس وجود تفاوت معنی‌دار بین والدین غریب و سپیدرود از نظر هر یک از صفات مطالعه‌شده با آزمون t-Student بررسی شد. به‌منظور گروه‌بندی لاین‌های مورد مطالعه از نظر کلیه صفات اندازه‌گیری‌شده از تجزیه خوشه‌ای براساس معیارهای مختلف فاصله و روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای با استفاده از پکیج Heatmaply نرم‌افزار R استفاده شد. از آنجایی که روش حداقل واریانس Ward دارای بیش‌ترین مقدار همبستگی کوفنتیک بود و بهترین نتیجه را در گروه‌بندی لاین‌های مورد مطالعه بر اساس صفات مرتبط با کیفیت دانه ارائه داد، به این دلیل تنها نتایج این روش گزارش شد.

برای تجزیه داده‌های مولکولی نیز ابتدا آزمون کای اسکور (χ^2) برای تفرق ژنوتیپ‌های نشانگر از نسبت مورد انتظار ۱:۱ با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 25، مورد آزمون قرار گرفت. به‌منظور شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش پیوسته با صفات مورفولوژیک مورد مطالعه، تجزیه رگرسیون گام به گام با در نظر گرفتن نشانگرها به عنوان متغیر مستقل و صفات مرتبط با کیفیت دانه به عنوان متغیرهای وابسته با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.25 انجام شد. برای گروه‌بندی لاین‌ها بر اساس داده‌های مولکولی نیز از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از

واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystems انجام شد. اجزای واکنش شامل تک DNA پلیمراز (با غلظت نهایی ۰/۴ واحد) به میزان ۰/۱ میکرولیتر، بافر PCR (با غلظت ۱۰ برابر) به مقدار ۱ میکرولیتر، $MgCl_2$ (با غلظت ۵۰ میلی‌مولار) به میزان ۰/۴۸ میکرولیتر، dNTPs (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) به مقدار ۰/۲ میکرولیتر، آغازگرهای مستقیم و معکوس (با غلظت ۰/۵ میکرومولار) هر کدام به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، آب دیونیزه استریل به مقدار ۵ میکرولیتر و ۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. برای انجام PCR ابتدا محلول مادری برای دو والد و ۱۴۴ نمونه شامل همه اجزای واکنش به‌جز DNA ژنومی تهیه و سپس به تعداد ۱۴۶ قسمت مساوی تقسیم و در تیوب‌های PCR ریخته شد و در انتها DNA ژنومی نمونه‌ها به هر تیوب اضافه شد. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر شامل واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و بعد ۳۵ چرخه حرارتی به‌صورت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴°C، جهت واسرشته‌سازی، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۸-۵۲°C (با توجه به دمای اتصال بهینه هر آغازگر) به‌منظور اتصال آغازگرها به DNA الگو و یک دقیقه در دمای ۷۲°C به‌منظور بسط و گسترش آغازگرها انجام شد و در انتها نیز به‌منظور بسط نهایی، نمونه‌ها به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲°C سلسیوس قرار گرفتند. لازم به توضیح است که جهت حذف نوارهای شبه‌ریزماهوره، برنامه دمایی دستگاه به‌صورت Touch down انجام شد، به‌طوری که دمای مرحله اتصال آغازگرها در ده چرخه اول، ده درجه بالاتر (۶۸-۶۲°C) با توجه به دمای اتصال بهینه هر آغازگر) در نظر گرفته شد و در هر چرخه یک درجه سلسیوس از این دما کاسته شد تا به دمای اتصال بهینه آغازگر رسید و سپس ۲۵ چرخه حرارتی باقیمانده با همین دما انجام شد. برای انجام الکتروفورز و مشاهده نوارها، محصول واکنش PCR

والدین و لاین‌ها در جدول ۲ درج شده است. طول، عرض و شکل (نسبت طول به عرض دانه) به عنوان مهم‌ترین صفات مرتبط با کیفیت ظاهری برنج، نقش مهمی در بازاریابی و ارزش اقتصادی ارقام برنج دارند. طول دانه در والد اسپیدرود با میانگین ۷/۵۱ میلی‌متر و در والد غریب با میانگین ۶/۳۳ میلی‌متر برآورد شد. همچنین عرض دانه در والد غریب (۲/۹۵ میلی‌متر) بیشتر از عرض دانه در والد اسپیدرود (۲/۲۵ میلی‌متر) و نسبت طول به عرض دانه در والد اسپیدرود (۴/۹۰) بیش‌تر از والد غریب (۳/۲۱) بود. بنابراین بر اساس نتایج می‌توان ارقام اسپیدرود و غریب را به ترتیب در دسته ارقام دانه‌بلند و متوسط گروه‌بندی کرد. میانگین این صفات (طول، عرض و نسبت طول به عرض دانه) در لاین‌های نوترکیب به ترتیب ۶/۹۵، ۲/۲۵ و ۳/۱۲ بود. طول دانه بعد پخت دارای میانگین ۸/۲۰ در والد غریب، ۱۰/۰۵ در والد اسپیدرود و میانگین ۱۰/۶۱ در بین نتاج بود. میانگین راندمان تبدیل دانه نیز در والد غریب ۷۴/۹ درصد، در والد اسپیدرود ۶۰ درصد و در نتاج جمعیت F_{10} برابر با ۵۹ درصد با دامنه تغییرات ۷۱-۲۹ درصد بود.

بررسی دامنه تغییرات صفات در بین لاین‌های خالص نوترکیب نسل F_{10} بر وجود تنوع فنوتیپی وسیع داده‌ها، تفکیک متجاوز و کنترل چند ژنی صفات مورد مطالعه دلالت داشت. همانطور که مشاهده می‌شود (جدول ۲)، تعدادی از لاین‌ها از نظر بسیاری از صفات مطالعه شده دارای تفکیک متجاوز بودند و ارزش‌های فنوتیپی بیشتر یا کمتر از والدین (اسپیدرود و غریب) نشان دادند و در واقع ارزش مشاهده شده صفت در آن‌ها کمتر از والد دارای حداقل میزان صفت و یا بیشتر از والد دارای حداکثر مقدار صفت بود. این وضعیت تفکیک متجاوز نام دارد که برای اکثر صفات مورد مطالعه مشاهده شد. وجود تفکیک متجاوز برای این صفات در جمعیت‌های اصلاحی مختلفی در تحقیقات قبلی نیز گزارش شده است. Wang و همکاران

معیارهای تشابه مختلف مانند دایس، جاکارد، تطابق ساده و روش‌های مختلف مانند نزدیک‌ترین همسایه‌ها، دورترین همسایه‌ها، UPGMA و غیره استفاده و در نهایت روش UPGMA به دلیل داشتن بالاترین ضریب همبستگی کوفتیک و ارایه بهترین گروه‌بندی انتخاب شد. نقشه پیوستگی جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق نیز بر اساس داده‌های ژنوتیپی ۳۵ نشانگر ریزماهواره چندشکل که همگی از کروموزوم‌های یک و شش برنج بودند، تهیه شد. گروه‌های پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار Join Map ver.3.0 (Ooijen and Voorrips, 2002) تهیه و فواصل بین نشانگرها بر اساس تابع Kosambi (۱۹۴۳) محاسبه شد. سپس QTL‌های کنترل‌کننده صفات کیفی برنج با استفاده از نقشه پیوستگی تهیه شده و ارزش‌های فنوتیپی صفات شناسایی شد. برای تجزیه QTL و شناسایی QTL‌ها و رسم نقشه پیوستگی از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (Li-Feng *et al*, 2007) و نرم‌افزارهای Q-Gen و QTLNETWORK Ver2.1 (Wang *et al*, 2012) استفاده شد.

نتایج و بحث

ارزش‌های فنوتیپی صفات مورد مطالعه در هر یک از والدین اسپیدرود و غریب و نیز لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب در جدول ۲ ارایه شده است. مقایسه میانگین بین والدین با استفاده از آزمون t -استیودنت نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین والدین از نظر تمامی صفات مورد مطالعه (به جز صفت الانگیته) در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. توزیع فراوانی لاین‌ها نیز برای تمامی صفات به صورت پیوسته و نرمال بود که بر کمی بودن این صفات و دخالت چندین ژن در کنترل آن‌ها دلالت داشت (Zhao *et al*, 2017; Yan *et al*, 2014; Li *et al*, 2011).

میانگین و دامنه تغییرات صفات کیفی دانه برای

و میزان آمیلوز با درجه حرارت ژلاتینی شدن رابطه مثبت و معنی‌دار بود. رابطه بین میزان برنج سالم (HRP) و میزان برنج خرد (BRP) بصورت منفی و معنی‌دار ($-0/92^{**}$) بود. همچنین رابطه بین عرض دانه سفید و طول دانه سفید منفی و معنی‌دار مشاهده شد که با نتایج Amarawathi و همکاران (۲۰۰۸) و Zho و همکاران (۲۰۲۰) منطبق بود. رابطه بین میزان آمیلوز و درجه حرارت ژلاتینی شدن در تحقیقات مختلف متفاوت گزارش شده است، در مطالعه Sabouri و همکاران (۲۰۱۲) و Bao و همکاران (۲۰۰۱) این رابطه مثبت و معنی‌دار گزارش شده است که نتایج تحقیق حاضر نیز با آن‌ها مطابقت داشت. در حالی که در برخی گزارش‌ها رابطه بین این دو صفت غیر معنی‌دار گزارش شده است (Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

(۲۰۰۷) و Zhang و همکاران (۲۰۰۸) در جمعیت لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب این پدیده را برای صفات کیفیت پخت و خوراک برنج گزارش کردند. در مطالعه دیگری که توسط Bian و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از ۳۷ اینبرد لاین حاصل از تلاقی دو رقم *Indica*×*Japonica* انجام شد نیز تفکیک متجاوز برای تمامی صفات مورد بررسی شامل درصد آمیلوز، طول دانه، عرض دانه، ضخامت دانه، نسبت طول دانه به عرض دانه، نسبت طول به ضخامت دانه، حجم و وزن هزار دانه مشاهده شد.

همبستگی بین کلیه صفات کیفی مورد بررسی در این پژوهش (جدول ۳) نشان داد که همبستگی بین طول شلتوک با شکل شلتوک، عرض دانه سفید با عرض شلتوک، نسبت طول به عرض دانه سفید با طول دانه سفید، میزان برنج سالم با بازده تبدیل دانه

جدول ۲. ارزش‌های فنوتیپی صفات مورد مطالعه در والدین و لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب و مقایسه میانگین بین والدین

Triats	Parents		t-Value (P ₁ - P ₂)	Recombinant inbred lines	
	Gharib m ± S _x	Sepidroud m ± S _x		m ± S _x	Range
	PW (mm)	2.95±0.05		2.25±0.05	11.31**
PL (mm)	9.15±0.01	10.05±0.05	-17.65**	9.07±0.046	8.25-12
PS (mm)	3.21±0.06	4.90±0.09	-15.05**	3.64±0.29	1.34-4.91
TPBR (gr)	84.6±0.3	75.4±0.2	25.52**	79.76±0.27	65.54-106
MY (%)	74.9±0.1	60±0.99	14.82**	59±0.01	29-71
HRP (%)	45.41±0.39	52.35±0.05	-17.65**	84.91±0.52	45.54-97.16
BRP (%)	18.15±0.06	23.35±0.15	-32.89**	15.08±0.58	2.84-54.46
GL (mm)	6.33±0.015	7.51±0.005	-73.99**	6.95±0.052	5.55-10.90
GW (mm)	2.49±0.005	1.86±0.01	55.91**	2.25±0.01	1.79-2.90
LAC (mm)	8.20±0.1	10.05±0.05	-16.54**	10.61±0.053	8.02-13.20
GS (mm)	2.55±0.0001	4.06±0.002	-528.79**	3.12.04	2.02-5.45
EL (mm)	1.29±0.02	1.34±0.007	-2.19 ^{ns}	1.54±0.009	1.1-1.94
GT	3.85±0.05	7.1±0.1	-29.06**	5.46±0.06	3.20-7
AC (%)	20.12±0.02	26.95±0.05	-130.09**	23.53±0.13	17.90-27.80

ns, ** و *** غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪. m میانگین و S_x اشتباه استاندارد میانگین است. صفات اندازه‌گیری شده در این مطالعه عبارت‌اند از: PW عرض شلتوک، PL طول شلتوک، PS شکل شلتوک، TPBR میزان برنج قهوه‌ای، MY بازده تبدیل دانه، HRP میزان برنج سالم، BRP میزان برنج خرد، GL طول دانه سفید، GW عرض دانه سفید، LAC طولی شدن دانه پس از پخت، GS نسبت طول به عرض دانه سفید، EL میزان الانگیتته، GT درجه حرارت ژلاتینی شدن و AC میزان آمیلوز.

جدول ۳. ضریب همبستگی بین صفات کیفیت دانه در جمعیت لاین‌های نوترکیب برنج

	PW	PL	PS	TPBR	MY	HRP	BRP	GL	GW	LAC	GS	EL	GT	AC
PW	1													
PL	0.113	1												
PS	0.87	0.97**	1											
TPBR	0.095	-0.20*	-0.207*	1										
MY	-0.050	-0.012	-0.011	-0.110	1									
HRP	-0.007	0.058	0.058	-0.045	0.40**	1								
BRP	0.038	-0.060	-0.061	0.037	0.096	-0.92**	1							
GL	-0.112	-0.065	-0.061	0.113	0.096	-0.032	0.041	1						
GW	0.637**	0.119	0.102	0.020	-0.058	0.015	-0.013	-0.23**	1					
LAC	-0.113	-0.001	0.003	-0.036	-0.040	0.008	0.011	0.152	-0.082	1				
GS	-0.38**	-0.097	-0.086	0.063	0.112	-0.048	0.050	0.854**	-0.68**	0.149	1			
EL	0.090	0.053	0.051	-0.26**	-0.129	0.069	-0.039	-0.65**	0.130	0.058	-0.54**	1		
GT	-0.034	0.117	0.119	-0.085	-0.002	0.168*	-0.171*	-0.091	-0.039	-0.054	-0.038	0.034	1	
AC	-0.149	-0.014	-0.010	0.134	-0.028	0.042	-0.031	0.102	0.048	-0.070	0.058	-0.138	0.445**	1

توضیحات مربوط به علائم اختصاری صفات در جدول شماره (۲).

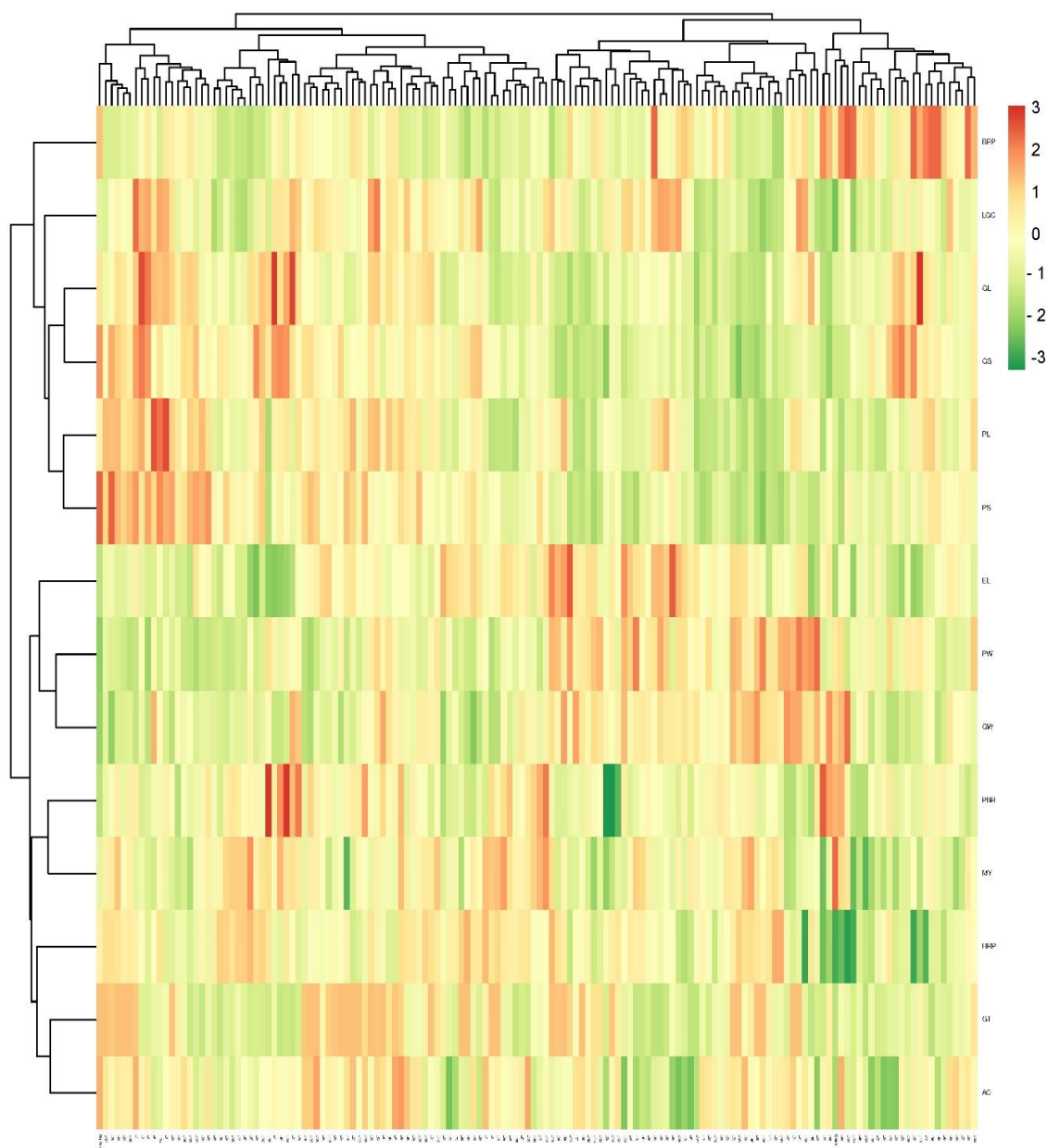
محاسبه شد (جدول ۴). این انحرافات تا حدی می‌تواند نشان‌دهنده وجود تنوع در بین ژنوتیپ‌ها باشد. از آنجایی که ژنوتیپ‌های موجود در هر یک از کلاسترها دارای قرابت بیشتری نسبت به ژنوتیپ‌های موجود در کلاسترهای متفاوت می‌باشند، بنابراین در صورت دورگ‌گیری می‌توان با توجه به ژنوتیپ‌های موجود در کلاسترهای مختلف و ارزش میانگین صفات برای هر کلاستر، برای بهره‌وری بیشتر از پدیده‌هایی همچون هتروسیس و تفکیک متجاوز استفاده نمود.

به منظور پیداکردن علت وجود همبستگی و توصیف رابطه بین ۱۴ صفت کیفی مورد مطالعه در لاین‌های برنج بر اساس تعداد کمتری عامل که روی این صفات تاثیرگذار هستند، تحلیل عاملی به روش تجزیه به مولفه‌های اصلی انجام شد. در این تجزیه تعداد سه عامل شناسایی شد که توانستند در مجموع ۸۸/۲۳۷ درصد از تغییرات کل را توجیه نمایند (جدول ۵). درصد واریانس هر عامل به ترتیب ۴۱/۶، ۳۴/۵۴ و ۱۲/۰۹۷ بود. عامل اول به تنهایی ۴۱/۰۶ درصد از کل واریانس را توجیه کرد. در این عامل بزرگترین ضرایب عاملی مثبت متعلق به صفات شکل دانه، شکل شلتوک، طول دانه و طول شلتوک بود.

همچنین بزرگترین ضرایب منفی متعلق به صفات عرض شلتوک و عرض دانه بود که به عامل کیفیت ظاهری نامگذاری شد. عامل دوم با داشتن واریانس ۳۴/۵۴ عامل کیفیت تبدیل نامگذاری شد، در این عامل صفات بازده تبدیل و میزان برنج سالم دارای بیش‌ترین ضرایب عاملی مثبت و صفت میزان برنج خرد بیش‌ترین ضرایب عاملی منفی را به خود اختصاص داد. عامل سوم با واریانس ۱۲/۰۹۷ عامل افزایش طول دانه نامیده شد. در این عامل بزرگترین ضرایب عاملی مثبت مربوط به صفت طول دانه، و بزرگترین ضرایب عاملی منفی مربوط به صفت الانگیته بود.

به منظور تعیین فاصله ژنتیکی لاین‌های مورد مطالعه بر اساس ۱۴ صفت کیفی دانه، دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش Ward ترسیم و در شکل ۱ ارایه شد. میزان ضریب همبستگی کوفنیتیک بین ماتریس فاصله اقلیدسی و ماتریس خروجی حاصل از دندروگرام به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای برابر با ۰/۷۹ بود که بیانگر گروه‌بندی قابل قبول ارقام از نظر خصوصیات کیفی دانه می‌باشد. با توجه به نتایج تجزیه خوشه‌ای صفات، ژنوتیپ‌ها در دو گروه اصلی قرار گرفتند، همچنین با محاسبه میانگین گروه‌ها و انحراف میانگین هر گروه از میانگین کل مشاهده گردید، که گروه اول با تعداد ۷۱ ژنوتیپ از نظر صفت شکل شلتوک، میزان درصد برنج خرد، عرض دانه و میزان الانگیته بیشتر از گروه دوم بود، لازم به ذکر است والد غریب در این گروه قرار گرفت. در این پژوهش میانگین دو خوشه از نظر صفت درجه حرارت ژلاتینی شدن متوسط بود و گروه دوم با میانگین درجه حرارت ژلاتینه شدن ۵/۴۷ بیشتر از گروه دیگر بود. از نظر صفت میزان آمیلوز گروه دوم با میانگین ۲۴/۰۵ بیشتر از خوشه اول بود و والد سپیدرود نیز در این گروه قرار گرفت. اولین بار Juliano و Villareal (۱۹۹۳) نشان دادند که میزان آمیلوز نقش بسیار تعیین‌کننده‌ای در کیفیت پخت و خوراک برنج دارد، مقدار کم آن سبب می‌شود که برنج بعد از پخت حالت چسبنده و لعاب‌دار به خود گیرد و از نظر حجم انبساط پیدا نکنند، درحالی که مقدار زیاد آن موجب سفت و خشک شدن برنج پخته شده می‌شود. بنابراین مناسب‌ترین میزان آن حد متوسط است که در این حالت برنج نرم و ملایم است و پس از سرد شدن سخت نمی‌گردد (Tavassoli, 2003).

در این تحقیق به منظور بررسی سهم صفات مورد مطالعه در ایجاد هر گروه و نشان دادن ارزش هر یک از این کلاسترها از لحاظ ۱۴ صفت اندازه‌گیری شده، مقدار انحراف میانگین کلاسترها از میانگین کل



شکل ۱. گروه‌بندی لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب مورد مطالعه بر اساس صفات مرتبط با کیفیت دانه برنج به روش حداقل واریانس Ward

جدول ۴. میانگین و انحراف از میانگین کل هر یک از گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای

		AC	GT	EL	GS	LAC	GW	GL
Cluster 1	Mean	23.06785	5.263028	1.573066	2.814645	10.39113	2.331479	6.612746
	Deviation from total mean	-0.50788	-0.21351	0.029579	-0.26479	-0.20884	0.096958	-0.28164
Cluster 2	Mean	24.05653	5.678667	1.515486	3.330113	10.79767	2.142733	7.161
	Deviation from total mean	0.480797	0.202126	-0.028	0.250673	0.197701	-0.09179	0.266616

توضیحات مربوط به علائم اختصاری صفات در جدول شماره (۲).

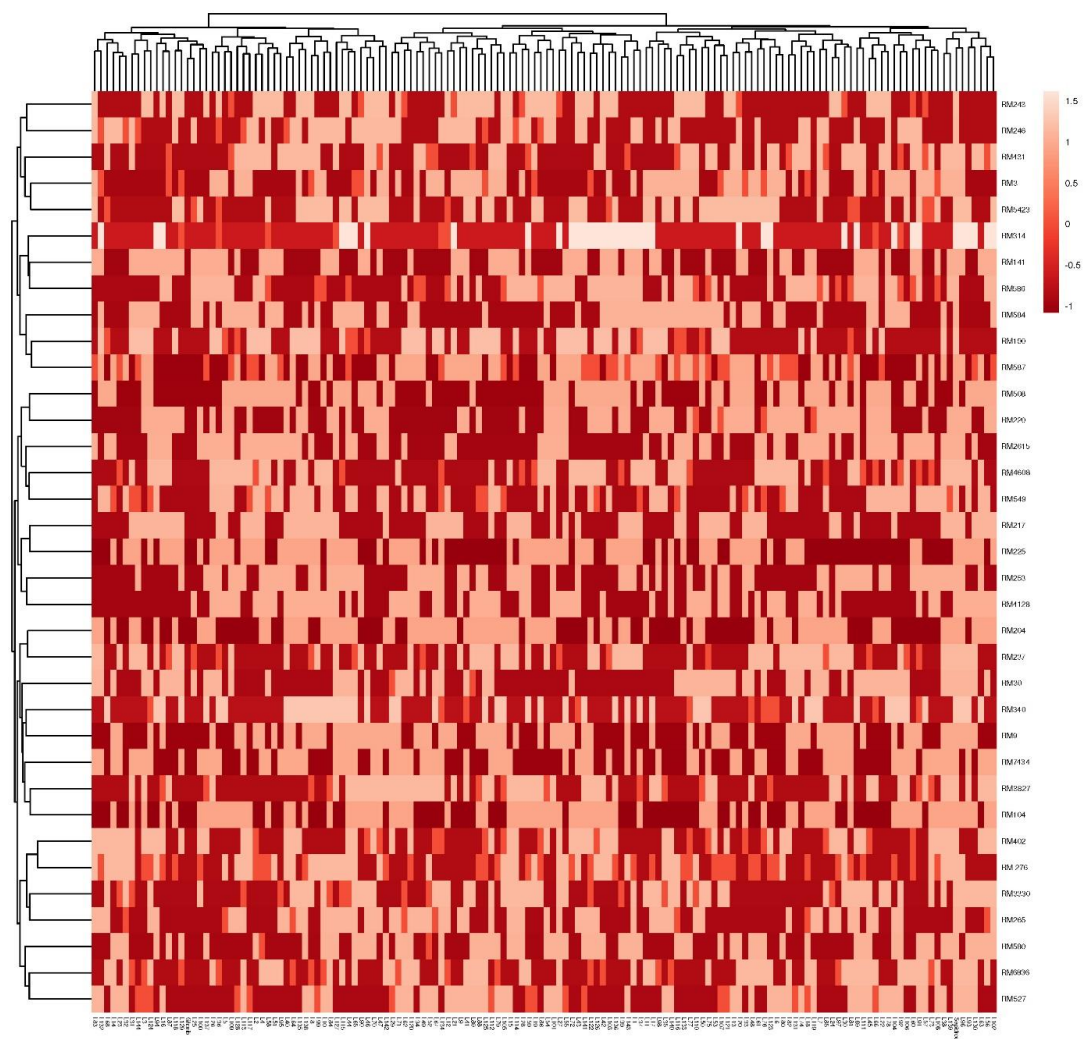
ادامه جدول ۴. میانگین و انحراف از میانگین کل هر یک از گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای

		PW	PL	PS	TPBR	MY	HRP	BRP
Cluster 1	Mean	2.831908	9.409014	3.33633	0.788799	0.59358	0.8389	0.168728
	Deviation from total mean	0.137556	-0.31705	-0.32071	-0.00848	-0.01431	-0.02144	0.024465
Cluster 2	Mean	2.564133	10.0262	3.960642	0.80531	0.621445	0.880632	0.121103
	Deviation from total mean	-0.13022	0.300138	0.303604	0.00803	0.013551	0.020294	-0.02316

توضیحات مربوط به علائم اختصاری صفات در جدول شماره (۲).

جدول ۵. نتایج تجزیه عاملی، مقادیر ویژه، درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی هر عامل

Triats	Factors		
	1	2	3
Paddy width	-0.3176	-0.1318	0.3221
Paddy length	0.3512	-0.05337	-0.1761
Paddy shape	0.4264	0.06524	-0.3314
Brown rice percentage	0.06626	0.09282	0.3381
Milling yield	-0.05336	0.5217	0.1244
Head rice percentage	-0.06664	0.5705	-0.02804
Broken rice percentage	0.06664	-0.5705	0.022801
White grain length	0.3925	0.008814	0.3926
White grain width	-0.3431	-0.05076	0.2014
Grain length after cooking	0.1622	-0.01426	-0.1717
White grain shape	0.4623	0.0227	0.1953
Elongation	-0.2464	-0.04094	-0.5634
Gelatinization temperature	0.006034	0.1655	-0.2096
Amylose content	0.0714	0.1068	0.01744
Eigen value	3.72405	2.73572	1.69364
Variance (%)	41.6	34.54	12.097
Cumulative variance (%)	41.6	76.14	88.237



شکل ۲. گروه‌بندی لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب مورد مطالعه بر مبنای نشانگرهای ریزماهواره با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و

روش UPGMA

۱۰۴ را از نظر اکثر صفات مورد بررسی به عنوان اینبردلاین‌های با آمیلوز متوسط، درجه حرارت ژلاتینی متوسط و طول دانه بلند بر اساس ذائقه مصرف‌کنندگان ایرانی، بازده تبدیل بالا و درصد برنج خرد کمتر را نام برد و به دلیل داشتن کیفیت مطلوب انتخاب و بعد از آزمایش‌های سازگاری و پایداری به کشاورز معرفی خواهد شد.

تجزیه و تحلیل رگرسیونی ۳۵ نشانگر ریزماهواره مرتبط با صفات کیفی دانه به منظور شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش انجام شد و نتایج در جدول ۶ ارائه شده است. در آستانه سطح معنی‌داری $P < 0.05$ و $P < 0.01$ تعداد ۲۵ نشانگر از ۳۵ نشانگر مرتبط، با QTL‌های صفات کیفی دانه در ارتباط بودند. ضریب تبیین بالا برای مدل‌های رگرسیونی صفات مورد مطالعه، نقش جایگاه ژنومی QTL‌های پیوسته با این نشانگرها با صفات کیفی دانه در برنج طی سالیان گذشته در انواع جمعیت‌های اصلاحی معرفی گردیده است. نتایج تجزیه ارتباطی در این مطالعه نشان داد که تغییرات صفات توجیه شده توسط نشانگرها در محدوده‌ی ۱۱-۳۹ بود، Zhou و همکاران (۲۰۱۲) تجزیه ارتباطی بین ۱۱ صفت زراعی با ۱۵۲ نشانگر SSR در برنج را انجام دادند و تغییرات صفات توجیه‌شده توسط نشانگرها را بین ۱/۹۹ تا ۲۱/۵۸ گزارش کردند. همچنین نشان دادند برخی صفات با بیش از یک نشانگر پیوستگی دارد (شکل ۳).

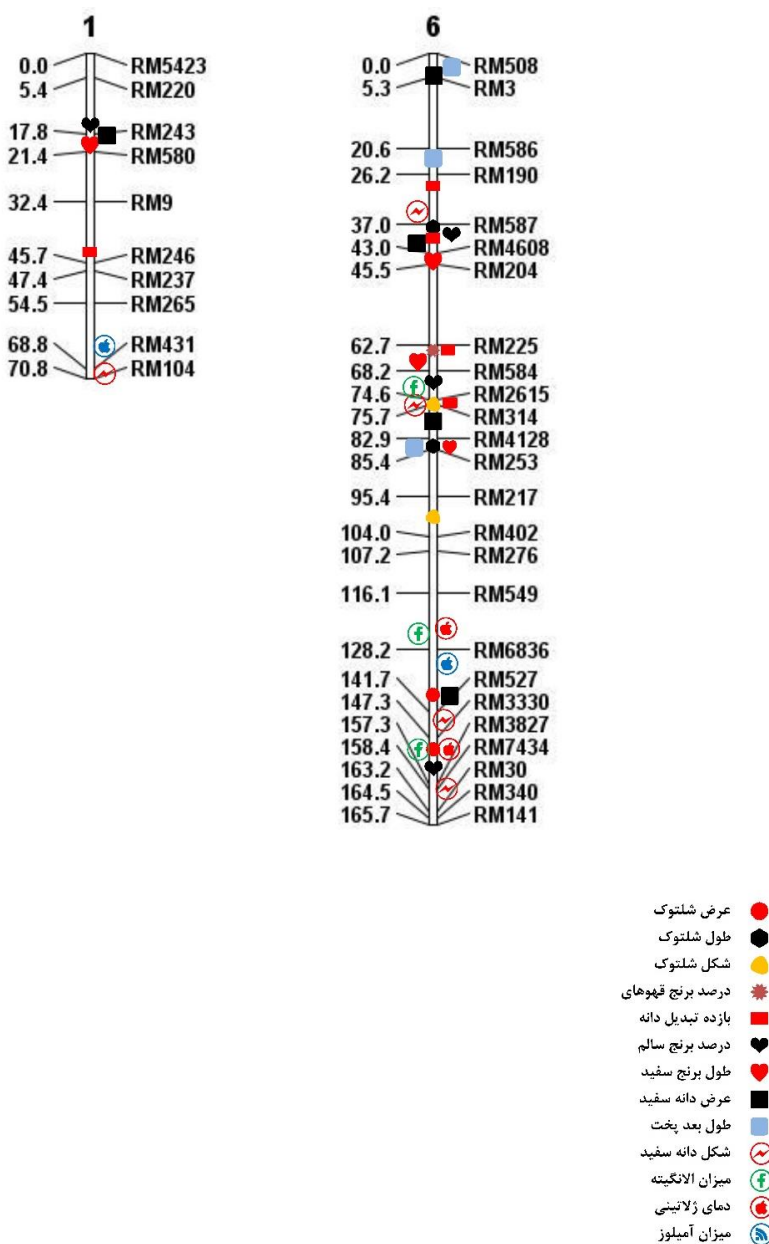
در این تحقیق از اطلاعات ۳۵ نشانگر ریزماهواره (SSR) که دارای الگوی نواریندی متفاوتی بین دو والد سپیدرود و غریب بودند جهت تجزیه رگرسیونی در جمعیت (لاین‌های F_{10} حاصل تلاقی والدین غریب و سپیدرود) مورد استفاده قرار گرفت. نشانگرهای اعتبارسنجی‌شده در این تحقیق از دو کروموزوم یک (۱۰ نشانگر) و کروموزوم شش (۲۵ نشانگر) انتخاب شد. به دلیل اینکه نسل F_{10} تقریباً خالص (هموزیگوت) است و مقدار خلوص آن نزدیک به ۹۹/۲۱ درصد می‌باشد، قبل از تهیه نقشه پیوستگی نسبت‌های ژنوتیپی مورد انتظار برای نشانگرهای منتخب مورد استفاده آزمون (۱:۱) شد. همچنین به منظور بررسی انحراف فراوانی‌های ژنوتیپی نشانگرهای ریزماهواره از فراوانی مورد انتظار مندلی، آزمون کای اسکور (χ^2) برای نشانگرها انجام شد. همانطور که پیش‌بینی می‌شد نتایج نشان داد که فراوانی‌های ژنوتیپی مطابقت خوبی با فراوانی‌های مورد انتظار دارد.

نتایج حاصل از تجزیه کلاستر به نوعی با نتایج به‌دست آمده از تجزیه مولکولی جمعیت‌ها و همچنین نتایج حاصل از فواصل و تشابهات ژنتیکی را تأیید می‌کند. نتیجه تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های کیفی با نتیجه حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای مورد بررسی دارای تشابه بود. با توجه به فواصل بین گروه‌ها و نتایج حاصل از کلاستر کیفی و نیز میانگین صفات محاسبه‌شده می‌توان اینبردلاین‌های ۳۸، ۵۸، ۵۶، ۶۵، ۸۸، ۹۲، ۹۴، ۹۷،

جدول ۶. تجزیه رگرسیونی گام به گام جهت شناسایی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با صفات کیفی دانه در جمعیت اینبردلاین‌های

نوترکیب برنج

Triat	Informative markers	Probability level	R ²
Amylose Content	RM431, RM190, RM314, RM340, RM217	0.002	0.23
Gelatinization Temperature	RM30, RM2615	0.031	0.26
Paddy width	RM204, RM265, RM527	0.0105	0.29
Paddy length	RM253, RM587, RM104, RM508	0.045	0.35
Paddy Shape	RM586, RM314	0.001	0.31
Milling Yield	RM246, RM508, RM225, RM253, RM204	0.019	0.39
White Grain Length	RM104, RM276, RM431	0.0033	0.11
White Grain Width	RM527, RM4608, RM6836	0.012	0.18
White Grain Shape	RM3827, RM586, RM253, RM549, RM3330	0.001	0.16



شکل ۳. محل قرارگیری QTLهای کنترل‌کننده صفات مرتبط با کیفیت دانه روی کروموزوم‌های شماره یک و شش برنج

و همکاران (۲۰۰۵)، Wang و همکاران (۲۰۰۷)، Swamy و همکاران (۲۰۱۲) و Halder و همکاران (۲۰۱۶)، نشانگر RM340 با مطالعه Sabouri و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشت. همچنین Yan و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی، به منظور مکان‌یابی QTLهای کنترل‌کننده کیفیت پخت و خوراک برنج بر روی یک جمعیت اینبردلاین، ارتباط بین نشانگر RM217 با صفت میزان آمیلوز را گزارش کردند.

در پژوهش حاضر نشانگرهای RM431، RM190، RM314، RM340 و RM217 با صفت میزان آمیلوز ارتباط معنی‌داری نشان دادند. پیوستگی نشانگر RM190 با صفت میزان آمیلوز در بسیاری از پژوهش‌ها گزارش شده است (Eizenga *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2017). نشانگر RM431 با صفت میزان آمیلوز در مطالعه Amarawathi و همکاران (۲۰۰۸)، نشانگر RM314 با پژوهش Fan

در این پژوهش برخی از نشانگرها ارتباط معنی‌داری با بیش از یک صفت نشان دادند. در این زمینه Yan و همکاران (۲۰۱۴) اظهار داشتند که با وجود همبستگی معنی‌دار بین صفات مورفولوژیکی برخی از این صفات پیوستگی بسیار نزدیکی به هم دارند و احتمالاً دلیل آن پلیوتروپی مکان‌های کروموزومی است. این بررسی به خوبی نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهوره ابزار مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی جمعیت‌ها می‌باشند. هرچند که ارزیابی دقیق تنوع ژنتیکی با استفاده از تعداد زیاد نشانگرها تحقق می‌یابد. تحقیقات نشان دادند که اکثر نشانگرهای استفاده شده در این پژوهش برای اهدافی نظیر تمایز، شناسایی، ارزیابی تمایز و روابط ژنتیکی جمعیت‌های برنج سودمند بوده و همچنین می‌توانند برای مدیریت ذخایر توارثی از طریق شناسایی نمونه‌های تکراری و هم‌نام کارآمد باشند. از آنجایی که تلاقی ارقام و توده‌هایی که از نظر مولکولی دورتر می‌باشند می‌تواند ارقامی با تنوع بیشتر را ایجاد نماید.

مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده صفات مورد

مطالعه روی کروموزوم شماره یک و شش برنج به‌منظور ردیابی QTL‌های کنترل‌کننده صفات کیفی دانه از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) و از نرم افزار Win QTL Cartographer (Bastin et al., 2001) استفاده شد. سپس QTL‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با کیفیت برنج شناسایی شدند. در این روش حد آستانه LOD با آزمون تبدیل با تعداد جایگشت ۱۰۰۰ انتخاب شد. QTL‌های دارای LOD=2 و بالاتر با اطمینان بیش‌تری در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار می‌گیرند زیرا سهم‌شان در توجیه تنوع فتوتیپی صفات بیشتر است (Hosseini et al., 2014; Bao, 2014). بر این اساس QTL‌هایی که دارای حداقل LOD=2.5 بودند، شناسایی و معرفی شدند (جدول ۷). در مجموع ۴۰ ناحیه ژنی واجد QTL شناسایی شد که کنترل ۱۳ صفت را برعهده داشتند.

برای صفت درجه حرارت ژلاتینی شدن تعداد دو نشانگر RM30 و RM2615 با این صفت ارتباط معنی‌داری نشان داد. ارتباط بین نشانگر RM2615 با دمای ژلاتینی شدن در مطالعه Ebadi و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش شده است. برای صفت طول دانه شلتوک چهار نشانگر RM253، RM587، RM104 و RM508 ارتباط معنی‌داری با این صفت نشان دادند. برای نشانگر RM104 و ارتباط آن با صفات ظاهری دانه در مطالعات Amarawathi و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش شد.

ارتباط نشانگرهای RM246، RM508، RM225، RM253 و RM204 با صفت بازدهی تبدیل دانه معنی‌دار بود. از بین این نشانگرها، RM225 و RM204 در مطالعه Zheng و همکاران (۲۰۰۷) و نشانگر RM508 در مطالعه Gaikwad و همکاران (۲۰۱۸) و ارتباط معنی‌دار این نشانگرها با صفت بازدهی تبدیل دانه گزارش شد.

برای صفت طول دانه سفید سه نشانگر RM104، RM276 و RM431 ارتباط معنی‌داری با این صفت نشان دادند. ارتباط بین نشانگر RM104 با طول دانه توسط بسیاری از محققین گزارش شده است (Amarawathi et al., 2008; Guleria et al., 2012). برای صفت عرض دانه سه نشانگر RM527، RM6836، RM4608، ارتباط معنی‌داری با این صفت نشان دادند. Dai و همکاران (2016) و Li-Feng و همکاران (2007) ارتباط بین نشانگرهای RM527 و RM6836 با صفت عرض دانه را گزارش کردند. برای صفت شکل دانه نیز دو نشانگر RM253 و RM549 با مطالعات قبلی مطابقت داشتند (Zheng et al., 2007; Lou et al., 2009). در این بین نشانگر RM253 با داشتن ارتباط معنی‌دار با تعداد سه صفت از مجموع صفات مطالعه شده می‌توان به عنوان یکی از نشانگرهای مناسب برای برنامه‌های به‌نژادی و بهبود کیفیت برنج استفاده نمود.

جدول ۷. نشانگرهای ریزماهوره پیوسته با صفات کیفی دانه در روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب

Variance explained by each QTL	Additive effect	LOD	QTL position	Marker interval	Chromosome	QTL	Triat
18.16	2.56	4.11	148.1	RM330-RM3827	6	<i>qpw6-1</i>	PW
13.71	0.37	3.68	138.6	RM6836-RM527	6	<i>qpw6-2</i>	
8.75	-0.46	2.69	37.1	RM190-RM587	6	<i>qpl6-1</i>	PL
19.23	1.44	4.31	84.4	RM4128-RM253	6	<i>qpl6-2</i>	
13.37	0.26	3.81	75.12	RM314-RM2615	6	<i>qps6-1</i>	PS
8.95	1.74	2.97	97.18	RM217-RM402	6	<i>qps6-2</i>	
12.23	11.37	2.83	63.1	RM225-RM584	6	<i>qbrp6-1</i>	BRP
29.63	0.76	5.59	43.36	RM9-RM246	1	<i>qmy1-1</i>	
9.63	-0.44	3.09	27.25	RM190-RM587	6	<i>qmy6-1</i>	MY
7.57	2.21	2.81	37.87	RM587-RM4608	6	<i>qmy6-2</i>	
13.41	0.38	3.75	63.45	RM225-RM584	6	<i>qmy6-3</i>	HRP
12.38	0.69	3.25	74.44	RM2615-RM314	6	<i>qmy6-4</i>	
9.54	0.14	2.61	15.93	RM220-RM243	1	<i>qhrp1-1</i>	HRP
14.56	-0.47	3.57	38.12	RM587-RM4608	6	<i>qhrp6-1</i>	
13.69	0.68	3.13	70.22	RM584-RM2615	6	<i>qhrp6-2</i>	
37.41	1.74	11.1	154.88	RM3330-RM3827	6	<i>qhrp6-3</i>	

توضیحات مربوط به علائم اختصاری صفات در جدول شماره (۲).

ادامه جدول ۷. نشانگرهای ریزماهوره پیوسته با صفات کیفی دانه در روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب

Variance explained by each QTL	Additive effect	LOD	QTL position	Marker interval	CH	QTL	Triat
21.53	0.33	4	17.8	RM220-RM243	1	<i>qgw6-1</i>	GW
17.67	0.69	3.74	5.25	RM3-RM508	6	<i>qgw6-2</i>	
8.73	0.39	2.71	42.3	RM4608-RM587	6	<i>qgw6-1</i>	
10.21	0.38	2.91	75.82	RM4128-RM314	6	<i>qgw6-2</i>	
9.23	-1.23	2.8	140.66	RM527-RM6836	6	<i>qgw6-1</i>	LAC
10.24	0.43	2.73	21.2	RM586-RM190	6	<i>qlac6-2</i>	
14.56	0.28	3.8	3.32	RM190-RM587	6	<i>qlac6-1</i>	
13.77	0.71	3.69	83.1	RM4128-RM253	6	<i>qlac1-1</i>	GS
23.91	0.47	5	70.8	RM431-RM104	1	<i>qgs6-1</i>	
8.67	-0.61	2.52	35.3	RM190-RM587	6	<i>qgs6-2</i>	
24.15	1.76	5.4	75.6	RM314-RM4128	6	<i>qgs6-3</i>	
27.13	1.72	6.3	156.3	RM3330-RM3827	6	<i>qgs6-4</i>	EL
25.33	0.27	5.61	158.43	RM7434-RM30	6	<i>qgs1-1</i>	
11.45	1.43	2.85	74.4	RM584-RM2615	6	<i>qel6-1</i>	
14.57	-0.48	3.99	125.3	RM276-RM549	6	<i>qel6-2</i>	GT
9.73	0.84	2.7	156.43	RM3330-RM3827	6	<i>qel6-3</i>	
15.73	0.39	4.61	125.63	RM549-RM6836	6	<i>qgt1-1</i>	AC
8.73	-1.26	2.76	161.3	RM7434-RM30	6	<i>qgt6-1</i>	
10.25	-0.47	2.81	66.24	RM265-RM431	1	<i>qac6-1</i>	
14.33	0.68	3.68	130.2	RM6836-RM527	6	<i>qac6-2</i>	

توضیحات مربوط به علائم اختصاری صفات در جدول شماره (۲).

و آل افزایش دهنده این صفت از والد غریب بود. Zhao و همکاران (۲۰۱۵) و Li و همکاران (۲۰۰۷) برای این صفت هر کدام یک QTL بر روی کروموزوم ۶ و نزدیک به نشانگر RM527 شناسایی کردند. همچنین Dai و همکاران (۲۰۱۶) یک QTL برای صفت عرض شلتوک بر روی کروموزوم ۶ و نزدیک به نشانگر RM6836 مکان‌یابی کردند. نتایج مشابه دیگری نیز توسط Zheng و همکاران (۲۰۰۷) بر روی کروموزوم ۶ و شناسایی مکان ژنی واجد

برای صفت عرض شلتوک تعداد دو QTL مکان‌یابی شد. *qpw6-1* در حد فواصل ناحیه‌ای نشانگر RM330-RM3827 که ۱۸/۱۶ درصد از تغییرات واریانس فنوتیپی را توجیه کرد و *qpw6-2* در حد فواصل ناحیه‌ای نشانگر RM6836-RM527 بر روی کروموزوم ۶ که توانست ۱۳/۷۱ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه کند. مقدار LOD برای آن‌ها به ترتیب ۴/۱۱، ۳/۶۸ بود. اثر افزایشی این دو QTL به ترتیب بین ۰/۳۷-۲/۵۶ میلی‌متر متغیر بود

نشانگری RM217-RM402 و RM314-RM2615 به ترتیب با LOD معادل ۰/۲۶ و ۱/۷۴ مکان‌یابی شد. درصد واریانس فنوتیپی توجیه شده برای *qps6-1*، ۱۳/۳۷ و برای *qps6-2*، ۸/۹۵ بود. اثر افزایشی برای این دو QTL بین ۰/۲۶ و ۱/۷۴ متغیر بود، همچنین هر دو والد اثر افزایشی بر این صفت داشتند. در مطالعه Swamy و همکاران (۲۰۱۲) نیز بر روی دو جمعیت مختلف BC₂F₂ به‌منظور مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با کیفیت برنج یک QTL مرتبط با صفت شکل شلتوک روی کروموزوم ۶ و نزدیک به نشانگر RM217 معرفی کردند. همچنین محققین دیگر نیز بر روی کروموزوم ۶ QTL‌های مرتبط با صفت شکل شلتوک را گزارش کرده‌اند (Zheng et al., 2007; Zhao et al., 2015).

برای صفت میزان برنج خرد تعداد یک QTL بر روی کروموزوم ۶ و در فاصله نشانگری RM225-RM584 با مقدار LOD معادل ۲/۸۳ که توانست ۱۲/۲۳ درصد از تغییرات واریانس فنوتیپی را توجیه کند. اثر افزایشی برای این QTL برابر با ۱۱/۷۳ بود. QTL شناسایی شده با نتایج Zheng و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد، آن‌ها در پژوهشی به‌منظور مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با صفات کیفی دانه در یک جمعیت لاین‌های خویش‌آمیخته توانستند یک QTL به نام *qBr6* در مجاورت نشانگر RM225 بر روی کروموزوم ۶ مکان‌یابی کنند.

برای صفت بازده تبدیل دانه تعداد پنج QTL در فواصل نشانگری، RM9-RM246، RM190-RM587، RM587-RM4608، RM225-RM584، RM2615-RM314 مکان‌یابی گردید. مقدار LOD برای این QTL‌ها به ترتیب ۵/۵۹، ۳/۰۹، ۲/۸۱، ۳/۷۵ و ۳/۲۵ بود. همچنین اثر افزایشی برای این QTL‌ها بین ۰/۴۴-۲/۲۱ متغیر بود. در تحقیقات Bernier و همکاران (۲۰۰۷) و Mallikarjuna و همکاران (۲۰۱۴)، QTL مرتبط با صفت بازده تبدیل دانه را در مجاورت نشانگر

QTL برای صفت عرض شلتوک در برنج را گزارش شده است.

برای صفت طول شلتوک تعداد دو QTL در نواحی نشانگری RM190-RM587 و RM4128-RM253 با LOD ۲/۶۹ و ۴/۳۱ مکان‌یابی شد. درصد واریانس فنوتیپی توجیه شده برای *qpl6-1* برابر با ۸/۷۵ و برای *qp6-2* ۱۹/۲۳ می‌باشد. همچنین اثر افزایشی برای این دو QTL بین ۰/۴۶- تا ۱/۴۴ متغیر بود و والد غریب آل کاهش‌دهنده و والد سپیدرود آل افزایش‌دهنده برای این صفت می‌باشد. از آنجایی‌که در مطالعات مختلف QTL‌های مرتبط با این صفت روی کروموزوم‌های مختلف مکان‌یابی شده‌اند، می‌توان اینطور نتیجه گرفت که ژن‌های کنترل‌کننده طول شلتوک در تمامی محیط‌ها به یک اندازه مساوی بیان نمی‌گردد و احتمال دارد یک ژن در یک محیط تظاهر یافته و قابل ردیابی باشد و در محیط دیگر اثر خود را بروز ندهد و قابل تفکیک نباشد. در پژوهشی توسط Guleria و همکاران (۲۰۱۲) به‌منظور مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده صفات کیفی دانه بر روی یک جمعیت اینبرلاین خویش‌آمیخته یک QTL برای صفت طول دانه بر روی کروموزوم ۶ مکان‌یابی کردند که سهم بالایی از واریانس فنوتیپی را توجیه می‌کرد. در مطالعه دیگری توسط Song و همکاران (۲۰۱۵) QTL مرتبط با این صفت بر روی کروموزوم ۶ مکان‌یابی شد که با نتایج این پژوهش هم‌راستا بود. در مطالعه Ishimaru و همکاران (۲۰۱۳) نیز QTL مرتبط با این صفت بر روی کروموزوم ۶ مکان‌یابی شد. مطالعات گسترده‌ای در زمینه مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با طول دانه شلتوک در برنج انجام گرفته است که نتایج آن‌ها حاکی از وجود چند QTL بزرگ اثر و تعداد زیادی QTL کوچک‌اثر بر روی کروموزوم‌های مختلف برنج است (Qi et al., 2012; Wang et al., 2008; Wang et al., 2012).

برای صفت شکل شلتوک تعداد دو QTL در نواحی

QTL مرتبط با صفت میزان برنج سالم را بر روی کروموزوم ۶ گزارش کردند.

برای صفت طول دانه تعداد چهار QTL در فواصل نشانگری RM204-، RM243-RM580، RM4608، RM30- و RM4128-RM253، RM340 به ترتیب با LOD، ۲/۵۱، ۲/۹، ۲/۵۹ و ۳/۱ مکان‌یابی گردید. از این تعداد یک QTL در فاصله نشانگری RM30-RM340 توانست بیش از ۲۰ درصد واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه کند. همچنین اثر افزایشی برای این QTL‌های مکان‌یابی شده بین ۰/۱۸ تا ۱/۷۴ میلی‌متر متغیر بود. والد سپیدرود آلل افزایش‌دهنده و والد غریب آلل کاهش‌دهنده برای این صفت می‌باشد. در پژوهشی توسط Yun و همکاران (۲۰۱۴) توانستند تعداد چهار QTL برای صفت طول دانه که یکی از آن‌ها بر روی کروموزوم یک و در حد فاصل نشانگرهای RM220-RM243 مکان‌یابی کنند. در پژوهش دیگری تعداد پنج QTL برای صفت طول دانه در یک جمعیت BC₁F₇ برنج مکان‌یابی شد که از این تعداد یک QTL بر روی کروموزوم یک و QTL دیگر بر روی کروموزوم ۶ بود (Lee *et al.*, 2005). همچنین Yoshida و همکاران (۲۰۰۲) نیز به منظور مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده کاراکترهای ظاهری دانه در برنج بر روی یک جمعیت دابل‌هاپلوئید موفق به مکان‌یابی تعداد چهار QTL برای این صفت شدند که یک QTL بر روی کروموزوم ۶ و نزدیک به نشانگر RM204 با پژوهش حاضر در یک راستا بود.

برای صفت عرض دانه تعداد پنج QTL در نواحی نشانگری RM220-RM243، RM3-، RM508، RM4608-RM587، RM4128-، RM314 و RM527-RM6836 به ترتیب با LOD معادل ۴، ۳/۷۴، ۲/۷۱، ۲/۹۱ و ۲/۸ مکان‌یابی شد. بیش‌ترین واریانس فنوتیپی توجیه شده مربوط به

RM4608 مکان‌یابی کردند که با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد. همچنین Zheng و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه خود یک QTL برای صفت بازده تبدیل دانه بر روی کروموزوم ۶ و در فاصله نشانگری RM225-RM253 و نزدیک به نشانگر RM225 مکان‌یابی کردند. در مطالعه دیگری توسط Aluko و همکاران (۲۰۰۴) به منظور مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده صفات کیفی دانه در برنج با استفاده از یک جمعیت BC₃F₁ برای صفت بازده تبدیل روی کروموزوم ۶ یک QTL در فاصله نشانگری RM190-RM253 و نزدیک به نشانگر RM190 مکان‌یابی شد. همچنین در تحقیقات دیگری نیز برای این صفت و بر روی کروموزوم شش، QTL‌های مرتبط شناسایی گردیده است (Gaikwad *et al.*, 2018; Hsu *et al.*, 2014).

برای صفت میزان برنج سالم تعداد چهار QTL در فواصل نشانگری RM220-RM243، RM587-RM4608، RM584-RM2615 و RM3330-RM3827 مکان‌یابی گردید. مقدار LOD برای این QTL‌ها به ترتیب ۲/۶۱، ۳/۵۷، ۳/۱۳ و ۱۱/۱ بود. اثر افزایشی برای این QTL‌ها بین -۰/۴۷، ۱/۴۷ متغیر بود. بیش‌ترین میزان واریانس فنوتیپی توجیه شده مربوط به *qhrp6-3* مجاور نشانگر RM3827 با مقدار ۳۷/۴۱ درصد بود. QTL‌های مربوط به این صفت در مطالعات زیادی گزارش شده است. در مطالعه Li و همکاران (۲۰۰۸) یک QTL مرتبط با صفت میزان برنج سالم بر روی کروموزوم ۱ و در فاصله نشانگری RM243-، RM243 و در مجاورت نشانگر RM243 مکان‌یابی شد که با نتایج این پژوهش هم‌راستا بود. Zheng و همکاران (۲۰۰۷) تعداد یک QTL برای این صفت بر روی کروموزوم یک شناسایی کردند. در تحقیقات دیگر توسط Gaikwad و همکاران (۲۰۱۸) و Aluko و همکاران (۲۰۰۴) هر کدام به تنهایی یک

واریانس فنوتیپی توجیه شده برای این QTL ها بین ۱۰/۲۴ تا ۱۴/۵۶ بود. Bao و همکاران (۲۰۰۱) از مدل های ژنتیکی برای تجزیه تحلیل ژن های مرتبط با صفت LAC برنج ایندیکا در دو محیط استفاده کردند و دریافتند که کیفیت ظاهر دانه برنج عمدتاً تحت تاثیر ژنوتیپ، اثرات اصلی ژن و تعاملات محیطی است. آن ها بر این باور بودند که انتخاب زود هنگام ارقام برای ارزیابی این صفت از دقت آزمایش می‌کاهد. Gao و همکاران (۲۰۰۴) با مکان‌یابی QTL های مرتبط با خصوصیات کیفی دانه بر روی یک جمعیت اینبردلاین، تعداد دو QTL بر روی کروموزوم ۶ و ۳ مکان‌یابی کردند که یک QTL بر روی کروموزوم ۶ توانست ۲۴/۶۴ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کند.

برای صفت الانگیته تعداد سه QTL در فواصل نشانگری RM584-RM2615، RM276-RM549 و RM3330-RM3827 به ترتیب با LOD معادل ۲/۸۵، ۳/۹۹ و ۲/۷ بیشترین تاثیر را بر این صفت داشتند. واریانس فنوتیپی توجیه شده برای این QTL ها به بین ۹/۷۳ الی ۱۱/۷۵ برآورد گردید. همچنین اثر افزایشی این QTL ها بین ۰/۴۸، -۰/۴۳ متغیر بود.

برای صفت میزان آمیلوز تعداد دو QTL مکان‌یابی شد، *qac1-1* در فواصل ناحیه‌ای نشانگر RM265- RM431 و *qac6-1* در فواصل ناحیه‌ای نشانگر RM6836-RM527 به ترتیب با LOD معادل ۲/۸۱ و ۳/۶۸، بیشترین اثر را بر روی صفت میزان آمیلوز داشتند، هر کدام به تنهایی بیش از ۱۰ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه نمودند. اثر افزایشی این دو QTL مکان‌یابی شده به ترتیب بین ۰/۴۷، -۰/۶۸ سانتی‌متر متغیر بود و آلل والد سپیدرود اثر افزایشی داشت. Fan و همکاران (۲۰۰۵) و Amarawathi و همکاران (۲۰۰۸) هر کدام یک QTL برای صفت میزان آمیلوز بر روی کروموزوم یک و نزدیک به نشانگر RM431 مکان‌یابی کردند. همچنین Rabiei و همکاران (۲۰۱۵) نیز سه QTL برای صفت میزان

qgw1-1 با ۲۱/۵۳ درصد بود. اثر افزایشی این QTL ها بین ۱/۲۳، -۰/۶۹ میلی‌متر متغیر بود همچنین والد سپیدرود آلل کاهش‌دهنده و والد غریب آلل افزایش‌دهنده برای این صفت می‌باشد. Rabiei و همکاران (۲۰۰۴)، Fu و همکاران (۲۰۱۵) و Qiu و همکاران (۲۰۱۷a) هر کدام یک QTL برای صفت عرض دانه بر روی کروموزوم ۶ و نزدیک به نشانگر RM3 معرفی کردند. همچنین در مطالعه‌ای توسط Hagiwara و همکاران (۲۰۰۶) نیز یک QTL برای عرض دانه در این ناحیه گزارش شده بود، آن ها یک QTL دیگر نیز برای این صفت نزدیک به نشانگر RM527 معرفی کردند که با نتایج این پژوهش منطبق بود. می‌توان ثبات این QTL ها را برای صفت عرض دانه برنج توسط تحقیقات مختلف نشان داد و مهر تأییدی برای استفاده از آن به‌عنوان نشانگر پیوسته با QTL صفت عرض دانه دانست.

برای صفت نسبت طول به عرض دانه تعداد پنج QTL، در نواحی نشانگری RM431-RM104، RM190-RM587، RM314-RM4128 و RM3330-RM3827 و RM7434-RM30 به ترتیب با LOD، ۵، ۲/۵۲، ۵/۴، ۶/۳ و ۵/۶۱ شکل دانه را کنترل کند. اثر افزایشی آن ها بین ۰/۶۱، -۰/۷۶ متغیر بود، اثر والد غریب و والد سپیدرود بصورت آلل‌های افزایش‌دهنده بودند. از این تعداد *qgs1-1*، *qgs6-2*، *qgs6-3* و *qgs6-4* توانستند بیش از ۲۰ درصد واریانس فنوتیپی را توجیه کنند. در مطالعات دیگری نیز برای صفت شکل دانه و در موقعیت کروموزوم شش QTL های مرتبط با این صفت معرفی گردیده است (Qiu et al., 2017b; Yu et al., 2018).

برای صفت طول دانه پس از پخت برنج تعداد سه QTL در نواحی نشانگری RM586-RM190، RM190-RM587 و RM4128-RM253 به ترتیب با LOD معادل ۲/۷۳، ۳/۸، ۳/۶۹ و اثر افزایشی بین ۰/۲۸، ۰/۷۱ مکان‌یابی گردید. میزان

به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که برای بسیاری از صفات مورد مطالعه حداقل یک QTL با اثر نسبتاً بزرگ و چند QTL با اثرات کوچک‌تر شناسایی شدند. اگرچه انجام مطالعات بیشتر و استفاده از جمعیت‌های دیگر برای به دست آوردن نتایج دقیق‌تر امری ضروری است، اما با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان از نشانگرهای پیوسته با QTL‌های بزرگ‌اثر کنترل‌کننده صفات مورد نظر در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر (MAS) استفاده نمود. نتایج این پژوهش می‌تواند در جهت برنامه‌ریزی اصلاحی به منظور ایجاد ارقام متنوع‌تر برای صفات مختلف مد نظر قرار گیرد. همچنین با توجه به وجود تعداد زیادی ارقام برنج در بانک ژن لازم است بررسی‌های دقیق‌تر مولکولی برای اطلاع از ذخایر ژنتیکی موجود در بانک ژن به عمل آید.

آمیلوز روی کروموزوم‌های ۱، ۶ و ۷ مکان‌یابی کردند که *qAC-6* با LOD معادل ۹/۴۹ بر روی کروموزوم ۶ به عنوان یک QTL بزرگ‌اثر به‌تنهایی توانست نزدیک به ۴۰ درصد از تنوع فنوتیپی صفت میزان آمیلوز را توجیه کند.

در این پژوهش تعداد دو QTL برای صفت درجه حرارت ژلاتینی شدن مکان‌یابی شد، *qgt6-1* در حدفاصل ناحیه نشانگر RM549-RM6836 و *qgt6-2* در فواصل ناحیه نشانگر RM7434-RM30 به ترتیب با LOD ۴/۶۱، ۲/۷۶ بیش‌ترین تاثیر را بر روی صفت درجه حرارت ژلاتینی داشتند، و هر کدام به تنهایی بیش از ۸ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه نمودند. Sabouri و همکاران (۲۰۱۲) برای صفت درجه حرارت ژلاتینی شدن یک QTL نزدیک به نشانگر RM7434 را مکان‌یابی کردند که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت.

REFERENCES

- Allahgholipour M, Moumeni A, Nahvi M, Yekta, M, Zarbafi SS (2012) Identification of parental combinations for improvement of rice grain quality, yield and yield components in rice. *Cereal Research*. 1(1): 1-10.
- Aluko G, Martinez C, Tohme J, Castano C, Bergman C, Oard JH (2004) QTL mapping of grain quality traits from the interspecific cross *Oryza sativa*×*O. glaberrima*. *Theoretical and Applied Genetics*. 109(3): 630-639.
- Amarawathi Y, Singh R, Singh AK, Singh VP, Mohapatra T, Sharma TR, Singh NK (2008) Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*. 21(1): 49-65.
- Bao J (2014) Genes and QTLs for rice grain quality improvement. In *Tech-Open Science Open Mind*. 239-278.
- Bao J, Xie J, Xia Y (2001) Genetic analysis of cooked rice elongation in Indica rice (*Oryza sativa* L.). *Zuo wu xue bao*. 27(4): 489-492.
- Bastin C, Zeng B (2001) QTL Cartographer: A refrens manual and totorial for QTL mapping. North Carolina State Univercity. USA. PP.163.
- Bazrkar-Khatibani L, Fakheri BA, Hosseini-Chaleshtori M, Mahender A, Mahdinejad N, Ali J (2019) Genetic Mapping and Validation of Quantitative Trait Loci (QTL) for the Grain Appearance and Quality Traits in Rice (*Oryza sativa* L.) by Using Recombinant Inbred Line (RIL) Population. *International Journal of Genomics*. 2019.
- Bernier J, Kumar A, Ramaiah V, Spaner D, Atlin G (2007) A large-effect QTL for grain yield under reproductive-stage drought stress in upland rice. *Crop Science*. 47(2): 507-516.
- Bian J, Li C, He H, Shi H, Yan S (2014) Identification and analysis of QTLs for grain quality traits in rice using an introgression lines population. *Euphytica*. 195(1): 83-93.

- Borale SU, Kumbhar SD (2021) Use of Simple Sequence Repeat Marker to Assess the Segregating Population of Rice (*Oryza sativa* L.) in field for Grain Length Quality Parameter. European Journal of Agriculture and Food Sciences. 3(1): 132-135.
- Dai L, Wang L, Leng Y, Yang Y, Huang L, Chen L, Zhu L (2016) Quantitative trait loci mapping for appearance quality in short-grain rice. Crop Science. 56(4): 1484-1492.
- Deborah DA, Vemireddy LR, Roja V, Patil S, Choudhary GP, Noor S, Anuradha G (2017) Molecular dissection of QTL governing grain size traits employing association and linkage mapping in Basmati rice. Molecular Breeding. 37(6). 77.
- Ebadi AA, Farshadfar E, Rabiei B (2013) Mapping QTLs controlling cooking and eating quality indicators of Iranian rice using RILs across three years. Australian Journal of Crop Science. 7(10). 1494.
- Eizenga GC, Neves PC, Bryant RJ, Agrama HA, Mackill DJ (2016) Evaluation of a M-202× *Oryza nivara* advanced backcross mapping population for seedling vigor, yield components and quality. Euphytica. 208(1): 157-171.
- Fan CC, Yu XQ, Xing YZ, Xu CG, Luo LJ, Zhang Q (2005) The main effects, epistatic effects and environmental interactions of QTLs on the cooking and eating quality of rice in a doubled-haploid line population. Theoretical and Applied Genetics. 110(8): 1445-1452.
- Fu JR, Zhu LX, Sun XT, Zhou DH, Ouyang LJ, Bian JM, Xu J (2015) Genetic analysis of grain shape and weight after cutting rice husk. Genet Mol Res. 14(4): 17739-17748.
- Gaikwad KB, Singh N, Bhatia D, Sharma N, Bains NS, Bharaj TS, Singh K (2018) Heterotic response of genomic regions derived from *Oryza rufipogon* and *O. nivara* in improving grain morphology and quality of indica rice (*Oryza sativa* L.). Indian J. Genet. 78(2): 155-165.
- Gao YM, Zhu J, Song, YS, He CX, Shi CH, Xing YZ (2004) Analysis of digenic epistatic effects and QE interaction effects QTL controlling grain weight in rice. Journal of Zhejiang University-SCIENCE A. 5(4): 371-377.
- Guleria S, Sharma V, Marathi B, Anand S, Singh N.K, Mohapatra T, Singh A.K (2012) Molecular mapping of grain physico-chemical and cooking quality traits using recombinant inbred lines in rice (*Oryza sativa* L.). Journal of plant biochemistry and biotechnology. 21(1): 1-10.
- Hagiwara WE, Onishi K, Takamura I, Sano Y (2006) Transgressive segregation due to linked QTLs for grain characteristics of rice. Euphytica. 150(1): 27-35.
- Halder T, Hoque ME, Islam MM, Ali L, Chowdhury AK (2016) Morphomolecular characterization of local boro rice (*Oryza sativa* L.) germplasm. Bangladesh Journal of Plant Breeding and Genetics. 29(2): 01-09.
- Hosseini-Chaleshtori M, Sorkheh K (2014) Rice Quality (Aspects of Quantitative, Molecular and Genomic). Sina-Teb Press, Tehran, Iran, P. 178.
- Ishimaru K, Hirotsu N, Madoka Y, Murakami N, Hara N, Onodera H, Katoh E (2013) Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. Nature genetics. 45(6): 707-711.
- Juliano BO, Villareal CP (1993) Grain quality evaluation of world rices. Int. Rice Res. Inst.
- Kim HY, Kim KM (2016) Mapping of grain alkali digestion trait using a *Cheongcheong/Nagdong* doubled haploid population in rice. Journal of Plant Biotechnology. 43(1): 76-81.
- Kordrostami M, Rabiei B, Sabouri A, Sabouri H (2015) Identification of QTLs Controlling Cooking and Milling Quality Traits in an F2: 4 Population of Rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Crop Breeding. 7(16): 16-26.

- Kosambi DD (1943) The estimation of map distance from recombination values, *Annals of Human Genetics*. 12: 172-175.
- Lee SH (2005) Analysis of rice quality and environmental factors based on different agricultural regions in Gyeongbuk province (Doctoral dissertation, Ph D. Dissertation Thesis, Kyungpook National University, Daegu).
- Li SQ, CUI GK, GUAN CR, Jun WANG, LIANG GH (2011) QTL detection for rice grain shape using chromosome single segment substitution lines. *Rice Science*. 18(4): 273-278.
- Li-Feng L, Hong-Liang Z, Ping M, Yan-Ying Q, Zi-Chao L (2007) Construction and evaluation of near-isogenic lines for major QTLs of basal root thickness and 1000-grain-weight in lowland and upland rice. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*. 4(3): 199-205.
- Lou J, Chen L, Yue G, Lou Q, Mei H, Xiong L, Luo L (2009) QTL mapping of grain quality traits in rice. *Journal of cereal science*. 50(2): 145-151.
- Mallikarjuna BP, Shivakumar N, Devendrappa J, Sheela VD, Bharamappa G, Halikatti G (2014) Combining ability analysis for grain yield and its attributes in Rice (*Oryza sativa* L.). *SAARC Journal of Agriculture*. 12(1): 1-8.
- Maroof MS, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(12): 5466-5470.
- Mei D, Yu Z, Gong C, Chen X, Zhu Q, Wang S (2018) Validation and Fine Mapping a Multifunction Region *qPCG10/qDC10* Conferring Chalkiness and Grain Shape of Rice. *Crop Science*. 58(2): 639-649.
- Ooijen J W, Voorrips RE (2002) JoinMap: version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. University and Research Center.
- Pang Y, Ali J, Wang X, Franje NJ, Revilleza JE, Xu J, Li Z (2016) Relationship of rice grain amylose, gelatinization temperature and pasting properties for breeding better eating and cooking quality of rice varieties. *PLoSOne*. 11(12). e0168483.
- Ponce KS, Ye G, Zhao X (2018) Qtl identification for cooking and eating quality in indica rice using multi-parent advanced generation intercross (MAGIC) population. *Frontiers in plant science*. 9.868.
- Qi P, Lin YS, Song XJ, Shen JB, Huang W, Shan JX and Lin HX (2012) The novel quantitative trait locus *GL3.1* controls rice grain size and yield by regulating *Cyclin-T1*;3. *Cell research*. 22(12): 1666-1680.
- Qiu X, Chen K, Lv W, Ou X, Zhu Y, Xing D, Li Z (2017a) Examining two sets of introgression lines reveals background-independent and stably expressed QTL that improve grain appearance quality in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 130(5): 951-967.
- Qiu X, Du B, Hu H, Ou X, Lv W, Yang L, Wang X (2017b) Scanning QTLs for Grain Shape using Two Sets of Introgression Lines in Rice. *International Journal of Agriculture and Biology*. 19(3).
- Rabiei B, Kordrostami M, Sabouri A (2015) Identification of QTLs for yield related traits in indica type rice using SSR and ALFP markers, *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 80: 91-99.
- 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(3): 325-332.

- Sabouri A, Rabiei B, Toorchi M, Aharizad S, Moumeni A (2012) Mapping quantitative trait loci (QTL) associated with cooking quality in rice (*Oryza sativa* L.). Australian Journal of Crop Science. 6(5): 808-814.
- Song XJ, Kuroha T, Ayano M, Furuta T, Nagai K, Komeda N, Ashikari M (2015) Rare allele of a previously unidentified histone H4 acetyltransferase enhances grain weight, yield, and plant biomass in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 112(1): 76-81.
- Sravani D, Neeraja CN, Ravindrababu V, Reddy MR (2020) Identification of SSR Markers Linked to Regions Associated with Protein Content in F2 Population of Rice (*Oryza sativa* L.). Current Journal of Applied Science and Technology. 32-37.
- Swamy B M, Kaladhar K, Shobha Rani N, Prasad GSV, Viraktamath BC, Reddy GA, Sarla N (2012) QTL analysis for grain quality traits in 2 BC2F2 populations derived from crosses between *Oryza sativa* cv Swarna and 2 accessions of *O.nivara*. Journal of Heredity. 103(3): 442-452.
- Tavassoli F (2003) Assessment of periodical storage on cooking Rice quality. Rice Research Institute of Iran (RRII) Edt. 23 pp.
- Wang E, Wang J, Zhu X, Hao W, Wang L, Li Q, Ma H (2008) Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. Nature genetics. 40(11). 1370.
- Wang LQ, Liu WJ, Xu Y, He YQ, Luo LJ, Xing YZ, Zhang Q (2007) Genetic basis of 17 traits and viscosity parameters characterizing the eating and cooking quality of rice grain. Theoretical and Applied Genetics. 115(4): 463-476.
- Wang S, Wu K, Yuan Q, Liu X, Liu Z, Lin X, Fu X (2012) Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. Nature genetics. 44(8). 950.
- Yamamoto T, Nagasaki H, Yonemaru JI, Ebana K, Nakajima M, Shibaya T, Yano M (2010) Fine definition of the pedigree haplotypes of closely related rice cultivars by means of genome-wide discovery of single-nucleotide polymorphisms. BMC genomics. 11(1): 1-14.
- Yan B, Liu R, Li Y, Wang Y, Gao G, Zhang Q, He Y (2014) QTL analysis on rice grain appearance quality, as exemplifying the typical events of transgenic or backcrossing breeding. Breeding science. 64(3): 231-239.
- Yao X, Wang J, Liu J, Zhang J, Ren C, Ma D, Xu Z (2017) Mapping quantitative trait loci associated with starch paste viscosity in rice (*Oryza sativa* L.) under different environmental conditions. Plant Breeding. 136(5): 591-602.
- Yoshida S, Ikegami M, Kuze J, Sawada K, Hashimoto Z, Ishii T, Kamijima O (2002) QTL analysis for plant and grain characters of sake-brewing rice using a doubled haploid population. Breeding Science. 52(4): 309-317.
- Yu J, Miao J, Zhang Z, Xiong H, Zhu X, Sun X, Li Z (2018) Alternative splicing of Os LG 3b controls grain length and yield in japonica rice. Plant biotechnology journal 16(9):1667-1678.
- Yun BW, Kim MG, Handoyo T, Kim KM (2014) Analysis of rice grain quality-associated quantitative trait loci by using genetic mapping. American Journal of Plant Sciences. 5(09). 1125.
- Zhang QF, Zhang YD, Zhen ZHU, Ling ZHAO, Zhao QY, Ling XU, Wang CL (2008) Inheritance analysis and QTL mapping of rice starch viscosity (rapid visco analyzer profile) characteristics. Rice Science. 15(3): 186-194.
- Zhang S, Hao H, Liu X, Li Y, Ma X, Liu W, Luan W (2021) SDG712, a Putative H3K9-Specific Methyltransferase Encoding Gene, Delays Flowering through Repressing the Expression of Florigen Genes in Rice. Rice 14(1):1-13.

- Zhao D, Li P, Wang L, Sun LXiaD, Luo L, He Y (2017) Genetic dissection of large grain shape in rice cultivar 'Nanyangzhan' and validation of a grain thickness QTL (*qGT3.1*) and a grain length QTL (*qGL3.4*). *Molecular breeding*. 37(3). 42.
- Zhao X, Zhou L, Ponce K, Ye G (2015) The usefulness of known genes/QTLs for grain quality traits in an indica population of diverse breeding lines tested using association analysis. *Rice*. 8(1): 1-13.
- Zheng TQ, Xu JL, Li ZK, Zhai HQ, Wan JM (2007) Genomic regions associated with milling quality and grain shape identified in a set of random introgression lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant breeding*. 126(2): 158-163.
- Zhou H, Xia D, He Y (2020) Rice grain quality traditional traits for high quality rice and health-plus substances. *Molecular Breeding*. 40(1): 1-17.
- Zhou J, You A, Ma Z, Zhu L, He G (2012) Association analysis of important agronomic traits in japonica rice germplasm. *African journal of Biotechnology*. 11(12): 2957-2970.