شماره ۹۴، بهار ۱۳۹۱

نشریه زراعت

(پژوهش و سازندگی)

نشانمند کردن ژن های برگرداننده باروری در لاین ایرانی امیدبخش برنج DN-۳۳-۱۸

• **قربانعلی نعمت زاده**

استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده برنج و مرکبات،

• **غفار کیانی** (نویسنده مسئول)

استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده برنج و مرکبات،

تاریخ‌دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۸۹ تاریخ‌پذیرش: تیر ماه ۱۳۸۹

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۵۱۸۱۸۴۶۲

Email: ghkiani@gmail.com

چکیده

سیستم نرعقیمی ژنتیکی- سیتوپلاسمی جهت بهره برداری از هتروزیس در گیاهان زراعی هنگامی اثربخش است که لاین برگرداننده باروری مناسبی در اختیار باشد. تلاقی بین لاین نرعقیم به نام ندا A با سه لاین امیدبخش به نام های DN-۳۲-۶ DN-۳۳-۱ و DN-۳۳-۱۸ انجام گرفت. مطالعات باروری دانه گرده و دانه بندی خوشه در نتاج نسل F1 این تلاقی ها نشان داد که تنها تلاقی "DN-۳۳-۱۸ / ندا A" دارای باروری دانه گرده و دانه بندی خوشه بیش از ۸۰ درصد می باشد. توارث پذیری ژن های برگرداننده باروری در جمعیت F2 این تلاقی در مرحله خوشه دهی و پر شدن دانه ارزیابی گردید. آزمون رنگ آمیزی دانه گرده، تفرق ۳۱۲ بوته بارور: ۱۶ بوته عقیم را نشان داد که با نسبت مندلی ۱: ۱۵ بر اساس آزمون مربع کای مطابقت داشته و حاکی از وجود دو ژن برگرداننده باروری در ژنوم لاین DN-۳۳-۱۸ می باشد. برای نشانمند کردن مولکولی این ژن‌ها، از ۱۲ نشانگر SSR استفاده گردید که ۴ نشانگر RM۱۷۱، RM۲۵۸، RM۵۹۱ و RM۳۱۴۸ باندهای چند شکل را بین والدین تولید نمودند. تجزیه و تحلیل لینکاژ نشان داد که نشانگر RM۳۱۴۸ واقع بر روی کروموزم شماره ۱ با ژن Rf۳ در فاصله ژنتیکی ۱۹/۷ سانتی مورگان و نشانگرهای RM۱۷۱ و RM۲۵۸ واقع در کروموزم شماره ۱۰ با ژن Rf۴ بترتیب در فواصل ژنتیکی ۳/۱ و ۶/۲ سانتی مورگان همبستگی دارند. انتظار می‌رود از این نشانگرها بتوان در انتخاب به کمک نشانگر مولکولی (MAS)، همچنین انتقال و هرمی کردن ژن های برگرداننده باروری در برنامه های اصلاحی برنج هیبرید استفاده نمود.

کلمات کلیدی: برنج، نرعقیمی سیتوپلاسمی، توارث پذیری، نشانگرهای ریزماهواره

www.SID.ir

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 94 pp: 95-103

Tagging of fertility-restoring genes in Iranian restorer rice promising line DN-33-18

By: G.A. Nematzadeh Professor and G. Kiani (Corresponding Author; Tel: +989351818462) and Assistant Professor of Department of Agronomy and Plant Breeding, Sari Agricultural and Natural Resources University, Rice and Citrus Research Institute.

Cytoplasmic-genetic male sterility system can be used to exploit heterosis in grain crops only when the effective restorer lines are available. Crosses between CMS line Neda A with three promising lines DN-32-6, DN-33-1 and DN-33-18 were made. Studies on pollen and grain fertility of these crosses showed that the cross of Neda-A/DN-33-18 had more than 80% pollen and grain fertility in the F1 generation. The inheritance of fertility restoration genes in F2 population of this cross was evaluated at flowering and grain filling stages. Pollen staining test showed segregation of 312 fertile: 16 sterile plants that in accordance with Mendelian 15: 1 ratio, representing existence of two genes in the genome of DN-33-18. 12 SSR markers were used for molecular tagging of these fertility-restoring genes showing that 4 markers including RM258, RM171, RM591 and RM3148 produced polymorphic bands between parents. Linkage analysis showed that marker RM3148 located on chromosome 1 linked with Rf3 gene at a genetic distance of 19.7 cM and markers RM258 and RM171 located on chromosome 10 flanked to Rf4 gene at the genetic distances of 3.1 and 6.3 cM, respectively. These markers are useful in MAS (marker-assisted selection) for transferring and pyramiding of fertility restoring genes in hybrid rice breeding programs.

Key words: Rice, CMS, Inheritance, Molecular tagging, SSR markers

مقدمه

از سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی به طور وسیعی در تولید بذر هیبرید برنج استفاده می شود. در حال حاضر حدود ۹۰ درصد از ارقام هیبرید برنج در کشور چین دارای سیتوپلاسم نوع WA می باشد (Yuan، ۱۹۹۲)، همچنین رفتار اصلاحی ژن های برگرداننده باروری نیز به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته است (Jing و همکاران، ۲۰۰۱). مطالعات اکثر محققین نشان می دهد که ژن برگرداننده باروری در نر عقیمی سیتوپلاسمی از نوع WA به وسیله دو مکان ژنی مستقل کنترل می شود (Govinda Raj و Virmani، ۱۹۸۸؛ Virmani، ۱۹۹۴؛ Bharaj و همکاران؛ ۱۹۹۵؛ Zhuang و همکاران، ۱۹۹۷؛ Yao و همکاران، ۱۹۹۷؛ Zhuang و همکاران، ۲۰۰۰؛ Ali و همکاران، ۲۰۰۳).

علاوه بر سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA، انواع دیگری از سیستم‌های نرعقیمی سیتوپلاسمی نظیر HL و BT نیز وجود دارند و ژن های برگرداننده باروری آنها نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. ژن‌های Rf۱، Rf۲، Rf۳ و Rf۴ به ترتیب برای CMS های نوع HL، BT و WA نامگذاری شده‌اند (Shinjyo، ۱۹۷۵؛ Zhuang و همکاران، ۱۹۹۷؛ Shinjyo و Sato، ۱۹۹۴). ژن Rf۱ که بر روی کروموزم شماره ۱۰ قرار دارد، باروری را در CMS نوع BT اعاده می‌نماید (Shinjyo، ۱۹۷۵) و همسانه سازی این ژن نیز اخیراً انجام شده است (Kazama و Toriyama، ۲۰۰۳؛ Akagi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Komori و همکاران، ۲۰۰۳). Rf۲ که بر روی کروموزم شماره ۲ قرار دارد باروری را در CMS نوع HL اعاده می کند (Shinjyo و Sato، ۱۹۹۴) در حالیکه ژن های Rf۳ و Rf۴ برای اعاده باروری در CMS نوع WA می باشند که به ترتیب بر روی کروموزم‌های ۱ و ۱۰ قرار دارند (Yao و همکاران ۱۹۹۷؛ Zhuang و همکاران، ۱۹۹۷). دو ژن دیگر به نام‌های Rf۵ و Rf۶(t) برای CMS نوع HL یافت شده است که بر روی کروموزم ۱۰ قرار دارند (Liu و همکاران، ۲۰۰۴) همچنین ژن RfD۱(t) برای CMS نوع D۱ یافت شده است (Tan و همکاران، ۲۰۰۴). این ژن‌های برگرداننده باروری بجز در CMS نوع WA در ارتباط با تجدید باروری به صورت گامتوفیتی عمل می کنند ولی ژن‌های تجدید باروری Rf۳ و Rf۴ برای CMS نوع WA به صورت اسپوروفیتی عمل می‌نمایند. در خصوص ژنتیک تجدید کننده‌های باروری گزارشات متعددی وجود دارد. Mishra و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی و جمع بندی منابع در زمینه توارث پذیری ژن های برگرداننده باروری، توارث پذیری تک ژنی، دو ژنی با اثر اپیستازی، همچنین سه ژنی و چهار ژنی را خاطر نشان نموده‌اند. Zhou (۱۹۸۳) بیان نمود که ژنتیک تجدید باروری به عوامل متعددی از جمله نوع نشانگرهای مورد استفاده، منابع نرعقیمی سیتوپلاسمی و تجدید کننده باروری و نوع جوامع مورد استفاده برای نقشه‌یابی بستگی دارد.

علیرغم مطالعات مختلف در سیستم های نرعقیمی، شناسائی و نقشه یابی ژن (های) تجدید باروری بخاطر فقدان ژن‌های تجدید باروری در بین ارقام ایرانی کمتر مطالعه شده است. هدف از این تحقیق مطالعه ژنتیکی ژن (های) برگرداننده باروری در لاین امیدبخش DN-۳۳-۱۸ می‌باشد که توسط پژوهشکده برنج و مرکبات ساری معرفی شده است. این گونه مطالعات پیش نیاز مطالعات مولکولی بوده و مواد اصلاحی با ارزشی را برای اینگونه مطالعات فراهم می‌آورد. بدین معنی که با شناسائی نشانگرهای مولکولی همبسته با ژن‌های برگرداننده باروری می‌توان از مزیت‌های انتخاب به کمک نشانگر مولکولی (MAS) در برنامه‌های اصلاحی برنج هیبرید استفاده نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تولید جمعیت F۲

در ایـن مطالعـه یک رقم نرعقیم ایرانی به نام ندا A به همراه سـه لاین جدید برنج به نام های DN-۳۳-۱، DN-۳۲-۶ و DN-۳۳-۱۸ (معرفی شـده توسط پژوهشکده برنج و مرکبات ساری) استفاده گردید. ابتدا تلاقی بین رقم نرعقیم به عنوان والد مادری با لاین های مذکور به عنوان والد پدری انجام گرفت و بذور نسـل دورگ (F۱) بدست آمدند. ندا A از طریق روش تلاقی برگشتی با لاین نرعقیم IR۵۸۰۲۵A (که از کشور فیلیپین وارد شده و دارای سیتوپلاسم عقیم نوع WA می‌باشد) اصلاح شـده اسـت. لاین های DN-۳۳-۱، DN-۳۲-۶ و DN-۳۳-۱۸ لایـن های جدیدی از برنج هسـتند که به تازگی توسـط محققین پژوهشکده برنج و مرکبات با استفاده از روش تلاقی برگشتی- شجره‌ای از تلاقی سپیدرود/ سنگ جو اصلاح و در دست معرفی می‌باشد.

ارزیابی باروری دانه گرده و دانه بندی خوشه

برای ارزیابی باروری دانه گرده، سه خوشچه از هر گیاه انتخاب و از محلول یدید یدور پتاسـیم ۱ درصد برای رنگ آمیزی نمونه‌ها استفاده گردید. دانه‌های گرده براساس رنگ پذیری و شکل ارزیابی شدند، آنهایی کـه وضعیت رنگ پذیری شـان به صورت تیره و توپـر بودند به عنوان بوته های بارور با دانه‌های گرده فعال و بوته هایی که دانه‌های گرده آنها به صورت روشن و چروکیده بودند، به عنوان بوته های کاملاً نرعقیم در نظر گرفته شـدند. برای آزمون باروری خوشـه، سه خوشه از هر گیاه با پاکت سـلوفان پوشانده شـده و دانه بندی این خوشه ها ارزیابی شدند. بوتـه هائی که هیـچ گونه دانه بندی روی خوشـه نداشـتند به عنوان بوته هـای کاملاً عقیم در نظر گرفته شـدند. از آزمون X^2 برای برازش نسبت تفکیک با نسبت مورد انتظار استفاده گردید.

آنالیز PCR با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره

اسـتخراج DNA از نمونـه های برگـی به روش دلاپورتـا و همکاران (۱۹۸۳) انجـام گرفـت. واکنش زنجیره ای پلی مراز با اسـتفاده از ۱۲ نشـانگر SSR انجـام گرفت (جدول ۱). مخلوط واکنش PCR شـامل ۵۰ نانوگـرم DNA نمونه، ۲/۵ میکرولیتر بافـر X۱۰، ۰/۳ میکرولیتر dNTP (mM ۱۰)، ۱ میکرولیتـر $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۱ میکرولیتر از هر جفـت پرایمر و ۱ واحد آنزیم Tag پلی مراز بود. واکنش PCR شـامل ۵ دقیقه ۹۴ درجه سانتی گراد (واسرشـت سازی اولیه) سپس ۳۵ چرخـه ۹۴ درجه سـانتی گـراد به مدت ۱ دقیقـه، ۶۷-۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و دمـای اتصـال نهائی ۷۲ درجه سـانتی گراد به مـدت ۵ دقیقه بود. فرآورده های PCR با اسـتفاده از الکتروفورز ژل آگارز متافور ۲ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نقشه یابی ژن های برگرداننده باروری

گروه های لینکاژ براسـاس نقشـه های ژنتیکی SSR در برنج ارائه شده توسط Mc Conch و همکاران (۲۰۰۲) تعیین شدند. فواصل ژنتیکی براساس فرمول Kosambi (۱۹۴۴) محاسبه و از روش حداکثر درست نمائـی (Allard، ۱۹۵۶) برای محاسـبه میزان نوترکیبی با اسـتفاده از بوتـه های مغلـوب جمعیت F۲ با فرض مغلـوب و هموزیگوت بودن ژن‌های Rf در آنها محاسبه گردیدند. برای ترسیم نقشه ژنتیکی از برنامه MapDraw (Liu و Mang، ۲۰۰۳) استفاده گردید.

نتایج و بحث

تفرق ژن های اعاده کننده باروری به روش کلاسیک

ارزیابـی بـاروری دانه گرده در آزمایشـگاه و همچنیـن دانه بندی خوشـه در مزرعه نشـان داد که از سـه تلاقی ندا۶-DN-۳۲ / A، ندا DN-۳۳-۱ / A و نـدا۱۸-DN-۳۳ / A، فقـط در تلاقـی نـدا DN-۳۳-۱۸ / A بیـش از ۸۰ درصد باروری دانـه گرده و دانه بندی خوشه در نسل F۱ مشاهده گردید (جدول ۲). این نتیجه نشان می‌دهد که ژنوم هسته ای لاین DN-۳۳-۱۸ حاوی ژن های برگرداننده باروری برای سیتوپلاسـم عقیم ندا A بوده و لاین برگرداننده باروری می باشد. برای مشـخص نمودن تعداد ژن های برگرداننده باروری در این لاین از نتاج دورگ مربوطه پس از خودگشـنی، بذور نسـل F۲ بدست آمدند. این بذور در سـال بعد کشـت و جمعیت در حال تفکیک F۲ مشـتمل بـر ۳۲۸ تـک بوته برای مطالعـه ژنتیک تجدید بـاروری ایجاد گردید. ارزیابی های باروری دانه گرده و دانه بندی خوشه بر روی تمام این تک بوته ها انجام و نتایج مربوطه در جدول ۳ منعکس شده است. نتایج اینگونه ارزیابی ها نشان داد که نسبت بوته های بارور به بوته های عقیم ۱۶ : ۳۱۲ می باشد (شکل ۱) این نسبت تفکیک با نسبت تفرق مندلی دو ژنی ۱: ۱۵ مطابقت کامل دارد و آماره کای اسکوئر محاسباتی ۱/۰۵۴ می باشد که از نظر آماری در سـطح احتمال ۵٪ معنی دار نمی‌باشـد. این بدین معنی اسـت که لاین DN-۳۳-۱۸ حاوی دو ژن مسـتقل برگرداننده باروری در ژنوم خود می باشـد. نتایج حاصل از باروری خوشـه نیز این نتایج را تائید می‌نماید (جدول ۳). نتایج بدست آمده در این تحقیق در انطباق با نتایج بسـیاری از محققین دیگر از جمله ژو، ۱۹۸۳؛ Young و Virmani، ۱۹۸۴؛ Govinda Raj و Virmani، ۱۹۸۸؛ Teng و Shen، ۱۹۹۴ می باشد.

ارزیابی مولکولی برای مکان یابی ژن های اعاده کننده باروری در لاین DN-۳۳-۱۸

برای تشخیص ژن‌های اعاده کننده باروری در لاین DN-۳۳-۱۸ با نشـانگرهای SSR، ۱۲ جفت نشانگر ریز ماهواره برای یافتن چندشکلی بین ندا A و DN-۳۳-۱۸ اسـتفاده گردید (جدول ۱). تجزیه و تحلیل مولکولی با این نشـانگرها نشان داد که ۴ نشانگر RM۱۷۱، RM۲۵۸، RM۵۹۱ و RM۳۱۴۸ چنـد شـکلی بین والد نرعقیـم (ندا A) و والد برگرداننده باروری (DN-۳۳-۱۸) را نشان دادند.

تجزیه و تحلیل لینکاژ با استفاده از ۱۶ بوته کاملاً عقیم در جمعیت F۲ و نیز روش حداکثر درست نمائی نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره RM۱۷۱ و RM۲۵۸ واقـع در کروموزم شـماره ۱۰ با ژن برگرداننده بـاروری Rf۴ در دو طرف آن به ترتیـب در فاصله ۳/۱ (LOD ۳/۸۵) و ۶/۲ (LOD ۳/۱۹) سـانتی مورگان همبسـتگی دارنـد (جدول ۴ و شکل ۲).

Archive of SID

در ایـن مطالعـه نشـانگرهای واقع بـر کروموزم ۱ برنـج یعنی RM۱، RM۴۴۳، RM۳۱۵ و RM۲۹۴ کـه در مطالعات محققین دیگر با ژن Rf۳ همبستگی نشان داده بودند، بین والدین مونومورف بودند. جستجو برای یافتن پلی مورفیسم با دیگر نشانگرهای SSR روی کروموزم ۱ ادامه یافت. در این تحقیق نهایتاً نشـانگر جدیدی بنام RM۳۱۴۸ شناسـائی گردید که پلی مورفیسم بین والدین را نشان داد و تجزیه و تحلیل لینکاژ هم حاکی از همبسـتگی این نشانگر با ژن اعاده کننده باروری Rf۳ بود. فاصله این نشانگر از ژن مزبور ۱۹/۷ سانتی مورگان محاسبه گردید (جدول ۴ و شـکل ۲).در این تحقیق دو ژن اعاده کننده باروری در لاین DN-۱۸-۳۳ مکان یابی شدند. یکی ژن Rf۴ روی بازوی بلند کروموزم شماره ۱۰ برنج واقع بوده و با نشـانگرهای ریزماهواره RM۱۷۱ و RM۲۵۸ به ترتیب در فاصله ژنتیکی ۶/۳ و ۳/۱ سانتی مورگان در دو طرف آن همبسته می باشـد. Satari و همکاران (۲۰۰۸) نشـان دادند که ژن برگرداننده بـاروری بـرای CMS های تیـپ WA، HL و BT در یک مکان روی کروموزم ۱۰ واقع می‌باشد و این ژن مکان یابی شده (Rf۴) در این تحقیق نیـز در همان مکان مشـابه قرار دارد. اما دیگر ژن اعـاده کننده باروری Rf۳ کـه روی بازوی کوتاه کروموزم شـماره ۱ برنج مـکان یابی گردید با نشـانگر RM۳۱۴۸ در فاصله ژنتیکی ۱۹/۷ سـانتی مورگان همبسته می‌باشـد. این ژن با هیچ کدام از نشـانگرهای SSR گزارش شده توسط محققین دیگر همبسـتگی ندارد، بنابراین پیشنهاد می شود که مطالعات بیشـتری در خصوص نقشه‌یابی اشباع شده آن صورت گیرد. با مشخص نمودن نشـانگرهایی که با ژن های تجدید کننده باروری پیوسته هستند می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی برنج از استراتژی انتخاب به کمک نشـانگر مولکولی (Marker-Assisted Selection = MAS) برای انتقـال ژن، هرمی کردن ژن‌ها، تولید و اصلاح ارقام جدید با خصوصیات مطلوب از نظر زراعی اسـتفاده نمود. نشانگرهای مولکولی SSR مزایای سـرعت و سادگی RAPD و در عین حال قابلیت اعتماد و تکرارپذیری RFLP را دارنـد (Jing و همـکاران، ۲۰۰۱). نتایج این تحقیق نشـان داد که نشـانگرهای ریزماهواره RM۱۷۱، RM۲۵۸ و RM۳۱۴۸ برای بکارگیری در انتخاب به کمک نشـانگر مولکولی یا MAS در سیسـتم CMS-WA بسیار مناسب هستند و باعث تسریع در ایجاد ارقام هیبرید برنج خواهند شـد. همچنین اسـتفاده از این نشانگرها در برنامه MAS همراه با تلاقی برگشـتی، می‌تواند لاین‌هـای نزدیک ایزوژن (NILs) را برای لاین‌های برگرداننده باروری تولید نماید.

جدول ۱- فهرست نشانگرهای مورد استفاده به همراه موقعیت کروموزمی و توالی های رفت و برگشت آنها.

نشانگر	کروموزم	توالی رفت	توالی برگشت
RM۱	۱	gcg aaa aca caa tgc aaa aa	gcg ttg gtt gga cct gac
RM۴۴۳	۱	ggg agt tag ggt ttt gga gc	tcc agt ttc aca ctg ctt cg
RM۳۱۵	۱	cgg tca aat cat cac ctg ac	caa ggc ttg caa ggg aag
RM۲۹۴	۱	ttg gcc tag tgc ctc caa tc	gag ggt aca act tag gac gca
RM۶۳۴۴	۷	aca cgc cat gga tga tga c	tgg cat cat cac ttc ctc ac
RM۷۰۹۳	۹	ctggttaacgtgagagctcg	gcagatcaattggggagtac
RM۱۷۱	۱۰	aac gcg agg aca cgt act tac	acg aga tac gta cgc ctt tg
RM۲۵۸	۱۰	tgc tgt atg tag ctc gca cc	tgg cct tta aag ctg tcg c
RM۲۴۴	۱۰	ccg act gtt cgt cct tat ca	ctg ctc tcg ggt gaa cgt
RM۵۹۱	۱۰	cgg tta atg tca tct gat tgg	ttc gag atc caa gac tga cc
RM۳۱۲۳	۱۰	att tcc cac aca tct cgc tg	gtg tcg ccg gtc aag aac
RM۷۰۰۳	۱۲	ggc aga cat aca gct tat agc	tgc aaa tga acc cct cta gc

www.SID.ir

جدول ۲- تلاقی آزمون (تست کراس) لاین‌های امیدبخش DN-۳۳-۱، DN-۳۲-۶ و DN-۳۳-۱۸ با لاین نرعقیم ندا A برای مطالعه ژنوم هسته‌ای آنها در ارتباط با برگردانندگی باروری در سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA

تلاقی	باروری دانه گرده	باروری خوشه	قابلیت اعاده کنندگی باروری
DN-۳۲-۶ / ندا A	۸۰>	۸۰>	برگرداننده باروری بطور ناقص
DN-۳۳-۱۸ / ندا A	۸۰<	۸۰<	برگرداننده باروری بطور کامل
DN-۳۳-۱ / ندا A	۸۰>	۸۰>	برگرداننده باروری بطور ناقص

جدول ۳- توزیع فراوانی باروری دانه گرده و خوشه (اعداد داخل پرانتز) در والدین، نسل F۱ و جمعیت F۲ حاصل از تلاقی ندا DN-۳۳-۱۸ / A

نتاج	بارور	کاملاً عقیم	نسبت ژنتیکی	X^2
ندا A (۱۰ بوته)	-	۱۰		
DN-۳۳-۱۸ (۱۰ بوته)	۱۰	-		
F۱ (۱۰ بوته)	۱۰	-		
F۲ (۳۲۸ بوته)	۳۱۲ (۳۱۶)	۱۶ (۱۲)	۱۵ :۱	$X^2 = ۱/۰۵۴^{ns}$ (۳/۷۶۰)

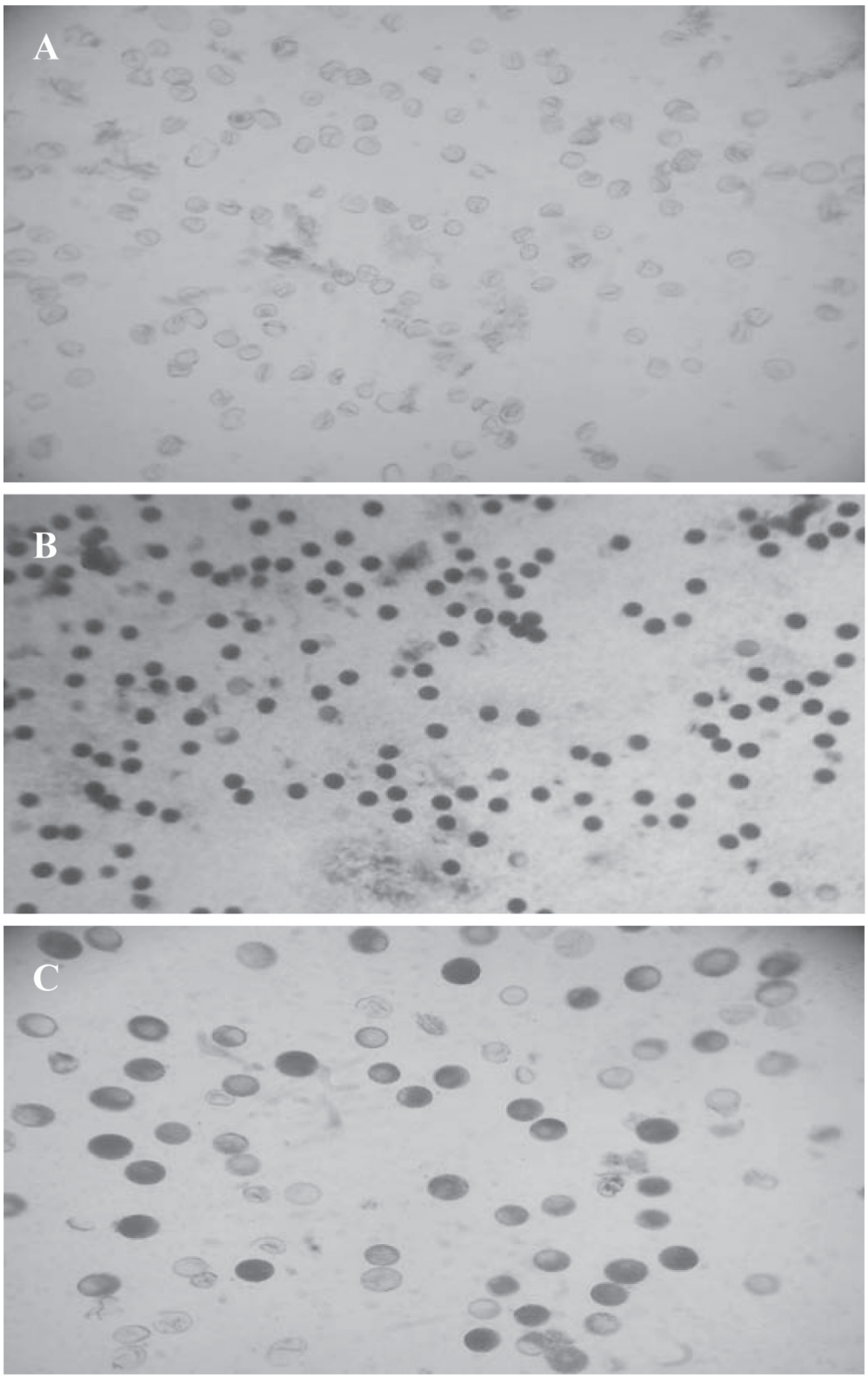
مقدار بحرانی برای درجه آزادی ۱ در سطح احتمال ۵ درصد ۳/۸۴۰ می باشد

ns : غیر معنی دار در سطح ۵ درصد

جدول ۴- میزان نوترکیبی و فواصل ژنتیکی بین نشانگر و لوکوس برگرداننده باروری با استفاده از روش حداکثر درست نمائی

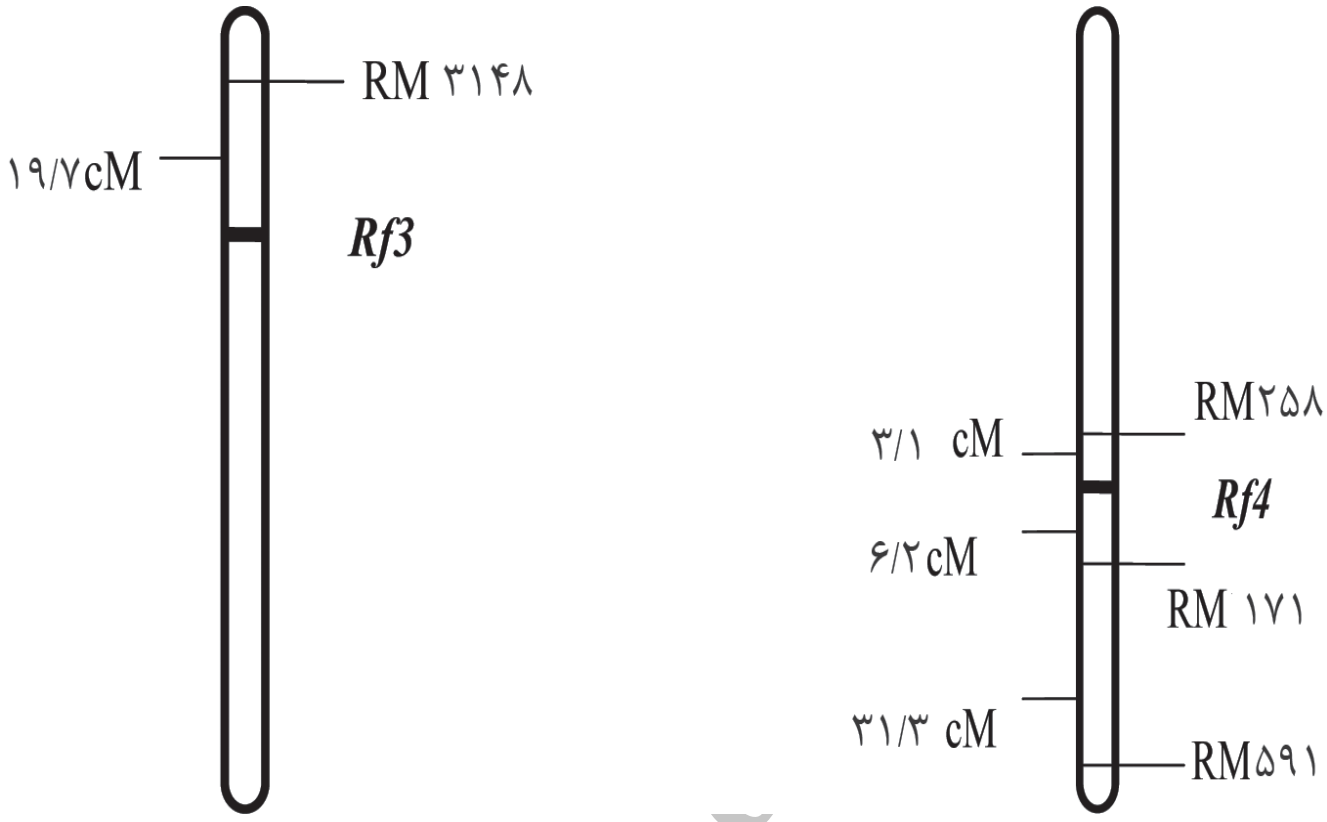
لوکوس	کروموزم	(□) میزان نوترکیبی	فاصله ژنتیکی	LOD
RM۲۵۸	۱۰	۱۲/۳	۳/۱	۳/۸۵
RM۱۷۱	۱۰	۶/۲۵	۶/۳	۳/۱۹
RM۵۹۱	۱۰	۳۷/۵	۳۷/۹	۰/۲۲
RM۳۱۴۸	۱	۱۸/۷۵	۱۹/۷	۱/۴۶

www.SID.ir

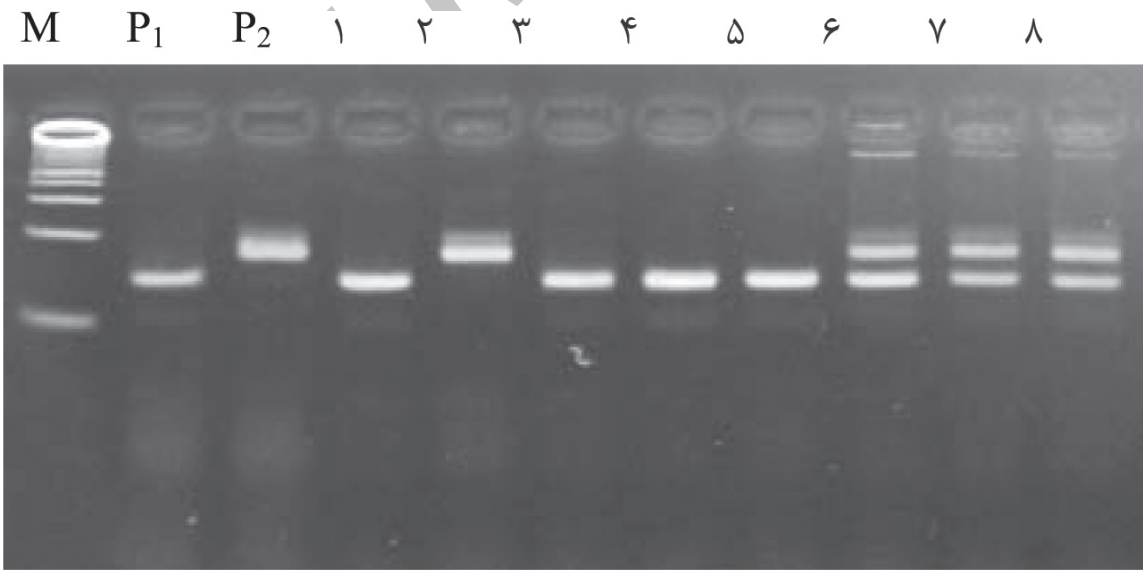


شکل ۱- تفرق باروری (زنده مانی) دانه گرده در جمعیت F۲ " ۱۸-۳۳-DN / ندا A"
با استفاده از محلول I۲KI ۱ ٪. دانه های گرده بوته کاملاً عقیم (A)، کاملاً بارور (B) و بارور ناقص (C).

www.SID.ir



شکل ۲- نشانگرهای SSR همبسته با ژن های اعاده کننده باروری روی کروموزم های ۱ (سمت چپ) و ۱۰ (سمت راست) برنج



شکل ۳- تحلیل لینکاژ برای نشانگر RM۳۱۴۸ (واقع بر کروموزم شماره ۱ برنج)
روی تعدادی از بوته های کاملاً عقیم از جمعیت F۲ حاصل از تلاقی DN-۳۳-۱۸ / ندا A.
P۱= ندا A، P۲= DN-۳۳-۱۸.

www.SID.ir

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی پژوهشـــکده برنج و مرکبات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به اجراء در آمده است.

منابع مورد استفاده

1- Akagi H, Nakamura A, Yokozeki Y, Inagaki A, Takahashi H, Mori K, Fujimura T (2004) Positional cloning of the rice Rf-1 gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria targeting PPR protein. *Theor Appl Genet*, 108: 1449–1457.

2- Ali AJ, Mohammed SEN, Rajagopalan R, Vijaykumar CHM (2003) *Inheritance of fertility restoration WA cytoplasm in sodic tolerant rice hybrids*. In: Khush GS, Brar DS, Hardy B (eds) Advances in rice genetics. Supplement to rice genetics IV. Proceedings of the fourth international rice genetics symposium, 22–27 October 2000, Los Banos, Philippines. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, pp 19–20

3- Allard RW (1956) Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia*, 24: 235–278.

4- Bharaj TS, Virmani SS, Khush GS (1995) Chromosomal location of fertility restoring genes for wild abortive cytoplasmic male sterility using primary trisomics in rice. *Euphytica*, 83: 169–173

5- Dellaporta RP, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1: 19-21.

6- Govinda Raj K, Virmani SS (1988) Genetics of fertility restoration of WA type cytoplasmic male sterility in rice. *Crop Sci*, 28: 787–792.

7- Jing R, Li X, Yi P, Zhu Y. (2001) Mapping fertility-restoring genes of rice WA cytoplasmic male sterility using SSLP markers. *Bot Bull Acad Sin*, 42: 167-171.

8- Kazama T, Toriyama K (2003) *A pentatrico peptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant apt6 RNA of cytoplasmic male-sterile rice*. FEBS Lett., 544: 99-102.

9- Komori T, Yamamoto T, Takemori N, Kashihara M, Matsushima H, Nitta N (2003) Fine genetic mapping of the nuclear gene, Rf-1, that restores the BT-type cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.) by PCR-based markers. *Euphytica*, 129: 241-247.

10- Kosambi D D (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen*, 12: 172–175.

11- Liu RH and Meng JL (2003) MapDraw: a Microsoft Excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data.] *Heraditas* (Beijing), 25 (3): 317-321

12- Liu XQ, Xu X, Tan YP, Li SQ, Hu J (2004) Inheritance and molecular mapping of two fertility-restoring loci for Honglian gametophytic cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Genet Genome*, 271: 586-94.

13- McCouch S R, Teytelman L, Xu Y, Lobos K B, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Zing 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 Res*, 9: 199-207.

14- Mishra GP, Singh RK, Mohapatra T, Singh AK, Prabhu KV, Zaman FU, Sharma RK (2003) Molecular mapping of a gene for fertility restoration of wild abortive cytoplasmic male sterility using a Basmati rice restorer line. *J Plant Biochem Biotechnol*, 12: 37–42.

15- Sattari M, Kathiresan A, Gregorio GB, Virmani SS (2008) Comparative genetic analysis and molecular mapping of fertility restoration genes for WA, Dissi, and Gambiaca cytoplasmic male sterility systems in rice. *Euphytica*, 160: 305–315.

16- Shinjyo C (1975) Genetical studies of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice (*Oryza sativa* L). *Sci Bull Coll Agri Univ Ryukyus*, 22:1–57.

17- Shinjyo C, Sato S (1994) Chromosomal location of fertility-restoring gene Rf-2. *Rice Genet News Lett*, 11: 93-95

18- Tan XL, YL Tan, YH Zhao, XM Zhang, RK Hong, SL Jin, XR Liu and DJ Huang (2004) Identification of the Rf gene conferring fertility restoration of the CMS Dian-type 1 in rice by using simple sequence repeat markers and advanced inbred lines of restorer and maintainer. *Plant Breeding*, 123: 338-341.

19- Teng LS, Shen ZT (1994) Inheritance of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in rice. *Rice Genet News Lett*, 11: 95–97

20- Virmani SS (1994) *Heterosis and hybrid rice breeding.* Monographs on theoretical and applied genetics 22, Springer-Verlag, Berlin, pp 41–71

21- Yao FY, Xu CG, Yu SB, Li JX, Gao YJ, Li XH, Zhang Q (1997) Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild-abortive cytoplasmic male sterility system of rice (*Oryza sativa* L). *Euphytica*, 98: 183–187.

22- Young J B, Virmani S S (1984) Inheritance of fertility restoration in a rice cross. *Rice Genet News Lett*, 1: 102–103.

23- Yuan LP (1992) *Development and prospect of hybrid rice breeding*. In: You CB, Chen ZL (Eds.), Agricultural Biotechnology. Proc. Asian-Pacific Conf. Agric. Biotechnol., China

Archive of SID

www.SID.ir

Sciences and Technology Press, Beijing, pp. 97-105.
24- Zhang Q, Bharaj TS, Virmani SS, Huang H (1997) Mapping of the Rf-3 nuclear fertility restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers. *Theor Appl Genet*, 94: 27-33.
25- Zhou T (1983) Analysis of R genes in hybrid indica rice of 'WA' type. *Acta Agron Sin*, 9: 241–247.
26- Zhuang JY, Fan YY, Wu JL, Xia YW, Zheng KL (2000) Mapping major and minor QTL for rice CMS-WA fertility restoration. *Rice Genet Newsl*, 17: 56–58.

Archive of SID