شناسایی ترکیبات عطری برنج با روش ریزاستخراج فاز جامد در کروماتوگرافی گازی توأم با طیف‌سنج جرمی و مکان‌یابی جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده آنها با بکارگیری نشانگر ریزماهواره

رضا امیری‌فهلیانی*[۱]، محمود خدامباشی[۲]، علیرضا غیاثوند[۳]

[۱] استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج و دانشجوی دکتری سابق دانشگاه شهرکرد
[۲] دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
[۳] استاد گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۹/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۲٤

چکیده

تقاضای بیشتر برای برنج‌های عطری، قیمت بالاتر آنها را درپی داشته و توجه به‌نژادگران گیاهی را به شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده عطر برنج جلب کرده است. نشانگرهای شدیداً پیوسته با ژن‌های مهم کنترل‌کننده صفات زراعی، عمل گزینش فنوتیپی را سودمندتر، مؤثرتر، واقعی‌تر و اقتصادی‌تر از روش‌های معمول به‌نژادی گیاهی می‌نمایند. این تحقیق به منظور شناسایی ترکیبات فرّار در برنج و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده آنها با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام شد. از تلاقی رقم موسی‌طارم و ۳۰٤، ۱۳۹ تک بوته $F_۲$ در سال ۸۷-۱۳۸٦ بصورت مجزا بذرگیری و برای کشت مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج، جداسازی و شناسایی ترکیبات فرّار نمونه‌های بذری خانواده‌های $F_{2:3}$ با استفاده از روش حساس و کارآمد ریزاستخراج فاز جامد در کروماتوگرافی گازی توأم با طیف‌سنج جرمی انجام شد. ترکیب‌های آلکانی تترادکان، پنتادکان، هگزادکان و هپتادکان از ترکیبات عمده شناسایی شده بودند. کروموزوم‌های ۱، ٤، ٦، ۱۱ و ۱۲ حامل جایگاه‌های کنترل‌کننده ترکیب‌های فرّار بودند. کروموزوم ٤ بیشترین جایگاه را در بر داشت. از ۱٤ جایگاه شناسایی شده، ۱۲ جایگاه حالاتی از غالبیت نسبی، غالبیت کامل و یا فوق غالبیت را نشان دادند. ترکیب هپتادکان کمترین توارث‌پذیری و ترکیب تترادکان بیش از ۵۰ ٪ توارث‌پذیری نشان داد. در پایان، در این تحقیق چندین جایگاه کنترل کننده ترکیبات عطری با فاصله ٤/۵ سانتی‌مورگان با نشانگر؛ فاصله مطلوب پیشنهاد شده بین نشانگر و QTL، برای گزینش؛ شناسایی شد.

واژه‌های کلیدی: *برنج، ترکیبات عطری، QTL، مکان‌یابی ژن، روش* SPME- GC- MS.

* نویسنده مسئول: رضا امیری‌فهلیانی تلفن: ۰۷٤۱-۲۲۱٤۸٤۰ Email: amiri720@yahoo.com

مقدمه

بعد از عملکرد، کیفیت دانه دومین هدف مهم به‌نژادی برنج (*Oryza sativa* L.) در نظر گرفته می‌شود. عطر نه تنها یکی از مهمترین ویژگی‌های خوب برای تعیین کیفیت برنج می‌باشد، بلکه برنج-های عطری ارزش غذایی بهتر و اسیدهای آمینه لیزین، فنیل‌آلانین، لوسین و متیونین بیشتری در مقایسه با انواع بدون عطر دارند (Sun *et al.*, 2008). برنج‌های عطری، مدتی طولانی است که عمومیت پیدا کرده و تقاضای بیشتر، قیمت بالاتر آن را در پی داشته است. این وضعیت، توجه به-نژادگران برنج را جهت شناسایی ژن‌های کنترل-کننده عطر برانگیخته است (Bounphanousay *et al.*, 2008).

ارزیابی واقعی عطر و گزینش با استفاده از روش‌های سنتی بهبود کیفیت برای به‌نژادگران، به دلیل نبود گروه‌های فنوتیپی مجزا در نتاج، حساسیت و تکرارپذیری پایین و خسته‌کننده بودن روش‌های آزمون کیفیت، مشکل است (Bullard & Holguin, 1977). فنون متفاوتی برای ارزیابی و شناخت عطر شامل: جویدن نیمه یک دانه منفرد و یا تعدادی دانه از تک بوته‌ها، حرارت دادن بافت برگی در آب و بررسی عطر حاصل از حل کردن برگ در محلول پتاسیم هیدروکسید (Garland *et al.*, 2000; Wilkie *et al.*, 2004)، واکنش‌های بافتی- شیمیایی (Nadaf *et al.*, 2006)، روش ارزیابی بویایی عطر متصاعد شده از دانه‌های پخته یا خام برنج (Jezussek *et al.*, 2002; Wilkie *et al.*, 2004)، و ارزیابی ترکیبات فرّار با استفاده از کروماتوگرافی گازی[1] و یا کروماتوگرافی گازی جفت شده با طیف‌سنج جرمی[2] (GC- MS) (Mahatheeranont *et al.*, 2001; Ghiasvand *et al.*, 2007)، معرفی و استفاده شده‌اند.

اگرچه روش‌های جویدن، حرارت دادن بافت برگی در آب و بررسی عطر حاصل از حل کردن برگ در محلول پتاسیم هیدروکسید ، واکنش-های بافتی- شیمیایی، و روش ارزیابی بویایی مفید می‌باشند، ولی نمی‌توانند عاری از اشتباه باشند و بدون ابهام ژنوتیپ گیاه را بر اساس عطر تعیین کنند (Yanjun *et al.*, 2001). بنابراین استفاده از روش GC- MS، روشی مناسب برای ارزیابی و سنجش ترکیبات فرّار و عطری می‌باشد (Ghiasvand *et al.*, 2006). از طرفی روش‌های قدیمی استخراج و جداسازی عطر، طعم و بو مانند استخراج مایع – مایع (LLE) وقت‌گیر، چند مرحله‌ای و گرانقیمت بوده و علاوه بر استفاده از حلال‌های سمی خطرناک و مضر برای محیط زیست، خطراتی نیز برای آزمایشگر ایجاد می‌کنند. بهترین جایگزین این شیوه های کلاسیک، روش-های کم حلال[3] و عاری از حلال[4] هستند. ریز استخراج فاز جامد[5]، یک روش کارآمد، حساس و

[1] Gas chromatography
[2] Mass spectrometry
[3] Solvent- Less
[4] Solvent- Free
[5] Solid phase micro- extraction (SPME)

ارزان عاری از حلال است که با استفاده از کمترین مقدار نمونه (در حد چند میلی‌گرم) و باکمترین دستکاری فیزیکی و شیمیایی در بافت نمونه (افزودن کمی آب به چند دانه برنج سالم) استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات عطری را انجام می‌دهد. جفت شدن تکنیک جدید SPME با GC- MS (با حساسیت و دقت اندازه‌گیری بسیار بالا)، کارآیی این روش را در جداسازی و اندازه‌گیری ترکیبات فرّار چندین برابر نموده و در سالهای اخیر، روش SPME- GC- MS کاربردهای گسترده‌ای در استخراج و اندازه‌گیری انواع ترکیبات غذایی، داروئی و آلاینده‌ها پیدا کرده‌است (Ghiasvand *et al*., 2007).

ترکیبات متعددی با مقادیر کم در عطر برنج-های خام یا نپخته و یا حتی در برگ‌های این گیاه در مراحل پایانی رشد، دخالت دارند (Bounphanousay *et al*., 2008; Srivong *et al*., 2008). ترکیبات فرّاری چون ۲- استیل- ۱- پیرولین[1] (AP)، لیمونین، پنتادکان، هگزادکان، هپتادکان، دودکان و هگزانول در برنج پخته شده گزارش شده‌اند (Singh *et al*., 2000). اثر سفید کردن برنج نیز بر عطر آن ارزیابی شده و مشخص شده است که لایه‌های سطح بیرونی برنج نقش مهمی را در تشکیل عطر ایفا می‌کنند (Bullard & Holguin, 1977).

تنوع ژنتیکی صفات کمّی، مانند بسیاری از خصوصیات مهم زراعی از قبیل عملکرد، کیفیت و برخی از شکل‌های مقاومت به بیماری (Collard *et al*., 2005)، به وسیله تعداد زیادی ژن کنترل می-شوند که از تفکیک تعداد زیادی QTL، که هرکدام بخشی از تنوع کلی را توجیه می‌کنند و تظاهر آنها توسط اثرات متقابل با دیگر ژن‌ها و محیط تغییر می‌کند، حاصل می‌شود (Mackay, 2001). منطقه-ای از ژنوم که شامل ژن‌های مربوط به یک صفت کمّی خاص می‌باشد، به عنوان مکان ژنی کنترل-کننده صفت کمّی (QTL) شناخته می‌شود. ایجاد نقشه‌های پیوستگی و انجام تجزیه QTL برای شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با صفات، مکان‌یابی یا نقشه‌یابی QTL گفته می‌شود (McCouch & Doerge, 1995; Paterson, 1996). اطلاع یافتن از مکان ژن‌ها در کروموزوم، می‌تواند در تشخیص آثار پیوستگی و پلیوتروپی آنها که مورد توجه خاص به‌نژادگران می‌باشد، کمک مؤثری داشته باشد. تعیین QTLها این امکان را فراهم می‌سازد که به بررسی آثار افزایشی و غالبیت مکان‌های ژنی به صورت منفرد، و همچنین اثرات متقابل ژن‌ها پرداخته و احتمالاً نوع عمل ژن و نوع اثر متقابل را در بعضی از موارد شناسایی نمود (Kearsey, 1998).

تعداد ژن‌های کنترل‌کننده صفتِ (صفات) هدف و موقعیت ژنومی آنها، توزیع اثرات ژنتیکی و وجود اثرات متقابل ژنتیکی، توارث‌پذیری صفت، تعداد ژن‌های در حال تفرق در جمعیت مورد

[1] Acetyl Pyrroline

بررسی، نوع و اندازهٔ جمعیت مورد بررسی، تراکم و پوشش نشانگرها در نقشه پیوستگی، روش‌های آماری و سطح معنی‌داری مورد استفاده برای نقشه-یابی QTL، ازجمله عوامل اثرگذار بر قدرت مکان-یابی QTL می‌باشند (Liu, 2002; Collard *et al*., 2005).

با توسعه نشانگرهای DNA، پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در توصیف صفات کمّی و گزینش QTLها آغاز شد (Collard *et al*., 2005). نشانگرهای مولکولی که شدیداً با ژن‌های مهم زراعی پیوستگی دارند، ممکن است به عنوان ابزاری برای گزینش به کمک نشانگر[1] در به‌نژادی گیاهان استفاده شوند (Kearsey & Pooni, 1996; Ribaut & Hoisington, 1998)، به نحوی که در مقایسه با روش‌های معمول گزینش فنوتیپی، سودمندتر، مؤثرتر، مطمئن‌تر و اقتصادی‌تر باشند (Collard *et al*., 2005).

نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز[2] از قبیل ریزماهواره‌ها[3] (McCouch *et al*., 2002)، نقش مهم و مؤثری در مکان‌یابی ژن‌ها و گزینش به کمک نشانگرها دارند. ریزماهواره‌ها یا توالی‌های ساده تکراری[4] (SSRها) شدیداً چندشکلی نشان می‌دهند و علاوه بر این، هم‌بارز بودن و قابلیت تکرار آنها، این نشانگرها را برای ترسیم نقشه ژنومی و به همین نحو برای مطالعات ژنتیکی جمعیت، مناسب ساخته است (McCouch *et al*., 1997; Dayanandan *et al*., 1998).

مطالعه ژنتیک کیفیت برنج با استفاده از نشانگرهای مولکولی، در مجموعه‌های ژنوتیپی متفاوتی صورت گرفته است (Ahn *et al*., 1992; Lorieux *et al*., 1996; Sun *et al*., 2008). یک ژن مغلوب بزرگ‌اثر کنترل‌کننده عطر، بر روی کروموزوم ۸ برنج عطری آمریکایی به نام دلّا (Ahn *et al*., 1992)، رقم بنگلادشی به نام سرجارم‌خی (Yano *et al*., 1992) و رقم فیلیپینی به نام آزوسنا (Lorieux *et al*., 1996) با استفاده از تکنولوژی آراف‌ال‌پی (RFLP) و رپید (RAPD)، مکان‌یابی شده است. دو ژن مغلوب کنترل کنندهٔ عطر در رقم هندی تی۳، بر روی کروموزوم‌های ۵ و ۹ گزارش شده‌اند (Yanjun *et al*., 2001). برای صفت عطر، ژن *fgr* نزدیک ناحیه سانترومری کروموزوم ۸ مکان‌یابی شده است (Ahn *et al*., 1992; Bradbury *et al*., 2005; Lang & Buu, 2008) که سطح AP را تعیین می‌کند (Lorieux *et al*., 1996) و با فاصله ٤/٥ سانتی مورگان، با نشانگر آراف‌ال‌پی به نام RG۲۸ کاملاً پیوستگی نشان می-دهد. AP یکی از مهمترین ترکیبات عطری برنج می‌باشد (Grimm *et al*., 2001). همچنین دو QTL برای عطر، یکی بر کروموزوم ٤ و دیگری بر کروموزوم ۱۲ گزارش شده‌است (Garland *et al*., 2000). چند شکلی معنی‌داری را در ناحیه کدکننده (*fgr*) ژنوتیپ‌های عطری برنج نسبت به انواع بدون

[1] Marker assisted selection
[2] Polymerase chain reaction (PCR)
[3] Microsatellite
[4] Simple sequence repeats

عطر و با وضعیت مشابهی برای ژن *badh2* گزارش کرده‌اند (Bradbury *et al*., 2005). ژن $badh_2$ (کد کننده بتائین آلدهاید هیدروژناز۲)، کنترل‌کننده عطر، بر روی بازوی بلند کروموزوم ۸ برنج قرار دارد (Srivong *et al*., 2008; Kovach *et al*., 2009). این ژن برای غربال ژنوتیپ‌های عطری در نتاج در حال تفرق برنج قابل استفاده بوده‌است (Bradbury *et al*., 2005; Srivong *et al*., 2008; Lang & Buu, 2008; Kovach *et al*., 2009).

هدف از اجرای این تحقیق شناسایی ترکیبات فرّار و عطری با استفاده از روش جدید ریزاستخراج فاز جامد با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی توأم با طیف‌سنج جرمی در برنج و مکان‌یابی ژن-های (QTLهای) کنترل کننده ترکیبات شناسایی شده با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بود.

مواد و روش‌ها

تک بوته‌های F_2 حاصل از تلاقی رقم موسی-طارم و ۳۰٤ در سال ۱۳۸٦ به صورت مجزا بذرگیری و برای کشت فامیل‌های $F_{2:3}$ به همراه والدین در سال ۱۳۸۷ مورد استفاده قرار گرفتند. تهیه خزانه در اردیبهشت ۱۳۸۷ در شرایط گلخانه-ای و در ظروف پلاستیکی در دانشگاه شهرکرد صورت گرفت و در مرحله ۵ برگی، انتقال نشاءها به زمین اصلی واقع در دشت خانمیرزا در فاصله ۳۵ کیلومتری لردگان صورت گرفت. در مرحله پنجه‌زنی، از تمامی بوته‌های موجود برای هر کرت آزمایشی (هر خانواده) نمونه‌های برگی گرفته شده و استخراج DNA با استفاده از روش تغییر یافته CTAB انجام شد (Amiri-Fahliani *et al*., 2011). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر (اپندورف، آلمان) صورت گرفت. هشتاد و یک جفت آغازگر بر اساس نقشه-های SSR ارائه شده در آدرس اینترنتی (www.gramene.org/microsat/RM_primers) و چهار جفت آغازگر بر اساس گزارشات ارائه شده برای ترکیبات عطری انتخاب گردیدند (Amiri-Fahlaini, 2010). فاصله آغازگرهای انتخاب شده بر روی هر کروموزوم بین ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌مورگان متغیر بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی لیتری و با حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت (Amiri *et al*., 2011).

از فیبرهای فلزی سوپرالاستیک SPME با پوشش سه تایی PDMS/CAR/DVB و یک نگهدارنده دستی فیبر (ساخت شرکت Supelco آمریکا) و ظرف‌های شیشه‌ای سیلانه شده مخصوص SPME با درب‌های آلومینیومی و سپتوم مرکب تفلون- سیلیکون، برای استخراج ترکیبات عطری از نمونه‌های برنج استفاده گردید. دستگاه کروماتوگرافی شیمادزو مدل ۱۷آ[1] با ستون دی‌بی-۵[2] (۹۵٪ فنیل، و ۵٪ پلی دای متیل سیلوکسان) مجهز به آشکارساز جرمی شیمادزو MS-QP5050، جهت جداسازی و شناسایی ترکیبات

[1] Shimadzu 17A
[2] DB-5

فرّار نمونه‌های بذری برنج مورد استفاده قرار گرفت. استخراج، جداسازی و شناسایی ترکیبات فرّار با استفاده از روش ارائه شده توسط غیاثوند و همکاران (2007) و به روش SPME- GC- MS در دانشگاه لرستان انجام شد. نمونه‌ها پس از آماده سازی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰°C، تحت امواج مافوق صوت قرار داده شدند. سپس فیبر تجاری مورد نظر، به مدت ۳۰ دقیقه جهت جذب در فضای فوقانی ظرف قرار داده شد. عمل واجذب به مدت ۲ دقیقه در محل تزریق با دمای ۲۶۰°C انجام شد. برنامه دمایی ستون از ۴۰°C شروع شده و با سرعت ۴°C بر دقیقه به ۲۰۰°C رسید. پس از آن با سرعت ۳۵°C بر دقیقه به ۲۷۰°C رسید و در این دما به مدت ۳ دقیقه نگه‌داشته شد. دمای آشکارساز در طول جداسازی، ۲۶۰°C بود. شناسایی ترکیبات با استفاده از مقایسه دو پارامتر زمان بازداری (حاصل از کروماتوگرام‌ها) و شاخص بازداری (محاسبه شده از تزریق ترکیبات آلکان نرمال همولوگ به ستون در شرایط نمونه) با مقادیر استاندارد موجود در متون علمی و همچنین بررسی طیف‌های جرمی و مقایسه آنها با طیف‌های جرمی استاندارد ذخیره شده در کتابخانه نرم‌افزاری Willey۲۲۹ سیستم GC- MS صورت گرفت.

تجزیه QTL با استفاده از نرم افزار کارتوگرافر[1] (Wang *et al*., 2007) انجام شد. بررسی QTLها با استفاده از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب[2] با سرعت پیمایش ۰/۵ سانتی‌مورگان و اندازه پنجره ۱۰ سانتی‌مورگان و تعداد ۵ نشانگر به عنوان کنترل[3] (هم‌عامل) صورت گرفت. آستانه معنی‌داری (LOD) مورد استفاده برای انتخاب QTLها برای تمامی صفات، مقدار ۳ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

با مقایسه ترکیب‌های شناسایی شده با اطلاعات کتابخانه نرم‌افزار مورد استفاده، مشخص شد که ترکیب‌های آلکانی تترادکان، پنتادکان، هگزادکان و هپتادکان جزئی از ترکیب‌های شیمیایی موجود در برنج هستند. این ترکیب‌ها توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است (Widjaja *et al*., 1996; Singh *et al*., 2000). نتایج حاصل از تجزیه QTL مربوط به ترکیب‌های شیمیایی در جدول ۱ گزارش شده است. نتایج نشان دادند که کروموزوم‌های ۱، ٤، ٦، ۱۱ و ۱۲ حامل جایگاه کنترل کننده ترکیب‌های فرّار شناسایی شده بوده و کروموزوم ٤ بیشترین جایگاه کنترل کننده ترکیب-های مذبور را در بر داشت. دیگر محققین وجود یک ژن کنترل کننده (*fgr*) یا آغازگرهای مرتبط با آن بر کروموزوم شماره ۸ (Ahn *et al*., 1992; Lorieux *et al*., 1996; Cordeiro *et al*., 2002) و همچنین دو QTL برای عطر، یکی بر کروموزوم ٤ و دیگری بر کروموزوم ۱۲ را (Garland *et al*., 2000) گزارش داده‌اند. اگرچه بیشترین جایگاه‌های

[1] Windows QTL Cartographer V 2.5
[2] Composite interval mapping (CIM)
[3] Cofactor

کنترل کننده ترکیب‌های مورد بررسی بر روی کروموزوم ٤ بود، ولی هیچگونه هم‌پوشانی جایگاه با در نظر گرفتن موقعیت آنها برای ترکیب‌های شناسایی شده، مشاهده نشد (جدول ۱). اطلاعات حاصله نشان دهنده این مطلب است که بخشی از ژن‌های کنترل کننده عطر بر روی کروموزوم ٤ برنج قرار داشته و از طرفی ترکیبات عطری، از چند اثری یک مکان ژنی منشاء نشده‌اند.

نکته قابل توجه جایگاه‌های کنترل‌کننده ترکیب‌ها، نحوه عمل جایگاه‌ها با توجه به نسبت غالبیت آنها بود. از ١٤ جایگاه شناسایی شده، ۱۲ جایگاه دارای حالاتی از غالبیت نسبی، غالبیت کامل و یا فوق غالبیت بودند. بنابراین با توجه به عمل غالبیت جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده ترکیب-های عطری شناسایی شده، این ترکیب‌ها توارث-پذیر بوده ولی امکان تثبیت را ندارند. علت عدم تثبت چنین ترکیب‌هایی به ماهیت خودگشن بودن گیاه برنج برمی‌گردد. یکی از دلایل مشاهده اثرات فوق غالبیت ژنی صفات کمّی، پراکندگی[1] ژن‌های کنترل‌کننده ویژگی‌های مورد بررسی در والدین مربوط به تلاقی می‌باشد. بر اساس این نتایج می-توان امیدوار بود که با انتخاب درست والدین در دورگ‌گیری، نتاج هیبریدی را ایجاد و معرفی کرد که دارای عطر بیشتری بوده و برای بروز عطر، هم از اثرات افزایشی و هم از اثرات غالبیت ژن‌ها استفاده کرد. این امیدواری بخصوص با توجه به تجاری شدن استفاده از برنج هیبرید در بسیاری از کشورها از بیشتر از پیش خواهد بود.

با مراجعه به جدول ۱ و تکیه بر سهم واریانس توجیه شده توسط جایگاه‌های کنترل‌کننده، مشاهده شد که ترکیب هپتادکان دارای کمترین میزان توارث‌پذیری شناسایی شده (مجموع سهم واریانس جایگاه‌های کنترل کننده هپتادکان) بود. ترکیب تترادکان بیشتر از ۵۰ ٪ توارث‌پذیری داشت. جایگاه‌های دارای اثرات افزایشی، نشان از توارث-پذیری و قابلیت تثبیت آن جایگاه‌ها را دارد.

یکی از مهم‌ترین ترکیبی که برای عطر برنج معرفی و مورد بررسی قرار گرفته است، ترکیب ۲AP می‌باشد (Grimm *et al*., 2001)، که در این تحقیق مورد شناسایی واقع نشد. کروموزوم‌های ٤ و ۱۲ که در این تحقیق برخی جایگاه‌های QTL را بر خود جای دادند، قبلاً نیز به عنوان کروموزوم‌های حامل ژنهای ترکیب‌های عطری و بدون معرفی ترکیب عطری خاص گزارش شده‌اند (Garland *et al*., 2000). جایگاه‌های شناسایی شده بر اساس روش مک‌کوچ و همکاران (1997) نام‌گذاری و در جدول۲ ارائه شده است.

در پایان می‌توان گفت: تجزیه QTL و یافتن جایگاه‌های کنترل کنندهٔ ویژگی‌های مورد بررسی نه تنها برای ویژگی‌های کمّی بلکه برای ویژگی‌های کیفی که در مراحل پایانی رشد گیاه تظاهر می‌یابند نیز کاملاً مفید می‌باشد. با یافتن چنین جایگاه‌هایی می-توان بدون نیاز به انتظار کشیدن در بروز صفات مذبور

[1] Dispersion

در انتهای دوره رشد، عمل گزینش را در مراحل ابتدایی رشد انجام داد. از طرفی ترکیبات عطری که جهت شناسایی دقیق آنها لازم است از دستگاه‌های ویژه‌ای استفاده شود و بنابراین هزینه ارزیابی آنها زیاد می‌باشد نیز می‌توانند مورد تجزیه QTL قرار گیرند. در چنین وضعیتی و در صورت پیدا کردن نشانگرهایی مرتبط با این ترکیبات، تجزیه QTL می‌تواند در کاهش هزینه‌های بعدی در برنامه‌های به‌نژادی بسیار مؤثر واقع شود.

گزینش صفات در نسل‌های در حال تفرق با کمک نشانگرهای مولکولی در دستیابی هرچه سریع‌تر و دقیق‌تر به اهداف به‌نژادی، و احتمالاً تسریع در حذف ژن‌های نامطلوب پیوسته با ژن‌های مطلوب، مؤثر واقع می‌شود. در این آزمایش از نشانگر SSR استفاده شد که با توجه به اختصاصی بودن این نشانگر و گستردگی یکنواخت آنها در طول کروموزوم از قابلیت تکرار پذیری بسیار بالایی برخوردار است.

فاصله مطلوب بین نشانگر و QTL برای انتخاب به کمک نشانگر نیز بر اساس گزارشات متفاوت، فاصله‌های کمتر از ٤/٥ سانتی‌مورگان پیشنهاد شده است که در این آزمایش چندین جایگاه با چنین فاصله‌ای با نشانگر، شناسایی شده است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه شهرکرد بخاطر تأمین بخشی از اعتبار لازم جهت اجرای این تحقیق نهایت سپاسگزاری را تقدیم می‌دارند. نویسنده اول همچنین از خانم دکتر مریم حسینی عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات برنج کشور، آقای محمد برزویی کارشناس ارشد شیمی تجزیه دانشگاه لرستان، آقایان دکتر علی آرمینیان دانش‌آموخته و مهندس سید صادق موسوی‌فرد دانشجوی دکتری دانشگاه شهرکرد، بخاطر همیاری‌های بی‌دریغشان صمیمانه قدردانی می‌نماید.

جدول ۱- نتایج حاصل از تجزیه QTL ترکیب‌های فرّار و معطر با استفاده از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب.

Table 1- QTL results for volatile compounds using composite interval mapping method.

نام ترکیب Compound	کروموزوم دربرگیرنده Carrier chromosome	آغازگر نزدیک به QTL Adjacent primer to QTL	موقعیت آغازگر Primer position	موقعیت QTL بر کروموزوم† QTL position on chromosome	اثر افزایشی QTL additive effect	اثر غالبیت QTL dominance effect	نسبت غالبیت Dominance ratio	عمل†† QTL QTL Action	سهم واریانس QTL (٪) QTL proportion (%)	مقدار LOD LOD value
تترادکان Tetradecane	1	RM11347	99.5	101.61	0.1434	0.4121	2.87	OD	0.45	4.0
	4	RM16355	7.4	9.01	-1.4194	0.3994	0.28	PD	18.20	4.5
	12	RM27511	9.2	4.51	-1.4171	0.4738	0.33	PD	17.82	3.8
	12	RM28097	62.9	61.81	-1.4171	0.4735	0.33	PD	17.82	11.8
پنتادکان Pentadecane	4	RM16355	7.4	10.01	-2.6732	0.7588	0.28	PD	17.78	8.8
	6	RM19359	8.7	11.51	-0.6735	-0.3065	0.46	PD	2.24	7.5
	11	RM26063	8.7	5.01	3.1375	-0.7844	0.25	PD	20.36	10.1
هگزادکان Hexadecane	1	RM11109	82.1	78.71	-0.8452	-0.0338	0.04	A	5.89	4.9
	4	RM16937	72.7	68.21	-1.5573	0.6865	0.44	PD	10.62	4.1
	12	RM27782	26.7	34.01	-1.5556	0.6874	0.44	PD	10.60	4.2
	12	RM28097	62.9	66.31	-1.8901	0.6686	0.35	PD	12.72	3.2
هپتادکان Heptadecane	1	RM11347	99.5	99.11	-0.1992	0.5100	2.56	OD	0.43	4.7
	4	RM16589	40.6	39.71	0.2918	0.0348	0.12	A	0.87	8.3
	6	RM8270	26.5	26.31	-0.3248	-0.1131	0.35	PD	0.99	9.8

† موقعیت بر حسب سانتی‌مورگان از ابتدای بازوی کوتاه کروموزم، و †† نسبت کمتر از **0.2** افزایشی (**A**)، **0.21** تا **0.8** غالبیت ناقص (**PD**)، **0.81** تا **1.2** غالبیت کامل (**D**)، و بیشتر از **1.2** فوق غالبیت (**OD**).

جدول ۲- نام پیشنهادی برای جایگاه‌های شناسایی شده مربوط به ترکیب‌های شیمیایی.

Table 2- Proposed name for identified QTLs corresponding to chemical compounds.

نام پیشنهادی QTL QTL proposed name	موقعیت QTL بر کروموزوم QTL position on chromosome	کروموزوم دربرگیرنده Carrier chromosome	نام ترکیب compound
*q*TTRDC-1	101.61	1	تترادکان Tetradecane
*q*TTRDC-4	9.01	4	
*q*TTRDC-12-1	4.51	12	
*q*TTRDC-12-2	61.81	12	
*q*PNTDC-4	10.01	4	پنتادکان Pentadecane
*q*PNTDC-6	11.51	6	
*q*PNTDC-11	5.01	11	
*q*HXDC-1	78.71	1	هگزادکان Hexadecane
*q*HXDC-4	68.21	4	
*q*HXDC-12-1	34.01	12	
*q*HXDC-12-2	66.31	12	
qHPTDC-1	99.11	1	هپتادکان Heptadecane
qHPTDC-4	39.71	4	
qHPTDC-6	26.31	6	

منابع

Ahn SN, Bollich CN, Tanksley SD (1992). RFLP tagging of a gene for aroma in rice. Theoretical and Applied Genetics 84: 825-828.

Amiri- Fahliani R (2010). Study of some agronomic traits and aromatic compounds in rice (*Oryza sativa* L.) and mapping their controlling genes using microsatellite markers. Ph.D. Thesis. Shar-e-Kord University, Shahr-e-Kord, Iran.

Amiri- Fahliani R, khodambashi M, Houshmand S, Arzani A, Sorkheh K (2011). Heritability for some agronomic characters of rice (*Oryza sativa* L.) and their linked microsatellites identification. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 35: 481-490.

Bounphanousay C, Jaisil P, Sanitchon J, Fitzgerald M, Sackville Hamilton NR (2008). Chemical and molecular characterization of fragrance in black glutinous rice from Lao PDR. Asian Journal of Plant Science 7: 1-7.

Bradbury LMT, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin Q, Waters DLE (2005). The gene for fragrance in rice. Plant Biotechnology Journal 3: 363-370.

Bullard RW, Holguin G (1977). Volatile components of unprocessed rice (*Oryza sativa*). Journal of Agriculture and Food Chemistry 25: 99.

Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142: 169-196.

Cordeiro GM, Mandy JC, Robert JH, Russell FR (2002). Identification of microsatellite markers for fragrance in rice by analysis of the rice genome sequence. Molecular Breeding 9:245-250.

Dayanandan S, Rajora OP, Bawa KS (1998). Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). Theoretical and Applied Genetics 96: 950-956.

Garland S, Lewin L, Blakeney A, Reinke R, Henry R (2000). PCR-based molecular markers for the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 101: 364-371.

Ghiasvand AR, Hosseinzadeh S, Pawliszyn J (2006). New cold-fiber headspace solid-phase microextraction device for quantitative extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment. Journal of Chromatography A 1124: 35–42.

Ghiasvand AR, Setkova L, Pawliszyn J (2007). Determination of flavour profile in Iranian fragrant rice samples using cold-fiber SPME–GC–TOF–MS. Flavour and Fragrance Journal 22: 377-391.

Grimm CC, Bergman C, Delgado JT, Bryant R (2001). Screening for 2-acetyl-1-pyrroline in the headspace of rice using SPME/GC–MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 245-249.

Jezussek MB, Juliano O, Schieberle P (2002). Comparison of Key Aroma Compounds in Cooked Brown Rice Varieties Based on Aroma Extract Dilution Analyses. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50:1101-1105.

Kearsey MJ (1998). The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). Journal of Experimental botany 327:1619-1623.

Kearsey MJ, Pooni HS (1996). The Genetical Analysis of Quantitative Traits. 1st ed, Chapman & Hall, Great Britain at the Alden Press, UK.

Kovach MJ, Calingacion MN, Fitzgerald MA, McCouch SR (2009). The origin and evaluation of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). PNAS 106: 14444-14449.

Liu BH (2002). Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Lorieux M, Petrov M, Huang N, Guiderdoni E, Ghesquiere A (1996). Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. Theoretical and Applied Genetics 93: 1145-1151.

Mackay TFC (2001). The genetic architecture of quantitative traits. Annual Review of Genetics 35: 303-39.

Mahatheeranont S, Keawsa-ard S, Dumri K (2001). Quantification of the Rice Aroma Compound, 2-Acetyl-1-pyrroline, in Uncooked Khao Dawk Mali 105 Brown Rice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 773-779.

McCouch SR, Doerge RW (1995). QTL mapping in rice. Trends in Genetics 11: 482-487.

McCouch SR, Chen X, Panaud O, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, Huang N, Ishii T, Blair M (1997). Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Molecular Biology 35:89-99.

McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Zh, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L (2002). Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). DNA Research 9: 199-207.

Nadaf AB, Krishnan S, Wakte KV (2006). Histochemical and biochemical analysis of major aroma compound (2-acetyl-1-pyrroline) in basmati and other scented rice (*Oryza sativa* L.). Current Science 91: 1533-1536.

Paterson AH (1996). Making genetic maps. In: Paterson AH (Ed.), Genome Mapping in Plants, RG Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Texas. pp. 23-39.

Ribaut JM, Hoisington D (1998). Marker-assisted selection: New tools and strategies. Trends in Plant Science 3:236–239.

Singh RK, Singh US, Khush GS (2000). Aromatic rice. Oxford and IBH publishing Co. PVT. Ltd., New Delhi.

Srivong P, Wangsomnuk P, Pongdontri P (2008). Characterization of fragrant gene and enzymatic activity of betaine aldehyde dehydrogease in aromatic and nonaromatic Thai rice cultivars. KKU Science Journal 36: 290-301.

Sun SX, Gao FY, Lu XJ, Wu XJ, Wang XD, Ren GJ, Luo H (2008). Genetic analysis and gene fine mapping of aroma in rice (*Oryza sativa* L. Cyperales, Poaceae). Genetics and Molecular Biology 31: 532-538.

Lang NT, Buu BC (2008). Development of PCR-based markers for aroma (*fgr*) gene in rice (*Oryza sativa* L.). Omonrice 16: 16-23.

Wang S, Basten CJ, Gaffney P, Zeng ZB (2007). Windows QTL Cartographer. Department of statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.

Widjaja RI, Craske JD, Wootton M (1996). Comparative studies on volatile components of non-fragrant and fragrant rices. Journal of the Science of Food and Agriculture 70: 151-161.

Wilkie K, Wootton M, Paton JE (2004). Sensory testing of Australian fragrant, imported fragrant and non-fragrant rice aroma. International Journal of Food Properties 7: 27-36.

Yanjun D, Tsuzuki E, Terao H (2001). Trisomic genetic analysis of aroma in three Japanese native rice varieties (*Oryza sativa* L.). Euphytica 117: 191-196.

Yano M, Shimosaka E, Saito A, Nakagahra M (1992). Linkage analysis of a gene for scent in indica rice variety, Surjamkhi, using restriction fragment length polymorphism markers. Japanese Journal of Breeding 41: 338-339.

Identification of Rice Aromatic Compounds by Solid Phase Micro-Extraction method in GC-MS and Mapping their Controlling QTLs using Microsatellite Marker

Amiri-Fahliani R.*[1], Khodambashi M.[2], Ghiasvand A.R.[3]

[1] Assistant Prof. of Agronomy & Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Yasouj University, and former PhD Student of ShahreKord University
[2] Associate Prof. of Agronomy & Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, ShahreKord University
[3] Professor of Chemistry Department, Faculty of Science, Lorestan University

Abstract

Increasing demand for aromatic rice causes their higher price and attracted plant breeder's attention to recognize rice aroma-controlling genes. Highly linked markers with the genes controlling important agronomic traits help to make phenotypic selection, more efficient, effective, reliable and cost-effective compare to the more conventional plant breeding methods. The aim of conducting this research was identification of volatile compounds in rice and mapping their controlling QTLs using SSR markers. The harvested seed of 139 single F_2 plants of cross between Mousa-Tarom and 304 were grown in 2010. Volatile compounds extraction, separation and identification of seed samples; harvested from each $F_{2:3}$ families; was conducted using the sensitive and efficient method of solid phase micro-extraction in gas chromatography coupled to a mass spectrometry apparatus. Alkane compounds of tetradecane, pentadecane, hexadeane and heptadecane were the general identified compounds. The identified QTLs controlling volatile compounds were located on chromosomes 1, 4, 6, 11, and 12. The chromosome number 4 included most of the volatile controlling loci. Out of 14 identified loci, 12 showed different situations of partial, complete or over dominance effects. Heptadecane compound showed the lowest heritability and tetradecane showed more than 50% heritability. Ultimately, in this study, several QTLs having less than 5.4 centiMorgan distances to the marker; the optimal recommended distance between the marker and QTL for selection; were identified.

Keywords: *Rice, Aromatic compounds, QTL, Gene mapping, SPME- GC- MS method.*

* Corresponding Author: Amiri-Fahliani R. Tel: 0741-2224840 Email: amiri720@yahoo.com