دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات

دوره هفتم/ شماره چهارم/ زمستان ۱۳۹۶ (۴۶۹-۴۵۱)

مکان‌یابی QTLهای مرتبط با ویژگی‌های ریشه و اندام هوایی برنج در لاین‌های نوترکیب حاصل از تلاقی عنبربو × سپیدرود تحت تنش خشکی

حسین صبوری*[۱]، شریفه محمدآلق[۲]، عبدالطیف قلی‌زاده[۳] و جعفر گیلکی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۲۲

چکیده

به‌منظور شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با تحمل به تنش خشکی با استفاده از روش تجزیه QTL، ۹۶ لاین F_8 مشتق از تلاقی بین دو رقم برنج ایرانی سپیدرود و عنبربو در مزرعه تحقیقاتی در منطقه آزاد شهر استان گلستان در سال زراعی ۱۳۹۰ کشت شدند. برای اعمال تنش خشکی از مرحله حداکثر پنجه‌زنی تا زمان رسیدگی به فاصله ۲۰ روز آبیاری انجام شد. نقشه پیوستگی با استفاده از ۱۲۴ نشانگر ریزماهواره و ۲۶۴ نشانگر AFLP در آزمایشگاه ژنتیک و اصلاح نباتات دانشگاه گنبد کاووس تهیه شد که ۱۹۵۰/۴ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را با متوسط فاصله ۵/۲۰ سانتی‌مورگان بین نشانگرها پوشش داد. نتایج این مطالعه نشان داد که ناحیه‌ای از کروموزوم ۲ در فاصله E070-M140-1-E070-M150-13، کروموزوم ۴ در فاصله E060-M160-3-RM1359 و کروموزوم ۹ در فاصله E120-M140-9-E090-M140-14 کنترل چندین صفت را تحت شرایط تنش خشکی به عهده داشتند. این هم‌مکانی QTLهای کنترل کننده چند صفت می‌تواند نشان دهنده کنترل ژنتیکی یکسان آن‌ها تحت شرایط تنش باشد. مکان‌یابی QTLها نشان داد که QTLهای qDWRD-2a، qDWRD-4a، qRVD-2، qRVD-4a، qRND-2a، qRND-4a، qPND-2a، qPND-4، qPWD-2، qPWD-4، qSWD-2a، qSWD-4، qFRWD-2، qFRWD-4، و qPSPD-9 بزرگ اثر بودند و بیش از ۲۰ درصد از تنوع فنوتیپی صفات را توجیه کردند. با توجه به اینکه این نواحی ژنومی سهم قابل توجهی از تغییرات فنوتیپی صفات را توجیه می‌کنند، از این‌رو پتانسیل استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی انتخاب به کمک نشانگر برای تحمل به خشکی پس از تعیین اعتبار آن‌ها در جمعیت‌های دیگر وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه QTL، نشانگرهای مولکولی، نقشه‌های پیوستگی

۱- دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
۳- استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
* نویسنده مسئول: hos.sabouri@gmail.com

مقدمه

برنج یک محصول زراعی مهم جهان است که به عنوان وعده غذایی اصلی برای یک سوم از مردم دنیا محسوب می‌شود (Khush, 1997). تنش خشکی از مهم‌ترین تهدیدهای جهانی برای تولید مواد غذایی است. همچنین خشکی مهم‌ترین عامل محدود کننده سازگاری ارقام پر محصول برنج به خصوص در محیط‌های خشک و دیم است که در آن دوره‌های کوتاه کمبود آب خسارت زیادی ایجاد می‌کند (Lafitte *et al*., 2007). علاوه بر این تغییرات آب و هوا، افزایش جمعیت جهان ابعاد این مشکل را گسترده‌تر می‌نماید. یکی از راه‌حل‌های این مشکل ایجاد ارقام جدید با تحمل بیشتر نسبت به تنش خشکی است (Takeda and Matsuoka, 2008).

آشنایی با اساس ژنتیکی مقاومت به خشکی در برنج فعالیتی است برای توانایی اصلاح‌گران و زیست شناسان مولکولی تا ارقامی جدید با ویژگی‌های مقاومت به خشکی را توسعه دهند. در این راستا از نشانگرهای مولکولی در بسیاری از مطالعات استفاده می‌شود. مکان‌یابی ژن‌ها راه حلی است که می‌تواند برای درک اطلاعات آللی درQTLهای (مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی) کنترل کننده مورد استفاده قرار گیرد (Byrne and McMullen, 1996; Pflieger *et al*., 2001). نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن‌های مرتبط با صفات موردنظر می‌توانند در جهت بهبود کارایی روش‌های اصلاحی به کار روند. به دست آوردن نقشه‌های ژنتیکی از مهم‌ترین کاربردهای نشانگرها است که با استفاده از آن می‌توان جایگاه ژنی و کروموزومی ژن‌های کنترل کننده صفات مطلوب را از نظر ترتیب و فاصله ژن‌ها و نشانگرها از یکدیگر تعیین نمود (Rafalski *et al*., 1996). از مهم‌ترین صفاتی که در بررسی‌های مرتبط با تحمل به خشکی مدنظر قرار می‌گیرند با ساختار ژنتیکی ریشه در ارتباط هستند. این صفات بسیار پیچیده بوده و با ژن‌های زیادی با اثرات کم کنترل می‌شوند (Sharma *et al*., 2011). در میان صفات ریخت شناسی ریشه صفات طول ریشه، وزن خشک ریشه، حجم ریشه و نسبت وزن ریشه به ساقه بیشترین ارتباط را با مقاومت به خشکی در برنج دارند (O'Toole and Soemartono, 1981; Yoshida and Hasegawa, 1982; Venuprasad *et al*., 2002). تنوع ژنتیکی قابل توجهی در میان ارقام مختلف برنج از نظر صفات مورفولوژیک ریشه (O'Toole and Bland, 1987) از قبیل قطر ریشه (Armenta-Soto *et al*., 1983) عمق ریشه (Nicou *et al*., 1970; Yadav *et al*., 1997; Mambani and Lal, 1983; Nemoto *et al*., 1998)، نیروی کشش ریشه (O'Toole and Bland, 1987; Ekanayake *et al*., 1985)، نسبت ریشه‌های عمیق به ساقه (Yoshida and Hasegawa, 1982)، تعداد ریشه (Armenta Soto *et al*., 1983) و توانایی نفوذ ریشه (Babu *et al*., 2001; Clark *et al*., 2008; Ali *et al*., 2000) وجود دارد. انواع نتاج مورد استفاده در مطالعات QTL ریشه برنج شامل F_2 (Price and Tomos, 1997)، لاین بک کراس خالص (Kato *et al*., 2008)، لاین‌های دابل هاپلوئید (Yadav *et al*., 1997; Zheng *et al*., 2000; Toorchi *et al*., 2002; Babu *et al*., 2003; Kamoshita *et al*., 2002a) و بیش از همه لاین خالص نوترکیب (Champoux *et al*., 1995; Ray *et al*., 1996; Price *et al*., 2000; Ali *et al*., 2000; Kamoshita *et al*., 2002b; Zheng *et al*., 2003) بوده است.

پرایس و توماس (Price and Tomos, 1997) با تشکیل جمعیت F_2 حاصل از تلاقی ۲ رقم متحمل به خشکی Bala و Azucena، مکان‌یابی صفات مرتبط با ریشه برنج را در شرایط خشکی مورد مطالعه قرار دادند. این محققین از ۷۱ نشانگر RFLP برای تهیه نقشه پیوستگی ۱۷۸ لاین استفاده کردند که این نقشه ۱۲۸۰ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد. آن‌ها توانستند یک QTL برای طول ریشه ۲۸ روز پس از کاشت، یک QTL برای حجم ریشه و دو QTL برای ضخامت ریشه و QTLهایی برای حداکثر طول ریشه در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از کاشت شناسایی نمایند. صبوری و همکاران (Sabouri *et al*. 2012) برای شناسایی QTLهای برخی صفات مرتبط با تحمل به خشکی در برنج از ۱۹۲ خانواده حاصل از تلاقی ارقام شاه‌پسند و IR28 استفاده و نقشه پیوستگی جمعیت را با استفاده از ۳۳ نشانگر ریزماهواره با طول ۳۶۶ سانتی‌مورگان تهیه کردند. آن‌ها توانستند یک QTL برای تعداد پنجه، دو QTL برای وزن خوشه، دو QTL برای طول خوشه، دو QTL برای خروج خوشه، یک QTL برای ارتفاع بوته، سه QTL برای وزن دانه، سه QTL برای تعداد دانه پر، یک QTL برای تعداد خوشه‌چه، یک QTL برای روز گلدهی، دو QTL برای سوختگی برگ، سه QTL برای لوله شدن برگ و سه QTL برای باروری روی کروموزوم‌های ۱ و ۶

شناسایی کنند. همچنین نگین و بو (Nguyen and Buu, 2010) به کمک ۲۲۰ لاین BC_2F_2 از تلاقی ارقام OM1490 و WAB880-1-38-18-20-P1-HB، پنج QTL برای تحمل به خشکی در گلدهی، دو QTL برای طول ریشه و دو QTL برای وزن خشک ریشه مکان‌یابی نمودند. نشانگرهای مرتبط با خشکی در مطالعه آن‌ها بیشتر روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۴، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲ قرار داشتند. آن‌ها توانستند نقشه پیوستگی ۲۳۲ نشانگر ریزماهواره که حدود ۲۵۵۳/۷ سانتی‌مورگان از کل ژنوم برنج را با فاصله متوسط ۱۰/۹۷ سانتی‌مورگان بین نشانگرها پوشش می‌داد تهیه نمایند. هدف از این پژوهش شناسایی QTLهای کنترل کننده صفات اساسی در ریشه و اندام هوایی برنج با استفاده از روش نقشه برداری QTL و تعیین سهم هر یک از نشانگرها در توجیه تنوع فنوتیپی صفات مذکور بوده است. در این پژوهش از عنبربو به عنوان والد پدری و سپیدرود به عنوان والد مادری استفاده شد. عنبربو نسبت به تنش خشکی نسبتا متحمل و سپیدرود حساس می‌باشد (Sabouri *et al.*, 2011).

مواد و روش‌ها

جمعیت گیاهی

جمعیت گیاهی مورد تحقیق ۹۶ لاین نوترکیب نسل هشتم بود که از تلاقی ارقام عنبربو × سپیدرود تهیه شده بود. نسل اول تلاقی در سال زراعی ۸۳-۱۳۸۲ در موسسه تحقیقات برنج کشور-رشت تهیه شد و سپس نسل‌های در حال تفکیک در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه گنبد کاووس تا نسل F_8 به روش بالک تک‌بذری توسعه یافت. در این تلاقی از عنبربو به‌عنوان والد پدری و سپیدرود به‌عنوان والد مادری استفاده شد. عنبربو نسبت به تنش خشکی نسبتاً متحمل و سپیدرود حساس می‌باشد (Sabouri *et al.*, 2011).

ارزیابی‌های فنوتیپی

به‌منظور ثبت داده‌های فنوتیپی، ۹۶ لاین حاصل از تلاقی در سه تکرار در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی کاشته شدند. ۱۵ بوته از هر لاین در یک خط سه متری در هر تکرار کاشت شد. فاصله بین بوته روی هر ردیف ۲۵ سانتی متر و فاصله بین ردیف‌ها نیز ۲۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. ۱۰ بوته از ۱۵ بوته کشت شده در هر تکرار به طور تصادفی انتخاب شد و با استفاده از بیل اطراف هر بوته به شعاع ۲۵ سانتی‌متر مشخص شد و با عمق ۵۰ سانتی‌متر بوته‌ها از خاک خارج شدند. به‌منظور اعمال تنش خشکی از مرحله حداکثر پنجه‌زنی (۴۰ روز پس از نشاء) تا زمان رسیدگی با فاصله ۲۰ روز آبیاری انجام شد. برای محاسبه پتانسیل اسمزی خاک در زمان آبیاری نمونه خاک از زمین تهیه و سپس در آون به مدت ۴۸ ساعت توزین شد. با توجه به منحنی رطوبتی خاک میانگین اسمزی خاک در دو مرحله آبیاری به‌ترتیب ۱۰ و ۱۵ بود.

جهت خروج بوته‌ها از خاک با توجه به اینکه در اثر خشکی این امر امکان‌پذیر نبود زمین به مدت ۲ روز تحت آبیاری قرار گرفت تا بوته‌ها به راحتی از خاک خارج شوند. پس از خارج‌سازی بوته‌ها از خاک با استفاده از روش شوویلومیکس (Shovelomics) (Trachsel *et al.*, 2010) ابتدا بوته‌ها به مدت هفت روز در آب غوطه‌ور شدند. سپس تحت فشار آب، خاک‌های ریشه‌ها خارج و بوته‌ها به آزمایشگاه منتقل و کاملاً بخش ریشه و بخش اندام هوایی از هم جدا شدند. برای ثبت خصوصیات ریشه، تک تک ریشه‌های گیاه جدا و تعداد ریشه‌های کمتر از ۵ سانتی‌متر، تعداد ریشه بین ۷-۶ سانتی‌متر، تعداد ریشه بین ۲۰-۸ سانتی‌متر، تعداد ریشه‌های بین ۳۰-۲۱ سانتی‌متر و تعداد ریشه‌های بیشتر از ۳۰ سانتی‌متر ثبت و طول آن‌ها اندازه‌گیری شد. حجم ریشه‌ها با غوطه‌ور کردن ریشه‌ها در استوانه مدرج ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. وزن خشک ریشه‌ها پس از قرار دادن در آون به مدت ۴۸ ساعت و دمای ۷۲ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد. با استفاده از اندام‌های هوایی صفات مرتبط مانند تعداد خوشه، ارتفاع گیاه، وزن ساقه، وزن کاه، طول خوشه، تعداد دانه پر، وزن دانه‌های پر و تعداد خوشه‌چه ثبت شدند.

ارزیابی‌های مولکولی

DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB از برگ‌های جوان بوته‌های نسل هشتم (Saghai Maroof *et al.*, 1994) در آزمایشگاه ژنتیک و اصلاح نباتات دانشگاه گنبد کاووس استخراج شد. کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفروز ژل آگارز یک درصد و غلظت نمونه‌های DNA به کمک DNA فاژ لامبدا با غلظت مشخص و به‌کمک دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین شد. در این پژوهش از نشانگرهای SSR و AFLP استفاده شد و گروه‌های پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار Map Manager (Manly and Olson, 1999) ایجاد شدند. از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب جامع (Inclusive composite

(interval mapping (Wang, 2009) و نرم‌افزار QGENE (Nelson, 1997) جهت مکان‌یابی صفات مورد بررسی استفاده شد. برای تعیین حد بحرانی جهت تشخیص QTLهای مفروض از آزمون جایگشت با ۱۰۰۰ مرتبه تکرار استفاده شد. آزمون‌های جایگشت LOD برابر با ۲ را برای حد بحرانی تشخیص دادند.

نشانگرهای ریزماهواره

برای مطالعه چندشکلی در والدین (عنبربو و سپیدرود) تعداد ۳۶۵ جفت نشانگر چندشکل ارایه شده توسط چن و همکاران (Chen *et al*., 1997)، تمنیخ و همکاران (Temnykh *et al*., 2000) و مک‌کوش و همکاران (McCouch *et al*., 2002) انتخاب شدند که از این تعداد ۱۳۶ آغازگر چندشکل بودند. برای نمونه‌های DNA لاین‌های نوترکیب بر اساس وجود چندشکلی و وضوح نوارها، تعداد ۱۲۴ آغازگر چندشکل برای الکتروفورز انتخاب شدند. مقادیر بهینه شده مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در جدول ۱ ارایه شده است. از ژل اکریل‌آمید واسرشته‌ساز ۶ درصد برای تفکیک نوارها استفاده و رنگ‌آمیزی ژل‌ها به روش نیترات نقره انجام شد.

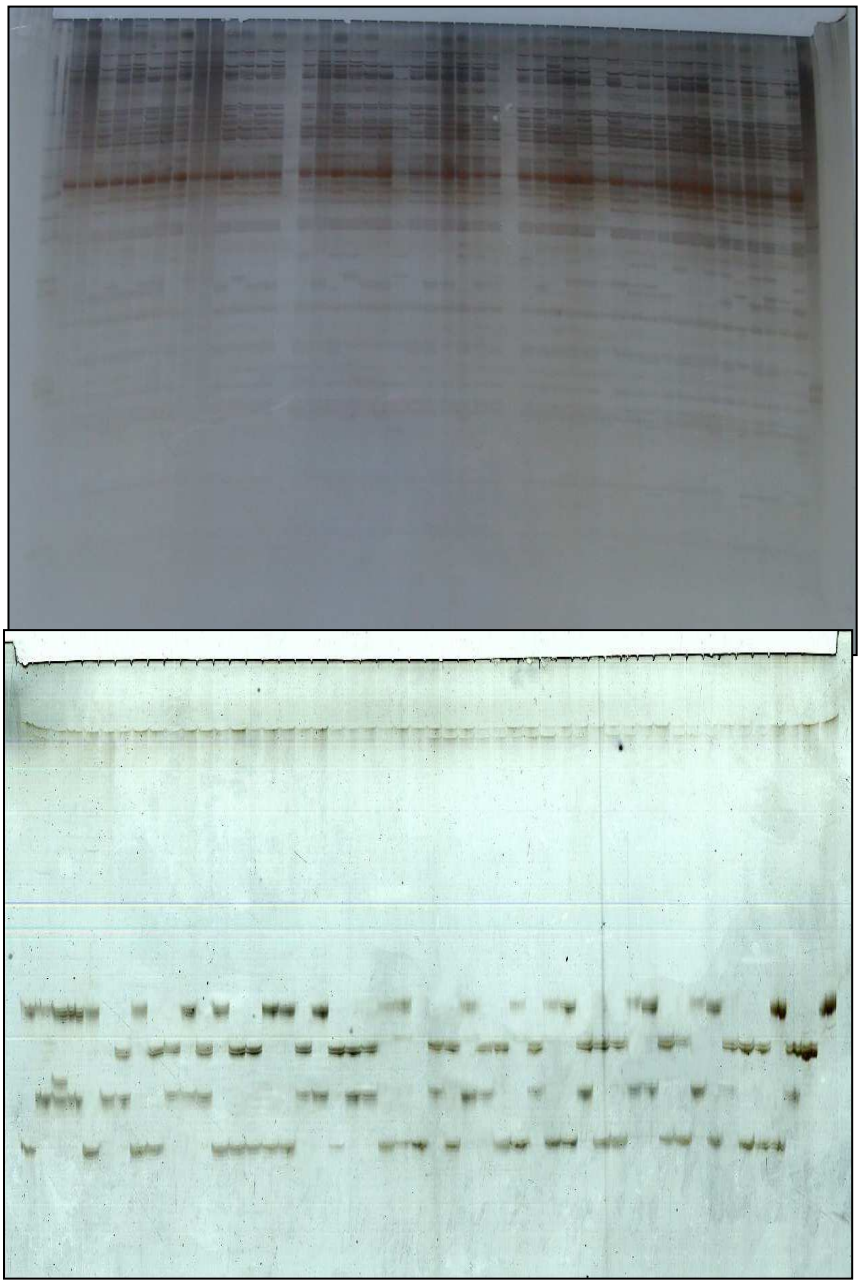
جدول ۱- مقادیر بهینه شده مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 1. Optimized concentrations of the materials used in polymerase chain reaction

ماده Material	مقدار برای یک واکنش (میکرولیتر) Optimized value for one reaction (µl)	غلظت Concentration
کلرید منیزیم $MgCl_2$	1.6	۱۵ میلی مول 15 mmol
بافر PCR PCR buffer	1.0	۱۰ برابر (۱۰X)
مخلوط دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها [dNTPs]	1.2	۱ میلی مول 1 mmol
آغازگر همسو Forward primer	0.4	۱۰ میکرومول (۶۰ نانوگرم در میکرولیتر) 10 µmol (60 ngr per µl)
آغازگر معکوس Reverse primer	0.4	۱۰ میکرومول (۶۰ نانوگرم در میکرولیتر) 10 µmol (60 ngr per µl)
آنزیم Taq پلیمراز Taq polymerase	0.2	۱ واحد 1 unit
DNA الگو DNA template	2	۱۰ نانوگرم در میکرولیتر 10 ngr per µl
آب دوبار تقطیر استریل Deionized water	3.20	-
حجم کل واکنش Reaction volume	10	-

نشانگرهای AFLP

واکنش AFLP بر اساس روش وس و همکاران *et al*., (Vos 1995) صورت گرفت. DNA ژنومی به کمک آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Mse*I (Ferments) هضم و سپس دو نوع آداپتور آنزیم‌های برشی فوق به انتهای قطعات برش خورده متصل شدند. مرحله پیش‌تکثیر به صورت انتخابی با یک نوکلئوتید اضافی در انتهای'۳، EcoRI: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3′ و MseI: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAA-3' انجام شد (جدول ۲). محصولات حاصل از پیش‌تکثیر انتخابی به نسبت ۱۰:۱ رقیق شده و با ۲۱ ترکیب چند شکل (از ۳۵ ترکیب آغازگری) دارای دو نوکلئوتید اضافی دیگر در انتهای '۳ (علاوه بر یک نوکلئوتید در پیش‌تکثیر) تحت چرخه حرارتی Touch down شامل سه مرحله دمایی مختلف تکثیر شدند. جدول ۲ ترکیبات آغازگری استفاده شده در روش AFLP را نشان می‌دهد. برای این نشانگر نیز از ژل اکریل‌آمید واسرشته ساز ۶ درصد برای تفکیک نوارها استفاده و رنگ‌آمیزی ژل‌ها به روش نیترات نقره انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱- نمونه‌ای از ژل‌های حاصل از نشانگر AFLP (ترکیب آغازگری E080-M150) برای تعیین ژنوتیپ لاین‌های ۱ تا ۴۸ (بالا) و نشانگر ریزماهواره RM420 برای تعیین ژنوتیپ لاین‌های ۱ تا ۹۶ (پایین).

Figure 1. An example of gels derived from AFLP markers (E080-M150 primer combinations) for genotyping of 1 to 48 F_8 lines (up) and the SSR markeer RM420 for genotyping of 1 to 96 lines (down).

جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده در روش AFLP در این تحقیق

Table 2. Primer combinations used in AFLP method in this research

*Eco*RI Primers		*Mse*I Primers		چند شکلی Polymorphism
Primer	DNA Sequence	Primer	DNA Sequence	
E060	GACTGCGTACCAATTCAAG	M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC	Polymorph چندشکل
E060	GACTGCGTACCAATTCAAG	M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA	Polymorph چندشکل
E060	GACTGCGTACCAATTCAAG	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT	Polymorph چندشکل
E060	GACTGCGTACCAATTCAAG	M180	GATGAGTCCTGAGTAAAAT	Polymorph چندشکل
E060	GACTGCGTACCAATTCAAG	M190	GATGAGTCCTGAGTAAACG	Polymorph چندشکل
E070	GACTGCGTACCAATTCAAT	M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC	Polymorph چندشکل
E070	GACTGCGTACCAATTCAAT	M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA	Polymorph چندشکل
E070	GACTGCGTACCAATTCAAT	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT	Polymorph چندشکل
E070	GACTGCGTACCAATTCAAT	M180	GATGAGTCCTGAGTAAAAT	Polymorph چندشکل
E070	GACTGCGTACCAATTCAAT	M190	GATGAGTCCTGAGTAAACG	Polymorph چندشکل
E080	GACTGCGTACCAATTCACG	M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC	Polymorph چندشکل
E080	GACTGCGTACCAATTCACG	M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA	Polymorph چندشکل
E080	GACTGCGTACCAATTCACG	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT	Polymorph چندشکل
E080	GACTGCGTACCAATTCACG	M180	GATGAGTCCTGAGTAAAAT	Polymorph چندشکل
E080	GACTGCGTACCAATTCACG	M190	GATGAGTCCTGAGTAAACG	Polymorph چندشکل
E090	GACTGCGTACCAATTCACT	M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC	Polymorph چندشکل
E090	GACTGCGTACCAATTCACT	M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA	Polymorph چندشکل
E090	GACTGCGTACCAATTCACT	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT	Polymorph چندشکل
E090	GACTGCGTACCAATTCACT	M180	GATGAGTCCTGAGTAAAAT	Polymorph چندشکل
E090	GACTGCGTACCAATTCACT	M190	GATGAGTCCTGAGTAAACG	Polymorph چندشکل
E100	GACTGCGTACCAATTCAGT	M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC	Polymorph چندشکل
E100	GACTGCGTACCAATTCAGT	M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA	Polymorph چندشکل
E100	GACTGCGTACCAATTCAGT	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT	Polymorph چندشکل
E100	GACTGCGTACCAATTCAGT	M180	GATGAGTCCTGAGTAAAAT	Polymorph چندشکل
E100	GACTGCGTACCAATTCAGT	M190	GATGAGTCCTGAGTAAACG	Polymorph چندشکل
E110	GACTGCGTACCAATTCATC	M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC	Monomorph یکشکل
E110	GACTGCGTACCAATTCATC	M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA	Monomorph یکشکل
E110	GACTGCGTACCAATTCATC	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT	Monomorph یکشکل
E110	GACTGCGTACCAATTCATC	M180	GATGAGTCCTGAGTAAAAT	Monomorph یکشکل
E110	GACTGCGTACCAATTCATC	M190	GATGAGTCCTGAGTAAACG	Monomorph یکشکل
E120	GACTGCGTACCAATTCATT	M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC	Monomorph یکشکل
E120	GACTGCGTACCAATTCATT	M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA	Monomorph یکشکل
E120	GACTGCGTACCAATTCATT	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT	Monomorph یکشکل
E120	GACTGCGTACCAATTCATT	M180	GATGAGTCCTGAGTAAAAT	Monomorph یکشکل
E120	GACTGCGTACCAATTCATT	M190	GATGAGTCCTGAGTAAACG	Monomorph یکشکل

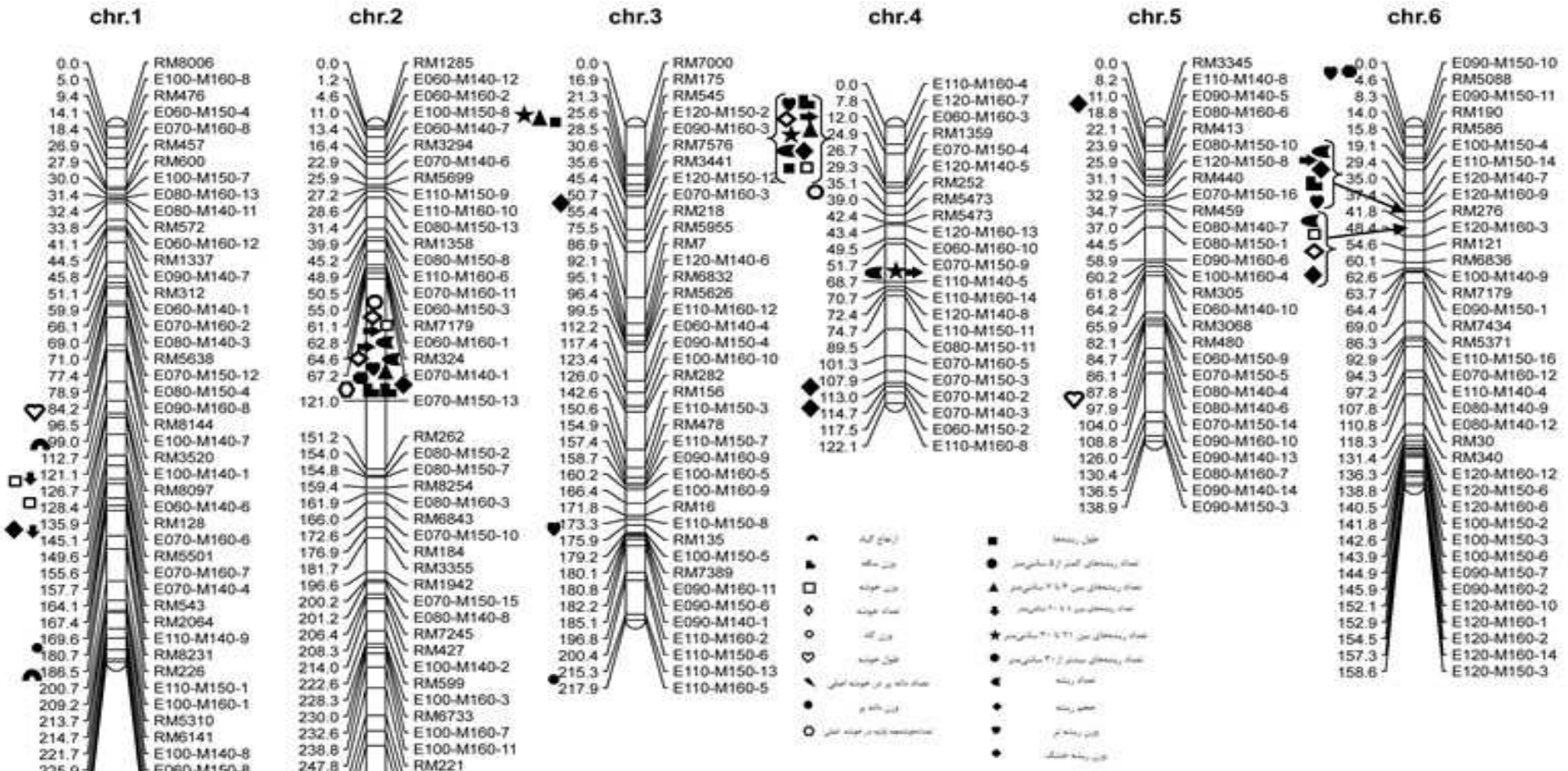
نتایج و بحث

برای کلیه صفات مورد بررسی به‌جز تعداد خوشه، والد عنبربو ارزش بالاتری نسبت به سپیدرود نشان داد. اختلاف میانگین همه صفات بین والدین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). کلیه صفات ارزیابی شده از توزیع نرمال پیروی کردند. نقشه پیوستگی جمعیت مورد مطالعه با استفاده از ۲۶۴ نوار چندشکل AFLP و ۱۲۴ نشانگر SSR تشکیل و نشانگرها به ۱۲ گروه پیوستگی معادل با ۱۲ کروموزوم برنج منتسب شدند که ۱۹۵۰/۴ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را با متوسط فاصله ۵/۲۰ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر پوشش دادند. برای تهیه نقشه از تابع نقشه‌یابی کوزامبی استفاده شد (شکل ۲). مطابق نتایج حاصل از این تحقیق، در مجموع ۸۹ QTL برای ۱۹ صفت مورد بررسی شناسایی شد و هر ۱۲ کروموزوم برنج حامل QTLهای کنترل کننده برخی صفات مورد مطالعه بودند (جدول ۵).

جدول ۳- میانگین صفات مورد بررسی برای والدین و جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب
Table 3. Traits means for parents and recombinant inbred lines population

صفات Traits	عنبر بو Anbarboo	سپیدرود Spidroud	لاین‌های نوترکیب Recombinant lines	t-value
تعداد ریشه Number of roots	1694.5200±3.5244	632.0000±3.6012	1066.3015±36.4077	210.867**
طول ریشه‌ها (سانتی‌متر) Root length (cm)	1894.5600±17.7978	947.8400±4.0550	1373.5035±86.7957	51.864**
تعداد ریشه‌های کمتر از ۵ سانتی‌متر The number of roots less than 5 cm	837.7600±36.5080	383.9000±0.9372	516.4833±25.6448	12.428**
تعداد ریشه‌های بین ۶ تا ۷ سانتی‌متر The number of roots between 6 and 7 cm	414.9000±2.5515	125.6000±0.2753	293.6778±11.7416	112.731**
تعداد ریشه‌های بین ۸ تا ۲۰ سانتی‌متر The number of roots between 8 and 20 cm	183.5000±0.3120	65.6500±0.2835	120.9969±5.5225	279.517**
تعداد ریشه‌های بین ۲۱ تا ۳۰ سانتی‌متر The number of roots between 21 and 30 cm	90.2000±1.0301	21.3000±0.1792	61.0097±2.3852	65.899**
تعداد ریشه‌های بیشتر از ۳۰ سانتی‌متر The number of roots above 30 cm	13.8400±0.007	4.8990±0.1704	10.5378±.4991	47.605**
وزن ساقه (گرم) Stem weight (g)	62.0166±0.6522	40.6640±0.2986	53.9147±3.5973	29.766**
وزن خوشه (گرم) Panicle weight	44.0115±0.3445	15.4192±0.006	33.6326±3.4460	81.422**
تعداد خوشه Panicle number	13.1500±0.1781	25.2350±0.4014	18.9010±2.4744	-27.521**
حجم ریشه (سانتی‌متر مکعب) Roots volume (cm^3)	247.3000±5.7656	78.9600±0.3275	178.8042±12.7414	29.150**
وزن تر ریشه (گرم) Roots fresh weight (g)	95.9570±2.2517	19.0540±0.009	51.5630±4.2196	34.125**
وزن خشک ریشه Root dry weight (g)	22.4180±0.2087	7.5861±0.002	15.3632±.8689	70.355**
تعداد دانه پر در خوشه اصلی Number of grains per panicle	122.4600±0.5056	61.7400±0.1437	94.7654±5.1249	115.526**
تعدادخوشه‌چه اولیه در خوشه اصلی Primary number of spikelet per main panicle	12.0136±0.1216	9.1960±0.1369	10.3244±0.5827	15.387**
وزن دانه پر (گرم) Grain weight (g)	33.7500±0.3089	17.1500±0.007	26.3701±.3006	52.288**
ارتفاع گیاه (سانتی‌متر) Plant height (cm)	142.2200±2.3604	111.7500±0.7500	125.5582±14.8054	12.303**
وزن کاه (گرم) Straw weight (g)	81.5000±1.2618	36.6000±0.4129	54.5155±3.1530	33.819**
طول خوشه (سانتی‌متر) Panicle length (cm)	35.2100±2.4323	21.5400±0.4405	24.6604±1.5555	5.530**

نتایج حاصل از مکان‌یابی نشان داد که از بین دو QTL ردیابی شده برای طول ریشه در qRLD-3 آلل عنبربو ۹۹۲/۹۳ سانتی‌متر طول ریشه‌ها را کاهش داد، در حالی که در qRLD-4 آلل سپیدرود ۱۳۶۹/۰۶ سانتی‌متر طول ریشه‌ها را افزایش داد. نگین و بو (Nguyen and Buu, 2010) نیز دو QTL برای طول ریشه شناسایی کردند. کورتویس و همکاران (Courtois *et al.*, 2003) برای شناسایی QTLهای کنترل کننده ساختار ریشه در جمعیت برنج‌های حاصل از تلاقی ارقام IAC165 و Co39 برای طول ریشه سه QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۹ و ۱۲ ردیابی کردند.



شکل ۲- نقشه پیوستگی کرموزوم‌های برنج حاصل از نشانگرهای ریزماهواره و AFLP برای جمعیت لاین‌های نوترکیب عنبربو و سپیدرود

Figure 2. Linkage map of rice chromosomes caused SSR and AFLP markers for Anbarbu × Spidroud RIL population

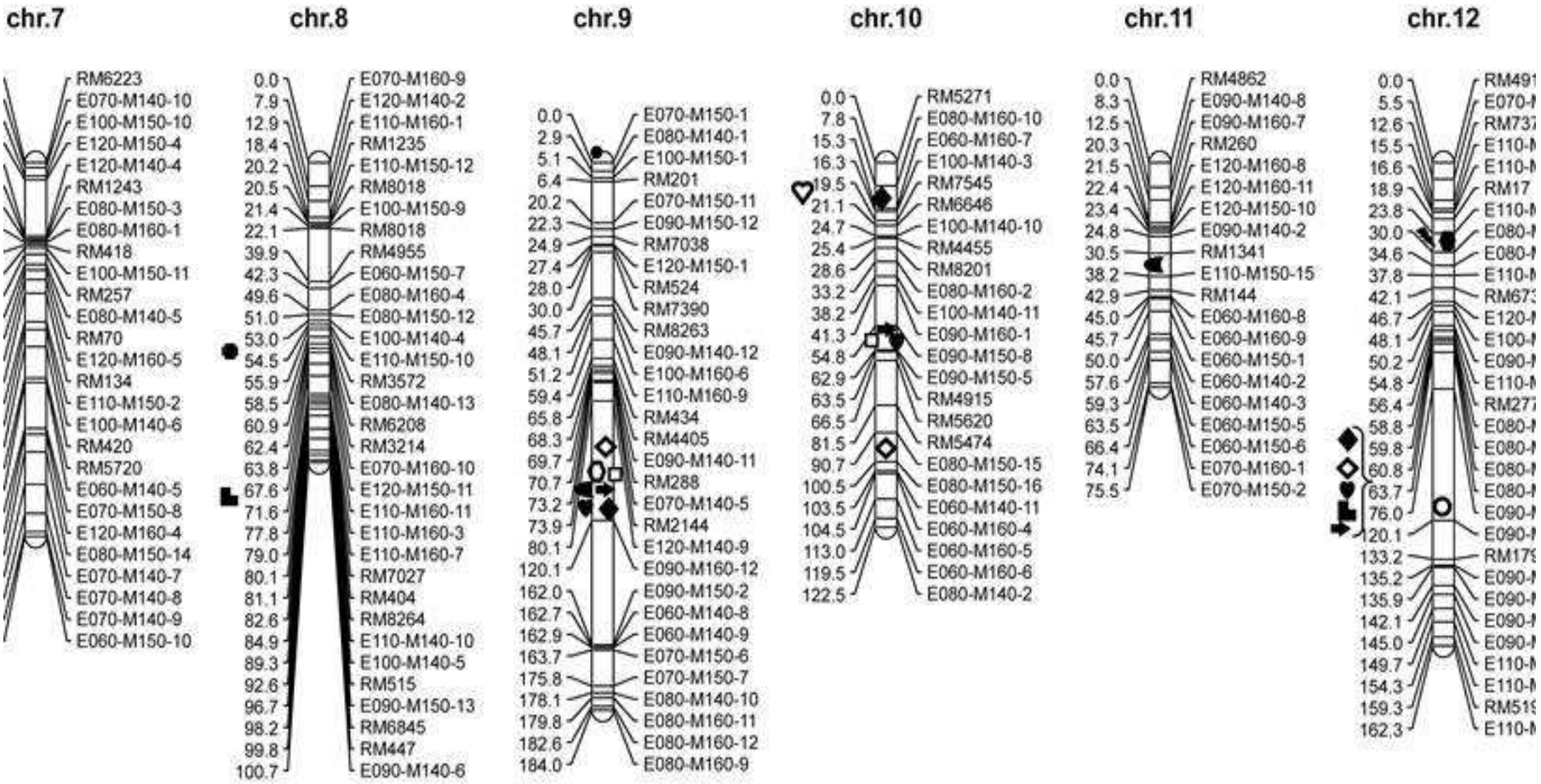


Figure 2. (Continued)

شکل ۲- ادامه.

کلیه QTLهای ردیابی شده برای تعداد ریشه‌های کمتر از ۵ سانتی‌متر با اثر کاهشی در والد عنبربو شناسایی شدند (qRNDL5-1، qRNDL5-3 و qRNDL5-9). این QTLهای شناسایی شده در مجموع ۳۳ درصد از تغییرات فنوتیپی آن را توجیه نمودند (جدول ۴). آلل عنبربو در qRNDB6T7-3 تعداد ریشه‌های بین ۷-۶ سانتی‌متر را کاهش و آلل سپیدرود درqRNDB6T7-2 و qRNDB6T7-4 باعث افزایش تعداد ریشه‌های بین ۷-۶ سانتی‌متر شد.

هر دو QTL آلل‌های افزایش دهنده تعداد ریشه‌های بین ۲۰-۸ سانتی‌متر از والد سپیدرود بودند و توانستند درصد بالایی از تغییرات را توجیه نمایند به نحوی‌که qRNDB8T20-1a با LOD=۴/۲۶۵ ، ۱۸/۵ درصد از واریانس فنوتیپی و qRNDB8T20-1b با LOD=۴/۱۹۲ توانست ۱۸/۲ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه کنند. آلل‌های هر سه QTL تشخیص داده شده برای تعداد ریشه‌های بیشتر از ۳۰ سانتی‌متر در جهت کاهش تعداد ریشه‌های بیشتر از ۳۰ سانتی‌متر عمل نمودند.

آلل‌های سپیدرود در همه‌ی QTLهای تعداد ریشه به جز یک مورد (qRND-9) باعث افزایش تعداد ریشه‌ها شد. qRND-2a با LOD=۶/۵۶۹ در مجاورت نشانگر E070-M150-13 و qRND-4a با LOD=۹/۴۹۴ در فاصله نشانگری E060-M140-3-RM1359 از QTLهای بزرگ اثر بودند که توانستند به ترتیب ۲۷ و ۳۶ درصد از تغییرات را توجیه کند. نگین و همکاران (Nguyen *et al*., 2006) به منظور مکان‌یابی QTLهای صفات ریشه مرتبط با مقاومت به خشکی از ۳۶ نشانگر SSR و ۲۰۳ نشانگر AFLP و ۱۳۵ لاین نوترکیب حاصل از تلاقی دو لاین RDB09 و R2021 استفاده نمودند و توانستند دو QTL روی کروموزوم‌های ۱ و ۳ شناسایی کنند. این QTLها در مطالعه حاضر شناسایی نشد.

QTLهای qRVD-2 در فاصله نشانگری E070-M140-1-E070-M150-13 و qRVD-4a در فاصله نشانگری E060-M140-3-RM1359 برای حجم ریشه بزرگ اثر بودند که به ترتیب ۲۳ و ۳۳ درصد از تغییرات فنوتیپی حجم ریشه را توجیه نمودند. پرایس و توماس (Price and tomos, 1997) یک QTL برای حجم ریشه QTL گزارش کردند.

از بین QTLهای ردیابی شده برای وزن تر ریشه، QTLهای qFRWD-2 و qFRWD-4 با LOD برابر با ۵/۸۸۴ و ۸/۳۷۵ اثر نسبتاً بزرگی بر وزن تر ریشه داشتند و توانستند ۲۴ و ۳۳ درصد از تغییرات فنوتیپی موجود را توجیه نمایند. همچنین از بین QTLهای شناسایی شده برای وزن خشک ریشه، qDWRD-2a با ضریب تبیین ۲۴ درصد بیشترین تبیین فنوتیپی صفت وزن خشک ریشه را داشت. آلل‌های والد عنبربو در qDWRD-12 و qDWRD-9 باعث کاهش وزن خشک ریشه شد، در حالی‌که والد سپیدرود وزن خشک ریشه را افزایش داد. نگین و بو (Nguyen and Buu, 2010) در پژوهشی که برای مکان‌یابی QTLهای در ارتباط با خشکی داشتند دو QTL برای وزن خشک ریشه ردیابی کردند.

کورتویس و همکاران (Courtois *et al*., 2003) چهار QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۴ و ۵ برای ارتفاع بوته ردیابی نمودند که QTL شناسایی شده برای ارتفاع گیاه روی کروموزوم ۱ در این مطالعه (qPHD-1) از نظر موقعیت مکانی با QTL ردیابی شده در مطالعه کورتویس و همکاران (Courtois *et al*., 2003) مطابقت داشت. همچنین صبوری و همکاران (Sabouri *et al*., 2012) توانستند یک QTL برای ارتفاع بوته روی کروموزوم ۶ در فاصله نشانگرهای RM162-RM461 شناسایی کنند. همچنین بابو و همکاران (Babu *et al*., 2003) با استفاده از جمعیت دابل هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی رقم CT9993-5-10-1-M و رقم IR62266-42-6-2 برای ارتفاع گیاه تحت شرایط خشک، QTLهایی را روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۴ و ۷ شناسایی کردند.

در QTLهای شناسایی شده برای وزن ساقه به‌جز qSWD-12 که در آن آلل عنبربو باعث کاهش وزن ساقه شد، در بقیه QTLها آلل والد سپیدرود وزن ساقه را افزایش داد و qSWD-6 توانست به تنهایی ۱۳۷/۴۶۵ گرم وزن ساقه را افزایش دهد. دو QTL (qSWD-2a و qSWD-4) از شش QTL شناسایی شده بزرگ اثر بودند.

از بین QTLهای مکان‌یابی شده برای کنترل وزن خوشه، QTLهای qSWD-2 و qSWD-4 توانستند به ترتیب ۲۹ و ۴۱ درصد از تغییرات فنوتیپی وزن خوشه را توجیه نمایند و بزرگ اثر تشخیص داده شدند. در مطالعه صبوری و همکاران (Sabouri *et al*., 2012) نیز دو QTL کنترل کننده وزن خوشه روی کروموزوم‌های ۱ و ۶ قرار داشت.

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات ویژگی‌های ریشه و اندام هوایی برنج در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب مورد بررسی

Table 4. Analysis of variance of root and shoot characteristics in the studied recombinant inbred lines population

منابع تغییرات Source of variation		درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square								
			تعداد ریشه Roots Number	طول ریشه‌ها Roots Length	تعداد ریشه‌های کمتر از۵ سانتی‌متر The number of roots less than 5 cm	تعداد ریشه‌های بین ۶ تا ۷ سانتی‌متر The number of roots between 6 and 7 cm	تعداد ریشه‌های بین ۸ تا ۲۰ سانتی‌متر The number of roots between 8 and 20 cm	تعداد ریشه‌های بین ۲۱ تا ۳۰ سانتی‌متر The number of roots between 21 and 30 cm	تعداد ریشه‌های بیشتر از ۳۰ سانتی‌متر The number of roots above 30 cm	وزن ساقه Stem weight	وزن خوشه Panicle weight
Replication	تکرار	2	6622.451	3989.013	305.005	13080.995**	10.235	1083.560**	2.648	444.080**	776.895**
Lines	لاین	95	1140925.987**	6548674.624**	570875.547**	118938.048**	26417.827**	4899.627**	195.529**	11242.011**	10309.077**
Error	خطا	190	6112.059	2932.024	660.034	369.005	58.631	13.714	10.591	3.904	۳.۳۰۴
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)			7.331	3.942	4.974	6.541	6.328	6.070	30.883	3.664	5.405

**: Significance at 1% probability level.

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

Table 4. Continued

جدول ۴- ادامه

منابع تغییرات Source of variation		درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square								
			تعداد خوشه Panicle Number	حجم ریشه Roots Volume	وزن تر ریشه Roots fresh weight	وزن خشک ریشه Root dry weight	تعداد دانه پر در خوشه اصلی No. of grains per panicle	تعدادخوشه‌چه اولیه در خوشه اصلی Primary no. of spikelet per main panicle	وزن دانه پر Grain weight	ارتفاع گیاه Plant height	وزن کاه Straw weigh	طول خوشه Panicle length
Replication	تکرار	2	78.470**	3117.033**	131.604**	68.321**	360.935**	425.339**	84.107**	3286.935**	3709.639**	166.730**
Lines	لاین	95	5318.559**	141099.745**	15486.437**	654.552**	22792.699**	276.959**	47.818**	190516.592**	8481.929**	1964.845**
Error	خطا	190	3.350	41.291	1.156	0.478	25.933	4.730	14.502	66.044	44.796	68.386
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)			9.684	3.593	2.086	4.502	5.373	21.066	14.441	6.472	12.277	33.534

**: Significance at 1% probability level.

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

جدول ۵- QTLهای شناسایی شده برای صفات مرتبط با ریشه و اندام‌های هوایی تحت شرایط تنش خشکی

Table 5. Identified QTLs for related traits to root and shoot under drought stress conditions

صفت Trait	QTL	نشانگرهای مجاور† Flanking markers†	کروموزوم Chr.	LOD	موقعیت (سانتی‌مورگان) Position (cM)	اثرافزایشی†† Additive effect††	ضریب تبیین Coefficient of determination
طول ریشه‌ها Roots Length	*qRLD-3*	E120-M150-2-E090-M160-3	3	2.824	26	-992.934	12.7
	qRLD-4	E060-M160-3-RM1359	4	3.085	16	1369.06	13.8
تعداد ریشه‌های کمتر از ۵ سانتی‌متر The number of roots less than 5 cm	*qRNDL5-1*	E110-M140-9-RM8231	1	2.055	178	-21.088	9.4
	qRNDL5-3	E110-M150-13-E110-M160-5	3	2.547	216	29.449	11.5
	qRNDL5-9	E070-M150-1-E060-M140-1	9	2.153	0	-25.846	9.8
تعداد ریشه‌های بین ۶ تا ۷ سانتی‌متر The number of roots between 6 and 7 cm	*qRNDB6T7-2*	E070-M140-1-E070-M150-13	2	2.574	114	29.559	11.6
	qRNDB6T7-3	E120-M150-2-E090-M160-3	3	2.378	26	-55.264	10.8
	qRNDB6T7-4	E060-M160-3-RM1359	4	3.834	24	37.85	16.8
تعداد ریشه‌های بین ۸ تا ۲۰ سانتی‌متر The number of roots between 8 and 20 cm	*qRNDB8T20-1a*	RM8097-E060-M140-6	1	4.265	126	2.98	18.5
	qRNDB8T20-1b	RM128-E070-M160-6	1	4.192	136	2.637	18.2
تعداد ریشه‌های بین ۲۱ تا ۳۰ سانتی‌متر The number of roots between 21 and 30 cm	*qRNDB21T30-3*	E120-M150-2-E090-M160-3	3	4.089	26	-16.716	17.8
	qRNDB21T30-4	E060-M160-3-RM1359	4	2.037	16	15.991	9.3
	qRNDB21T30-8	E120-M150-11-E10-M160-11	4	2.308	68	25.098	10.5
تعداد ریشه‌های بیشتر از ۳۰ سانتی‌متر The number of roots above 30 cm	*qRNDA30-2*	E070-M140-1-E070-M150-13	2	2.395	110	-20.89	10.9
	qRNDA30-6	E090-M150-10-RM5085	6	2.07	2	-1.046	9.5
	qRNDA30-8	E100-M140-4-E110-M150-10	8	2.043	54	-279.096	9.3
تعداد ریشه Roots number	*qRND-11*	RM1341-E100-M150-15	11	2.077	38	2321.539	9.5
	qRND-2a	E070-M140-1-E070-M150-13	2	6.569	108	163.983	27
	qRND-2b	E070-M140-1-E070-M150-13	2	4.227	112	216.263	18.4
	qRND-4a	E060-M140-3-RM1359	4	9.494	18	308.964	36.6
	qRND-4b	E070-M150-9-E110-M140-5	4	2.96	68	1101.106	13.2
	qRND-6a	E120-M160-9-RM276	6	2.432	38	440.203	11
	qRND-6b	RM276-E120-M160-3	6	2.514	44	98.989	11.4
	qRND-7	RM420-RM5720	7	2.071	68	81.016	9.5
	qRND-9	E120-M140-9-E090-M150-2	9	2.973	100	-200.846	13.3
حجم ریشه Roots volume	*qRVD-1*	RM128-E070-M160-6	1	3.142	136	33.714	14
	qRVD-10	E060-M160-10-E060-M160-7	10	2.62	8	-56.337	11.8
	qRVD-12	E080-M160-9-E080-M160-5	12	3.492	62	-55.651	15.4
	qRVD-2	E070-M140-1-E070-M150-13	2	5.701	108	42.963	23.9
	qRVD-3	E070-M160-3-RM218	3	2.909	52	-31.183	13

Table 5. Continued

جدول ۵- ادامه

صفت Trait	QTL	نشانگرهای مجاور Flanking markers†	کروموزوم Chr.	LOD	موقعیت (سانتی‌مورگان) Position (cM)	اثرافزایشی Additive effect††	ضریب تبیین Coefficient of determination
	qRVD-4a	E060-M140-3-RM1359	4	8.493	18	82.289	33.5
	qRVD-4b	E070-M150-3-E070-M140-2	4	2.197	110	-57.608	10
	qRVD-4c	E070-M140-2-E070-M140-3	4	2.517	114	-51.308	11.4
	qRVD-5	E090-M140-5-E080-M160-6	5	2.756	12	-42.963	12.4
	qRVD-6a	E120-M160-9-RM276	6	3.772	38	150.283	16.6
	qRVD-6b	RM276-E120-M160-3	6	3.793	44	33.357	16.6
	qRVD-7	RM420-RM5720	7	2.721	68	25.663	12.2
	qRVD-9	E120-M140-9-E090-M140-14	9	2.292	100	-49.501	10.4
وزن تر ریشه Roots fresh weight	*qFRWD-10*	E090-M150-8-E090-M150-5	10	2.613	60	42.423	11.8
	qFRWD-12	E080-M160-9-E080-M160-5	12	2.737	62	-43.531	12.3
	qFRWD-2	E070-M140-1-E070-M150-13	2	5.884	108	38.145	24.6
	qFRWD-3	E110-M50-8-RM135	3	2.093	174	-26.04	9.6
	qFRWD-4	E060-M160-3-RM1359	4	8.375	20	57.773	33.1
	qFRWD-6a	E090-M150-10-RM5085	6	2.588	2	42.692	11.7
	qFRWD-6b	E120-M160-9-RM276	6	2.186	38	102.058	10
	qFRWD-9	E120-M140- E090-M140-14	9	2.218	100	-42.682	10.1
وزن خشک ریشه Root dry weight	*qDWRD-10*	E090-M150-8-E090-M150-5	10	2.47	60	19.599	11.2
	qDWRD-12	E080-M160-9-E080-M160-5	12	2.819	62	-20.935	12.6
	qDWRD-2a	E070-M140-1-E070-M150-13	2	5.836	108	18.03	24.4
	qDWRD-2b	E070-M140-1-E070-M150-13	2	4.395	112	25.46	19
	qDWRD-4a	E060-M160-3-RM1359	4	7.749	24	17.604	31
	qDWRD-4b	E070-M150-9-E110-M140-5	4	3.055	68	29.262	13.6
	qDWRD-6	E120-M160-9-RM276	6	3.155	38	57.507	14
	qDWRD-9	E120-M140-9-E090-M140-14	9	2.493	100	-21.399	11.3
ارتفاع گیاه Plant height	*qPHD-1*	E100-M140-7-RM3520	1	2.227	104	-19.787	10.1
	qPHD-3	E110-M160-2-E110-M150-6	3	2.662	198	-34.649	12
وزن ساقه Stem weight	*qSWD-12*	E080-M160-9-E080-M160-5	12	2.805	62	-53.387	12.6
	qSWD-2a	E070-M140-1-E070-M150-13	2	5.564	108	45.139	23.4
	qSWD-2b	E070-M140-1-E070-M150-13	2	4.047	114	31.865	17.6
	qSWD-4	E060-M160-3-RM1359	4	8.184	24	46.019	22.5
	qSWD-6	E120-M160-9-RM276	6	2.732	38	37.465	12.3
	qSWD-8	E120-M150-11-E110-M160-11	8	2.282	68	92.776	10.4

جدول ۵- ادامه

Table 5. Continued

صفت Trait	QTL	نشانگرهای مجاور Flanking markers†	کروموزوم Chr.	LOD	موقعیت (سانتی‌مورگان) Position (cM)	اثرافزایشی Additive effect††	ضریب تبیین Coefficient of determination
وزن خوشه Panicle weight	*qPWD-1*	E100-M140-7-RM3520	1	2.563	104	-13.579	11.6
	qPWD-10	E090-M150-8-E090-M150-5	10	2.991	60	21.459	13.4
	qPWD-2	E070-M140-1-E070-M150-13	2	7.33	106	20.797	29.6
	qPWD-3	E110-M160-2-E110-M150-6	3	2.186	198	-20.28	10
	qPWD-4	E060-M160-3-RM1359	4	11.257	16	49.282	41.7
	qPWD-6	RM276-E120-M160-3	6	3.549	44	13.458	15.7
	qPWD-7	RM420-RM5720	7	2.44	68	10.141	11
	qPWD-9	E120-M140-9- E090-M140-14	9	2.468	100	-21.324	11.2
تعداد خوشه Panicle number	*qPND-10*	E080-M150-15-E080-M150-16	10	2.05	100	-11.051	9.4
	qPND-12	E080-M160-9-E080-M160-5	12	2.886	62	-11.767	12.9
	qPND-2a	E070-M140-1-E070-M150-13	2	6.054	106	10.647	25.2
	qPND-2b	E070-M140-1-E070-M150-13	2	3.367	112	12.537	14.9
	qPND-4	E060-M160-3-RM1359	4	6.369	16	21.735	26.3
	qPND-6	RM276-E120-M160-3	6	3.745	42	6.264	16.5
	qPND-9	E120-M140-9- E090-M140-14	9	2.559	100	-12.042	11.6
وزن کاه Straw weight	*qSWD-12*	E090-M140-9-E090-m140-9	12	2.529	100	2.131	11.4
	qSWD-2	E070-M140-1-E070-M150-13	2	2.676	104	7.289	12
	qSWD-4	RM252-RM5472	4	3.395	38	-21.949	15
	qSWD-7	E080-M150-14-E070-M140-8	7	2.273	106	-6.544	10.3
طول خوشه Panicle length	*qPL-1*	E090-M160-8-RMB144	1	2.085	88	1.328	9.5
	qPL-10	RM7545-RM6646	10	2.246	20	-1.523	10.2
	qPL-5	EO80-M140-4-E080-M140-6	5	2.039	92	2.594	9.3
تعداد دانه پر در خوشه اصلی Filled grains per main panicle	*qFGPD-12*	E110-M140-13-E080-M150-5	12	2.822	26	16.161	12.7
وزن دانه پر Grain weight	*qGWD-12*	E110-M140-13-E080-M150-5	12	2.633	26	0.613	11.9
	qGWD-7	E070-M140-10-E100-M150-10	7	2.088	2	-1.09	9.5
تعدادخوشه‌چه اولیه در خوشه اصلی Primary spikelets per main panicle	*qPSPD-2*	RM427-E100-M140-2	2	2.422	212	-1.208	11
	qPSPD-9	E120-M140-9- E090-M140-14	9	5.793	98	-3.368	24.3

† زیر نشانگر نزدیک‌تر به QTL خط کشیده شده است.

†† علامت منفی نشانده جهت آلل از طرف والد کاهنده صفت و علامت مثبت نشاندهنده جهت آلل از طرف والد افزاینده صفت است. میانگین صفات مورد بررسی برای والدین در جدول ۳ آمده است.

† The nearest marker was under lined.

†† Negative signed showed as direction of allele from decreased parent and positive sign showed as direction of allele from increased parent.

اثر افزایشی هفت QTL ردیابی شده برای تعداد خوشه از ۱۱/۰۵۱- تا ۲۱/۷۳ متغیر بود. در QTLهای qPND-10، qPND-12 و qPWD-9 آلل عنبربو باعث کاهش تعداد خوشه شد و در سایر QTLهای ردیابی شده آلل‌های سپیدرود باعث افزایش آن گردید. QTLهای qPND-2a و qPND-4 روی کروموزوم‌های ۲ و ۴ توانستند به ترتیب ۲۵/۲ و ۲۶/۳ درصد از تغییرات فنوتیپی مربوط به تعداد خوشه را کنترل کنند. آلل‌های عنبربو در qSWD-4 و qSWD-7 وزن کاه را به مقدار ۲/۹۴ و ۶/۵۴ گرم کاهش دادند، درحالیکه آلل‌های سپیدرود در qSWD-2 و qSWD-12 باعث افزایش وزن کاه به میزان ۷/۲۸ و ۲/۱۳ گرم شدند.

آلل‌های والد سپیدرود باعث افزایش طول خوشه در qPL-1 و qPL-5 شد؛ اما در qPL-10 طول خوشه را به میزان ۱/۵۲ سانتی‌متر کاهش داد. مایکل گومز و همکاران (Michael Gomez *et al*., 2006) در مطالعه‌ای که برای شناسایی QTLهای مرتبط با تنش خشکی در ۱۷۷ لاین نوترکیب حاصل از تلاقی ارقام Bala×Azucena برای طول خوشه یک QTL ردیابی کردند. احمدی و همکاران (Ahmadi *et al*., 2008) در شرایط نرمال توانستند برای طول خوشه QTLهای روی کروموزوم‌های ۲، ۴، ۱۱ و۱۲شناسایی کنند. QTLهای ردیابی شده در پژوهش حاضر با QTLهای مطالعه آن‌ها مطابقت نداشت که این امر می‌تواند ناشی از عوامل بسیاری همچون متفاوت بودن جمعیت و شرایط آزمایش باشد.

برای صفت تعداد دانه پر در خوشه، QTL کنترل کننده روی کروموزوم ۱۲ در مجاورت نشانگر E080-M150-5 شناسایی شد. آلل عنبربو در این مکان باعث افزایش تعداد دانه پر در خوشه شدند (جدول ۲). صبوری و همکاران (Sabouri *et al*., 2012) دو QTL برای تعداد دانه پر روی کروموزوم‌های ۱ و ۶ شناسایی کردند و اکسیو و همکاران (Xiao *et al*., 1996) برای تعداد دانه در خوشه سه QTL روی کروموزوم‌های ۳، ۴ و ۵ ردیابی کردند. یک QTL در فاصله نشانگری RG214–RG620 روی کروموزوم ۴ توسط بابو و همکاران (Babu *et al*., 2003) مکان‌یابی شد. در اینجا می‌توان اظهار کرد با بررسی کلی نتایج مکان‌یابی تعداد دانه پر در خوشه روی جمعیت‌های مختلف و با نشانگرهای متفاوت می‌توان این احتمال را داد که به دلیل کمی بودن صفت مکان‌های کنترل کننده آن روی کروموزوم‌های مختلف پراکنده است.

برای وزن دانه پر دو QTL ردیابی شد که qGWD-12 در فاصله نشانگری E110-M140-13-E080-M150-5 لل عنبربو باعث افزایش وزن دانه پر شد. اما qGWD-7 در فاصله نشانگرهای E070-M140-10 و E100-M150-10 آلل سپیدرود وزن دانه را به میزان ۱/۰۹ گرم کاهش داد. مکان‌های کمی شناسایی شده در مطالعه صبوری و همکاران (Sabouri *et al*., 2012) برای وزن دانه سه روی کروموزوم‌های ۱ و ۶ (دو مورد) قرار داشتند که این QTLها۲۰ درصد از تنوع فنوتیپی موجود در این صفت را توجیه کرد.

دو QTL مکان‌یابی شده برای تعداد خوشه‌چه اولیه در خوشه اصلی (qPSPD-2 و qPSPD-9) روی کروموزوم‌های ۲ و ۹ قرار داشتند که qPSPD-9 با LOD=۵/۷۹۳ در فاصله نشانگرهای E120-M140-9 و E090-M140-14 بزرگ اثر بود. آلل‌های کاهش دهنده در هر دو QTL ردیابی شده از والد سپیدرود منتقل شدند. در مطالعه صبوری و همکاران (Sabouri *et al*., 2012) برای تعداد خوشه‌چه یک QTL در فاصله نشانگری RM140-RM8115 شناسایی شد.

نتیجه‌گیری کلی

مکان‌یابی QTLهای صفات ریشه و اندام هوایی برنج در لاین‌های F_8 حاصل از تلاقی ارقام سپیدرود و عنبربو نشان داد که QTLهای qSWD-2a، qSWD-4، qPWD-2، qPWD-4، qPND-2a، qPND-4، qRVD-2، qRVD-4a، qFRWD-2، qFRWD-4، qDWRD-2a، qDWRD-4a، qRND-2a، qRND-4a و qPSPD-9 بزرگ اثر بودند و به ترتیب ۲۳/۴، ۲۲/۵، ۲۹/۶، ۴۱/۷، ۲۵/۲، ۲۶/۳، ۲۳/۹، ۳۳/۵، ۲۴/۱، ۳۳/۱، ۲۴/۴، ۳۱، ۲۷، ۳۶/۶ و ۲۴/۳ درصد از تنوع فنوتیپی صفات مربوطه را توجیه کردند. بنابراین از نشانگرهای مرتبط با آن‌ها می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی از طریق گزینش به کمک نشانگر پس از تعیین اعتبار آن‌ها در آزمایش‌های دیگر استفاده کرد. برهمکنش بین QTLها نیز موجب شد تا برای برخی از صفات مورد مطالعه مجموع درصدهای بیان QTLهای ردیابی شده بیش از ۱۰۰ درصد باشد (Liu, 1998).

یکی از مهم‌ترین مزایای نقشه‌یابی QTL برای چندین صفت به‌طور هم‌زمان این است که QTLهایی که هم‌زمان بر چندین صفت اثر می‌گذارند و باعث همبستگی می‌شوند، شناسایی می‌شوند. در واقع حضور چند QTL در یک مکان

عمدتاً به‌دلیل پیوستگی ژن‌های کنترل کننده این صفات و یا به‌دلیل بر وجود پدیده پلیوتروپی است. صفاتی که با یکدیگر همبستگی دارند، در بیشتر مواقع به وسیله QTLهایی که در یک ناحیه مشابه از کروموزوم قرار دارند، کنترل می‌شوند. در پژوهش حاضر نیز وجود این آثار مشاهده شد، به‌طوری‌که به‌عنوان مثال در حد فاصل نشانگرهای E070-M140-1 و E070-M150-13 روی کروموزوم دو QTLهایی برای صفات مختلف از جمله تعداد ریشه‌های بین ۷-۶ سانتی‌متر، تعداد ریشه‌های بیشتر از۳۰ سانتی‌متر، وزن ساقه، وزن خوشه، تعداد خوشه، حجم ریشه، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، تعداد ریشه، وزن کاه و تعداد خوشه‌چه اولیه مشاهده شد. همچنین کروموزوم ۴ در فاصله نشانگری E060-M160-3-RM1359 دارای QTLهایی برای صفات طول ریشه‌ها، تعداد ریشه‌های بین ۷-۶ سانتی‌متر، تعداد ریشه‌های بین ۲۱ تا ۳۰ سانتی‌متر، وزن ساقه، وزن خوشه، تعداد خوشه، حجم ریشه، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و تعداد ریشه (شکل ۲) و کروموزوم ۹ در فاصله نشانگری E120-M140-9-E090-M140-14 شامل QTLهایی برای صفات مختلف از جمله وزن خوشه، تعداد خوشه، حجم ریشه، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، تعداد ریشه و تعداد خوشه‌چه اولیه در خوشه بود.

سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از طرح تحقیقاتی شماره ۶/۵۸۱ مصوب تاریخ ۹۰/۱۲/۱ دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشکده گنبد کاووس می‌باشد. بدین‌وسیله از مدیریت پژوهشی دانشگاه و ریاست محترم دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی به‌جهت تأمین منابع مالی اجرای تحقیق قدردانی به‌عمل می‌آید. بدین وسیله از زحمات بی‌دریغ سرکار خانم مهندس مهناز کاتوزی، محبوبه نجارعجم، ملیحه قزلسفلو، ماهم پیراسته و آقایان مهندس احمدرضا دادرس و رضا کریم کشته قدردانی می‌شود.

References

Ahamadi, J., Fotokian, M. H. and Fabriki-Orang, S. 2008. Detection of QTLs influencing panicle length, grain number and grain sterility in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Crop Science and Biotechnology** 11 (3): 163-170.

Ali, M. L., Pathan, M. S., Zhang, J., Bai, G., Sarkarung, S. and Nguyen, H. T. 2000. Mapping QTLs for root traits in a recombinant inbred population from two indica ecotypes in rice. **Theoretical and Applied Genetics** 101: 756-766.

Armenta-Soto, J., Chang, T. T., Loresto, G. C. and O'Toole, J. C. 1983. Genetic analysis of root characteristics in rice. **SABRAO Journal of Breeding and Genetics** 15: 103-118.

Babu, R. C., Shashidhar, H. E., Lilley, J. M., Thanh, N. D., Ray, J. D., Sadasivam, S., Sarkarung, S., O'Toole J. C. and Nguyen, H. T. 2001. Variation in root penetration ability, osmotic adjustment and dehydration tolerance among accessions of rice adapted to rainfed lowland and upland ecosystems. **Plant Breeding** 120: 233-238.

Babu, R. C., Nguyen, B. D., Chamarerk, V., Shanmugasundaram, P., Chezhian, P., Jeyaprakash, P., Ganesh, S. K., Palchamy, A., Sadasivam, S., Sarkarung, S., Wade, L. J. and Nguyen, H. T. 2003. Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: association between secondary traits and field performance. **Crop Science** 43: 1457-1469.

Byrne, P. F. and McMullen, M. D. 1996. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. **Probe** 7 (1): 24-27.

Champoux, M. C., Wang, G., Sarkarung, S., Mackill, D. J., O'Toole, J. C., Huang, N. and McCouch, S. R. 1995. Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics** 90 (6): 969-981.

Chen, X., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y. G. and McCouch, S. R. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 95: 553-567.

Clark, L. J., Price, A. H., Steele, K. A. and Whalley, W. R. 2008. Evidence from near-isogenic lines that root penetration increases with root diameter and bending stiffness in rice. **Functional Plant Biology** 35: 1163-1171.

Courtois, B., Shen, L., Petalcorin, W., Carandang, S., Mauleon, R. and Li, Z. 2003. Locating QTLs controlling constitutive root traits in the rice population IAC 165 × Co39. **Euphytica** 134: 335-345.

Ekanayake, I. J., O'Toole, J. C, Carrity, D. P. and Masajo, T. M. 1985. Inheritance of root characters and their relations to drought resistance in rice. **Crop Science** 25: 927-933.

Kamoshita, A., Zhang, J., Siopongco, J., Sarkarung, S., Nguyen, H. T. and Wade, L. J. 2002a. Effects of phenotyping environment on identification of QTL for rice root morphology under anaerobic conditions. **Crop Science** 42 (1): 255-265.

Kamoshita, A., Wade, L., Ali, M., Pathan, M., Zhang, J., Sarkarung, S. and Nguyen, H. 2002b. Mapping QTLs for root morphology of a rice population adapted to rainfed lowland conditions. **Theoretical and Applied Genetics** 104: 880-893.

Kato, Y., Hirotsu, S., Nemoto, K. and Yamagishi, J. 2008. Identification of QTLs controlling rice drought tolerance at seedling stage in hydroponic culture. **Euphytica** 160: 423-430.

Khush, G. S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and varation of rice. **Plant Molecular Biology** 35: 25-34.

Lafitte, H. R., Yongsheng, G., Yan, S. and Li, Z. K. 2007. Whole plant responses, key processes, and adaptation to drought stress: the case of rice. **Journal of Experimental Botany** 58: 169-175.

Liu, B. H. 1998. Statistical genomics, linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press, New York, USA.

Mambani, B. and Lal, R. 1983. Response of upland rice varieties to drought stress. 1. Relation between the root system development and leaf water potential. **Plant and Soil** 73: 59-72.

Manly, K. F. and Olson, J. M. 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QTX. **Mammalian Genome** 10: 327-334.

McCouch, S. R., Teytelman, L., Xu, Y. B., Lobos, K. B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z. K., Xing, Y. Z., Zhang, Q. F., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom. R., DeClerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D. and Stein, L. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Research** 9: 199-207.

Michael Gomez, S., Satheesh Kumar, S., Jeyaprakash, P., Suresh, R., Biji, K. R., Manikanda Boopathi, N., Price, A. H. and Babu, R. C. 2006. Mapping QTLs linked to physio-morphological and plant production traits under drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) in the target environment. **Journal of Biochemistry and Biotechnology** 2 (4): 161-169.

Nemoto, H. R., Suga, M. and Okutsu, Y. 1998. Deep rooted rice varieties detected through observation of root characteristics using the trench method. **Breeding Science** 48: 321-324.

Nelson, J. C. 1997. QGENE: Software for marker-based genomic analysis and breeding. **Molecular Breeding** 3 (3): 239-245.

Nguyen, D. T., Nguyen, T. K. L., Pham, Q. C., Tran, Q. T., Le, T. B. T. and Nguyen, H. T. 2006. Mapping QTLs associated with root traits related to drought resistance in Vietnamese upland rice. **ASEAN Journal of Science and Technology for Development** 23 (4): 323-332.

Nguyen, T. L. and Buu, C. B. 2010. Quantitative trait loci influencing drought tolerance in rice (*Oryza sativa*. L). **Omonrice** 17: 22-28.

Nicou, R., Seguy, L. and Haddad, G. 1970. Comparison of rooting in four upland rice varieties with and without soil tillage. **Agronomy Tropopical** 25: 639-659.

O'Toole, J. C. and Bland, W. L. 1987. Genotypic variation in crop plant root systems. **Advanced Agronomy** 41: 91-145.

O'Toole, J. C. and Soemartono, N. 1981. Evaluation of a simple technique for characterizing rice root systems in relation to drought resistance. **Euphytica** 30: 283-290.

Pflieger, S., Lefebvre, V. and Causse, M. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: A review. **Theoretical and Applied Genetics** 7 (4): 275-291.

Price, A. H. and Tomos, A. D. 1997. Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.) II: Mapping quantitative trait loci using molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics** 95:143-152.

Price, A. H., Steele, K. A., Moore, B. J., Barraclough, P. B. and Clark, L. J. 2000. A combined RFLP and AFLP linkage map of upland rice (*Oryza sativa* L.) used to identify QTLs for root-penetration ability. **Theoretical and Applied Genetics** 100: 49-56.

Rafalski, J. A., Vogel, J. M., Morgante, M., Powell, W., Andre, C. and Tingey, S. V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. Nonmammalian Genome Analysis. A Practical Guide. Academic Press, San Diego.

Ray, J. D., Yu, L., McCouch, S. R., Wang, G. and Nguyen, H. T. 1996. Mapping quantitative trait loci associated with root penetration ability in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 92: 627-636.

Sabouri, H., Sabouri, A. and Khatami Nejad, R. 2012. Mapping QTLs linked to some traits related to drought strees in rice. **Journal of Crop Production and Processing** 119 :1-12. (In Persian with English Abstract).

Sabouri, H., Khanahmadi, A. R., Khataminejad, R., Jafarzadeh, M. R., Katouzi, M. and Moradzadeh, M. 2011. Introduction of rice drought tolerant variety in Gonbad Kavous region. Final report of research design, Collage of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad-e-Kavous University, Golestan, Iran. 78 p. (In Persian).

Saghai Maroof, M. A., Biyashev, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q. and Allard, R. W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** 91: 5466-5570.

Sharma, S., Xu, S., Ehdaie, B., Hoops, A., Close, T. C. J., Lukaszewski, A. J. and Waines, J. G. 2011. Dissection of QTL effects for root traits using a chromosome arm-specific mapping population in bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics** 122: 759-769.

Takeda, S. and Matsuoka, M. 2008. Genetic approaches to crop improvement: Responding to environmental and population change. **Nature** 9: 444-457.

Themnykh, S. D., Park, N. A, Cartinnour, N. H., Lipovhch, L., Cho, Y. J., Ishii, T. and McCouch, S. R. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza Sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 100: 697-712.

Toorchi, M., Shashidhar, H. E, Sharma, N. and Hittalmani, S. 2002. Tagging QTLs for maximum root length in rainfed lowland rice (*Oryza sativa L.*) using molecular markers. **Cellular and Molecular Biology Letter** 7: 771-776.

Trachsel, S., Kaeppler, S. M., Brown, K. M. and Lynch, J. P. 2010. Shovelomics: High throughput phenotyping of maize (*Zea mays* L.) root architecture in the field. **Plant and Soil** 341 (1-2): 75-87.

Venuprasad, R., Shashidhar, H. E., Hittalmani, S. and Hemamalini, G. S. 2002. Tagging quantitative trait loci associated with grain yield and root morphological traits in rice (*Oryza sativa* L.) under contrasting moisture regimes. **Euphytica** 128: 293-300.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T .V. D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** 23: 4407-4414.

Wang, J. 2009. Inclusive composite interval mapping of quantitative trait genes. **Acta Agronomica Sinica** 35: 3239-3245.

Xiao, J. H., Li, J. M., Yuan, L. P. and Tanksley, S. D. 1996. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from subspecific rice cross. **Theoretical and Applied Genetics** 92: 230-244.

Yadav, R., Courtois, B., Huang, N. and McLaren, G. 1997. Mapping genes controlling root morphology and root distribution in a double-haploid population of rice. **Theoretical and Applied Genetics** 94: 619-632.

Yoshida, S. and Hasegawa, S. 1982. The rice root system: its development and function. In: Drought resistance in crops with emphasis on rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Zheng, H. G., Babu, R. C., Pathanmd, M. S., Ali, L., Huang, N., Courtois, B. and Nguyen, H. T. 2000. Quantitative trait loci for root-penetration ability and root thickness in rice: Comparison of genetic backgrounds. **Genome** 43: 53-61.

Zheng B. S., Yang, L., Zhang, W. P., Mao, C. Z., Wu, Y. R., Yi, K. K., Liu, F. Y. and Wu, P. 2003. Mapping QTLs and candidate genes for rice root traits under different water supply conditions and comparative analysis across three populations. **Theoretical and Applied Genetics** 107: 1505-1515.

University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research
Vol. 7, No. 4, Winter 2018 (451-469)

Mapping QTLs related to rice roots and shoots traits in recombinant lines derived from Anbarboo × Sepidroud under drought stress conditions

Hossein Sabouri[1*], Sharifeh Mohammad Alegh[2], Abdollatif Gholizade[3] and Jafar Gilaki[4]

Received: November 11, 2015 Accepted: May 11, 2016

Abstract

To identify the genomic regions associated with drought stress tolerance using QTL analysis, 96 F_8 lines derived from a cross between two varieties, Sepidroud and Anbarboo, were planted at a research field in Azadshahr region, Golestan Province, Iran, in 2011. To impose drought stress, irrigation interval was considered as 20 days from maximum tillering phase to maturity stage. The linkage map was constructed using 124 microsatellite markers and 264 AFLP markers at the laboratory of Genetics and Plant Breeding, Gonbad-e-Kavous University, Golestan, Iran, which covered 1950.4 cM of the rice genome with average distance of 5.20 cM between adjacent markers. In this study, regions of chromosome 2 at the interval of E070-M140-1-E070-M150-13, chromosome 4 at the interval of E060-M160-3-RM1359 and chromosome 9 at the interval of E120-M140-9-E090-M140-14 were identified that controlled several traits under drought stress conditions. Co-locating of the QTLs involved in control of traits can indicates same genetic controlling. QTL mapping of traits indicated QTLs qRND-2a, qRND-4a, qRVD-2, qRVD-4a, qFRWD-2, qFRWD-4, qDWRD-2a, qSWD-2a, qSWD-4, qPWD-2, qPWD-4, qPND-2a, qPND-4 and qPSPD-9 had a large effect and more than 20% of the explanation of phenotypic variation, respectively. Considering that these genomic regions explained a significant part of phenotypic variation therefore those have potential for application in the breeding programs of Marker-assisted selection for drought tolerance after validation in other environments and populations.

Keywords: Linkage maps, Malecular markers, QTL analysis

1. Assoc. Prof., Dept. of Plant Production, College of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad-e-Kavous University, Gonbad-e-Kavous, Iran
2. M. Sc. Student, Dept. of Plant Production, College of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad-e-Kavous University, Gonbad-e-Kavous, Iran
3. Assist. Prof., Dept. of Plant Production, College of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad-e-Kavous University, Gonbad-e-Kavous, Iran
4. B. Sc. Student, Dept. of Plant Production, College of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad-e-Kavous University, Gonbad-e-Kavous, Iran
* Corresponding author: hos.sabouri@gmail.com