

شناسایی QTL های پیوسته با ارتفاع بوته و زمان رسیدگی در برنج Identification of QTLs linked to plant height and maturity time in rice

میثم شیخ پور آهندانی^۱، بابک ربیعی^۲ و رضا شیرزادیان خرم آباد^۳

چکیده

شیخ پور آهندانی، م.، ب. ربیعی و ر. شیرزادیان خرم آباد. ۱۳۹۲. شناسایی QTL های پیوسته با ارتفاع بوته و زمان رسیدگی در برنج. مجله علوم زراعی ایران. ۱۵ (۲): ۱۲۰-۱۰۷.

هدف از این تحقیق، شناسایی نشانگرهای ریزماهواره (SSR) و AFLP پیوسته با صفات ارتفاع بوته و زمان رسیدگی در یک جمعیت ۱۸۸ فردی $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی ارقام برنج بینام و کادوس به منظور استفاده از آنها در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر و هرمی نمودن ژن‌ها (QTL ها) برای کاهش ارتفاع بوته و زمان رسیدگی در نتاج حاصل بود که در سال ۱۳۸۸ در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان اجرا شد. از بین نشانگرهای SSR و AFLP مورد استفاده در این تحقیق، تعداد ۶۱ نشانگر SSR و ۷۴ نشانگر AFLP، چندشکلی خوبی در بین والدین نشان دادند که برای تهیه نقشه پیوستگی جمعیت مورد استفاده قرار گرفتند. نقشه حاصل، ۱۷۸۶/۴ سانتی مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد و فاصله متوسط هر دو نشانگر مجاور از یکدیگر ۱۴/۰۶ سانتی مورگان بود. با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، برای ارتفاع بوته، پنج QTL روی کروموزوم‌های ۳، ۷، ۹، ۱۰ و ۱۱ و برای روز تا رسیدگی کامل نیز دو QTL بر روی کروموزوم‌های ۶ و ۷ شناسایی شدند. این QTL ها در مجموع به ترتیب ۶۲/۸ درصد و ۲۳/۹ درصد از تنوع فنوتیپی این دو صفت را پوشش دادند. از میان QTL های شناسایی شده، qPH-3 (در فاصله بین نشانگرهای P36-RM232 و qPH-10 (در فاصله بین نشانگرهای RM147_P77-M62-4) برای ارتفاع بوته و qMD-6 (در فاصله بین نشانگرهای RM314_P51-M74-4) برای روز تا رسیدگی کامل، به ترتیب با فاصله ۵/۵، ۱۹/۷ و ۰/۸ سانتی مورگان از نزدیک‌ترین نشانگر و ۱۷/۱۶، ۱۵/۴۷ و ۱۵/۷۱ درصد از تنوع فنوتیپی صفات مربوطه را کنترل کردند و به عنوان QTL های موثر و نسبتاً بزرگ‌اثر ارتفاع بوته و زمان رسیدگی شناسایی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان از سه QTL فوق برای هرمی کردن ژن‌ها یا از نشانگرهای پیوسته با آنها برای استفاده در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر به منظور انتخاب لاین‌های پاکوتاه و زودرس در لاین‌های در حال تفرق برنج مورد مطالعه، استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: برنج، تجزیه QTL، نشانگر ریزماهواره و نقشه پیوستگی.

این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

۲- دانشیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان (عضو انجمن علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران) (مکاتبه کننده)

(پست الکترونیک: rabiei@guilan.ac.ir)

۳- استادیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

مقدمه

یکی از مهم‌ترین اهداف اصلاحی در برنج، کاهش ارتفاع بوته و زمان رسیدگی است. ارقام پا کوتاه، علاوه بر تولید عملکرد بیشتر دانه در واحد سطح، مقاومت بیشتری در مقابل خوابیدگی بوته و همچنین مقاومت بیشتری به تنش‌های زنده و غیرزنده نشان می‌دهند (Fujino and Sekiguchi, 2008). از نظر زمان رسیدگی نیز رقم‌های زودرس نسبت به رقم‌های دیررس، خوشه بیشتری تولید می‌کنند (Akita, 1989). با توجه به کاهش دمای هوا، کاهش میزان فتوسنتز و عدم انتقال مجدد مواد فتوسنتزی به دانه‌ها، وزن هزار دانه در ارقام دیررس کمتر از ارقام زودرس می‌باشد (Noorbakhshian and Rezaei, 1999). به علاوه ارقام زودرس در مدت زمان کوتاه‌تری دوره‌ی زندگی خود را تکمیل می‌کنند و به همین علت از بسیاری از تنش‌های محیطی انتهای فصل، در امان مانده و قبل از وقوع تنش، محصول آنها برداشت می‌شود. به این ترتیب، کاهش ارتفاع بوته و زمان رسیدگی و یا انتخاب نتاج پاکوتاه و زودرس در نسل‌های در حال تفرق، به ترتیب به منظور تحمل بیشتر بوته‌ها در برابر خوابیدگی و دور ماندن از تنش‌های محیطی انتهای فصل، همیشه مورد توجه به‌نژادگران برنج بوده است، اما مشکل اساسی در بسیاری از پژوهش‌ها، انتخاب هم‌زمان نتاج پاکوتاه، زودرس و پر محصول است. در صورتی که بتوان پژوهش‌های پایه‌ای برای شناسایی ژن‌ها یا QTL‌های کنترل‌کننده این صفات اجرا نمود، انتخاب نتاج مناسب می‌تواند با دقت بیشتر و به صورت هدفمند با توجه به نشانگرهای پیوسته با آنها انجام شود (Rabiei and Ghareyazie, 2005). بر این اساس، پژوهش‌های مختلفی برای شناسایی QTL‌ها و نشانگرهای پیوسته با آنها انجام شده است.

در آزمایشی، پنج QTL زمان رسیدگی بر روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۵، ۶ و ۸، با استفاده از ۸۸ نشانگر SSR در یک جمعیت متشکل از ۱۹۲ گیاه F_2 حاصل از

تلاقی والدین برنج‌های دم‌سفید و گرده، مکان‌یابی شد (Rabiei and Ghareyazie, 2005). در آزمایش دیگری در یک جمعیت ۱۲۵ فردی F_2 ، یک QTL با غالبیت ناقص بر روی کروموزوم ۸ مکان‌یابی شد که توصیف‌کننده‌ی ۹۳/۸ درصد از تغییرات ارتفاع بوته بود (Zhang et al., 2006). در یک آزمایش، در یک جمعیت لاین خویش‌آمیخته نوترکیب (RILs) و چند جمعیت تست‌کراس، با استفاده از ۲۴۴ نشانگر مولکولی، هفده QTL برای ارتفاع بوته شناسایی شدند که بر روی تمامی دوازده کروموزوم برنج پراکنده بودند (You et al., 2006). در تحقیق دیگری در یک جمعیت F_2 حاصل از تلاقی دو رقم برنج ایرانی و با استفاده از نشانگر ریزماهواره چندشکل، سه QTL بزرگ‌اثر مرتبط با زمان رسیدگی بر روی کروموزوم‌های ۶، ۷ و ۸ شناسایی شدند که به ترتیب ۲۳/۵، ۱۹/۸ و ۲۰/۵ درصد از تغییرات فنوتیپی زمان رسیدگی را توصیف می‌کردند (Rabiei, 2007). گزارش دیگری، در یک جمعیت ۱۱۵ فردی حاصل از تلاقی برگشتی (BC1F1) و با استفاده از ۹۳ نشانگر ریزماهواره چندشکل، برای ارتفاع بوته، یک QTL در منطقه ۱۲۸ سانتی‌مورگانی کروموزوم شماره ۴ شناسایی شد که ۱۲/۸ درصد تنوع فنوتیپی این صفت را کنترل می‌کرد (Susanto et al., 2008). در یک آزمایش، در سه جمعیت F_2 ارقام برنج ژاپنی، QTL‌های مرتبط با زمان رسیدگی، با استفاده از نشانگرهای SSR مورد بررسی قرار گرفته و در پایان، سه QTL بر روی کروموزوم‌های ۳ و ۶ (دو QTL) مکان‌یابی شدند (Fujino and Sekiguchi, 2008). در یک تحقیق دیگر بر روی یک جمعیت ۱۹۲ فردی F_2 و $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی بین ارقام برنج خزر (*Indica*) و طارم محلی (*Indica*)، و با استفاده از ۳۶۵ نشانگر ریزماهواره چندشکل، دو QTL بزرگ‌اثر مربوط به ارتفاع بوته، بر روی کروموزوم‌های ۱ و ۵ مکان‌یابی شدند که به ترتیب ۱۶/۳۰ و ۲۰/۴۸ درصد از تنوع فنوتیپی ارتفاع بوته را

تلاقی دو رقم برنج ایرانی با نام های بینام و کادوس بود که به همراه والدین، در مزرعه پژوهشی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان در سال ۱۳۸۸ کشت شدند. علت انتخاب این ارقام به عنوان والدین تلاقی، به دلیل خصوصیات بسیار متفاوت آنها بود تا از این طریق بتوان جمعیت بسیار متنوعی برای شناسایی QTL های بزرگ اثر و حتی کوچک اثر صفات مورد نظر ایجاد و اثرات ژنوتیپی و فنوتیپی آنها را با دقت بیشتری ارزیابی نمود. بینام از ارقام محلی ایران است که طی سال های متمادی در مناطق شمالی کشور کشت شده است و دارای کیفیت پخت بسیار مطلوب می باشد. این رقم پابلند و حساس به خوابیدگی و بیماری بلاست بوده و همچنین دارای دوره رشد کم تا متوسط و عملکرد پایین می باشد. در مقابل، کادوس از ارقام اصلاح شده در موسسه تحقیقات برنج کشور است که دارای کیفیت پخت متوسط می باشد. این رقم دارای ارتفاع بوته کوتاه و مقاوم به خوابیدگی و بیماری بلاست بوده و دارای دوره رشد متوسط و عملکرد بالا است و جزء ارقام پرمحصول محسوب می شود (جدول ۱).

توصیف می کردند (Sabouri et al., 2009). در گزارش دیگری نیز دو QTL برای صفت ارتفاع بوته، بر روی کروموزوم های ۷ و ۸ مکان یابی شدند. این QTL ها در یک جمعیت ۲۳۶ فردی $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی دو رقم برنج ایرانی با نام های سپیدرود و غریب و با استفاده از ۱۰۵ نشانگر چندشکل ریزماهواره شناسایی شدند (Sabouri et al., 2010).

هدف از این تحقیق، تهیه نقشه پیوستگی یک جمعیت $F_{2:3}$ برنج حاصل از تلاقی رقم های بینام و کادوس با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR و AFLP، مکان یابی QTL های کنترل کننده صفات ارتفاع بوته و زمان رسیدگی روی نقشه پیوستگی ایجاد شده و شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با آنها جهت انتخاب به کمک نشانگر یا هر می کردن QTL ها به منظور دستیابی به ارقام پاکوتاه و زودرس در برنامه های اصلاح مولکولی بود.

مواد و روش ها

جمعیت تهیه نقشه شامل ۱۸۸ لاین F_3 حاصل از

جدول ۱- مشخصات والدین برنج مورد استفاده برای تهیه جمعیت نقشه یابی در تحقیق حاضر (Safaei Chaeikar et al., 2009)

Table 1. Characteristics of rice parents used for mapping population constructing (Safaei Chaeikar et al., 2009)

رقم برنج Rice cultivar	منشا Origin	کیفیت پخت Cooking quality	زمان رسیدگی Maturity (day)	ارتفاع بوته Plant height (cm)	عملکرد دانه Grain yield (kg.ha ⁻¹)
بینام Binam	بومی ایرانی Iranian native	خیلی خوب Very good	110	138	3000
کادوس Kadous	اصلاح شده Improved	متوسط Intermediate	130	110	5500

رسیدگی کامل، تعداد روز از زمان کاشت بذر در خزانه تا زمان رسیدگی کامل ۸۰ درصد از خوشه های هر لاین ثبت شد.

جهت ارزیابی ژنوتیپ های والدینی برای شناسایی نشانگرهای چندشکل و همچنین غربال مولکولی جمعیت، استخراج DNA از نمونه های برگ والدینی و گیاهچه های F_2 ، که از قبل در دمای ۸۰- درجه

برای ارزیابی فنوتیپی، ارتفاع بوته و زمان رسیدگی در ۱۸۸ لاین F_3 و در ۲۱ بوته از هر لاین در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار اندازه گیری شد و میانگین هر لاین برای تجزیه QTL مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه گیری ارتفاع بوته، طول بلندترین ساقه از سطح زمین تا نوک خوشه آن بدون احتساب ریشک بر حسب سانتی متر و برای صفت روز تا

DNA ژنومی در دمای اصلی اتصال آغازگر در طی ۲۶ چرخه انجام شد. الکتروفورز فرآورده‌های PCR، بر روی ژل‌های پلی‌اکریلامید واسرشته‌ساز شش درصد با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی (Bio-RAD Sequi Gen, USA) انجام شد.

رنگ آمیزی ژل نیز با روش باسام و همکاران (Bassam et al., 1991) در شش مرحله به صورت زیر انجام شد: ۱- تثبیت DNA در بافت ژل به وسیله یک لیتر محلول اسید استیک ۱۰ درصد به مدت ۴۵ دقیقه، ۲- شستشوی ژل با آب دو بار تقطیر، ۳- رنگ آمیزی ژل با محلول رنگ آمیزی شامل یک گرم نیترا نقره و دو میلی لیتر فرم آلدهید ۳۷ درصد در یک لیتر آب دو بار تقطیر به مدت ۳۰ دقیقه، ۴- شستشوی ژل با آب دو بار تقطیر سرد به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه، ۵- ظهور نوارهای الکتروفورزی به وسیله محلول ظاهر کننده سرد شامل ۳۰ گرم کربنات سدیم، دو میلی لیتر فرم آلدهید ۳۷ درصد و ۵۰۰ میکرو لیتر محلول تیوسولفات سدیم یک درصد در یک لیتر آب دو بار تقطیر، ۶- توقف ظهور نوارهای الکتروفورزی با استفاده از محلول تثبیت. کلیه مراحل برش، تکثیر اولیه و تکثیر نهایی نشانگرهای AFLP، با روش ووس و همکاران (Vos et al., 1995) انجام شد.

سانتی گراد نگهداری شده بودند، با استفاده از روش CTAB (Murray and Thompson, 1980) انجام شد. کلیه ارزیابی‌های ژنوتیپی مربوطه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. به منظور تهیه نقشه ژنتیکی و شناسایی QTL‌های کنترل کننده صفات مورد مطالعه، ۱۴۴ جفت نشانگر SSR و ۶۲ ترکیب از نشانگرهای AFLP بر روی والدین مورد ارزیابی قرار گرفتند و نشانگرهای چندشکل بین والدین برای ثبت داده‌های ژنوتیپی افراد جمعیت مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems- 2720, USA) انجام شد. برنامه حرارتی و دوره‌های زمانی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور کاهش تکثیر نوارهای الکتروفورزی اضافی و تکثیر اختصاصی، با توجه به دمای اتصال آغازگرها، طی برنامه کاهش دمایی (Touch down PCR) انجام شد. بدین صورت که اتصال آغازگر از ۱۰ درجه سانتی گراد بالاتر از دمای اصلی اتصال آغازگر شروع شد و در هر چرخه، دمای اتصال آغازگر یک درجه سانتی گراد کاهش یافت و پس از ۱۰ چرخه به دمای اصلی اتصال آغازگر رسید و سپس تکثیر

جدول ۲- توالی جایگاه‌های برشی آنزیم‌های هضم کننده DNA، سازگار سازها و آغازگرهای *MseI* و *PstI* در مرحله پیش تکثیر

Table 2. Sequence of restriction sites of DNA restriction enzymes, adaptors and *PstI* and *MseI* primers in

preamplification stage			
Sequence of <i>MseI</i> restriction site	توالی جایگاه برشی <i>MseI</i>	Sequence of <i>PstI</i> restriction site	توالی جایگاه برشی <i>PstI</i>
5'...T↓TAA...3'		5'...CTGCA↓G...3'	
3'...AAT↑T...5'		3'...G↑ACGTC...5'	
Sequence of <i>MseI</i> adaptor	توالی سازگار ساز <i>MseI</i>	Sequence of <i>PstI</i> adaptor	توالی سازگار ساز <i>PstI</i>
5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'		5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3'	
3'-TACTCAGGACTCAT-5'		3'-CATCTGACGCATGT-5'	
توالی آغازگر <i>MseI</i> در مرحله پیش تکثیر		توالی آغازگر <i>PstI</i> در مرحله پیش تکثیر	
Sequence of <i>MseI</i> primer in preamplification stage		Sequence of <i>PstI</i> primer in preamplification stage	
5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'		5'-GACTGCGTACATGCAG-3'	

جدول ۳- توالی آغازگرهای مورد استفاده در مرحله تکثیر انتخابی

Table 3. Sequence of primers used in selective amplification stage

آغازگر Primer	نوکلئوتیدهای انتخابی Selective nucleotides
P89-M44	P-TGG + M-ATC
P36-M42	P-ACC + M-AGT
P67-M39	P-GCA + M-AGA
P77-M62	P-GTG + M-CTT
P57-M61	P-CGG + M-CTG
P43-M33	P-ATA + M-AAG
P67-M59	P-GCA + M-CTA
P70-M47	P-GTT + M-CAA
P70-M49	P-GTT + M-CAG
P70-M37	P-GTT + M-ACG
P70-M48	P-GTT + M-CAC
P70-M50	P-GTT + M-CAT
P70-M54	P-GTT + M-CCT
P70-M55	P-GTT + M-CGA
P70-M58	P-GTT + M-CGT
P51-M58	P-CCA + M-CGT
P51-M74	P-CCA + M-CCA

ابتدا مقادیر نوترکیبی بین نشانگرهای چندشکل محاسبه و بر اساس تابع کوسامبی (Kosambi, 1944) به فاصله ژنتیکی بر حسب سانتی مورگان تبدیل شدند. در مرحله بعد با استفاده از نقشه پیوستگی حاصل و ارزش های فنوتیپی صفات، QTL های کنترل کننده صفات ارتفاع بوته و زمان رسیدگی با روش مکان یابی فاصله ای مرکب (CIM) شناسایی شدند. این عمل با استفاده از نرم افزار Win QTL Cartographer (Basten *et al.*, 2001) انجام و حداقل فاصله پیویش ۰/۵ سانتی مورگان در نظر گرفته شد و QTL هایی با حداقل LOD=۲/۵ (معادل ۱۱/۵ LRT) به عنوان QTL های مهم و موثر بر صفات مورد مطالعه انتخاب شدند.

نتایج و بحث

مقایسه میانگین بین والدین بینام و کادوس نشان داد که تفاوت بین آنها از نظر ارتفاع بوته و روز تا رسیدگی کامل بسیار معنی دار بود (جدول ۴). انجام آزمون های چولگی و کشیدگی در جمعیت F₃ نشان داد که توزیع فنوتیپی صفات مورد مطالعه، پیوسته و تقریباً نرمال بود و

برای این منظور، هضم DNA ژنومی با استفاده از دو آنزیم محدودگر *PstI* و *MseI* انجام گرفت. توالی جایگاه های برشی آنزیم های هضم کننده DNA، سازگار سازها، آغازگرهای *PstI* و *MseI* در مرحله پیش تکثیر در جدول دو و توالی آغازگرهای مرحله تکثیر انتخابی در جدول سه ارائه شده اند.

میانگین، انحراف استاندارد فنوتیپی و واریانس صفات مورد مطالعه از ۲۱ نمونه ی تصادفی اندازه گیری شده از والدین و ۱۸۸ لاین F₃، برآورد شد. برای مقایسه ی میانگین والدین از نظر صفات ارتفاع بوته و زمان رسیدگی، از آزمون t-student و برای بررسی وجود توزیع نرمال در جمعیت F₃ مورد مطالعه از آزمون های چولگی و کشیدگی استفاده گردید. برای تهیه نقشه پیوستگی جمعیت، نرم افزار MapManager QTXb17 (Manly and Olson, 1999) مورد استفاده قرار گرفت و به منظور ایجاد گروه های پیوستگی و اختصاص نشانگرها به آنها از نقشه ژنتیکی ارائه شده توسط مک کوش و همکاران (McCouch *et al.*, 2002) استفاده شد. برای این منظور،

آل‌های متفاوت در دو والد در مکان‌های ژنی کنترل‌کننده این صفات و دخالت هر دو والد در بروز آن‌ها می‌باشد، به نظر می‌رسد که ترکیب آل‌های دو والد در نتاج، منجر به بروز مقادیر بالاتر یا پایین‌تر از والدین و ظهور پدیده تفکیک متجاوز شده است.

هیچ کدام از آماره‌های چولگی و کشیدگی معنی‌دار نبودند که این موضوع می‌تواند دلیلی بر وجود وراثت کمی برای صفات مورد مطالعه باشد (شکل ۱). از نتاج F_3 ، ارزش‌های فنوتیپی خارج از محدوده والدینی را نشان دادند که می‌تواند نشان‌دهنده پدیده تفکیک متجاوز باشد که دلیل آن احتمالاً وجود

جدول ۴- مقادیر اندازه‌گیری شده برای صفات ارتفاع بوته و زمان رسیدگی در والدین و ۱۸۸ لاین F_3 برنج

Table 4. Measured values for plant height and maturity time in parents and 188 F_3 lines of rice

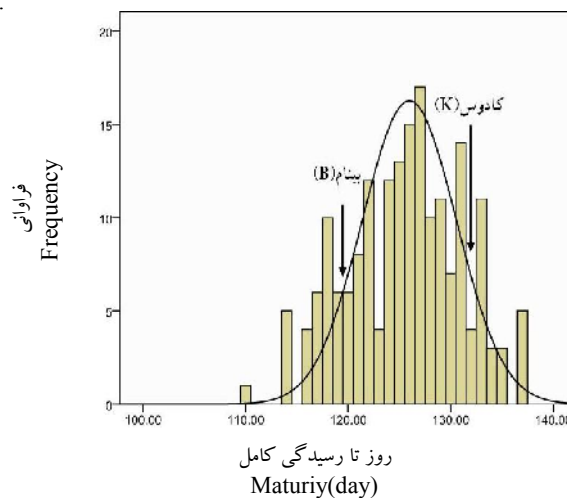
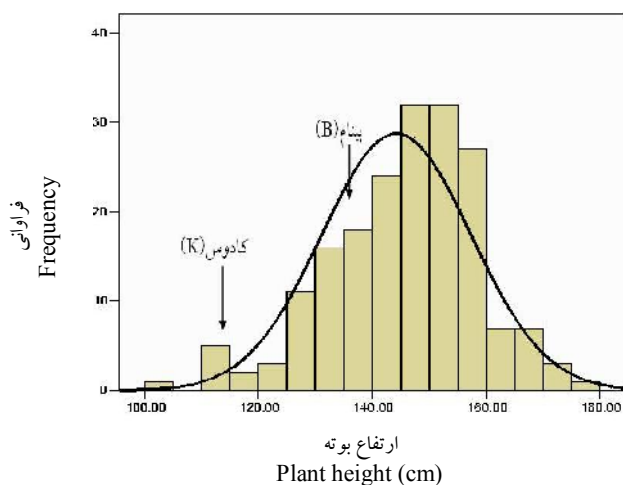
صفات گیاهی Plant characteristics	والدین Parents		F_3 ($m \pm S\bar{x}$)	t- value (P_1-P_2)
	کادوس Kadous ($m \pm S\bar{x}$)	بینام Binam ($m \pm S\bar{x}$)		
ارتفاع بوته Plant height (cm)	113.6 $\pm$ 1.46	136.7 $\pm$ 0.83	144.5 $\pm$ 0.9	29.91 **
روز تا رسیدگی کامل Maturity (day)	131.6 $\pm$ 0.67	119.3 $\pm$ 0.86	125.3 $\pm$ 0.7	11.31 **

** : Significant at 1% probability level

** : معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

m و $S\bar{x}$: به ترتیب میانگین و اشتباه استاندارد جمعیت می‌باشند

m and $S\bar{x}$: Average and standard error of population, respectively



شکل ۱- توزیع فراوانی ارزش‌های فنوتیپی صفات ارتفاع بوته و زمان رسیدگی در ۱۸۸ لاین F_3 برنج حاصل از تلاقی ارقام بینام و کادوس. بیکان‌ها موقعیت والدین را از نظر صفات مورد مطالعه نشان می‌دهند

Fig.1. Frequency distribution of phenotypic values of plant height and day to maturity traits studied traits in 188 F_3 rice lines derived from a cross between Binam and Kadous.

(B) and (K) indicate the phenotypic values of the parents, Binam and Kadous, respectively

۱۸۸ بوته F_2 تعیین ژنوتیپ شدند که از این تعداد ۱۳۵ نشانگر ۶۱ نشانگر SSR و ۷۴ نشانگر AFLP

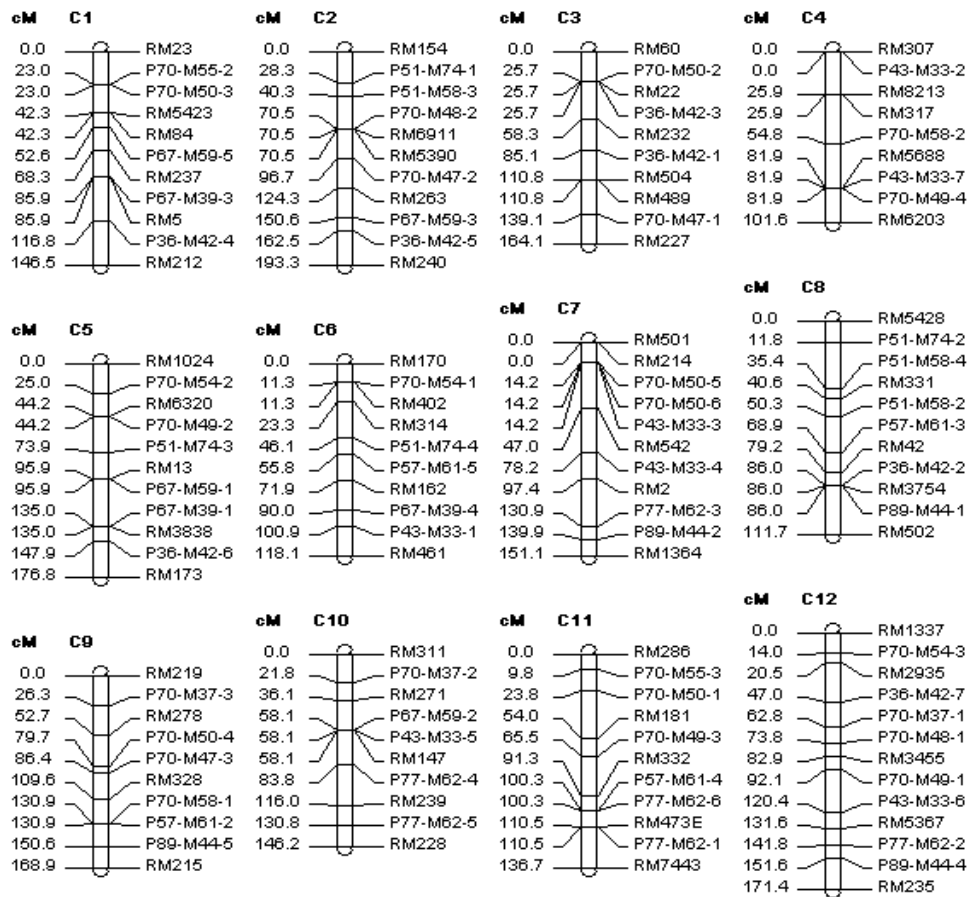
برای تهیه نقشه ژنتیکی جمعیت، تعداد ۱۴۴ نشانگر SSR و ۶۲ ترکیب آغازگر از نشانگرهای AFLP، در

(۱۷ ترکیب) چندشکلی در بین والدین بینام و کادوس نشان دادند که برای تهیه نقشه پیوستگی مورد استفاده قرار گرفتند. شامل ۶۱ نشانگر SSR توزیع یکنواختی روی کروموزوم‌ها داشتند به گونه‌ای که به‌طور متوسط روی هر کروموزوم ۵ نشانگر SSR وجود داشت. نقشه حاصل، ۱۷۸۶/۴ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد و فاصله بین دو نشانگر مجاور، به‌طور متوسط ۱۴/۰۶ سانتی‌مورگان بود (شکل ۲). همچنین، هفت نشانگر با هیچ یک از نشانگرها پیوسته نبودند و به‌عنوان نشانگرهای ناپیوسته شناسایی شدند.

QTL های ارتفاع بوته به ترتیب روی کروموزوم‌های ۳، ۷، ۹، ۱۰ و ۱۱ شناسایی شدند (جدول ۵). از این میان، دو QTL که روی کروموزوم‌های ۳ (*qPH-3*) واقع در فاصله P36-M42-3_RM232 و ۱۰ (*qPH-10*) واقع در فاصله RM147_P77-M62-4 قرار داشتند، به‌عنوان QTL های مهم‌تر شناخته شدند، به‌نحوی که هر کدام از آن‌ها به تنهایی قادر به توصیف بیش از ۱۵ درصد از واریانس فنوتیپی ارتفاع بوته بودند. برآورد اثر افزایشی QTL ها نشان داد که در *qPH-3*، آلل‌های کادوس باعث کاهش ارتفاع بوته شدند، اما در *qPH-10*، مثبت و آلل‌های والد بینام موجب افزایش ارتفاع بوته شدند. در بررسی اثر غالبیت نیز مشخص شد که در *qPH-3*، اثر غالبیت QTL به سمت کاهش ارتفاع بوته بود، اما در *qPH-10*، غالبیت QTL به سمت افزایش ارتفاع بوته بود. بررسی عمل QTL ها نیز نشان داد که در *qPH-3*، اثر QTL از نوع فوق‌غالبیت می‌باشد. بنابراین برای استفاده از این QTL در جهت کاهش ارتفاع بوته می‌توان از روش تولید هیبرید استفاده نمود و نتاج انتخابی را با یکدیگر تلاقی داد. اما در QTL دوم (*qPH-10*)، عمل QTL از نوع غالبیت ناقص بود و بنابراین یک یا دو نسل انتخاب بین ژنوتیپ‌های برتر و سپس هیبرید بین آن‌ها به‌منظور استفاده از هر دو نوع اثرات افزایشی و غالبیت QTL برای اصلاح جمعیت

قابل توصیه است، اگرچه باید توجه داشت که هر دو نوع اثرات افزایشی و غالبیت در این QTL در جهت افزایش ارتفاع بوته بودند. همچنین سه QTL دیگر نیز قابل توجه هستند. *qPH-7* (روی کروموزوم ۷ و مابین RM542_P43-M33-4 و در فاصله ۹/۶ سانتی‌مورگانی از P43-M33-4)، *qPH-9* (روی کروموزوم ۹ و مابین RM219_P70-M37-3 و در فاصله ۶/۵ سانتی‌مورگانی از RM219) و *qPH-11* (روی کروموزوم ۱۱ و مابین P70-M49-3_RM332 و در فاصله ۱۰/۵ سانتی‌مورگانی از P70-M49-3) به ترتیب با LOD برابر با ۳/۱، ۴/۷ و ۳/۳، تنوع فنوتیپی صفت ارتفاع بوته را به ترتیب به میزان ۱۳/۱۲، ۱۲/۵۶ و ۴/۵۱ درصد توصیف نمودند و در رده بعدی اهمیت قرار داشتند. اثر افزایشی در این سه QTL، نشان داد که آلل‌های بینام موجب افزایش ارتفاع بوته شدند، اما در بررسی اثر غالبیت ژن‌ها، یک QTL از بقیه متفاوت بود. در *qPH-11*، اثر غالبیت QTL به سمت افزایش ارتفاع بوته بود، در حالی که در دو QTL دیگر، اثر غالبیت QTL تمایل به کاهش ارتفاع بوته را داشت. اثر QTL ها نیز در هر سه QTL از نوع فوق‌غالبیت بود، بنابراین برای استفاده از این QTL در جهت کاهش ارتفاع بوته می‌توان از روش تولید هیبرید استفاده نمود و نتاج انتخابی را با یکدیگر تلاقی داد. به نظر می‌رسد که از نشانگرهای P36-M42-3 و RM219 به دلیل فاصله مناسبی که با QTL های موجود برای این صفت دارند، می‌توان برای مطالعات آینده جهت کاربرد در برنامه‌های به‌نژادی به کمک نشانگر استفاده نمود.

شینگ و همکاران (Xing *et al.*, 2001)، یک QTL برای ارتفاع بوته روی کروموزوم شماره ۷ مکان‌یابی نمودند. این QTL در سه سال اجرای آزمایش بطور متوالی شناسایی شد و از اینرو با احتمال بسیار زیاد این QTL می‌تواند کنترل ارتفاع بوته را بر عهده داشته باشد. یو و همکاران (Yu *et al.*, 2002) در یک تحقیق



شکل ۲- نقشه پیوستگی ۱۲۸ نشانگر SSR و AFLP در جمعیت F₂ حاصل از تلاقی ارقام برنج بینام و کادوس. نشانگرها در سمت راست گروه‌های پیوستگی و فاصله ژنتیکی آن‌ها بر اساس تابع کوسامبی در سمت چپ آن‌ها نشان داده شده است. گروه‌های پیوستگی بر

اساس نقشه ژنتیکی مک کوش و همکاران (McCouch *et al.*, 2002) ایجاد شدند

Fig. 2. Linkage map of 128 SSR and AFLP markers in the F₂ population derived from Binam and Kadous rice cultivars. Names of markers and genetic distances (cM) calculated by the Kosambi function are shown on the right and left of the linkage groups, respectively. Linkage groups were constructed based on the genetic map of McCouch *et al.* (2002)

جمعیت دابل هاپلوئید (DH)، برای صفت ارتفاع بوته، یک QTL بزرگ اثر بر روی کروموزوم شماره ۳ مکان‌یابی نمودند که ۲۴/۴ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مذکور را توجیه می‌کرد. فنگ‌هوا و همکاران (Feng-hua *et al.*, 2005)، ده QTL مربوط به ارتفاع برنج را در دو جمعیت برنج شناسایی نمودند. این QTL‌ها روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۲ قرار داشتند. اثرات افزایشی هفت QTL شناسایی شده، مثبت بود و مابقی سه QTL دیگر به صورت منفی بود. یو و همکاران (You *et al.*, 2006)

دو ساله در جمعیت ۲۴۰ فردی F_{2:3}، برای ارتفاع بوته در سال اول فقط یک QTL روی کروموزوم ۷ (*ph7* در فاصله RG128-C1023) مکان‌یابی نمودند که ۱۳/۱ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توصیف می‌کرد، در حالی که در سال دوم دو QTL روی کروموزوم‌های ۳ (*ph3* در فاصله R1966-G144) و ۷ (*ph7* در فاصله C1023-R1440) شناسایی نمودند که به ترتیب ۶/۱ و ۹/۷ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را کنترل می‌کردند. هیتالمانی و همکاران (Hittalmani *et al.*, 2002) در یک

جدول ۵- نشانگرهای پیوسته با QTL های کنترل کننده ارتفاع بوته و زمان رسیدگی در جمعیت F_{2:3} حاصل از تلاقی ارقام برنج بینام و کادوس
Table 5. Linked markers to QTLs controlling plant height and maturity time in the F_{2:3} population from the cross between Binam and Kadous rice cultivars

صفات گیاهی	QTL	نشانگرهای مجاور	کروموزوم	LOD	موقعیت °Position (cM)	اثر افزایشی (a)	اثر غالبیت (d)	درجه غالبیت Degree of dominance	والد دهنده Donor parent	در صد واریانس فنوتیپی (R ²) Percentage of phenotypic variance explained
ارتفاع بوته Plant height	<i>qPH-3</i>	P36-M42-3 _RM232	3	4.95	5.5	- 2.45	- 11.76	- 4.8	کادوس Kadous	17.16
	<i>qPH-7</i>	RM542_ P43-M33-4	7	3.1	9.6	4.55	- 8.66	- 1.9	بینام Binam	13.12
	<i>qPH-9</i>	RM219_ P70-M37-3	9	4.71	6.5	4.53	- 5.48	- 1.20	بینام Binam	12.56
	<i>qPH-10</i>	RM147_ P77-M62-4	10	4.67	19.7	8.69	1.94	0.2	بینام Binam	15.47
	<i>qPH-11</i>	P70-M49-3 _RM332	11	3.37	10.5	5.45	13.18	2.41	بینام Binam	4.51
	<i>qMD-6</i>	RM314_ P51-M74-4	6	3.23	0.8	-2.73	- 3.99	- 1.46	بینام Binam	15.71
روز تا رسیدگی کامل Maturity	<i>qMD-7</i>	P43-M33-3 _RM542	7	4	14	3.7	6.84	1.8	کادوس Kadous	8.25

*: Position means the distance of QTL from nearest marker
SSR and AFLP markers, named with RM and P-M, respectively

*: منظور از موقعیت، فاصله QTL از نزدیکترین نشانگر است
نشانگرهای SSR و AFLP به ترتیب با RM و P-M نامگذاری شده‌اند

در یک جمعیت لاین خویش آمیخته نوترکیب (RILs) و جمعیت‌های تست کراس، با استفاده از ۲۴۴ نشانگر مولکولی توانستند هفده QTL برای ارتفاع بوته شناسایی کنند که روی تمامی دوازده کروموزوم برنج پراکنده بودند. صبوری و همکاران (Sabouri *et al.*, 2010) در یک جمعیت ۲۳۶ فردی $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی دو رقم برنج ایرانی با نام‌های سپیدرود و غریب، با استفاده از ۱۰۵ نشانگر ریزماهواره، برای صفت ارتفاع بوته، دو QTL شناسایی نمودند که یکی از آن‌ها بر روی کروموزوم ۷ (واقع در فاصله RM3608-RM3555) قرار داشت. این QTL، ۴/۱۹ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توصیف کرد و در آن اثر غالبیت QTL به سمت افزایش ارتفاع بوته و اثر QTL از نوع فوق غالبیت بود.

برای صفت روز تا رسیدگی کامل دو QTL شناسایی شدند. QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۶ (*qMD-6*) واقع در فاصله RM314_P51-M74-4، با LOD برابر با ۳/۲۳، میزان ۱۵/۷۱ درصد از تنوع فنوتیپی صفت روز تا رسیدگی کامل را توصیف نمود و به عنوان QTL مؤثر برای این صفت معرفی شد. در این QTL، آلل‌های بینام باعث کاهش تعداد روز تا رسیدگی کامل شدند، اثر غالبیت QTL به سمت کاهش زمان رسیدگی و عمل ژن در آن از نوع فوق غالبیت بود. بنابراین به نظر می‌رسد که برای استفاده از این QTL می‌توان از روش تولید هیبرید استفاده نمود و نتاج انتخابی را با یکدیگر تلاقی داد. نشانگر P51-M74-4 به دلیل نزدیکی مناسب با این QTL، احتمالاً بتواند به عنوان نشانگر مطلوب در برنامه‌های اصلاحی انتخاب به کمک نشانگر در آینده به کار گرفته شود. QTL دیگر (*qMD-7*) نیز در فاصله P43-M33-3_RM542 روی کروموزوم ۷ مکان‌یابی شد که با توجه به توجیه کمتر تغییرات فنوتیپی این صفت (۸/۲ درصد)، به عنوان QTL کوچک‌اثر شناخته شد. برآورد اثر افزایشی QTL نشان داد که آلل‌های کادوس باعث افزایش روز تا رسیدگی

کامل شدند و عمل ژن‌ها در آن از نوع فوق غالبیت بود، بنابراین هیبرید بین ژنوتیپ‌های برتر برای اصلاح جمعیت، قابل توصیه است. ربیعی و قره‌یاضی (Rabiei and Ghareyazie, 2005) در یک جمعیت ۱۹۲ فردی F_2 حاصل از تلاقی والدین دم‌سفید و گرده، پنج QTL برای زمان رسیدگی شناسایی نمودند که از این بین، QTL بزرگ‌اثر *md6* (در فاصله نشانگرهای RM121-RM527)، مقدار ۲۷/۹ درصد از تنوع فنوتیپی زمان رسیدگی را کنترل کرد. این QTL، همانند QTL شناسایی شده روی کروموزوم شماره ۶ در این تحقیق، کاهش زمان رسیدگی را به دنبال داشت. مونکادا و همکاران (Moncada *et al.*, 2001) در یک جمعیت ۲۷۴ فردی تلاقی برگشتی پیشرفته، چهار QTL برای زمان رسیدگی شناسایی نمودند که یکی از آن‌ها همانند پژوهش حاضر روی کروموزوم ۷ قرار داشت و ۷/۸ درصد از تنوع فنوتیپی صفت را توصیف نمود. فوجینو و سکی‌گوچی (Fujino and Sekiguchi, 2008) در سه جمعیت F_2 ارقام برنج ژاپنی، سه QTL برای زمان رسیدگی شناسایی نمودند که از این بین، دو QTL روی کروموزوم شماره ۶ قرار داشت. یکی از QTL‌ها در موقعیت ۱۰/۴ سانتی‌مورگانی و دیگری در موقعیت ۵۳/۵ سانتی‌مورگانی واقع بودند. اثر غالبیت در هر دو QTL، به سمت افزایش زمان رسیدگی بود.

نتیجه‌گیری

از میان QTL‌های شناسایی شده، *qPH-3* و *qPH-10* برای ارتفاع بوته و *qMD-6* برای زمان رسیدگی کامل، به ترتیب ۱۷/۲، ۱۵/۵ و ۱۵/۷ درصد از تنوع فنوتیپی صفات مربوطه را کنترل کردند و به عنوان QTL‌های موثر و نسبتاً بزرگ‌اثر کنترل‌کننده این صفات شناسایی شدند. در *qPH-3* و *qMD-6*، عمل ژن‌ها از نوع فوق غالبیت بود و بنابراین برای استفاده مؤثر از این QTL‌ها احتمالاً بتوان از روش هیبرید بین ژنوتیپ‌های

از آزمایش حاضر نیز می توان نواحی شناسایی شده از کروموزوم های ۳، ۶ و ۱۰ را مورد توجه قرار داد و برای تایید نتایج، آزمایش دیگری برای نقشه یابی دقیق این ناحیه اجرا نمود.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان و کارشناسان محترم آزمایشگاه های بیوتکنولوژی، مرکزی و زراعت و همچنین از تمامی همکارانی که در مراحل اجرای این تحقیق یار و یاور نگارندگان بودند، تشکر و قدردانی می شود. هزینه اجرای این تحقیق توسط معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی و معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان پرداخت شده است که بدین وسیله قدردانی می شود.

برتر جهت اصلاح جمعیت به ترتیب برای ارتفاع بوته و روز تا رسیدگی استفاده نمود، اما در $qPH-10$ ، عمل ژن از نوع غالبیت ناقص بود و بنابراین یک یا دو نسل انتخاب بین ژنوتیپ های برتر و سپس هیبرید بین آنها به منظور استفاده از هر دو نوع اثرات افزایشی و غالبیت QTL قابل توصیه است. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از نشانگرهای P36-M42-3، RM219 و P51-M74-4 به دلیل فاصله کمی که با QTL های مجاور خود برای دو صفت مورد مطالعه داشتند، احتمالاً بتوانند به عنوان نشانگرهای مناسب برای انتخاب به کمک نشانگر در برنامه های آتی جمعیت مورد مطالعه مورد استفاده قرار می گیرند. اگرچه تکرار آزمایش با نسل های پیشرفته تر و جمعیت های دیگر به منظور به دست آوردن نتایج دقیق تر ضروری است، اما با توجه به نتایج حاصل

References:

منابع مورد استفاده

- Akita, S. 1989.** Progress in Irrigated Rice Research (3rd. Ed.) International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P. M. Gresshoff. 1991.** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 196: 80-83.
- Basten, C. J., B. S. Weir and Z. B. Zeng. 2001.** QTL Cartographer: A Reference Manual and Tutorial for QTL Mapping. North Carolina State University. USA. pp. 163.
- Feng-hua, H., X. Zhang-Ying, Z. Rui-Zhen, A. Talukdar and Z. Gui-Quan. 2005.** Identification of QTLs for Plant height and its components by using single segment substitution lines in rice (*Oryza sativa*). Rice Sci. 12: 151-156.
- Fujino, K and H. Sekiguchi. 2008.** Mapping of quantitative trait loci controlling heading date among rice cultivars in the northernmost region of Japan. Breed. Sci. 58: 367-373.
- Hittalmani, S., H. E. Shashidhar, P. G. Bagali, N. Huang, J. S. Sidhu, V. P. Singh and G. S. Khush. 2002.** Molecular mapping of quantitative trait loci for plant growth, yield and yield related traits across three diverse locations in a doubled haploid rice population. Euphytica, 125: 207-214.
- Kosambi, D. D. 1944.** The estimation of map distances from recombination values. Annals Eugenics, 12: 172-175.
- Manly, K. F. and J. M. Olson. 1999.** Overview of QTL mapping software and introduction to map manager QT. Mammalian Genome, 10: 327-334.

- McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xiang, Q. Zhang, I. Kano, M. Yano, R.F. Jellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Wave and L. Stein. 2002.** Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). DNA Res. 9: 199-207 and 257-279.
- Moncada, P., C. P. Martinez, J. Borrero, M. Chatel, H. Gauch, E. Guimaraes, J. Tohme, and S. R. McCouch. 2001.** Quantitative trait loci for yield and yield components in an *Oryza sativa* x *Oryza rufipogon* BC₂F₂ population evaluated in an upland environment. Theor. Appl. Genet. 102: 41-52.
- Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8: 4321-4325.
- Noorbakhshian, J. and A. Rezaei. 1999.** Study of correlation between some traits and grain yield in rice cultivars using path analysis. Iran. J. Crop Sci. 1: 55-65. (In Persian with English abstract).
- Rabiei, B. and B. Ghareyazie. 2005.** Preparation of linkage map of SSR markers& mapping of QTLs controlling maturity date in a F₂ rice population. 4th International Biotechnology Congress in Islamic Republic of Iran. 15-17 Aug., Kerman (Mahan). (In Persian).
- Rabiei, B. 2007.** Linkage map of SSR markers and QTLs detection for heading date of Iranian rice cultivars. J. Agric. Sci. Technol. 9: 235-242.
- Sabouri, A., M. Toorchi, B. Rabiei, S. Aharizad, A. Moumeni and R. K. Singh. 2010.** Identification and mapping of QTLs for agronomic traits in Indica – Indica cross of rice (*Oryza sativa* L.). Cereal Res. Commun. 38: 317-326.
- Sabouri, H., A. Sabouri and A. R. Dadras. 2009.** Genetic dissection of biomass production, harvest index and panicle characteristics in indica-indica crosses of Iranian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Aust. J. Crop Sci. 3: 155-166.
- Safaei Chaeikar, S., H. A. Samizadeh, B. Rabiei and M. Esfahani. 2009.** Correlation of agronomic traits under favorable irrigation and water stress conditions in rice (*Oryza sativa* L.). J. Sci. Technol. Agric. Natur. Resour. 13(48): 91-105. (In Persian with English abstract).
- Susanto, U., H. Aswidinnoor, J. Koswara, A. Setiawan, V. Lopena, L. Torizo and V. S. Parminder. 2008.** QTL mapping of yield, yield components and morphological traits in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR marker. Bul. Agron. 36: 188-195.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414.
- Xing, Y. Zh., C. G. Xu, J. P. Hua, Y. F. Tan and X. L. Sun. 2001.** Mapping and isolation of quantitative trait loci controlling plant height and heading date in rice. Acta Bot. Sin. 43: 840-845.
- You, A., X. Lu, H. Jin, X. Ren, K. Liu, G. Yang, H. Yang, L. Zhu and G. He. 2006.** Identification of quantitative trait loci across recombinant inbred lines and testcross populations for traits of agronomic

importance in rice. Genetics, 172: 1287-1300.

Yu, S. B., J. X. Li, C. G. Xu, Y. F. Tan, X. H. Li and Q. Zhang. 2002. Identification of quantitative trait loci and epistatic interactions for plant height and heading date in rice. Theor. Appl. Genet. 104: 619–625.

Zhang, Y., L. Luo, C. Xu, Q. Zhang and Y. Xing. 2006. Quantitative trait loci for panicle size, heading date and plant height co-segregating in trait-performance derived near-isogenic lines of rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 113: 361-368.

Identification of QTLs linked to plant height and maturity time in rice

Sheykhpour Ahandani, M.¹, B. Rabiei² and R. Shirzadian Khoramabad³

ABSTRACT

Sheykhpour Ahandani, M., B. Rabiei and R. Shirzadian Khoramabad. 2013. Identification of QTLs linked to plant height and maturity time in rice. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 15(2): 107-120. (In Persian).

The objective of this study was to determine the microsatellite (SSR) and AFLP markers linked to plant height and maturity time in the 188 F_{2:3} families derived from the cross between two Iranian rice cultivars, Binam and Kadous for using in marker assisted selection method and pyramiding of genes (QTLs) for decreasing of plant height and maturity time in progenies. Among SSR and AFLP markers that used in this research, 61 SSR and 74 AFLP markers had adequate polymorphism between the parents that were used to construct linkage map of the population. The average distance of adjacent markers was 14.06 cM and covers 1786.4 cM of the rice genome. Using the Composite interval mapping (CIM) method, 5 QTLs were mapped for plant height on the chromosomes 3, 7, 9, 10 and 11, and 2 QTLs for maturity time on the chromosomes 6 and 7. These QTLs totally controlled 62.82 % and 23.96 % of the phenotypic variance of 2 traits, respectively. Among these mapped QTLs, *qPH-3* (between P36-M42-3_RM232) and *qPH-10* (between RM147_P77-M62-4) for plant height and *qMD-6* (between RM314_P51-M74-4) for maturity time with distance from nearest markers, respectively equal 5.5, 19.7 and 0.8 cM, controlled 17.16 %, 15.47 % and 15.71 % of the phenotypic variance, respectively. These QTLs were identified as effective and relatively major QTLs for plant height and maturity times. Results showed that these three QTLs can be used for pyramiding of genes and their linkage markers can be used in marker assisted selection programs for selection of dwarf and early lines in these segregating populations.

Keywords: Linkage map, Microsatellite marker, QTL analysis and Rice.

Received: February 2012 Accepted: March 2013

1- MSc Student, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2- Associate Prof., Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran (Corresponding author)

(Email: rabiei@guilan.ac.ir)

3- Assistant Prof., Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran