

Scientific Short Article

بررسی مولکولی خلوص لاین‌های CMS برنج

Molecular Purity Assessment of Rice CMS Lines

غفار کیانی<sup>۱</sup> و قربانعلی نعمت‌زاده<sup>۲</sup>

۱ و ۲- به ترتیب استادیار و استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۳/۵

چکیده

کیانی، غ. و نعمت‌زاده، ق. ۱۳۹۱. بررسی مولکولی خلوص لاین‌های CMS برنج. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۸: ۱۵۳-۱۴۹.

ژنوم لاین‌های CMS برنج گزارش شده است (Rajendrakumar *et al.*, 2007)؛ با لاین‌های نگهدارنده آن‌ها اختلاط می‌یابند. با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان اقدام به خالص‌سازی لاین‌های نرعیم برنج کرد. در این راستا می‌توان به استفاده از نشانگرهای RFLP (Narayanan, *et al.*, 1996) و RAPD (Ichii *et al.*, 2003) اشاره کرد که با توجه به هزینه‌بر بودن RFLP و نیز تکرار پذیری کم RAPD استفاده از این نشانگرها در سطح گسترده برای خالص‌سازی لاین‌های CMS برنج عملی نیست. ابداع و استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی mtDNA (Mitochondria DNA) مبتنی بر PCR طراحی شده از توالی‌های ویژه در

ژنوم لاین‌های CMS برنج گزارش شده است (Rajendrakumar *et al.*, 2007)؛ با لاین‌های نگهدارنده آن‌ها اختلاط می‌یابند. با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان اقدام به خالص‌سازی لاین‌های نرعیم برنج کرد. در این راستا می‌توان به استفاده از نشانگرهای RFLP (Narayanan, *et al.*, 1996) و RAPD (Ichii *et al.*, 2003) اشاره کرد که با توجه به هزینه‌بر بودن RFLP و نیز تکرار پذیری کم RAPD استفاده از این نشانگرها در سطح گسترده برای خالص‌سازی لاین‌های CMS برنج عملی نیست. ابداع و استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی mtDNA (Mitochondria DNA) مبتنی بر PCR طراحی شده از توالی‌های ویژه در

نشانگرها در خالص‌سازی لاین‌های CMS برنج، از نظر هزینه و زمان، صرفه جویی قابل ملاحظه‌ای را به دنبال داشته و تولید بذر هیبرید یکنواخت را تضمین می‌کند. با توجه به اصلاح و معرفی لاین‌های نرعیم برنج نظیر ندا A و نعمت A در کشور، لزوم حفظ و نگهداری و تکثیر آن‌ها بسیار ضروری است. هر سال ارزیابی‌های پایداری عقیمی، تکثیر و خالص‌سازی این لاین‌ها با روش‌های فنوتیپی انجام می‌شود. یکی از این روش‌ها، GOT (Grow out tests) است. این روش بر اساس ارزیابی خصوصیات مورفولوژیک و

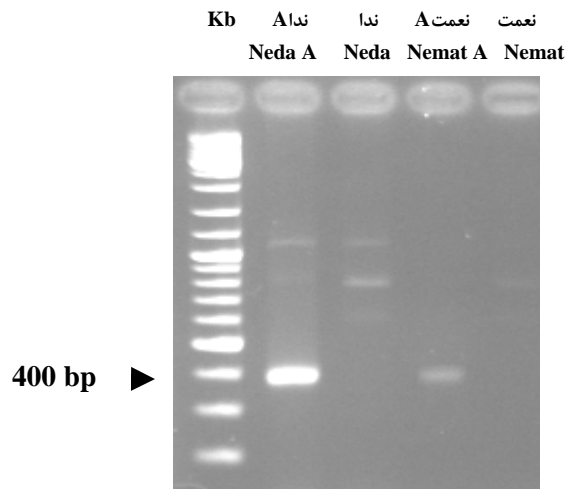
۱ میکرولیتر  $MgCl_2$  (۵۰ میلی مولار)،  
۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار) و  
۱ واحد آنزیم *Taq* پلی مرز بود. واکنش PCR  
طبق روش یاشیتولا و همکاران  
(Yashitola et al., 2004) انجام شد.  
فراورده های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل  
آگارز ۱/۵٪ تفکیک و مورد تجزیه و تحلیل  
قرار گرفتند.

در ارزیابی لاین های نرعیتم ندA و نعمت A  
با نشانگر *cms* چندشکلی بین این لاین های  
نرعیتم با نگهدارنده های آن ها مشاهده شد  
(شکل ۱). به طوری که این نشانگر در لاین های  
نرعیتم باند مورد انتظار به وزن ۳۸۶ جفت باز را  
نشان داد، در حالی که لاین های نگهدارنده آن ها  
فاقد باند مورد نظر بودند. این نتایج نشان داد که  
نشانگر *cms* قادر به تفکیک بوته های نرعیتم از  
نگهدارنده در لاین های ندA و نعمت A است و  
در جریان تکثیر بذر CMS برای تشخیص  
مولکولی بوته های خارج از تیپ می توان از این  
نشانگر به طور عملی استفاده کرد.

به منظور تأیید کارایی نشانگرهای شناسایی  
شده اختصاصی برای سیتوپلاسم نرعیتم، از  
نشانگر *cms* برای شناسایی و حذف بوته های  
ناخالص در مزرعه تکثیری لاین نرعیتم ندA  
اقدام شد. بدین منظور نمونه ای متشکل از ۹۶  
تک بوته به طور تصادفی از مزرعه تکثیری لاین  
نرعیتم ندA انتخاب و با استفاده از نشانگر *cms*  
در سطح مولکولی مبادرت به تشخیص ناخالصی  
در آن ها شد. نتایج این ارزیابی (شکل ۲) نشان

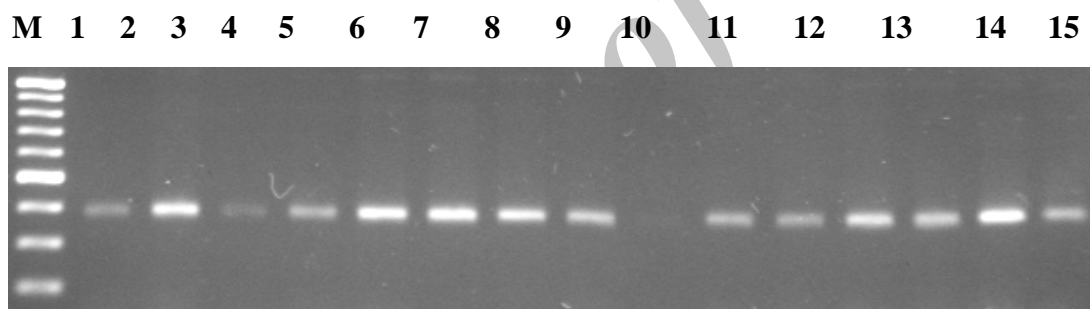
گلدهی در مرحله بلوغ انجام می شود  
(Yashitola et al., 2002, 2004). با توجه به  
این که بسیاری از این ویژگی های مورفولوژیک  
چند ژنی هستند و از طرفی نیز تحت تاثیر عوامل  
محیطی قرار دارند، ضرورت استفاده از روشی  
سریع، دقیق و با کارایی بالا و در عین حال با  
هزینه کم از جمله نشانگرهای مولکولی بیش از  
پیش احساس می شود. استفاده از نشانگر در  
تشخیص لاین های ایزوسیتوپلاسمیک  
(A و B لاین ها) برای خالص سازی لاین های  
CMS برنج هدف این تحقیق بود.  
در این مطالعه از دو لاین نرعیتم  
سیتوپلاسمی (ندA، نعمت A) و لاین های  
نگهدارنده متناظر آن ها (ندA و نعمت B) جهت  
بررسی های مولکولی استفاده شد. لاین های  
مذکور در بهار سال زراعی ۱۳۸۹ در مزرعه  
پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
ساری کاشته شدند.

استخراج DNA از نمونه های برگ  
بر اساس روش کوچرت و همکاران  
(Kochert et al., 1989) انجام شد. از نشانگر  
میتوکندریایی *cms* (با توالی رفت  
ACCTTTGGGCGATGGTT و برگشت  
GGGTTTAGAGTCGCCAC) برای مطالعه  
چندشکلی بین لاین های ایزوسیتوپلاسمیک  
نرعیتم و نگهدارنده استفاده شد. مخلوط  
واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۵۰ تا ۱۰۰  
نانوگرم DNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X)، ۰/۳  
میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)،



شکل ۱- تشخیص مولکولی لاین‌های نر عقیم ندا A و نعمت A از لاین‌های نگهدارنده آن‌ها با استفاده از نشانگر میتوکندریایی *cms*

Fig. 1. Molecular detection of male sterile rice lines Neda A and Nemat A from their maintainers using mitochondrial marker *cms*



شکل ۲- غربال مولکولی تک بوته‌های ندا A برای تشخیص ناخالصی در آن با استفاده از نشانگر میتوکندریایی *cms*. شماره‌های ۱ الی ۱۵ تعدادی از تک بوته‌های لاین نر عقیم ندا A از مزرعه تکثیری هستند. بوته شماره ۹ که با علامت \* مشخص شده بوته ناخالص است. M، مارکر وزنی.

Fig. 2. Molecular screening of Neda A individual plants for detection of contamination in it using mitochondrial marker *cms*. Numbers 1 to 15 are some of Neda A individual plants from multiplication farm. Plant number 9 with \* sign is off-type plant. M, weight marker.

دانه بندی و فنوتیپ بارور بودند. بنابراین، از این نشانگر به طور قابل اعتماد می‌توان در تشخیص ناخالصی در مزارع تکثیری لاین‌های نر عقیم ندا A و نعمت A استفاده کرد.

در مزارع تکثیری لاین‌های CMS، مزرعه تکثیری با فاصله مناسبی از سایر مزارع جدا

داد که در نمونه مذکور شش بوته ناخالص وجود داشت و بقیه از نظر ژنتیکی نر عقیم بودند. ارزیابی‌های فنوتیپی نیز بر روی تمام تک بوته از نظر دانه بندی انجام شد و نتایج به دست آمده نشان داد که فقط بوته‌های ناخالص شناسایی شده در سطح مولکولی، در شرایط مزرعه دارای

هزینه کمتر نسبت به GOT در سطح ژنتیکی شناسائی کند. استفاده از این نشانگر خصوصاً در مراحل اولیه تکثیر بذر لاین‌های CMS (فاز رویشی) تولید بذر خالص لاین‌های CMS برنج را تضمین کرده و به پیشبرد اهداف به‌نژادی در برنامه‌های تولید بذر برنج هیبرید کمک شایانی را خواهد کرد.

می‌شوند تا امکان آلوده سازی با گرده‌های سایر ارقام وجود نداشته باشد. در چنین شرایطی، تنها راه ایجاد ناخالصی در لاین‌های CMS، از طریق لاین نگهدارنده آن توسط اختلاط مکانیکی در مرحله برداشت و خرم‌ن کوبی است. نشانگر مورد استفاده در این تحقیق با دقت و به طور موثر می‌تواند ناخالصی موجود در لاین‌های CMS ناشی از لاین نگهدارنده را با دقت بالا و

واژه‌های کلیدی: برنج، نشانگرهای میتو کندریائی، نر عقیمی، خلوص ژنتیکی.

## Reference

- Ichii, M., Hong, D. L., Ohara, Y., Zhao, C. M., and Taketa, S. 2003.** Characterization of CMS and maintainer lines in indica rice (*Oryza sativa* L.) based on RAPD marker analysis. *Euphytica* 129: 249–252.
- Kochert, G., Tanksley, S. D., and Price, J. P. 1989.** RFLP training course laboratory manual. p. 5–6. Rockefeller Program on Rice Biotechnology, Cornell University, Ithaca, New York, USA.
- Narayanan, K. K., Senthikumar, P., Venmadhi, S., Thomas, G., and Thomas, J. 1996.** Molecular genetic studies on the rice mitochondrial genome. pp. 689–695. In: Khush, G. S. (ed.) *Rice Genetics III. Proceedings of the Third Rice Genetics Symposium*, 16-20 Oct. 1995, International Rice Research Institute, Los Banos, Manila, Philippines.
- Rajendrakumar, P., Biswal, A. K., Balachandran, S. M., Ramesha, M. S., Viraktamath, B. C., and Sundaram, R. M. 2007.** A mitochondrial repeat specific marker for distinguishing wild abortive type cytoplasmic male sterile rice lines from their cognate isogenic maintainer lines. *Crop Science* 47: 207-211.
- Yashitola J., Thirumurugan, T., Sundaram, R. M., Naseerullah, M. K., Ramesha, M. S., Sarma, N. P., and Sonti, R. V. 2002.** Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. *Crop Science* 42: 1369-1373.

**Yashitola J., Sundaram, R. M., Biradar, S. K., Thirumurugan, T., Vishnupriya, M. R., Rajeshwari, R., Viraktamath, B. C., Sarma, N. P., and Sonti, R. V. 2004.** A sequence specific PCR marker for distinguishing rice lines on the basis of wild abortive cytoplasm from their cognate maintainer lines. *Crop Science* 44: 920-924.

Archive of SID